

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Tuxtepec

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA MICROBIOTA DEL QUESO FRESCO ARTESANAL EN LA REGIÓN DE LA CUENCA DEL PAPALOAPAN

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

I.B. NANCY CRUZ VELASCO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ ABAD ZAVALA

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DRA. AMÉRICA CHÁVEZ MARTÍNEZ

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca 2017



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2017/MB/013
ASUNTO	Jurado asignado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 13 de Octubre de 2017

C. NANCY CRUZ VELASCO
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dra. María de Jesús García Gómez	UNPA	Presidente
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	UNPA	Vocal
Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre	UNPA	Secretario
Dr. Julian Mario Peña Castro	UNPA	1er Suplente
Dr. Enrique Villalobos Amador	UNPA	2º Suplente

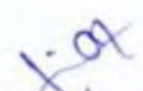
Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



Dr. MARIO VALERA ZARAGOZA
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado



M. en C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
Vice-rector Académico
Vo. Bo.



C.c.p. Dr. José Abad Zavaleta – Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200. Col. Parque Industrial.
C.P. 38401, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2017/MB/101
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 13 de Octubre de 2017

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la C. Nancy Cruz Velasco, matrícula 13140005, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "Caracterización genética de la microbiota del queso fresco artesanal en la región de la Cuenca del Papaloapan" para su posterior presentación y defensa por parte de la sustentante.

Sin otro asunto en particular, me despido quedando atento ante cualquier duda y deseándole suerte en todas sus actividades.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Beu Lo-tama, chi i'je

Dr. MARIO VALERA ZARAGOZA
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. Nancy Cruz Velasco
C.c.p. Archivo

CAMPUS IXTIPIPA
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial,
C.P. 68001, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BUENTA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad Universitaria,
C.P. 68400, Loma Buena, Oax.
Tel. 01(281)8729240

AGRADECIMIENTOS

A mi *alma mater* la Universidad del Papaloapan por abrirme de nuevo sus puertas para seguir desarrollándome como profesionista.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca otorgada (CVU 561058) durante mis estudios de maestría en Biotecnología en esta Institución.

A mi director de tesis, Dr. Abad Zavaleta por su amistad y apoyo durante mi proyecto de tesis. A mi Co-directora, Dra. América Chávez Martínez por el apoyo brindado durante mis estancias para la realización de mi proyecto de tesis, además de sus consejos y enseñanzas.

A la Facultad de Zootecnia y Ecología de la UACH, en especial a la M.C. Ruth Lechuga y al Dr. Agustín Corral por facilitarme los equipos y reactivos necesarios para mi trabajo y por sus asesorías y enseñanzas durante mi estancia en sus laboratorios.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de lácteos de la UACH, Juliana, Mario, Ivette, Luis y Ely por las convivencias.

A mi familia, a mi mamá Nancy Velasco por su ejemplo de lucha constante, por sus consejos y su amor sincero. A mis hermanos: Vicente, Ana e Isabel porque sé que siempre contare con ellos.

A los mejores amigos que eh tenido en mi vida y que a pesar de las distancias siempre estamos unidos: Ana Luisa, Madeline, Karime, Jade, Goretty, Miguel, Adriana, Juanito y Sergio.

A mi gran compañero de este viaje, Jorge Armando por tu amor, paciencia y por la espera de mi ausencia durante mi proyecto de tesis.

A mi personita favorita, mi niña Lia Renata por su amor y por cada sonrisita que me regala día a día.

Dedicada a mi Lia

“Imagination is more important than knowledge”

Albert Einstein

CONTENIDO

I	INTRODUCCIÓN	12
II	MARCO TEÓRICO	14
	2.1. Generalidades del queso	14
	2.2. Producción de queso en México	14
	2.3. El queso en las regiones tropicales (un caso particular)	15
	2.4. Importancia del queso fresco en la región del Papaloapan	17
	2.5. Elaboración artesanal del queso fresco	17
	2.6. Microbiología del queso fresco	19
	2.7. Grupos de microorganismos del queso	20
	2.7.1. Bacterias	20
	2.7.1.1. Flora láctica	22
	2.7.1.2. Flora butírica	23
	2.7.1.3. Flora psicrótrofa	24
	2.7.1.4. Flora coliforme	24
	2.7.2. Levaduras	24
	2.7.3. Mohos	25
	2.8. Estudios de la diversidad microbiana	25
	2.8.1. Microbiología clásica	25
	2.8.2. Microbiología moderna	25
	2.8.3. Secuenciación de ADN	27
	2.9. Técnicas moleculares para el estudio de la diversidad microbiana	29
	2.9.1. Enfoques basados en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	29
	2.9.2. Gen ribosomal 16S rARN	29
	2.9.3. DGGE	30
III	JUSTIFICACIÓN	33
IV	HIPOTESIS	34
V	OBJETIVOS	34
	5.1. General	34
	5.2. Específicos	34
VI	METODOLOGÍA	35

6.1.	Toma de muestras del queso fresco artesanal (QFA)	35
6.2.	Procesamiento de la muestra	36
6.3.	Análisis microbiológico	36
6.4.	Análisis estadístico	38
6.5.	Identificación genética	38
6.5.1.	Amplificación (PCR) del ADN genómico	39
6.5.2.	Análisis PCR-DGGE	39
6.5.3.	Evaluación y purificación de productos de PCR	40
6.5.4.	Análisis de DGGE	40
6.5.5.	Secuenciación de los productos de DGGE	42
6.5.6.	Análisis de secuencias	42
VII	RESULTADOS Y DISCUSIONES	44
7.1.	Análisis microbiológicos	44
7.2.	Identificación Genética	55
7.2.1.	Análisis de la temporada verano	55
7.2.2.	Análisis de la temporada invierno	62
VIII	CONCLUSIONES	69
IX	PERPECTIVAS	70
X	BIBLIOGRAFIA	71
XI	ANEXOS	77

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1.	Producción de los quesos más comercializados en México (2009-2015).	14
Tabla 2.	Límites máximos (Log UFC/ml) de contenido microbiano para leche y quesos establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010.	51
Tabla 3.	Carga microbiana encontrada en muestras del queso fresco artesanal de la región de la cuenca del Papaloapan (Log UFC/ml).	54
Tabla 4.	Marcadores de referencia obtenidos en la base de datos del GenBank (temporada verano).	59
Tabla 5.	Marcadores de referencia obtenidos en la base de datos del GenBank (temporada invierno).	66

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1.	Volumen y valor de las importaciones de la leche, 2006-2016	16
Figura 2.	Diagrama del proceso de elaboración del queso fresco.	19
Figura 3.	Estrategia experimental empleada para el análisis microbiológico y molecular de la microbiota del queso fresco artesanal.	35
Figura 4.	Ensamblado de una secuencia a partir de los amplicones Forward y Reverse.	42
Figura 5.	<i>Enterococcus</i> presentes en muestras de queso fresco artesanal	44
Figura 6.	<i>Lactobacillus mesofílicos</i> presentes en muestras de queso fresco artesanal.	45
Figura 7.	<i>Leuconostoc</i> presentes en muestras de queso fresco artesanal	45
Figura 8.	<i>Streptococcus mesófilos</i> presentes en muestras de queso fresco artesanal.	47
Figura 9.	<i>Streptococcus termófilos</i> presentes en muestras de queso fresco artesanal.	47
Figura 10.	<i>mesófilos</i> presentes en muestras de queso fresco artesanal.	48
Figura 11.	<i>Lactococcus</i> presentes en muestras de queso fresco artesanal.	48
Figura 12.	<i>Staphylococcus aureus</i> presentes en muestras de queso fresco artesanal.	49
Figura 13.	Coliformes totales presentes en muestras de queso fresco artesanal.	49
Figura 14.	Mohos y levaduras presentes en muestras de queso fresco artesanal	50
Figura 15.	Microorganismos presentes en el queso fresco artesanal de la región de la Cuenca del Papaloapan en temporada verano e invierno.	51
Figura 16.	Diversidad microbiana en cajas petri con muestras de quesos frescos artesanales.	53
Figura 17.	Gel de Electroforesis en agarosa al 1.5%, teñido con bromuro	55

de etidio de los amplicones de las muestras de queso fresco de la temporada de verano.

- Figural 18. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización al 8% (35%-60%) teñido con SYBR Green I nucelic acid gel stain (Invitrogen™). 56
- Figura 19. Dendograma (software BioNumerics versión 6.6; Applied Maths, Austin Tx, utilizando la técnica UPGMA,) de análisis mediante PCR-DGGE de las comunidades bacterianas presentes en los quesos frescos artesanales recolectadas en verano. 57
- Figura 20. Bandas seleccionadas del gel en DGGE, vistas con ayuda del software BioRad. Los amplicones corridos fueron obtenidos con las muestras de los quesos frescos artesanales recolectados en verano. 58
- Figura 21. Bacterias encontradas en las muestras de quesos usando el Secuencer 5.3. 61
- Figura 22. Gel de Electroforesis en agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio de los amplicones de las muestras de queso fresco de la temporada de invierno. 62
- Figura 23. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización al 8% (35%-60%) teñido con SYBR Green I nucelic acid gel stain (Invitrogen™). 63
- Figura 24. Dendograma (software BioNumerics versión 6.6; Applied Maths, Austin Tx, utilizando la técnica UPGMA,) de análisis mediante PCR-DGGE de las comunidades bacterianas presentes en los quesos frescos artesanales recolectadas en invierno. 64
- Figura 25. Bandas seleccionadas del gel en DGGE, vistas con ayuda del software BioRad. 65
- Figura 26. Bacterias encontradas en las muestras de quesos usando el Secuencer 5.3. 67

RESUMEN

Los microorganismos que integran la microbiota de los quesos frescos artesanales es muy compleja y variada, y desempeñan una función clave en sus propiedades sensoriales tales como: textura, color y sabor, además, son los responsables de llevar a cabo la producción de ácido láctico como producto final de la fermentación. Por otro lado, se le atribuyen algunas características indeseables que conllevan a la disminución de la calidad e higiene durante el proceso de maduración. Derivado de los múltiples efectos generados por estos microorganismos, algunos de ellos patógenos, es de vital importancia caracterizar genéticamente la microbiota del queso fresco artesanal producido en la Región de la Cuenca del Papalopan, a través de técnicas microbiológicas y moleculares. Para tal efecto, en este trabajo de investigación se cuantificó el contenido de *mesófilos* aerobios; *Streptococcus mesofilos* y *termofilos*, *Lactobacillus mesofilos*, *Leuconostoc*, Coliformes totales, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras. Además se determinó la composición de la microbiota mediante la técnica PCR-DGGE. Los resultados muestran que el queso fresco artesanal producido tanto en verano como en invierno, contiene una elevada y variada cantidad de microorganismos en comparación con los quesos industriales producidos a base de leche pasteurizada. Ninguna muestra analizada cumple con los límites máximos de contenido microbiano para leche y derivados lácteos según las normas oficiales mexicanas (NOM-243-SSA1-2010). Por otro lado, con los estudios moleculares se encontró variación de microorganismos en ambas temporadas, tanto patógenos como de uso industrial, lo que evidenció la falta de buenas prácticas de manufactura en la elaboración de quesos artesanales, por lo que estos productos pueden ser un vehículo de transmisión de enfermedades alimentarias y provocando pérdidas económicas a los productores por la falta de consumo. Por otro lado, se deben implementar sistemas de aseguramiento de calidad que garanticen la producción de quesos inocuos mediante cultivos iniciadores que no contengan microorganismos patógenos y aseguren la calidad del producto.

Palabras clave: Queso fresco; Microbiota; Microbiología; Molecular.

I. INTRODUCCIÓN

El queso es uno de los productos alimenticios más antiguos y populares elaborados por el hombre. Es un alimento de amplio consumo a nivel mundial, cuyas características nutritivas, funcionales, sensoriales y de textura difieren en cada tipo. Alrededor del mundo se estiman aproximadamente 1800 variedades de este producto con características muy particulares de cada región, y se ha convertido en un producto clásico de la dieta humana. El proceso de elaboración del queso ha sufrido cambios importantes a lo largo de la historia, transformándola de un arte empírico a una tecnología industrial con fuertes bases científicas, convirtiéndola en un área de estudio importante para elucidar y comprender los fenómenos que interfieren durante su elaboración, formulación y almacenamiento, así como, los efectos provocada por los microorganismos en la calidad del producto final. Derivado de lo anterior, la comprensión de los aspectos científico-técnicos involucrados en su manufactura es de vital importancia para mantener un control de las alteraciones que pudieran afectar las propiedades finales del producto, su calidad y la aceptación del consumidor. La elaboración de queso fresco artesanal en muchas regiones se lleva a cabo a partir de leche no pasteurizadas, por lo que las poblaciones microbianas en el queso elaboradas a base de esta materia prima son variadas y complejas, a diferencia de las elaboradas a partir de leche pasteurizada, incidiendo directamente en sus características sensoriales como sabor, olor, color y textura (Grappin y Beuvier, 1997). Los grupos microbianos con mayor presencia o mayor interés tecnológico presentes en los quesos son las bacterias ácido lácticas (BAL) y algunos otros géneros donde se encuentran microorganismos patógenos (Klaenhammer *et al.*, 2002; Robinson, 1987). Para el estudio de estos microorganismos se usan principalmente técnicas microbiológicas tradicionales y técnicas moleculares como amplificación del gen 16S rRNA y DGGE lo cual pueden determinar poblaciones microbianas completas (Cocolin *et al.*, 2013).

La región de la cuenca del Papaloapan es una de las zonas de gran potencial lechero, debido a que los costos de producción están por debajo de los de las zonas ganaderas templadas en sistemas intensivos y por lo general elabora productos al mercado local y regional, a base de leche cruda. La agroindustria quesera nace de la necesidad de conservar los sólidos de la leche en forma de un producto menos perecedero, que se encuentra en un ambiente ecológico desfavorable para su conservación. La quesería es,

por tanto, una de las industrias agroalimentarias que demanda mayor esfuerzo por la labor y constancia que requiere (Villegas de Gante, 2012).

La microbiota espontánea presentes en los quesos artesanales es muy compleja y en ocasiones la presencia ocasional de ciertos microorganismos patógenos disminuye la calidad higiénica y sensorial de estos quesos. Debido a esto existen variaciones entre quesos aunque sean de la misma zona geográfica. Para evitar este problema los fabricantes han optado por utilizar cada vez con más frecuencia leche pasteurizada. En el proceso de pasteurización se destruye la microbiota espontánea presente en la leche, observándose que los quesos industriales desarrollan un sabor menos intenso que los elaborados con leche cruda, motivo por el cual son menos atractivos y por tanto menos aceptados por consumidores de la región, aun cuando, se asegure una estandarización del producto y se mejoren las condiciones sanitarias. Por esta razón es importante conocer qué microorganismos conforman la microbiota del queso fresco en la región de la Cuenca del Papaloapan, tanto las cepas patógenas que incurren en la disminución de la calidad sanitaria del queso como las cepas benéficas. La identificación y el aislamiento de estas últimas podrían permitir su adición a la leche pasteurizada para la elaboración del queso brindando así las características sensoriales del queso artesanal. Hasta ahora no se ha registrado algún trabajo de investigación donde se haya estudiado la microbiota de los quesos frescos tradicionales en la región de la Cuenca del Papaloapan.

El propósito de este trabajo fue caracterizar molecularmente la microbiota del queso fresco artesanal producido en la región de la Cuenca del Papaloapan, y para su estudio utilizar técnicas complementarias microbiológicas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades del Queso

El *Codex Alimentarius* de la FAO/OMS (2011) define al Queso como un producto sólido o semisólido, madurado o fresco, en el que la proporción de las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante coagulación total o parcial de la leche por medio de la acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del lactosuero. Los criterios de clasificación de los quesos son de acuerdo: 1) al contenido de humedad se clasifican en quesos duros, semiduros y blandos; 2) al método de coagulación de la caseína, se clasifican en quesos al cuajo (enzimáticos), queso de coagulación láctica (ácido láctico), queso de coagulación de ambos métodos; al microorganismo utilizado en la maduración y; 3) al microorganismo utilizado en la textura del queso y, se clasifican en quesos de ojos redondeados, granulares y quesos de textura cerrada (Fernández-Regatillo, 1990).

2.2 Producción de queso en México

En México se elaboran más de treinta tipos de quesos, la mayor parte artesanales y de difusión regional (A. Villegas de Gante, 2012). La tabla 1 registra los volúmenes de los siete quesos de mayor circulación comercial en el lapso 2009-2015 (SIAP-SAGARPA, Boletín de la leche, 2015).

Tabla 1. Producción de los quesos más comercializados en México (2009-2015).

Queso	Volumen (toneladas)		Variación	
	Año 2009	Año 2015	(2009-2015) Porcentaje	Tasa media anual (2009-2015) porcentaje de crecimiento
Fresco	41625	56963	26.92	4.48
Chihuahua	27449	35087	21.76	3.62
Oaxaca	17087	20445	16.42	2.73
Panela	26688	48887	45.40	7.56
Tipo manchego	13232	28015	52.76	8.79
Doble crema	16907	30392	44.37	7.39
Amarillo	43872	44108	0.53	0.008

Las cifras de la Tabla 1 es información proporcionada por establecimientos sujetos a registro censal, sin embargo, no se contabiliza el registro de los innumerables negocios (fabricantes y expendedores) que operan en la economía informal en toda la República Mexicana.

Actualmente, la agroindustria quesera en México, enfrenta dificultades de comercialización debido al proceso artesanal de producción con leche sin pasteurizar, además de que el queso es altamente perecedero y su consumo constituye un riesgo potencial para la salud debido a su alta concentración de microorganismos (a menudo mayor de 500 000 células/ml), a su riqueza en nutrientes y a su elevado porcentaje de agua (mayor de 85 %). Es por ello que la transformación de la leche en queso debe realizarse dentro de unas horas a partir de la ordeña (antes de 4 h si es bronca y menos de 24 h si es enfriada y pasteurizada) (Villegas de Gante, 2012). La producción de leche está fuertemente influida por la estacionalidad, derivando en “escasez” y “excedentes” en la producción. Lo anterior influye en la capacidad utilizada en las plantas, mano de obra, mercado de los productos, etc. La influencia estacional es tanto más marcada cuanto más extremo es el clima; por ejemplo, en el trópico mexicano se produce entre dos y tres veces más leche en temporadas de lluvias que en la de sequía, lo cual acarrea problemas de abasto y de costos de producción (Villegas de Gante, 2012). Labora paralelamente a la actividad productora lechera; esto es, intensa y continuamente durante todo el año ya que las vacas no dejan de producir, al menos a nivel de hato. La actividad es más notable en las empresas pequeñas, que no poseen métodos de conservación de leche fluida (refrigeración). La quesería es, por tanto, una de las industrias agroalimentarias que demanda mayor esfuerzo por la labor y constancia que requiere (Villegas de Gante, 2012).

2.3 El queso en las regiones tropicales (un caso particular)

El abastecimiento nacional de leche se ha agudizado en los últimos años, esto se ve reflejado en el aumento de las importaciones de leche descremada en polvo (Figura 1). En 2006, se importaron 143 mil 529 toneladas, para 2016 la cifra fue de 292 mil 803, lo que significa un aumento de 104% en 11 años (SIAP-SAGARPA, Boletín de la leche, 2016).

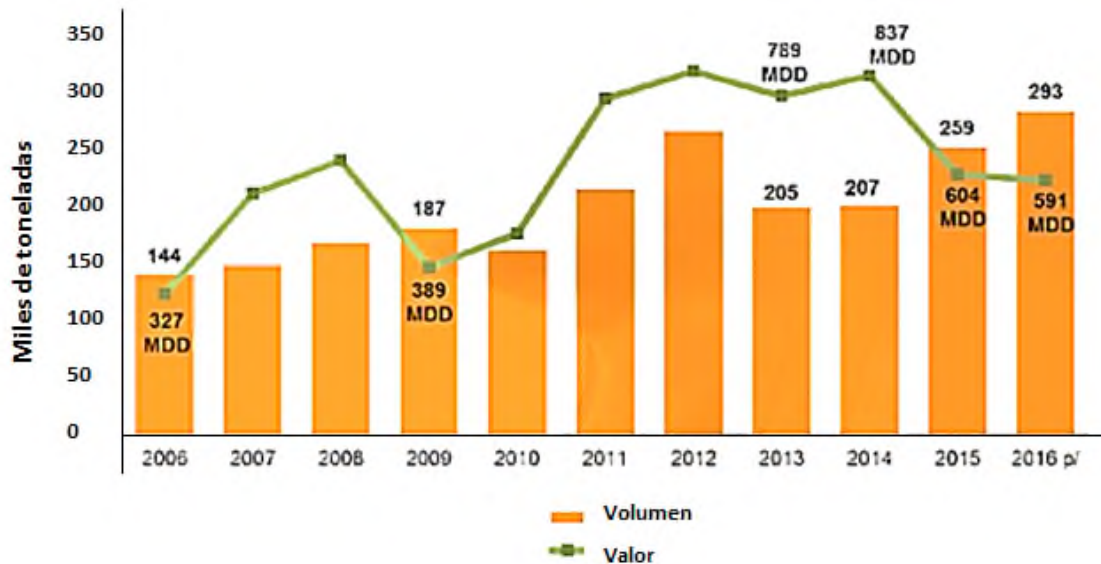


Figura 1. Volumen y valor de las importaciones de la leche, 2006-2016

Las regiones tropicales húmedas son zonas de gran potencial lechero en México, que ayudarían a resolver el problema de abasto de este vital alimento, debido a que la ganadería del trópico (de Tabasco, costa de Chiapas y Veracruz, norte de Oaxaca) presenta, entre otras ventajas comparativas, un hato numeroso que se explota en el sistema de doble propósito (en forma limitada en la actualidad, pero con un ritmo creciente) y a que los costos de producción están por debajo de los de zonas ganaderas templadas en los sistemas intensivos (A. Villegas de Gante, 2012).

La agroindustria quesera de las regiones tropicales se caracteriza por los Bajos niveles de transformación que van desde unos cuantos litros hasta cerca de 20 000 L/día de leche procesada. Cuenta con una infraestructura de material de equipo atrasado y diverso, la maquinaria existente (acero inoxidable, chapa estañada, plástico o madera), este material que causan problemas de durabilidad e higienización. El “saber hacer” técnico es escaso; a lo sumo existe un saber hacer práctico, producto de la experiencia repetida. Enfrenta fuertes problemas de abastecimiento de leche en época de escasez (temporada de sequía), y de comercialización de los productos en épocas de abundancia. Por lo general, elabora productos destinados al mercado local y regional. Posee un control de calidad deficiente de la materia prima, los procesos y productos, por lo que hay rechazos y pérdidas económicas. Los quesos frescos tropicales presentan ciertas características fisicoquímicas y de composición que se explican por la necesidad de conservarlos en un ambiente ecológico difícil, que favorece el deterioro de los alimentos

por multiplicación microbiana además de que se elaboran con leche cruda (A. Villegas de Gante, 2012).

2.4 Importancia del queso fresco en la región del Papaloapan

En la Región del Papaloapan, casi la mitad del queso producido corresponde al queso fresco. El queso fresco puede ser artesanal, si se elabora con leche cruda, o industrial, cuando se elabora con leche pasteurizada. En la elaboración de queso fresco industrial, hasta el momento, el reglamento de la D.O. (Denominación de Origen) no especifica cuál ha de ser el cultivo iniciador empleado, por lo que suelen emplearse cultivos mixtos comerciales inespecíficos principalmente bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*. El queso en la región es uno de los alimentos de gran importancia debido a que es la modalidad más antigua de transformación industrial de la leche, que proporciona proteínas ricas en aminoácidos esenciales (Veisseyre, 1990).

2.5 Elaboración artesanal del queso fresco

En el proceso de fabricación del queso (Figura 1), la leche se somete a tratamientos como: filtrado, clarificación, desnatado o añadido de nata, homogenización de los glóbulos grasos en el seno de la leche para obtener un producto homogéneo y con parámetros óptimos del queso (Fernández-Regatillo, 1990). La función principal de las bacterias lácticas (fermentos) es la producción de ácido láctico a partir de la lactosa.

El ácido láctico promueve la formación y desuerado de la cuajada, evita que crezcan microorganismos patógenos debido a que disminuye el pH a 5.0-5.2 y le confiere sabor ácido. Además, las bacterias dan lugar a sustancias responsables del aroma y contribuyen a la maduración mediante la proteólisis (ruptura de proteínas) y la lipólisis (ruptura de las grasas), con la fermentación se logra la proporción de ácido requerido, sin ocasionar sabores desagradable (Alais, 1985; Fernández-Regatillo, 1990; Veisseyre, 1990).

La coagulación consiste en una serie de modificaciones fisicoquímicas de la caseína (principalmente proteína de la leche), que conducen a la formación de un coágulo, esto debido a la acción conjunta de la acidificación por las bacterias lácticas (coagulación láctica) y de la actividad del cuajo (coagulación enzimática) (Alais, 1985).

El cuajo (renina o quimosina) es una enzima proteolítica que actúa desestabilizando a la caseína, lo que da lugar a la formación de un gel o coágulo que engloba al suero y los glóbulos grasos en su interior, su actividad proteolítica conduce a la formación de compuestos que serán utilizados por las bacterias del fermento para su multiplicación (Alais, 1985).

Para la producción de queso fresco se utilizan pequeñas cantidades de cuajo y se opera a temperaturas bajas (15-20°C) para evitar la actividad óptima de la enzima. En este caso, el cuajo se emplea más bien para facilitar el desuerado, que por su acción coagulante o por su capacidad proteolítica a lo largo de la maduración. La leche deberá contener los fermentos lácticos necesarios para asegurar la acidificación. La firmeza del cuajo y la textura de la cuajada formada dependerán, fundamentalmente, de la cantidad de cuajo utilizado, de la temperatura (velocidad de coagulación máxima a 40-42°C) y de la acidez de la leche (Alais, 1985; Fernández-Regatillo, 1990; Veisseyre, 1990).

El desuerado, consiste en la separación del suero que impregna el coágulo, obteniéndose entonces la parte sólida que constituye la cuajada. Para permitir la salida del suero retenido en el coágulo es preciso recurrir a acciones de tipo mecánico, como son el cortado y el removido, cuya acción se complementa mediante el calentamiento y la acidificación. El salado contribuye también a la pérdida de suero que continúa tras el desuerado y mejora el sabor del queso. El moldeado es la colocación de la cuajada en moldes. El prensado, que se efectúa en prensas de queserías, con las que se ejerce sobre la cuajada determinada presión que puede aumentar progresivamente durante el curso de la operación Figura 2 (Fernández-Regatillo, 1990; Veisseyre, 1990).

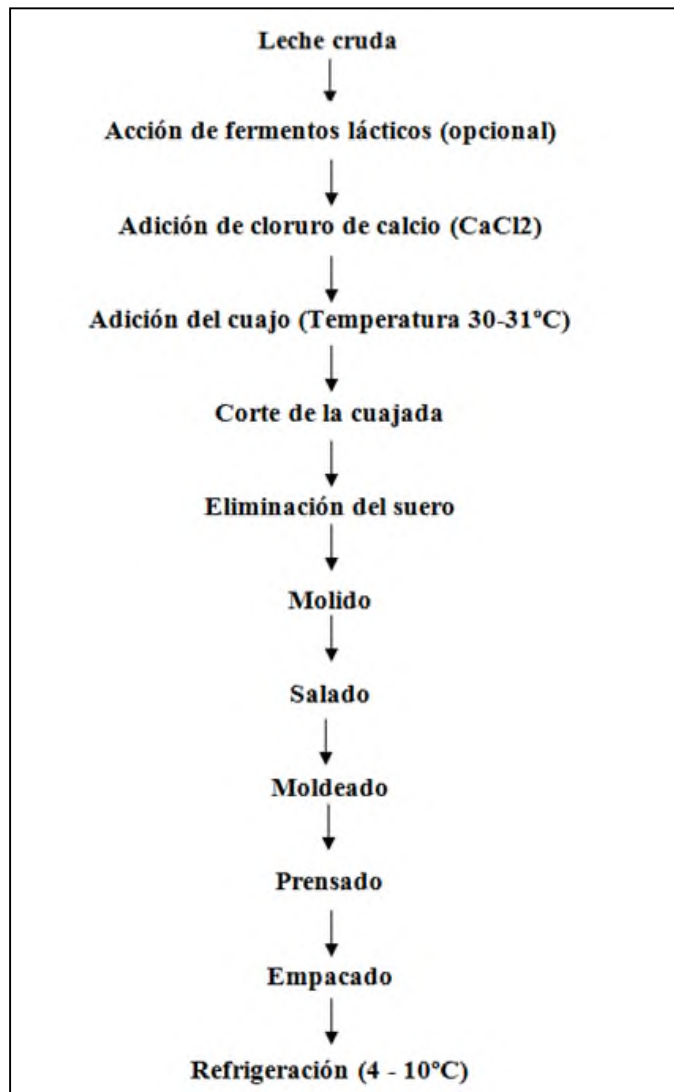


Figura 2. Diagrama del proceso de elaboración del queso fresco

2.6 Microbiología del queso fresco

El queso es considerado como un microecosistema, donde se puede identificar, por ejemplo; la parte abiótica, formada por un “sustrato”, es decir, la cuajada de fosfocaseinato de calcio, cuya complejidad composicional es alta, y en el cambio continuo en los factores externos de conservación-maduración como a los intrínsecos en la composición y la microbiología (Cogan, 2000). En el queso se producen reacciones bioquímicas e interacciones microbianas, la presencia de las bacterias depende de la contaminación microbiana de la leche, la acidificación de la misma previa a la elaboración del queso, los tratamientos térmicos de la leche, el uso de cultivo iniciador, las condiciones del proceso, principalmente en cuanto a tiempos, temperaturas y condiciones higiénicas. Cuando se usa leche pasteurizada, gran parte de la microflora se destruye por el calor y por este motivo se agregan cultivos iniciadores acidificantes (BAL) para que produzcan el descenso en el pH (Cogan, 2000).

La investigación sobre la producción del queso se ha enfocado en desarrollar tecnología designada a controlar el crecimiento microbiano y sus efectos en la calidad (Peláez y Requena, 2005). Las poblaciones microbianas en el queso elaborado con leche cruda son más complejas, que en los de leche pasteurizada (Grappin y Beuvier, 1997). La diversidad microbiana que exista en un determinado queso, así como la interacción entre las poblaciones microbianas es uno de los principales factores que contribuyen al sabor por medio de la producción de sustancias sápidas y aromáticas por el desarrollo microbiano, y a la textura del queso, por medio de la acidificación y la producción de exopolisacáridos (Leroy y De Vuyst, 2004; Peláez y Requena, 2005).

2.7 Grupos de microorganismos del queso

De entre los grandes grupos de microorganismos existentes en la naturaleza, solamente las bacterias, las levaduras y los mohos desempeñan una función relevante en la tecnología quesera; por su abundante actividad e importancia pueden ordenarse decrecientemente en bacterias, levaduras y mohos (A. Villegas de Gante, 2012).

2.7.1 Bacterias

Las bacterias forman parte de la microbiota o microflora natural de los quesos, la carga bacteriana proviene desde la leche cruda y de las condiciones de manejo e higiene con que se obtiene el producto. La leche cruda o bronca presenta una cuenta total (mesófilo-aeróbica), que se halla en un intervalo entre unas 20 000 UFC/ml y más de dos millones de UFC/ml (Villegas de Gante, 2012). Las bacterias del queso provienen de la leche cruda constituyendo una microbiota muy diversa, compuesta por numerosos géneros y especies; algunas son ejemplares nativos, otros ocasionales. Algunos criterios para clasificar a las bacterias provenientes de la leche cruda y posteriormente sus derivados (el queso) son:

Por su crecimiento poblacional en función de la temperatura, se distinguen los *Psicrófilos*, *Mesófilos* y *Termófilos*. Los *Psicrófilos* se multiplican aun en bajas temperaturas (0 a 6 °C), su temperatura óptima de crecimiento se acerca a 20 °C. Comprenden los géneros como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* y algunos coliformes. Los *Mesófilos* se multiplican entre los 15 y 40 °C, su temperatura óptima se ubica entre los 30 y 37 °C, constituyen la flora bacteriana más abundante de la leche cruda. En este grupo se incluye la microflora acidificante más típica, debido a que muchos cultivos lácticos son *mesófilos*. Los coliformes y patógenos son *mesófilos*. En los *Termófilos* su temperatura óptima de crecimiento se halla entre 40

y 50 °C; forma parte de la flora natural y cultivada. Destacan los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus termófilo* (X. Jouzier y Cohen-Maurel, 1985).

Por su requerimiento de oxígeno, pueden clasificarse en aerobios estrictos, aerobios facultativos y anaerobios estrictos. Los aerobios estrictos necesitan indispensablemente el oxígeno para vivir, puesto que necesitan un metabolismo aerobio; por ejemplo, los mohos del queso y *Pseudomonas*. Los aerobios facultativos pueden proliferar tanto en ausencia como en presencia de oxígeno; por ejemplo, la flora coliforme y las levaduras. Los anaerobios estrictos en presencia de oxígeno los inhibe; por ejemplo; el género *Clostridium* puede hallarse en quesos madurados (*Clostridium tyrobutricum*) (X. Jouzier y Cohen-Maurel, 1985).

Por el grado de transformación de la lactosa (y consecuentemente, de la cantidad de ácido láctico que producen) las bacterias de la leche y queso se clasifican en Homofermentativas y Heterofermentativas. Las Homofermentativas (u homofermentadoras) de la lactosa que metabolizan, más de 90 % la convierten en ácido láctico, y el resto en otros productos. Las Heterofermentativas (u heterofermentadoras) de la lactosa efectivamente metabolizada, alrededor de 50% se convierte en ácido láctico, y el resto en otros productos (ácido acético, alcohol etílico, CO₂, H₂) (X. Jouzier y Cohen-Maurel, 1985).

Por su capacidad patogénica, la flora láctea puede ser banal o patógena. Si es banal altera a los componentes de la leche y derivados (deteriorando el producto), pero no produce enfermedades. Por ejemplo, las bacterias ácido lácticas. Si es patógena provoca enfermedades en el consumidor por ser una fuente de infecciones o intoxicaciones alimentarias. Ejemplos de estos microorganismos son *Mycobacterium tuberculosis* o *bovis* (tuberculosis); *Brucella abortus* (brucelosis); *Staphylococcus aureus* (intoxicación estafilocócica); *Salmonella typhi* (tifoidea) (X. Jouzier y Cohen-Maurel, 1985).

Y por respuesta a la tinción de Gram. Gram positivas (G+). Las que retienen el colorante de Gram (cristal violeta). En este grupo se encuentran los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, etc. Gram negativas (G-). Aquellas bacterias que no retienen el cristal violeta y son teñidas por el colorante de contraste safranina. En este grupo se encuentran los coliformes y los psicrótrofos (géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, etc.) (X. Jouzier y Cohen-Maurel, 1985).

Algunos grupos de bacterias importantes en la quesería son: flora láctica, flora butírica, flora psicrótrofa y flora coliforme (A. Villegas de Gante, 2012).

2.7.1.1 Flora láctica

El grupo microbiano con mayor presencia o mayor interés tecnológico en los quesos son las bacterias ácido lácticas (BAL). Las BAL son un grupo heterogéneo de microorganismos Gram positivos, anaerobios estrictos o facultativos, no esporulados y catalasa negativos con capacidad de producir ácido láctico como consecuencia de la fermentación de azúcares. De acuerdo con Orla-Jensen (1919) citado por Stiles y Holzapfel (1997) las BAL tienen formas de bacilos o cocos, que fermentan los carbohidratos y alcoholes de más de 3 átomos de carbono para formar principalmente ácido láctico (Konings *et al.*, 2000). Su hábitat lo constituyen tanto sustratos de origen animal como vegetal (Temmerman *et al.*, 2004). Son 11 los géneros de BAL asociados a los alimentos: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella* (Stiles y Holzapfel, 1997). Los principales géneros del grupo de las BAL presentes en el queso son los *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Streptococcus* (Klaenhammer *et al.*, 2002), cada una de las cuales posee una morfología y características bioquímicas determinadas (Sneath *et al.*, 1986). Debido a su uso en la industria alimentaria la caracterización metabólica, parámetros de crecimiento, resistencia a los procesos industriales, de las bacterias lácticas ha sido muy completa (Temmermann *et al.*, 2004).

En las últimas décadas se ha puesto especial interés a la correcta identificación de las mismas, existiendo un amplio rango de técnicas. La mayoría de las técnicas requieren de aislamiento previo en cultivos están las técnicas fenotípicas (características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas y perfiles proteicos) y genotípicas (PCR con uso de primers específicos, determinación de secuencias de genes como 16S rDNA, uso de enzimas de restricción (Temmerman *et al.*, 2004). De acuerdo a estudios realizados por Konings *et al.*, (2000), las BAL son agentes implicados en la fermentación de numerosos alimentos, de las cuales algunas pueden crecer en condiciones elevadas de presión osmótica, utilizan proteínas en mayor o menor medida, experimentan un proceso de lisis celular cuando el medio de crecimiento no es adecuado liberando enzimas en las matrices alimentarias y son susceptibles al ataque de fagos. Las BAL, además de producir ácido láctico también pueden producir cantidades apreciables de otros productos antimicrobianos de bajo peso molecular como el peróxido de hidrógeno, acetoina, diacetilo, CO₂, alcoholes (Helander *et al.*, 1997), que llegan al alimento con efecto inhibitor en mayor o menor medida, además de estos metabolitos de la fermentación, también se producen bacteriocinas (Rodríguez *et al.*, 2003; Leroy y De

Vuyst, 2004). Las bacteriocinas se pueden usar para mejorar la calidad de los atributos sensoriales de ciertos alimentos como en el queso, por medio del control que pueden tener frente a microflora alterante o no deseada, o generando ruptura celular y la consecuente liberación de enzima por parte de las bacterias afectadas, lo cual puede usarse para el potenciar actividades proteolíticas o lipídicas como sea deseable (Leroy y De Vuyst, 2004; Guinane *et al.*, 2005; Peláez y Requena, 2005).

2.7.1.2 Flora butírica

La flora butírica está constituida por bacilos esporulados anaerobios del género *Clostridium*, que fermentan el lactato (proveniente de la fermentación láctica) y producen ácido butírico, ácido acético y gas (CO₂ e hidrógeno), principalmente.

Esta microflora es originaria del suelo, y se trasfiere por medio de sus esporas, por distintos medios contaminando la leche cruda. En particular, constituye un riesgo muy grave para las leches destinadas para fabricación de queso artesanal, especialmente de pastas duras y semiduras. Las esporas butíricas, altamente termorresistentes, pueden hallarse en la masa del queso, donde, si las condiciones son favorables, pueden germinar y multiplicarse. En forma vegetativa, fermentan el lactato (o el ácido láctico) producidos por la flora acidoláctica, y sus productos de fermentación (ácido butírico, CO₂ y e hidrogeno), ocasionan rancidez de la pasta, y un inflamamiento del queso (hinchazón tardía), defecto que aparece en el producto después de varias semanas de maduración (Fox, 1993).

Entre los microorganismos del género *Clostridium*, responsables de la fermentación butírica destaca, el *Clostridium tyrobutyricum*; por eso, a los microorganismos de este género que causan este fenómeno indeseable, a menudo se les conoce simplemente como tirobutíricos. Los tirobutíricos son bacterias anaeróbicas estrictas, que no fermentan la lactosa, pero que fermentan el lactato en presencia de acetato. Esporulan relativamente poco, pero sus esporas son muy termorresistentes, con tiempos de reducción decimal del orden de 3 h a 80 °C y de 15 min a 90 °C, por eso sobreviven fácilmente a la pasteurización a que se somete la leche para queso, y pueden germinar posteriormente ya en la pasta durante la maduración del producto. Además de los tirobutíricos, ciertos clostridios proteolíticos pueden contaminar la leche cruda y causar alteraciones en los productos lácteos (A. Villegas de Gante, 2012).

2.7.1.3 Flora psicrótrofa

Son un grupo de microorganismos cuya velocidad de crecimiento es significativa a baja temperatura. Son básicamente constituidos por bacilos gram negativos, aerobios, que permanecen a la familia *Pseudomonadaceae*, cuyos géneros principales son *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium*. Incluye algunos géneros de la familia *Enterobacteriaceae* como, el *Enterobacter* y a algunos esporulados termorresistentes, como el género *Bacillus* (Fox, 1993).

En general se trata de microorganismos saprófitos ampliamente extendidos en la naturaleza (en suelo, agua y vegetación), los cuales pueden ser transportados por los animales, los forrajes, el agua, etc. Su presencia en la leche, es por tanto, resultado de contaminación en el momento de la ordeña o durante manipulaciones posteriores de la lecha cruda, cuando las condiciones de higiene son deficientes. El impacto de la flora psicrótrofa en la conservación de la leche cruda fría depende de la contaminación inicial, la temperatura del fluido y el origen de la contaminación (Fox, 1993; Villegas de Gante, 2012).

2.7.1.4 Flora coliforme

Los coliformes son microorganismos de origen fecal, cuya presencia en la leche, los quesos y otros derivados, revela la falta de higiene por provenir de contaminación con materia fecal, reciente o lejana, lo que lleva a un riesgo sanitario para el consumidor. Este grupo pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, que incluye un conjunto de gérmenes, la mayoría es habitante normal del intestino de los mamíferos; entre ellos se encuentran ciertas especies patógenas para el hombre, por ejemplo las *Salmonellas*.

Los coliformes presentan en común la propiedad de fermentar la lactosa y producir gas (CO₂ e hidrógeno) y ácidos, principalmente lácticos; son responsables pues de efectuar la fermentación gaseosa.

El queso elaborado con leche cruda es el que se encuentra más expuesto a la contaminación o bien se puede producir una contaminación post-pasteurización. Si esta leche está contaminada con patógenos y sobrevive al proceso de elaboración puede producirse toxiinfecciones alimentarias (Robinson, 1987).

2.7.2 Levaduras

Las levaduras son hongos ascomicetos unicelulares, estos microorganismos son menos frecuentes en la leche y sus derivados (queso) que las bacterias, existen desde la leche cruda, sobre todo en aquella producida en condiciones higiénicas deficientes; se hallan

en la corteza de quesos en proceso de maduración y en la pasta de quesos frescos de leche cruda. Sin embargo, también constituyen parte de la flora normal de ciertas leches ácido-alcohólicas, por ejemplo el kéfir (Nalbantoglu, 2014).

2.7.3 Mohos

Los mohos son importantes porque constituyen una microflora invasora de la corteza, y a veces del cuero de los quesos semiduros y duros (queso Cheddar y Chihuahua, entre otros), madurados prolongadamente, sin protección alguna y con mal manejo de la cámara de maduración (altas temperaturas). Sin embargo, constituyen una flora deseable para la elaboración de quesos de corteza florida (el queso Camembert) y de pasta de venas verde-azules (los quesos Roquefort y Cabrales) (Fox, 1993; Villegas de Gante, 2012).

2.8 Estudios de la diversidad microbiana

2.8.1 Microbiología clásica

El estudio de los microorganismos se basa principalmente en la microbiología clásica mediante técnicas microbiológicas tradicionales, en aislar y cultivar a los microorganismos en el laboratorio, pero estos métodos clásicos de cultivos solo permiten recuperar entre el 0.1 y el 10 % de los microorganismos ambientales, los llamados microorganismos cultivables (Rondon *et al.*, 1999; Handelsman *et al.*, 2002).

2.8.2 Microbiología moderna

La microbiología moderna hizo su aparición debido a que se desconocen los requerimientos nutricionales necesarios de todos los microorganismos, las condiciones fisicoquímicas precisas de su ambiente natural y la información sobre las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que se mantienen en una comunidad microbiana (Escalante-Lozada *et al.*, 2004; Keller y Zengler, 2004).

Los microorganismos son una fuente importante de productos y procesos biotecnológicos. Por esta razón, se han buscado metodologías alternativas para la determinación de la diversidad de una población que no dependan del cultivo de microorganismos sino del estudio y análisis de su información genética. Un método pionero fue el análisis de los genes conservados con regiones internas variables como las regiones intergénicas del gen 16S mediante el uso de técnicas electroforéticas y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) como electroforesis

en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RADP) y polimorfismo de nucleótido simple (SNP) (Bedoya *et al.*, 2002). Los avances metodológicos mediante técnicas moleculares en conjunto con las técnicas de aislamiento y purificación de ácidos nucleicos, secuenciación y de ensamblado de secuencias, se ha hecho posible el desarrollo de una nueva alternativa para el estudio de microorganismos tal como la metagenómica. La metagenómica es el análisis del metagenoma, el cual es el conjunto de material genético de los microorganismos presentes en un hábitat, es decir, la metagenómica es el estudio del ADN de los microorganismos presentes en el medio ambiente sin necesidad de aislarlos ni cultivarlos en el laboratorio (Ferrer, 2004; Herrera y Castellanos, 2007). Desde el punto de vista biotecnológico, la metagenómica es una herramienta importante en la búsqueda de nuevas actividades enzimáticas de interés industrial que en conjunto con los avances en los métodos de secuenciación, permite el escrutinio masivo de todo el conjunto de genomas de microorganismos (cultivables y no cultivables) presentes en una muestra. En la última década, esta tecnología ha revolucionado el estudio de la diversidad microbiana, la obtención de metabolitos y el entendimiento de la dinámica de poblaciones. Así, el primer trabajo donde se demostró el potencial de la metagenómica en el descubrimiento de nuevos genes fue realizado por Rondon *et al.* (2000) donde a partir de suelos se identificaron nuevas enzimas con diversas actividades hemolíticas, lipolíticas y amilolíticas. Posteriormente se realizaron otros estudios sobre diversidad de poblaciones, en alimentos. Recientemente Nalbantoglu *et al.*, (2014) realizó un estudio metagenómico y escrutinio por secuenciación (pirosecuenciación) de los granos de kékfir donde dio a conocer la diversidad microbiana del alimento. En otros trabajos siguieron una metodología de la metagenómica que consiste de los siguientes pasos: selección de la muestra ambiental, extracción de ADN, selección del tamaño de las moléculas, decisión de clonar o no el ADN y proponer el método de análisis y escrutinio. De los cuales se encuentran, análisis de librería metagenómica por escrutinio funcional (Riesenfeld *et al.*, 2004; Schloss y Handelsman, 2004), por escrutinio mediante PCR con oligonucleótidos degenerados (Cowan *et al.*, 2005), y por el análisis de la librería metagenómica por secuenciación (Peña-Castro *et al.*, 2013; Cortés-López *et al.*, 2014).

2.8.3 Secuenciación de ADN

Hoy en día, las técnicas modernas de secuenciación post-Sanger, han abierto una ventana enorme de hipótesis a probar, que van desde el descubrimiento de genes y sus productos, hasta la dinámica de poblaciones y el ensamblado de genomas microbianos. La secuenciación es una técnica de análisis molecular que permite determinar la composición y el orden de los nucleótidos que forman un fragmento de ADN. Para su determinación de un fragmento de ADN, es necesario multiplicar el número de copias de dicha molécula mediante PCR o usando vectores de clonación (Sanger *et al.*, 1977). Sanger con el método enzimático de terminación de cadenas (método de los didesoxinucleótidos), y Gilbert, con el método de fragmentación química, desarrollaron las primeras aproximaciones a la secuenciación del ADN en los años 70 (Sanger *et al.*, 1977). El método de Maxam y Gilbert permitían secuenciar el ADN original y detectar modificaciones en el mismo, el método de Sanger es el que terminó siendo más popular. En sus orígenes se trataba de un método muy manual, tedioso y peligroso (por el uso de compuestos radioactivos), y con una capacidad de lectura de unas 80 bases. El comienzo de los proyectos de secuenciación en a finales de los 90 hizo que esta metodología se adaptara a estrategias menos nocivas gracias a la utilización de didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia que se analizaban en una electroforesis capilar y producían un cromatograma o electroferograma, a partir del cual se deducía la secuencia en el ordenador. Esto permitió mejorar, automatizar y aumentar el rendimiento del proceso de secuenciación. Estos nuevos avances posibilitaron el desarrollo de los secuenciadores automáticos de tipo ABI Prism (Applied Biosystems) o CEQ-serie (Beckman Coulter). Esta tecnología permitía secuenciar a la vez hasta 96 muestras de ADN en unas pocas horas, y la longitud de las secuencias que producía estaba entre 500 y 1000 bases. La gran longitud de las lecturas generadas, en comparación con el proceso manual, junto con el desarrollo de las estrategias de secuenciación a gran escala (Whole Genome Shotgun Sequencing) facilitaban cada vez más el ensamblaje de las secuencias genómicas. En 1995 se publicó el primer genoma secuenciado de un organismo de vida libre, *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995). En aquel tiempo los costos de secuenciación eran demasiados, por lo que se redujeron precios, desarrollaron los denominados secuenciadores de segunda generación, capaces de generar cientos de miles de reacciones de secuencias en paralelo (secuenciadores de verdadero alto rendimiento (high-throughput) gracias a la inmovilización de las reacciones en una superficie sólida. De esta forma, la cantidad de reactivos necesarios se minimiza (podrían llamarse nanorreacciones) y se abarata por

base leída. La primera aproximación a la secuenciación masiva en paralelo está basada en la pirosecuenciación del ADN (Fleischmann *et al.*, 1995; Mostafa *et al.*, 1996). Se trata de una técnica no fluorescente que mide la liberación de pirofosfato en una reacción de polimerización mediante una serie de reacciones enzimáticas acopladas que liberan luz cada vez que se incorpora un nucleótido, producen una imagen que se analizan para proporcionar flujogramas que una vez interpretados por el ordenador devuelven las secuencias de nucleótidos. Esta tecnología fue desarrollada por la empresa 454 Life Sciences que fue absorbida por Roche. Al mismo tiempo, otras dos compañías desarrollaron otro tipo de tecnologías para la secuenciación masiva en paralelo del ADN. Solexa utiliza también un método basado en la polimerización del ADN, donde la incorporación de un nucleótido marcado con fluorescencia y protegido en la cadena naciente impide que ésta siga creciendo. Tras detectar la señal fluorescente, se elimina el grupo protector y se puede incorporar otro nucleótido marcado, con lo que se empieza de nuevo el ciclo. La segunda tecnología es la desarrollada por la compañía SOLID, esta tecnología secuencia por ligación de octámeros marcados de secuencia conocida a la cadena de ADN, con la posterior detección de la señal fluorescente emitida tras cada ligación. Ambas técnicas, Solexa y SOLID, tienen la gran ventaja sobre la pirosecuenciación de resolver de forma fiable las regiones homopoliméricas, y además son más baratas. Sin embargo, su gran desventaja radica en que no son capaces de generar lecturas superiores a las 75 bases, por lo que no se pueden utilizar en las secuenciaciones de novo. Una importante ventaja de todos los secuenciadores de segunda generación es secuencian el ADN sin necesidad de clonarlo. El primer secuenciador de tercera generación por Helicos BioSciences y se basa en la secuenciación a tiempo real de miles de millones de pequeñas moléculas únicas de ADN adheridas a una superficie sólida. Permite generar de forma fiable fragmentos de entre 25 y 45 bases. Dada la pequeñez de las lecturas generadas, esta tecnología está recomendada para la resecuenciación de genomas y no para la secuenciación de novo. Otra tecnología, encuadrada en los secuenciadores de tercera generación, es la desarrollada por ZS Genetics, que utiliza la microscopía electrónica y permite leer la secuencia del ADN directamente sobre una imagen electrónica. La lectura de la secuencia requiere de la replicación previa de una hebra molde de ADN para poder marcarla con bases modificadas con yodo, bromo o triclorometilo antes de analizarlas. Una vez finalizada la secuenciación y obtenida una secuencia de nucleótidos, se puede comparar con secuencias depositadas en las bases de datos disponibles en internet como GenBank, EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RIDOM (Ribosomal

Differentiation of Medical Microorganisms) y RDP (Ribosomal Database Project) entre otras, usando programas informáticos como BLAST. Este software permite visualizar una lista de secuencias similares a la secuencia problema, los alineamientos con respecto a ella y los respectivos porcentajes de homología, asociado finalmente la secuencia problema a una especie en concreto.

2.9 Técnicas moleculares para el estudio de la diversidad microbiana

Existen técnicas moleculares para el estudio de la diversidad poblacional, para la obtención de metabolitos y el entendimiento, estructura de las poblaciones (Kirk *et al.*, 2004).

2.9.1 Enfoques basados en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La PCR dirigida al 16S rADN se ha usado ampliamente para estudiar la diversidad procariota y permite su identificación, así como la predicción de las relaciones filogenéticas. Con el 18S rDNA y el espaciador transcrito interno (ITS) se utilizan cada vez más para estudiar comunidades de hongos. Sin embargo, las bases de datos disponibles no son tan extensas como para los procariotas. Muchas otras técnicas han sido desarrolladas para evaluar la diversidad de la comunidad microbiana. Estos métodos, el ADN se extrae de la muestra y es purificada, el ADN diana (16S, 18S o ITS) se amplifica usando primers universales o específicos y los productos resultantes se separan en diferentes maneras (Kirk *et al.*, 2004).

2.9.2 Gen ribosomal 16S rARN

Es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nucleótidos (nt), codificado por el gen *rrs* a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el 16S rARN se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla (Neefs *et al.*, 1990). Proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas y reciben el nombre de rARN SSU (del inglés, small subunit). Se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones que se concentran en zonas específicas. El análisis de la secuencia de fragmentos del gen 16S rARN de distintos grupos filogenéticos reveló un hecho adicional de gran importancia práctica: la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos asignados. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos o en la mayor

parte de los miembros de un determinado grupo filogenético y nunca, o sólo raramente, están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo (Woese *et al.*, 1985). El 16S rARN presenta una serie de características, consideradas por Woese como cronómetro molecular definitivo (Woese, 1987). Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas a lo largo de toda la escala evolutiva. Los rARN SSU contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar, no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos. El tamaño relativamente largo, 1500 nt, minimiza las fluctuaciones estadísticas. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los fragmentos de 16S rARN, existen bases de datos amplias en continuo crecimiento.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de 16S rARN de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva.

2.9.3 DGGE

La electroforesis en gel del gradiente desnaturizante (DGGE) es una técnica molecular basada en una electroforesis que usa un gradiente químico de urea y formamida para desnaturizar amplicones de ADN a medida que se muevan en un gel de acrilamida. Esta técnica desarrollada por el científico Leonard S. Lerman, fue usada con anterioridad para identificar mutaciones puntuales en genes humanos responsables de diferentes enfermedades (Fischer y Lerman, 1983). Posteriormente, su uso se amplió al estudio de comunidades microbianas en Ecología Marina (Lyautey *et al.*, 2004) y con más profundidad en microbiología de los alimentos, con la caracterización de poblaciones responsables de la fermentación y la maduración de productos como el queso siciliano artesanal (Randazzo *et al.*, 2002), el queso azul Stilton (Ercolini *et al.*, 2003), el queso Cabrales (Flórez y Mayo, 2006), queso Rabiola di Roccaverano (Bonetta *et al.*, 2008), el kimchi, un plato tradicional de la gastronomía coreana

compuesto por vegetales fermentados (Chang *et al.*, 2008) y el queso fontina (Dolci *et al.*, 2013). Los estudios se basaron en la variación nucleotídica interespecifica del gen 16S rARN, que codifica el rARN de la subunidad menor del ribosoma de los procariotas. Se han desarrollado para fragmentos de ADN ribosómico amplificados por PCR separadas de ADN con la misma longitud, pero con la variación en la composición de nucleótidos. Las temperaturas de fusión se asocian a la secuencia y fragmentos de ADN dejan de migrar cuando las regiones de pares de bases con la temperatura de fusión más bajo alcanzan esta temperatura. Esto se produce debido a una transición de conformación de helicoidal a derretida parcialmente, y en consecuencia, el movimiento a lo largo del campo eléctrico se detendrá. Una abrazadera GC (secuencia rica GC) unida para el extremo 5' se utiliza como un cebador especial para anclar los fragmentos de PCR y evitar que se disocien completamente. El suelo bacteriano, dinámica, estructura y diversidad aún están siendo evaluados a través de este método, pero también han sido reemplazados cada vez más por plataformas de secuenciación. La técnica de DGGE de cultivo independiente es la más utilizada frecuentemente en la microbiología de los alimentos, es interesante observar que DGGE se ha aplicado a todas las áreas de microbiología de los alimentos, como los alimentos fermentados, deterioro de los alimentos y la seguridad alimentaria, siendo el más rico y el primero en términos de la literatura científica. DGGE es más adecuado para la estudio de la ecología microbiana de las fermentaciones espontáneas. Vino, carne y productos cárnicos, leche y productos lácteos son los más frecuentes tipos estudiados de alimentos, tanto en términos de fermentación y procesos de deterioro, mientras que de masa fermentada y hortalizas se han investigado en menor medida, usando métodos independientes del cultivo (Cocolin *et al.*, 2013). Los alimentos fermentados son transformaciones microbianas en el que un gran número de microorganismos pertenecen a diferentes especies y géneros, los cuales compiten para establecer su supremacía. DGGE se ha demostrado para ser capaz de estudiar los cambios dinámicos que se producen durante la fermentación de alimentos y poner de relieve las poblaciones microbianas dominantes. Su potencial demostrado por Cocolin *et al.* (2007) en un estudio en el que una optimización de los procedimientos de DGGE se llevó a cabo para estudiar diferentes conjuntos de primers que se utilizan a menudo en el análisis de DGGE, desnaturalización gradientes y las condiciones de electroforesis. Esta técnica sólo puede detectar los organismos más abundantes presentes en la comunidad bacteriana. Además, la interpretación puede ser engañosa como una única banda puede representar a múltiples especies y misma especie pueden ser representados por múltiples

bandas. Los primers de cada taxón en combinación con PCR anidada se han desarrollado al perfil microbiano, poblaciones que se producen en baja abundancia y parecen ser capaces de mostrar resultados congruentes con métodos más rigurosos, como el amplicon del gen 16S rRNA por Pirosecuenciación para perfilar la baja abundancia de poblaciones microbianas (Rincon-Florez *et al.*, 2013). Este método ofrece ventajas frente a técnicas convencionales como la rapidez, la sencillez, la independencia de cultivo, la capacidad de estudiar muestras heterogéneas y de realizar un seguimiento temporal y espacial de comunidades microbianas en diferentes hábitats. Sin embargo, presenta inconvenientes como una incorrecta identificación ocasional de la especie a la que pertenece una determinada banda. Las bandas que se aprecien tenues pueden recortarse y someterse a una nueva PCR y a otra electroforesis. La heterogeneidad de los operones ribosómicos, relativamente frecuentes en procariotas y eucariotas, provoca que las bandas diferentes puedan pertenecer a una sola especie (Fischer y Lerman, 1983).

III. JUSTIFICACIÓN

La microbiota espontánea presentes en los quesos frescos artesanales es muy compleja, estos microorganismos son los responsable de las características sensoriales. Pero también son responsables de defectos producidos por la presencia de ciertos microorganismos contaminantes que disminuyen la calidad higiénica y sensorial de estos quesos. Para evitar estos problemas, los fabricantes utilizan, cada vez con más frecuencia, leche pasteurizada. En el proceso de pasteurización se destruye la microbiota espontánea presente en la leche, observándose que los quesos industriales desarrollan un sabor menos intenso que los elaborados con leche cruda, motivo por el cual son menos atractivos y por tanto menos consumibles por las personas de la región, aun cuando, se asegure una mayor uniformidad del producto y se mejoren las condiciones sanitarias. Por esta razón es importante conocer que microorganismos habitan en el queso fresco de la región de la Cuenca del Papalopan, con la finalidad de hacer un estudio durante dos temporadas del año para saber si la misma diversidad microbiana se comporta igual. Con este análisis de diversidad microbiana, se podrá adicionar las cepas bacterianas benéficas a la leche pasteurizada a utilizar en la elaboración del queso fresco brindando así la característica sensorial autentica del queso fresco artesanal de la región.

IV. HIPOTESIS

La microbiota de los quesos frescos artesanales, analizada microbiológica y molecularmente, de la Región de la Cuenca del Papaloapan mostrará una variabilidad de acuerdo a la temporada de producción.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Caracterizar mediante métodos de microbiología clásica y biología molecular, la microbiota de quesos frescos elaborados artesanalmente en la región de la Cuenca del Papaloapan.

5.2 Específicos

- 1.** Comparar la microbiota de los quesos frescos artesanales por temporada (invierno y verano) mediante técnicas de microbiología clásica.
- 2.** Analizar la variabilidad del ADN genómico de muestras de quesos frescos de diferentes temporadas de producción mediante técnicas de PCR- DGGE.
- 3.** Identificar los microorganismos que integran la microbiota de quesos frescos artesanales mediante comparación con secuencias registradas en GenBank.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Toma de muestras del queso fresco artesanal (QFA)

Se recolectaron 11 muestras del queso fresco elaborados tradicionalmente con leche cruda procedentes de 4 lugares de la región de la Cuenca del Papaloapan, que se tomaron en dos temporadas diferentes, en verano en el mes de julio (2014) e invierno en el mes de enero (2015). Los lugares de muestreo fueron seleccionados de acuerdo a un estudio estadístico de los ranchos con mayor productividad de quesos frescos de la región, los cuales fueron: Tuxtepec (2 muestras), Chiltepec (1 muestra), Benemérito Juárez (4 muestras) y Loma Bonita (4 muestras). Las muestras se obtuvieron directamente de los productores con un periodo de anaquel de un día. Para su análisis, las muestras fueron trasladadas en una hielera a una temperatura aproximada de 4 °C a los laboratorios de la facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, estas fueron procesadas el día posterior de su llegada.

La estrategia experimental se muestra en la Figura 3.

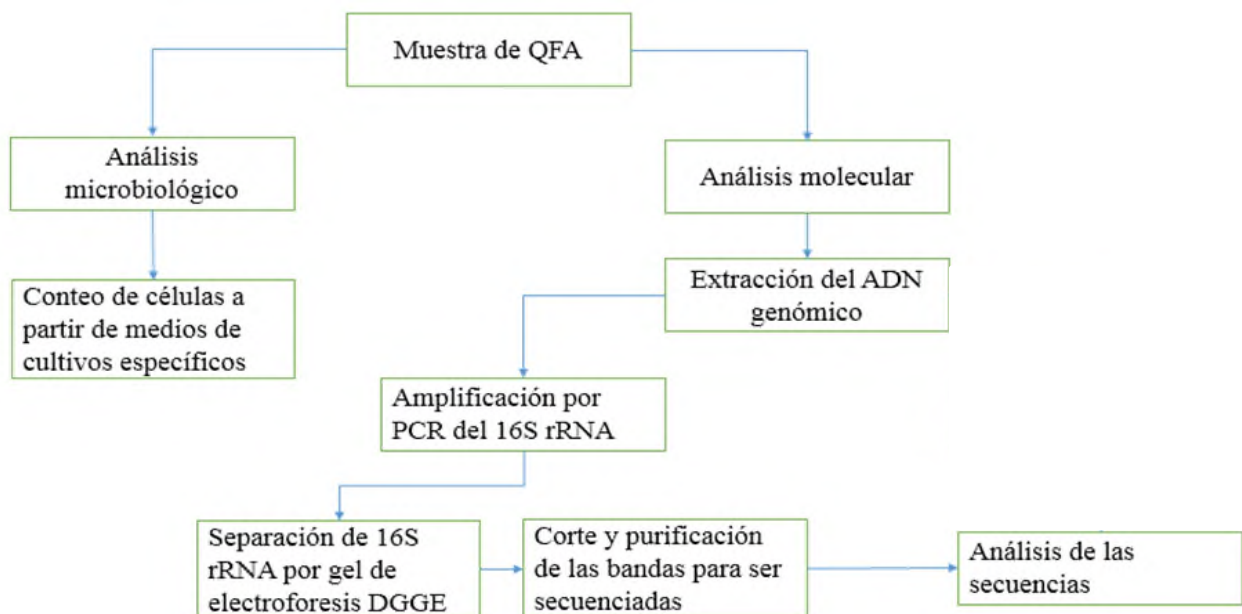


Figura 3. Estrategia experimental empleada para el análisis microbiológico y genético de la microbiota del queso fresco artesanal.

6.2 Procesamiento de la muestra

Una suspensión de 10g de queso en 90ml de solución buffer de fosfatos se homogenizó por dos minutos en una licuadora (Laboratory Blender, UK). El homogenizado se dejó reposar por un minuto con la finalidad de permitir la sedimentación de las partículas grandes, tras lo cual, se utilizó 1 ml del sobrenadante para realizar diluciones decimales seriadas para proceder a la siembra por duplicado en medios selectivos.

6.3 Análisis microbiológico

Los medios y condiciones para crecimiento usados en la cuantificación de bacterias, hongos y levaduras fueron:

Agar conteo en placa (PCA; Oxoid) a 30°C para mesófilos; agar M17 (Oxoid) conteniendo 1% de lactosa (M17L) a 30 y 45°C para *Streptococos mesófilos* y *Streptococos termófilos* respectivamente; agar DeMan rogosa sharpe (MRS; Oxoid) a 30°C para *Lactobacillus mesófilos*; agar MRS suplementado con 500 µg/ml de vancomicina (MRSV) a 30°C para *Leuconostoc*; agar baird-parker (BP; BD Bioxon) suplementado con telurito de yema de huevo (BD Bioxon), a 35°C para *Staphylococcus*; agar kanamycin aesculin azide (KAA; Oxoid) a 35°C para *Enterococos*; agar dextrosa y papa (ADP; BD Bioxon) acidificado con ácido tartárico al 10% (Merck) a 25°C para levaduras y hongos; y agar bilis rojo violeta (BRV; Oxoid) a 32°C para colifórmes totales.

Todos los medios se inocularon por siembra en superficie con 100 µL, de la dilución respectiva, excepto el medio BRV, el cual fue inoculado con 1000 µL por siembra en masa. Los agares BP, KAA y VRB fueron incubados por 24 hrs; M17L, MRS y MRSV por 48 hrs; PCA a 30°C fue incubado por 72 hrs; agar M17L y ADP lo fueron por 5 días. Todos los medios se incubaron bajo condiciones anaeróbicas excepto PCA, ADP y BRV (Renyé *et al.*, 2008). Las unidades formadoras de colonias (UFC) se determinaron en las placas con conteos de entre 10–200 colonias. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

El conteo se llevó a cabo por recuento en placa, la cual determinó el número de células y/o agregados celulares que formaron colonias en las diferentes placas de agar. Como es imposible distinguir entre colonias que proceden de células individuales de las que

surgen de agregados, la población final se expresó en términos de unidades formadoras de colonias por unidad de volumen (UFC/ml).

El recuento en placa de colonias se realizó visualmente, con ayuda de un contador de colonias (contador Quebec). Este contador es de fondo oscuro que muestra un fondo iluminado y una magnificación para que las colonias de cada muestra no se confundieran. Para su conteo se fueron marcando las colonias contadas en el fondo de la placa con un pincel con el fin de asegurarse que las mismas colonias no se cuenten de nuevo.

El factor de dilución se calculó mediante la fórmula:

$$Factor\ de\ dilución = \frac{Vol.\ de\ la\ muestra}{(Vol.\ de\ la\ muestra + Vol.\ del\ diluyente)}$$

También el volumen del inoculo y el número de colonias de la placa y el número de microorganismos del queso fresco artesanal, se calculó el recuento mediante:

$$UFC/ml = \frac{media\ del\ número\ de\ colonias\ de\ placas\ duplicadas}{(factor\ de\ dilución\ x\ vol.\ inoculado\ en\ la\ placa)}$$

Para los resultados del recuento se utilizaron las normas estándar de recuento. Las normas utilizadas fueron (Harrigan, W.F. 1988; Maturin, *et al.* 1998)

1. Placas con número de colonias en el intervalo de 20-200 (la mejor situación posible). Si en una estimación preliminar las placas contienen entre 20 y 200 colonias, descartar el resto de placas y contar solo las que estén en este intervalo.
2. Placas con un numero de colonias entre 1-20. Si el recuento proporciona solamente placas con menos de 20 colonias, registrar el número real de colonias de las placas que procedan de la dilución más baja (es decir el inoculo más concentrado depositado en las placas).
3. Placas sin colonias. Cuando no aparecen colonias en las placas, el recuento que se estima es como el más pequeño del límite de detección del procedimiento utilizado. El límite de detección es el número que resulta de la presencia de una colonia en la placa en la que se depositó la más baja dilución de la muestra.
4. Placas con más de 200 colonias. Si la operación rinde en placas que contengan un número de colonias superior a las 200, hallar el recuento estimado. Contar porciones representativas de la placa en la que se deposite la dilución más elevada. Elegir un área

representativa de un contador de colonias que esté dotado por rejillas de 1 cm. Si hay menos de 10 colonias/cm², contar 13 cuadrados (7 consecutivos en sentido horizontal y 6 en el vertical). Las sumas de los 13 cuadrados multiplicados por 5 es el recuento estimado de los 65 cm² de la placa. Si hay más de 10 colonias/cm², contar 4 cuadrados representativos y multiplicar la media por 65 para calcular el recuento de la placa.

5. Placas con colonias esparcidas. Contar una cadena de colonias que no estén muy separadas como si fueran una sola colonia. Si las colonias pueden distinguirse, no consideremos que estén esparcidas para fines de recuento. Si las cadenas de colonias se forman a partir de puntos distintos, contar cada colonia como si fuera una sola. Si la zona esparcida es superior al 25% de la placa, se anota como colonias esparcidas.

6.4 Análisis estadístico

Se realizó una análisis de varianza (ANOVA) mediante la prueba de Tukey para efectuar el contraste entre temporadas (verano e invierno) de las muestras recolectadas, se ajustó un modelo lineal con dos factores explicativos de efectos fijos a un nivel de $\alpha=0.05$, con el programa estadístico SAS/STAT[®] (SAS institute Inc., 2004, versión 9.0). El modelo estadístico se representa de la siguiente forma:

$$y_{ij} = \mu + \tau_j + e_{ij}$$

Dónde:

y_{ij} = es la *i-ésima* observación en el *j-ésimo* nivel del factor explicativo τ_j .

μ = es la media general de la variable de interés.

τ_j = es el efecto aditivo del *j-ésimo* nivel del factor τ_j .

e_{ij} = Es el *i-ésimo* error aleatorio del modelo, en el *j-ésimo* nivel del factor τ_j .

6.5 Identificación Genética

Para el análisis de la población bacteriana, se utilizaron las muestras recolectadas. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se tomó una alícuota de 1ml en un tubo nuevo y estéril de 1.5 ml, la muestra se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min para obtener la pastilla de MOS y proceder a la extracción de ADN. El ADN de las bacterias presentes en los quesos frescos se obtuvo siguiendo las especificaciones del kit de extracción NucleospinTissue de Macherey-Nagel agregándole una nueva solución de pre-lisis conteniendo 20 mM de Tris-HCl; 2 mM de EDTA; 1% Triton X-100 pH 8 y 2 mg/ml de lisozima, dejando los demás puntos del protocolo igual al del fabricante.

6.5.1 Evaluación y cuantificación del ADN

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, en el que se cargaron 5 µl de cada muestra más 2 µl del buffer de carga azul de bromofenol, éste fue teñido con bromuro de etidio a 10 mg/ml. El gel fue visualizado con luz ultravioleta utilizando un fotodocumentador MiniBis. Una vez que se corroboró la presencia de ADN íntegro, se cuantificó y determinó su pureza por espectrofotometría en el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo scientific).

6.5.2 Amplificación (PCR) del ADN genómico

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µl con 100 ng de ADN, se uso la GoTaq Green Master Mix (Promega) y 50 ng de cada oligonucleótido F=G17 (5'- GTG AAG TCG TAA CAA GG - 3') y B=GplusR (5'- CGT CCT TCA TCG GCT - 3') (Godálava, *et al.* 2016). La amplificación se realizó en un termociclador Corbett bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguido de 40 ciclos, cada uno con una desnaturalización a 94°C por 1min un alineamiento a 54°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1 min, terminando con una extensión final a 72°C por 5 min.

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados para amplificar un fragmento de 16S rRNA presentes en bacterias.

6.5.3 Análisis PCR-DGGE

Para el análisis de la diversidad bacteriana mediante PCR para Electroforesis en Gradiente de Desnaturalización (DGGE). Se utilizaron 100 ng/µl de ADN de cada muestra como ADN templado para generar un amplicón para la electroforesis DGGE. La PCR fue realizada bajo las siguientes condiciones: todas las reacciones de amplificación para PCR-DGGE se realizaron en un volumen final de 50 µl con 200 ng de ADN, se uso la GoTaq Green Master Mix (Promega) y 100 ng de cada oligonucleótido B=GplusR (5'-CGT CCT TCA TCG GCT - 3') y F=G17-CG (5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GGT GAA GTC GTA ACA AGG - 3') donde se amplifico el gen 16s rRNA. Las reacciones se colocaron en un termociclador Corbett bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos, cada uno con una desnaturalización a 93°C por 30 s un alineamiento a 78°C por 30 s y una extensión a 72°C por 30 s, terminando con una extensión final de 72°C por 2 min.

6.5.4 Evaluación y purificación de productos de PCR

Los resultados de la extracción y de la amplificación del gen 16S, se verificaron mediante electroforesis horizontal (MINI SUB CELL GT BIO-RAD).

Los fragmentos amplificados se observaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, tenidos con bromuro de etidio a 10 mg/mL y visualizando con luz ultravioleta en el fotodocumentador ImageQuant 300 Pro (General Electric).

6.5.5 Análisis de DGGE

Para conocer el cambio de la población bacteriana de acuerdo a las muestras, se realizó un análisis de la diversidad mediante PCR-DGGE, que consiste en la separación de las cadenas dobles de ADN de los diversos MOS presentes en una sola muestra, dicha separación depende del punto de desnaturalización dado por la cantidad citosina (C) y guanina (G) presentes en el fragmento de ADN amplificado (Muyzer, 1999). La cantidad de C y G es diferente en cada fragmento amplificado ya que pertenece a una cepa bacteriana en particular, por lo tanto cada banda observada representa a una especie bacteriana.

Una vez obtenidos los amplicones mediante PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para este tipo de electroforesis, se procedió a correr la electroforesis en gradiente de desnaturalización, utilizando un equipo DCode universal mutation detection system (Bio-Rad, Hercules, Calif.) con geles de acrilamida al 8% (acrilamida:bisacrilamida 37.5:1) con dimensiones de 16 cm x 16 cm x 1 mm, usando un gradiente de desnaturalización de concentración baja del 35% y una alta del 60%, y como agentes desnaturalizantes urea y formamida (Walter *et al.*, 2000). Se cargaron las muestras obtenidas de los productos de PCR y la electroforesis fue conducida con un voltaje constante de 60 voltios con una temperatura de 60 °C durante 17 horas.

Los geles fueron teñidos con una solución de SYBR Green I nucleica cid gel stain (invitrogen) y vistos con un fotodocumentador de luz UV ImagenQuant 300 (General Electric). Se realizaron varias pruebas hasta obtener una fotografía de las bandas con una mayor visión para ser analizadas con el software BioNumerics (versión 6.6 Applied Maths, Austin, TX). Y con base al patrón de bandeo de las muestras y mediante el cálculo de las distancias euclidianas (lo que refleja la mayor similitud entre dos muestras), se generó una matriz de distancias, con la cual se elaboraron dendogramas mediante el método unweighted-pair group method with mathematical averages

(UPGMA), el objetivo de hacer un dendograma o análisis de conglomerados es agrupar las comunidades bacterianas de acuerdo a su semejanza.

Al tener las imágenes con los perfiles de bandeo de los geles DGGE, se eligieron algunas bandas de interés en base a la intensidad y a la presencia de bandas en determinadas muestras (cada banda representa el genotipo de una determinada especie bacteriana), las bandas elegidas fueron cortadas con ayuda de un transiluminador UVP. En total se eligieron 26 bandas, las bandas elegidas previamente fueron cortadas y puestas en un microtubo estéril de 600 µl al cual se le adicionó 40 µl de buffer TE como agente eluyente. La elución el fragmento de ADN de la matriz de acrilamida, se hizo siguiendo la técnica propuesta por Karnati et al., (2009). Con el ADN eluido se realizó una reamplificación mediante PCR en un volumen de 25 µl bajo las mismas condiciones señaladas anteriormente para la PCR-DGGE, utilizando los mismo oligonucleótidos, con la diferencia de que el iniciador F=G17-CG no contenía la cola de CG necesarias para DGGE. Una vez efectuada la PCR se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y a partir de éste se purificaron los amplicones que fueron mandados a secuenciar.

Los productos de PCR se limpiaron utilizando el kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Jiang et al., 2011). Los amplicones contenidos dentro de la matriz del gel de agarosa, se cortaron directamente del gel bajo luz UV y se colocaron en un microtubotubo de 1.5 mL al cual se le agregaron aproximadamente 110 µl de “membrane binding solution”, cubriendo el fragmento de agarosa, se agitó vortex y se incubó a 65°C hasta que el gel quedó completamente disuelto. Posteriormente se colocó la solución dentro de la columna y se procedió a seguir los siguientes pasos: se agregaron 25 µl de “membrane binding solution” al producto de reacción de PCR, se mezcló suavemente y la solución total fue colocada dentro de una minicolumna, previamente montada en un microtubo de 1.5 mL. Se incubó durante 1 min a temperatura ambiente para después centrifugarse a 13,000 rpm por 1 min, se desechó el eluido del microtubo y se lavó la columna con 700 µl de “membrane wash solution”, luego se centrifugó de nuevo a 13000 rpm por 1 min, se desechó el eluido y se repitió de nuevo el lavado con 500 µl, dando una centrifugación a 13000 rpm por 5 min. Finalmente se cambió la columna a un microtubo nuevo y se le agregaron 50 µl de “Nuclease-Free Water” y se incubó por 1 min. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min para obtener un eluido de ADN limpio. Este ADN se cuantificó y verificó su pureza en el equipo NanoDrop (Thermo scientific) y finalmente se almacenó a -20°C para su posterior uso.

6.5.6 Secuenciación de los productos de DGGE

De los productos purificados se enviaron 15 µl para su secuenciación automática en el equipo ABI PRIMS®3100 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) a la Unidad de Diagnóstico y Análisis Molecular del Instituto Nacional de Salud Pública ubicado en la Ciudad de Cuernavaca Morelos, Méx.

6.5.7 Análisis de secuencias

Las secuencias de los amplicones se analizaron mediante la evaluación de los cromatogramas. Los cromatogramas de las secuencias que presentaron ruido se redujeron para tener solamente el fragmento de la secuencia con mayor fiabilidad. Posterior a la limpieza de las secuencias de los amplicones, se hizo el ensamble de los productos *forward* y *reverse*. Para esto, se obtuvieron la secuencias reversas complementarias de todas las *reverse* para que estuvieran en dirección 5'-3'. Posteriormente con un alineamiento de la secuencia *forward* y la reversa complementaria se obtuvo la secuencia consenso (Figura 4). Esto se hizo con el software MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*).

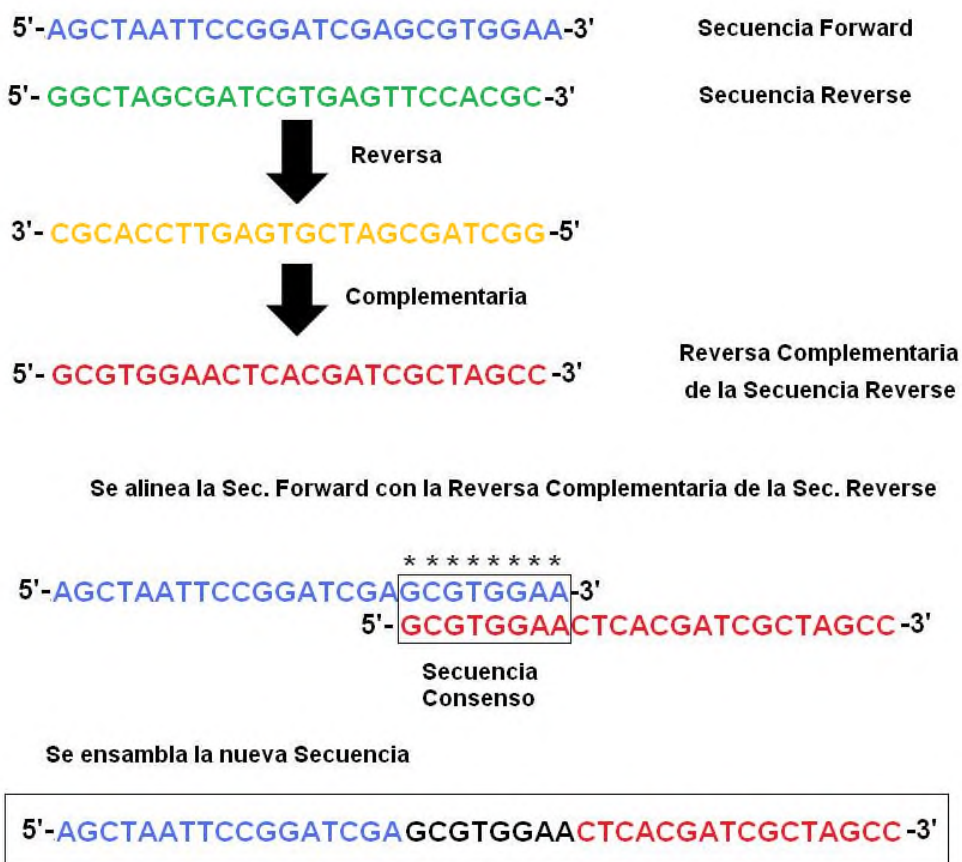


Figura 4. Ensamblado de una secuencia a partir de los amplicones Forward y Reverse (Cruz-Nolasco A. 2014).

Una vez obtenidas las 26 secuencias, se realizó una comparación de dichas secuencias donde se utilizó la base de datos del GenBank usando el programa Blast del NCBI, con el fin de identificar las bacterias por género y especie, eligiendo aquellas secuencias del GenBank con mayor porcentaje de similitud (Lesk, 2002). Además, con base al patrón de secuenciación de las muestras y mediante el cálculo de distancias euclidianas (lo que refleja mayor similitud entre dos secuencias), se generó una matriz de distancias, con la cual se elaboró un dendograma mediante el método “unweighted-pair group method with mathematical averages” (UPGMA), donde los grupos se fueron generando entre las secuencias más parecidas, para esto se utilizó el software BioNumerics (versión 6.6; Applied Maths, Austin, TX).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Análisis microbiológicos

El análisis microbiológico basadas en medios de cultivos específicos, donde las muestras de los quesos frescos artesanales provenientes de once productores diferentes recolectados en dos temporadas, verano e invierno no mostraron diferencia significativa ($p > 0.05$). Los respectivos conteos se muestran en el Anexo 1. En la Tabla 3 se muestran los lugares de procedencia del muestreo, media aritmetica y sus desviaciones estándar respectivamente.

Las muestras procedentes de BJ2 y LB2 muestran menor diversidad con respecto a *Enterococcus* (Fig.5), Es decir, contienen un promedio de 4.58 a 6.16 Log UFC/ml., mientras que las demás mantienen un promedio de 6.51 a 7.88 Log UFC/ml para las dos temporadas. Con respecto a *L. mesofilicos* (Fig.6), las muestras procedentes de LB2 y LB1 tienen menor diversidad con promedio de 5.45 a 6.57 Log UFC/ml y las muestras procedentes de Chiltepec contienen la mayor diversidad con un promedio de 8.62 a 9.16 Log UFC/ml para ambas temporadas. La figura 7 muestra los promedios en Log UFC/ml para *Leuconostoc*, las muestras procedentes de LB3 fue la de menor diversidad para este grupo de bacterias con un promedio de 4.62 Log UFC/ml en invierno y para verano con un promedio de 0 Log UFC/ml, las muestras procedente de Chiltepec mostro mayor diversidad para este grupo con un promedio de 7.78 a 8.02 Log UFC/ml.

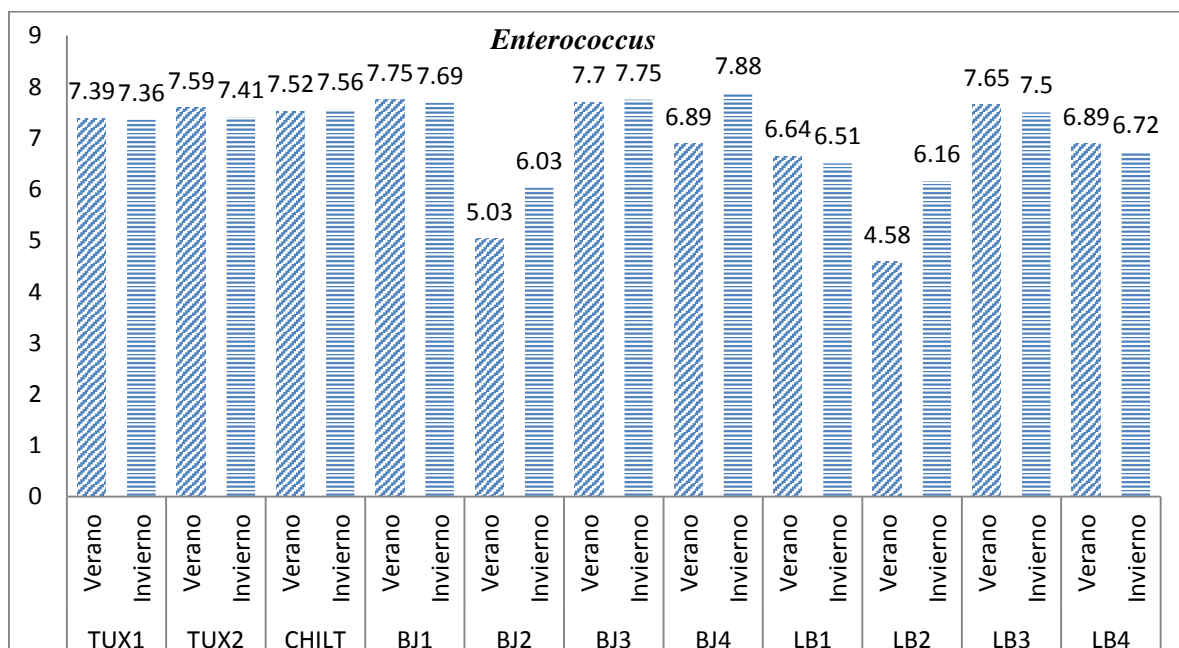


Figura 5. *Enterococcus* presentes en muestras de queso fresco artesanal de la región de la Cuenca del Papaloapan en las temporadas verano e invierno.

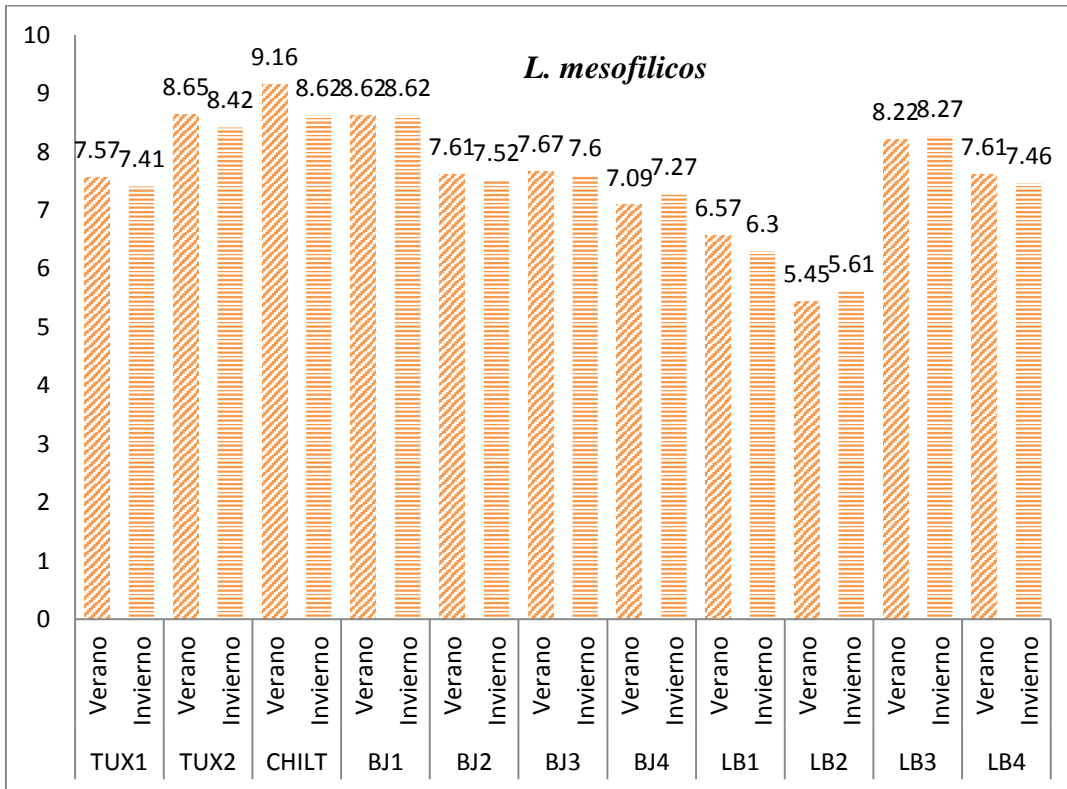


Figura 6. *Lactobacillus mesophilicus* presentes en muestras de queso fresco artesanal de la región de la Cuenca del Papaloapan en temporada verano e invierno.

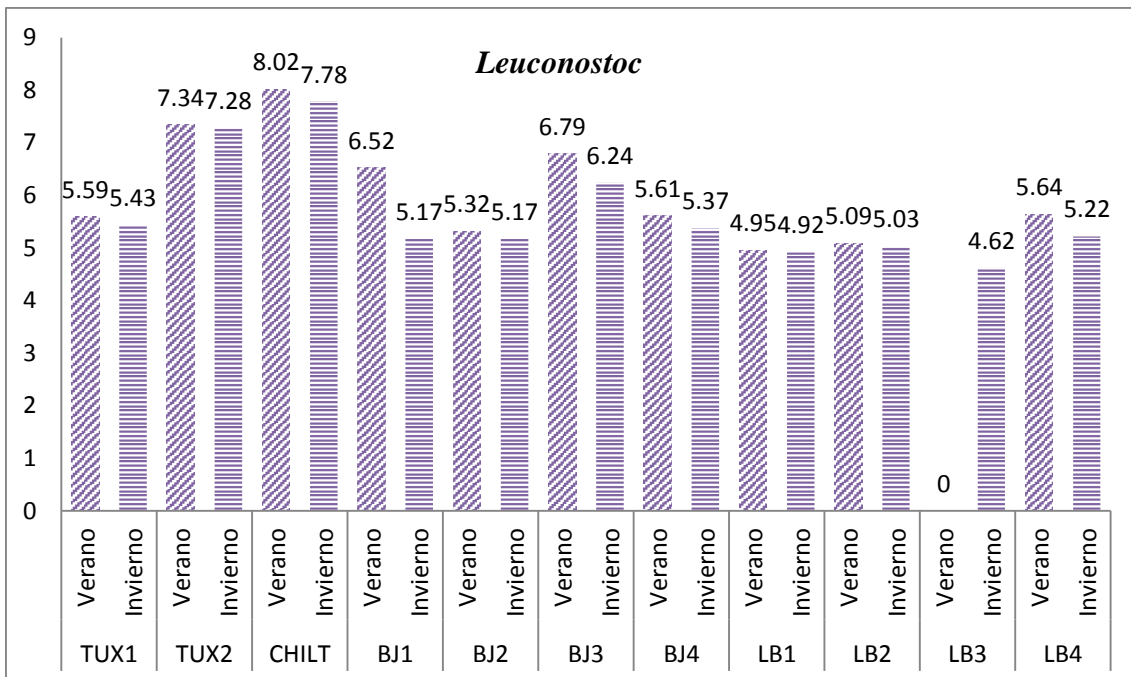


Figura 7. *Leuconostoc* presentes en muestras de queso fresco artesanal de la región de la Cuenca del Papaloapan en temporada verano e invierno.

Las muestras procedentes de LB1 y LB2 muestran menor diversidad con respecto a *S. mesófilos* (Fig.8), Es decir, contienen un promedio de 6.64 a 7.38 Log UFC/ml, mientras que las demás mantienen un promedio de 7.41 a 9.43 Log UFC/ml para las dos temporadas. Con respecto a *S. termófilos* (Fig.9), las muestras procedentes de LB2 tienen menor diversidad con promedio de 5.19 a 5.36 Log UFC/ml, mientras que las demás mantienen un promedio de 7.25 a 8.89 Log UFC/ml para las dos temporadas. La figura 10 muestra los promedios en Log UFC/ml para *mesófilos*, las muestras procedentes de LB1 y LB2 fueron las de menor diversidad para este grupo de bacterias con un promedio de 6.66 a 7.43 Log UFC/ml, mientras que para las demás muestras obtuvieron un promedio de 7.54 a 9.73 Log UFC/ml para ambas temporadas. Con respecto a la diversidad de *Lactococcus* (Fig. 11), las muestras procedentes de LB1 y LB2 contienen el menor promedio con un 6.54 a 7.69 Log UFC/ml y las muestras procedentes de Chilt y BJ1 son las de mayor diversidad con un promedio de 8.86 a 9.56 Log UFC/ml para las dos temporadas. Las muestras procedentes de LB2 muestra el menor número de diversidad bacteriana respecto a *S. aureus* (Fig. 12), con un promedio de 5.71 Log UFC/ml en verano y 6.06 Log UFC/ml en invierno, para las demás muestras se mostraron valores altos con promedios de 6.48 a 8.93 Log UFC/ml para ambas temporadas. La figura 13 muestra los valores promedios en Log UFC/ml de las coliformes totales, las muestras procedentes de LB2 y BJ2 son las de menor número de diversidad con promedio de 4.85 a 6.72 Log UFC/ml y las procedentes de los demás lugares de muestreo muestran promedios parecidos de 6.43 a 8.67 Log UFC/ml para ambas temporadas. Con respecto a mohos y levaduras (Fig. 14), las muestras procedentes de TUX1, TUX2, BJ1, BJ4, LB1, LB3 y LB4 muestran mohos con promedios de 3 a 3.8 Log UFC/ml en ambas temporadas mientras que para las demás muestran 0 Log UFC/ml, la muestra procedente de LB3 es la única que no presenta levaduras en la muestra de verano, las demás presentan un promedio de 3.53 a 5.07 Log UFC/ml en ambas temporadas.

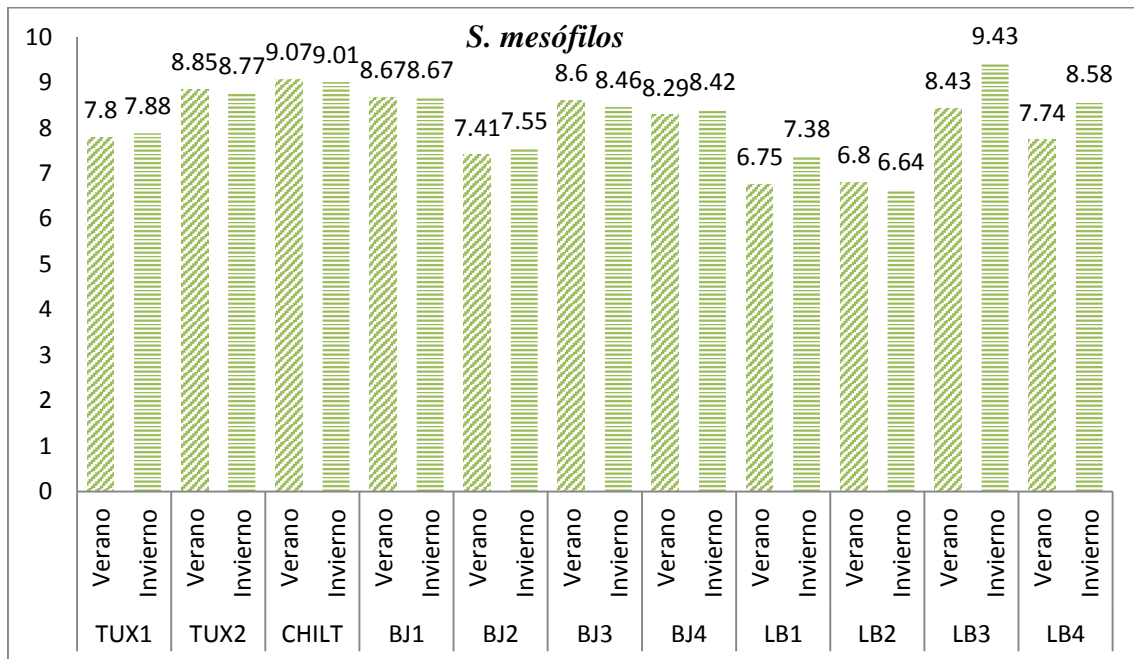


Figura 8. *Streptococcus mesófilos* presentes en muestras de queso fresco artesanal de la región de la Cuenca del Papaloapan en temporada verano e invierno.

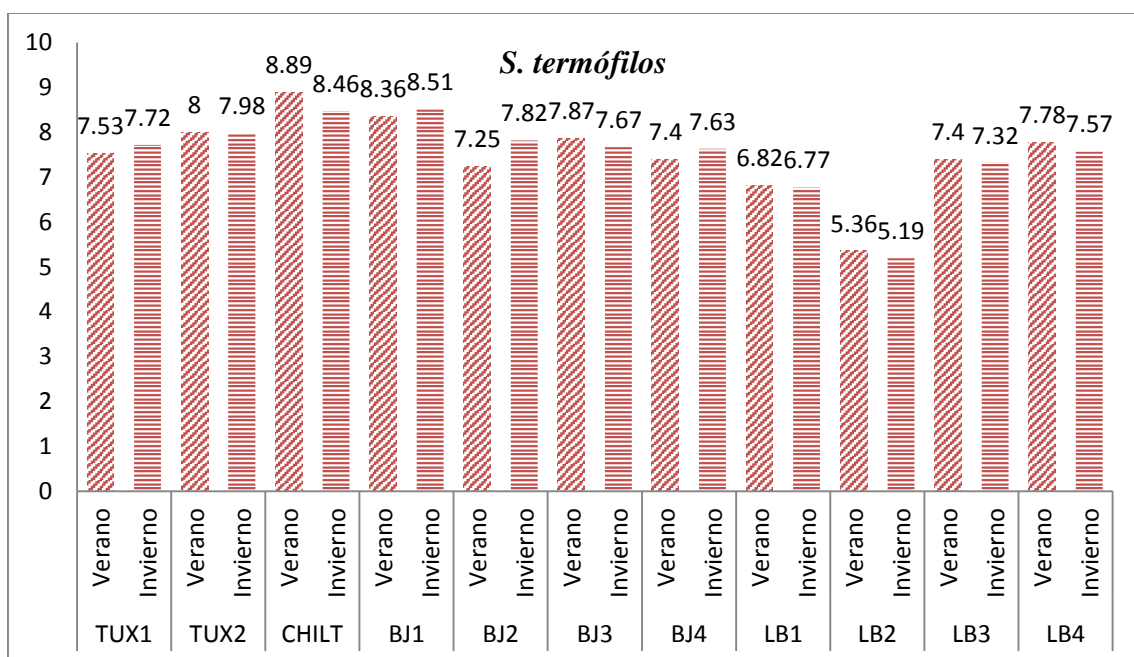


Figura 9. *Streptococcus termófilos* presentes en muestras de queso fresco artesanal de la región de la Cuenca del Papaloapan en temporada verano e invierno.

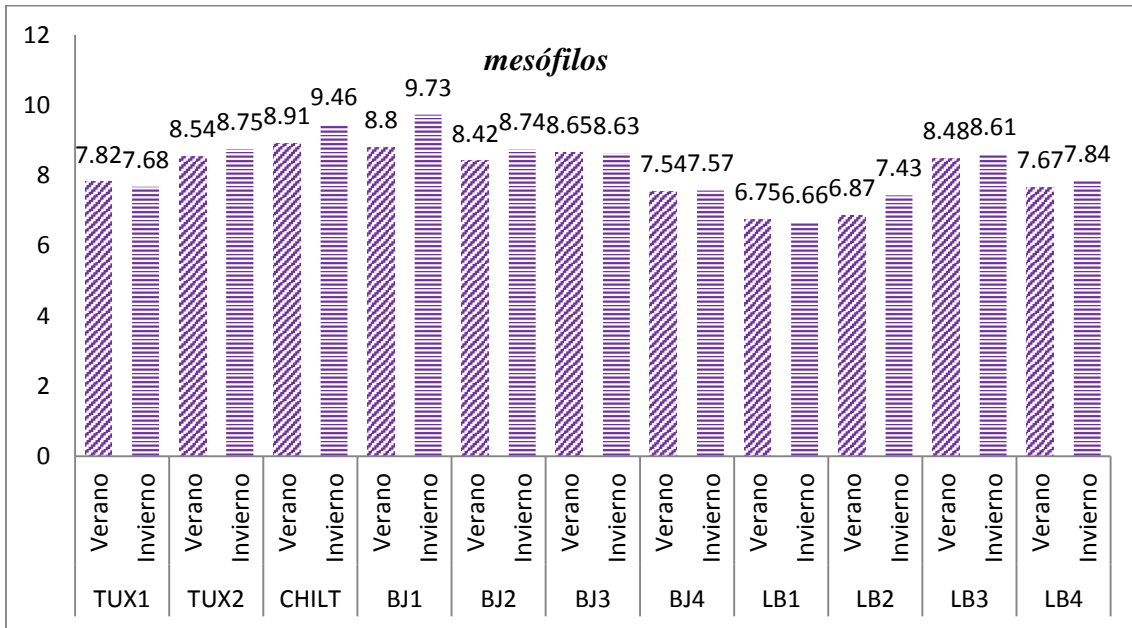


Figura 10. *mesófilos* presentes en muestras de queso fresco artesanal de la región de la Cuenca del Papaloapan en temporada verano e invierno.

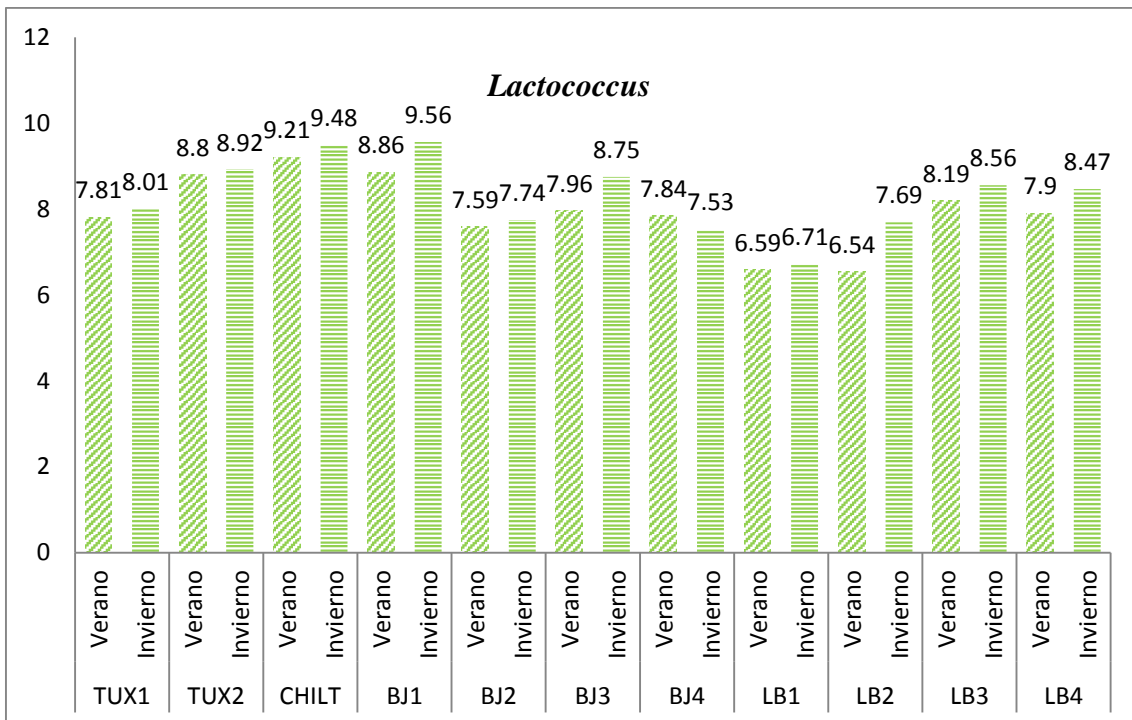


Figura 11. *Lactococcus* presentes en muestras de queso fresco artesanal de la región de la Cuenca del Papaloapan en temporada verano e invierno.

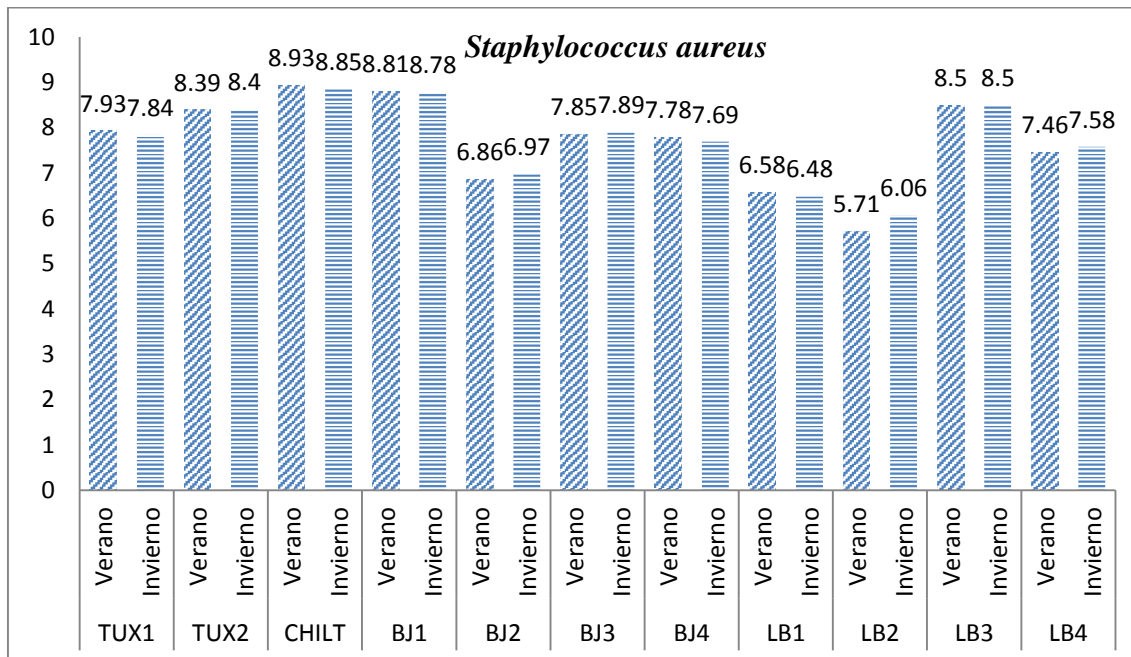


Figura 12. *Staphylococcus aureus* presentes en muestras de queso fresco artesanal de la región de la Cuenca del Papaloapan en temporada verano e invierno.

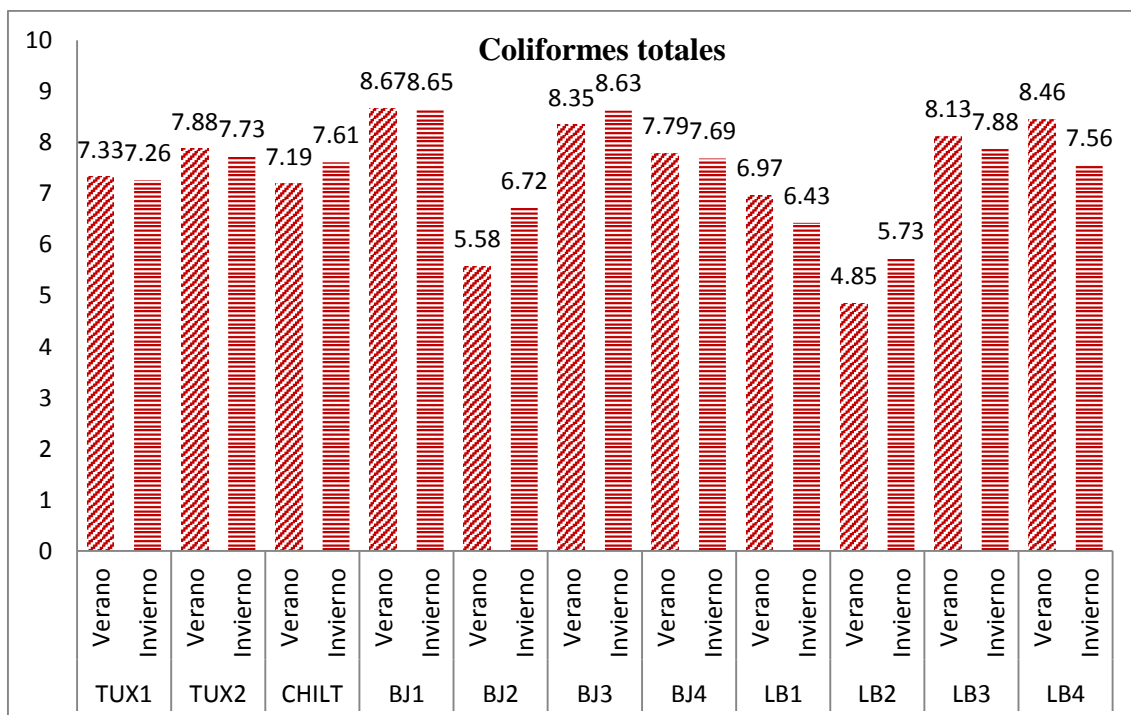


Figura 13. Coliformes totales presentes en muestras de queso fresco artesanal de la región de la Cuenca del Papaloapan en temporada verano e invierno.

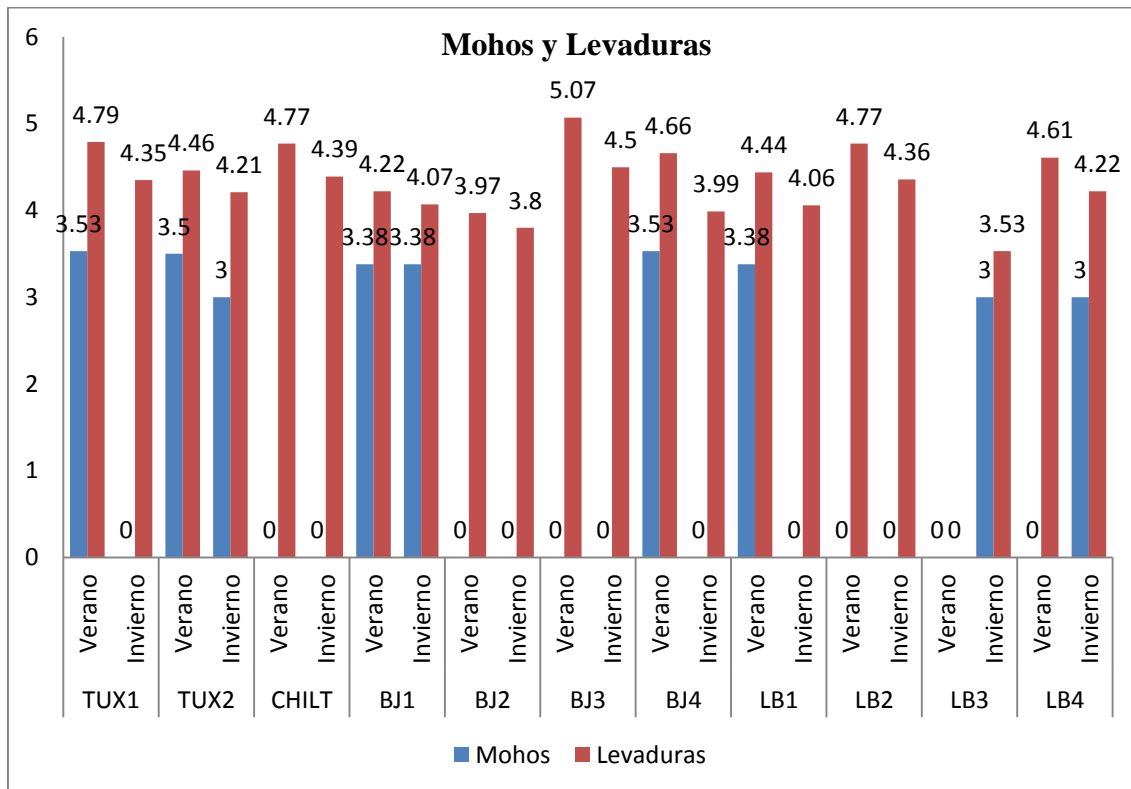
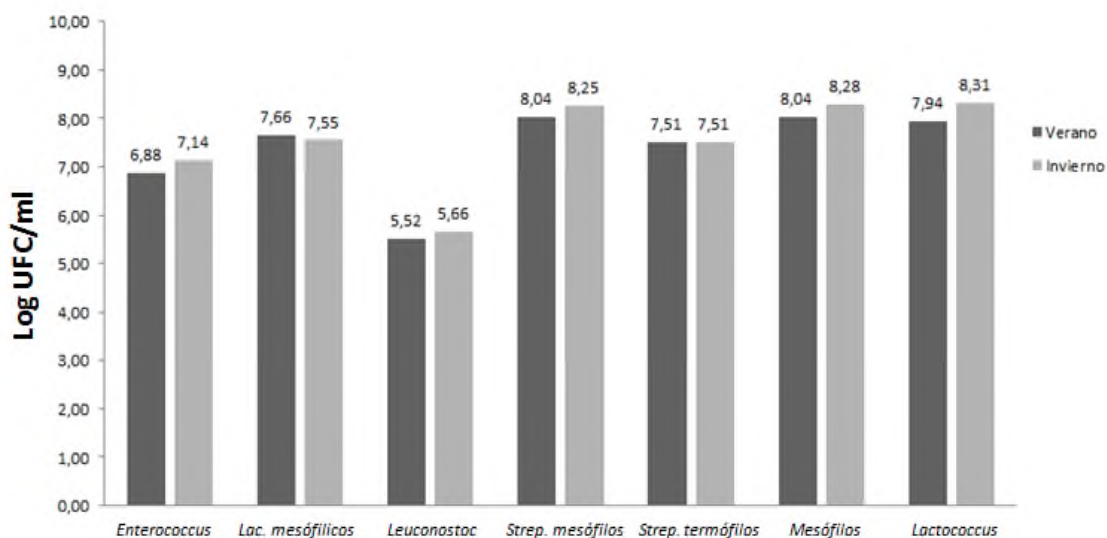


Figura 14. Mohos y Levaduras presentes en muestras de queso fresco artesanal de la región de la Cuenca del Papaloapan en temporada verano e invierno.

La figura 15 muestra la comparación de los microorganismos presentes en el queso fresco artesanal, donde las muestras provenientes de once productores diferentes recolectados en dos temporadas, verano e invierno no mostraron diferencia significativa ($p > 0.05$). En la Tabla 3 se muestran todos los valores correspondientes a su media aritmética y desviaciones estándar respectivamente.

A)



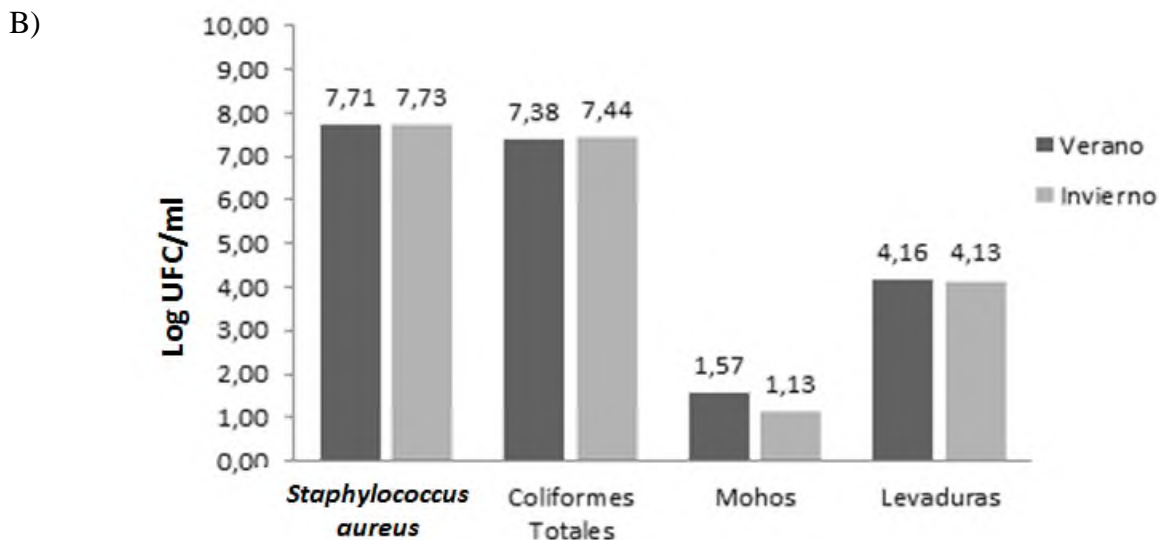


Figura 15. Microorganismos presentes en el queso fresco artesanal de la región de la Cuenca del Papaloapan en temporada verano e invierno. A) Bacterias BAL, B) *Staphylococcus aureus*, coliformes totales, mohos y levaduras.

Los resultados de todas las muestras recolectadas en la región de la Cuenca del Papaloapan, al compararlas con los valores establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 (Tabla 2), se observó que la mayoría de estos se encuentran dentro de los rangos establecidos para la flora láctica; sin embargo, los coliformes totales, *Staphylococcus aureus* así como mohos y levaduras estuvieron por arriba de los límites establecidos en la norma (Tabla 3).

Tabla 2. Límites máximos (Log UFC/ml) de contenido microbiano para leche y quesos establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010.

NOM-243-SSA1-2010	<i>Staphylococcus aureus</i>	Coliformes Totales	Mohos y Levaduras
	3.00 máx.	2.00 máx.	2.69 máx.

En el caso de *Staphylococcus aureus* se observaron recuentos de hasta 7.93 Log UFC/ml lo que sobrepasa al límite (3.00 máx. Log UFC/ml) establecido por la Norma Oficial Mexicana, de la muestra recolectada marcada como Tux1 originaria de la ciudad de Tuxtepec Oaxaca. Para el recuento de coliformes totales se observó una máxima de 7.88 Log UFC/ml de la muestra recolectada marcada como Tux2 originaria de la ciudad de Tuxtepec Oaxaca, y una mínima de 4.8 Log UFC/ml en la muestra marcada como LM2 recolectada en Loma Bonita Oax., ambas recolectadas en verano (Tabla 2), sobrepasando los valores límites máximos (2.00 máx. Log UFC/ml) establecidos por

norma. En el recuento de mohos y levaduras se observó una máxima de 3.5 Log UFC/ml para mohos y 5.0 Log UFC/ml para levaduras provenientes de la muestra Tux1 de la ciudad de Tuxtepec Oaxaca y de la muestra BJ3 de la comunidad Benemérito Juárez, ambas recolectadas en verano (Tabla 2), estas sobrepasaron los límites máximos (2.69 máx. Log UFC/ml) registrados en la Norma Oficial Mexicana, y con un recuento mínimo para hongos y levaduras de 0.0 para la muestra LM3 recolectada en Loma Bonita Oax., durante el verano (Tabla 2). En los recuentos de bacterias mesófilas aéreas se encontró una máxima de 9.7 Log UFC/ml en la muestra de BJ1 recolectada Benemérito Juárez Oax., y una mínima de 6.6 Log UFC/ml de la muestra LM1 recolectada en Loma Bonita Oax., ambas de la temporada invierno (Tabla 2), entre estas bacterias *mesófilas* también se encuentran especies. Estos resultados nos indican que durante la manipulación y proceso no se tomaron las medidas higiénicas y sanitarias convenientes. *Staphylococcus aureus* fue uno de los microorganismos más presentes en recuento microbiano en todas las muestras de queso, la presencia de este microorganismo se debe a contaminación de material y equipo de trabajo o materias primas de origen animal como la leche pero principalmente por contaminación directa de portadores de la infección (a partir de la piel, boca y fosas nasales) que manipularon el proceso o el producto terminado, esto indica que podrían existir enterotoxinas estafilocócicas capaces de provocar intoxicaciones al consumidor. Ejemplos de caja petri con diversidad microbiana se muestran en la Figura 16.

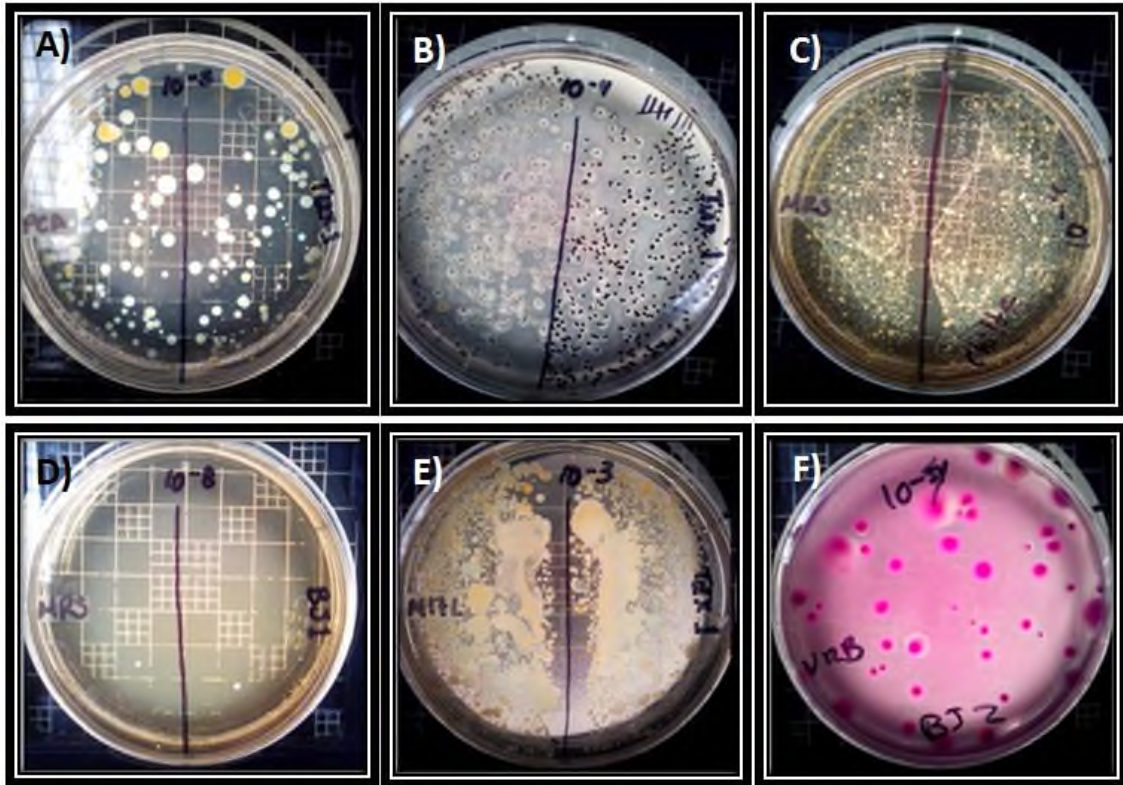


Figura 16. Diversidad microbiana en cajas petri con muestras de quesos frescos artesanales. A) Agar Conteo en Placa (PCA; Oxoid) a 30°C con *mesófilos*. B) Agar M17 (Oxoid) conteniendo 1% de lactosa (M17L) a 30 °C con *Streptococcus mesófilos*. C) Agar DeMan Rogosa Sharpe (MRS; Oxoid) a 30°C con *Lactobacillus*. D) Agar MRS suplementado con 500 µg/ml de vancomicina (MRSV) a 30°C para *Leuconostoc*. E) Agar M17 (Oxoid) conteniendo 1% de lactosa (M17L 45°C para *Streptococcus termófilos*. F) Agar Bilis Rojo Violeta (BRV; Oxoid) a 32°C con coliformes totales.

Tabla 3. Carga microbiana encontrada en muestras del queso fresco artesanal de la Región de la Cuenca del Papaloapan (Log UFC/ml).

MX ^A	Temporada	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus</i>	Coliformes totales	<i>Lactobacillus mesofilicos</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Streptococcus mesófilos</i>	<i>Streptococcus termófilos</i>	Mohos	Levaduras	Mesófilos	<i>Lactococcus</i>
Tux1	Verano	7.93(0.02) ^B	7.39(0.02)	7.33(0.05)	7.57(0.16)	5.59(0.03)	7.80(0.07)	7.53(0.25)	3.53(0.08)	4.79(0.01)	7.82(0.03)	7.81(0.02)
	Invierno	7.84(0.03)	7.36(0.11)	7.26(0.05)	7.41(0.12)	5.43(0.10)	7.88(0.01)	7.72(0.14)	0.00(0.00)	4.35(0.04)	7.68(0.08)	8.01(0.03)
Tux2	Verano	8.39(0.02)	7.59(0.03)	7.88(0.09)	8.65(0.03)	7.34(0.09)	8.85(0.00)	8.00(0.05)	3.50(0.28)	4.46(0.06)	8.54(0.03)	8.80(0.02)
	Invierno	8.40(0.11)	7.41(0.12)	7.73(0.11)	8.42(0.09)	7.28(0.04)	8.77(0.04)	7.98(0.05)	3.00(0.00)	4.21(0.14)	8.75(0.09)	8.92(0.09)
CHIL	Verano	8.93(0.05)	7.52(0.06)	7.19(0.69)	9.16(0.22)	8.02(0.02)	9.07(0.00)	8.89(0.03)	0.00(0.00)	4.77(0.04)	8.91(0.02)	9.21(0.02)
	Invierno	8.85(0.07)	7.56(0.06)	7.61(0.05)	8.62(0.04)	7.78(0.02)	9.01(0.02)	8.46(0.03)	0.00(0.00)	4.39(0.16)	9.46(0.06)	9.48(0.07)
BJ1	Verano	8.81(0.04)	7.75(0.08)	8.67(0.16)	8.62(0.02)	6.52(0.08)	8.67(0.17)	8.36(0.30)	3.38(0.55)	4.22(0.07)	8.80(0.04)	8.86(0.09)
	Invierno	8.78(0.06)	7.69(0.04)	8.65(0.00)	8.62(0.09)	5.16(0.12)	8.67(0.07)	8.51(0.24)	3.38(0.12)	4.07(0.17)	9.73(0.07)	9.56(0.03)
BJ2	Verano	6.86(0.05)	5.03(0.05)	5.58(0.11)	7.61(0.05)	5.32(0.07)	7.41(0.22)	7.25(0.03)	0.00(0.00)	3.97(0.09)	8.42(0.09)	7.59(0.01)
	Invierno	6.97(0.02)	6.03(0.11)	6.72(0.02)	7.52(0.09)	5.17(0.14)	7.55(0.07)	7.82(0.10)	0.00(0.00)	3.80(0.14)	8.74(0.11)	7.74(0.11)
BJ3	Verano	7.85(0.07)	7.70(0.06)	8.35(0.04)	7.67(0.08)	6.79(0.12)	8.60(0.03)	7.87(0.07)	0.00(0.00)	5.07(0.01)	8.65(0.04)	7.96(0.01)
	Invierno	7.89(0.07)	7.75(0.04)	8.63(0.01)	7.60(0.01)	6.24(0.10)	8.46(0.03)	7.67(0.02)	0.00(0.00)	4.50(0.06)	8.63(0.10)	8.75(0.05)
BJ4	Verano	7.78(0.03)	6.89(0.19)	7.79(0.02)	7.09(0.26)	5.61(0.05)	8.29(0.16)	7.40(0.11)	3.53(0.08)	4.66(0.01)	7.54(0.04)	7.84(0.01)
	Invierno	7.69(0.01)	7.88(0.07)	7.69(0.10)	7.27(0.03)	5.37(0.03)	8.42(0.14)	7.63(0.13)	0.00(0.00)	3.99(0.12)	7.57(0.10)	7.53(0.04)
LM1	Verano	6.58(0.03)	6.64(0.02)	6.97(0.04)	6.57(0.01)	4.95(0.06)	6.75(0.03)	6.82(0.05)	3.38(0.12)	4.44(0.12)	6.75(0.05)	6.59(0.01)
	Invierno	6.48(0.05)	6.51(0.01)	6.43(0.13)	6.30(0.03)	4.92(0.03)	7.38(0.03)	6.77(0.06)	0.00(0.00)	4.06(0.02)	6.66(0.17)	6.71(0.11)
LM2	Verano	5.71(0.02)	4.58(0.15)	4.85(0.09)	5.45(0.10)	5.09(0.02)	6.80(0.01)	5.36(0.05)	0.00(0.00)	4.77(0.08)	6.87(0.24)	6.54(0.05)
	Invierno	6.06(0.08)	6.16(0.16)	5.73(0.06)	5.61(0.06)	5.03(0.11)	6.64(0.11)	5.19(0.11)	0.00(0.00)	4.36(0.19)	7.43(0.16)	7.69(0.02)
LM3	Verano	8.50(0.10)	7.65(0.05)	8.13(0.05)	8.22(0.26)	0.00(0.00)	8.43(0.04)	7.40(0.11)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	8.48(0.05)	8.19(0.04)
	Invierno	8.50(0.06)	7.50(0.01)	7.88(0.07)	8.27(0.06)	4.62(0.21)	9.43(0.07)	7.32(0.05)	3.00(0.00)	3.53(0.08)	8.61(0.16)	8.56(0.04)
LM4	Verano	7.46(0.06)	6.89(0.01)	8.46(0.05)	7.61(0.00)	5.64(0.05)	7.74(0.06)	7.78(0.03)	0.00(0.00)	4.61(0.08)	7.67(0.09)	7.90(0.03)
	Invierno	7.58(0.03)	6.72(0.02)	7.56(0.06)	7.46(0.07)	5.22(0.07)	8.58(0.02)	7.57(0.10)	3.00(0.00)	4.22(0.07)	7.84(0.01)	8.47(0.08)

^A Lugares donde se realizó el muestreo

^B Media (Desviación estándar)

6.2 Identificación Genética

6.2.1 Análisis de la temporada verano.

Las muestras de quesos recolectados en el mes de julio (verano) de 2014, fueron recolectadas todas en un mismo día. La temperatura para los diferentes lugares de muestreo estuvo entre los 36-40°C.

A las 11 muestras de quesos frescos recolectadas de los diferentes lugares durante el verano se les extrajo el ADN. Posteriormente se les realizó una amplificación por la técnica de PCR utilizando la Go Taq Green Master Mix (Promega), logrando así una amplificación de aproximadamente 450 pb, observándose fragmentos inespecíficos, usando los oligos B=G+ y G17. Representadas en la Figura 17.

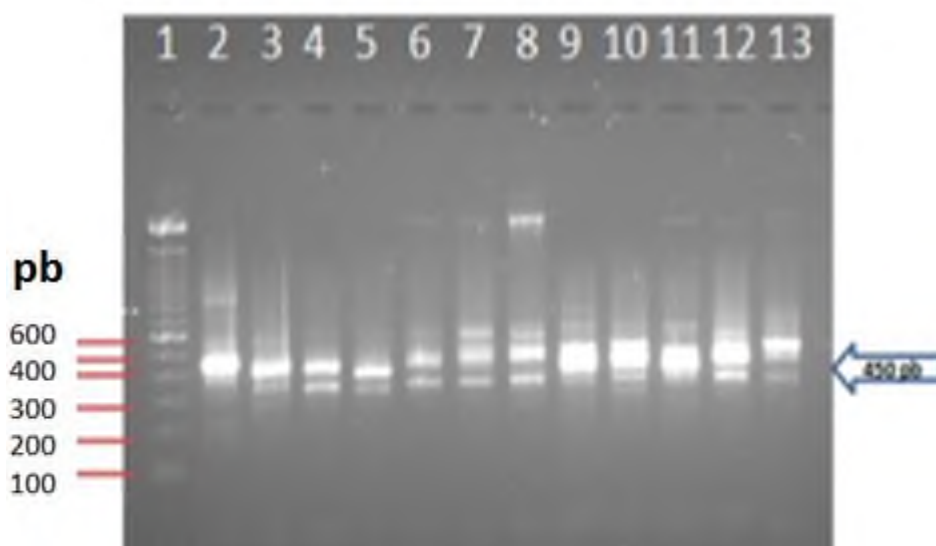


Figura 17. Gel de Electroforesis en agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio de los amplicones de las muestras de queso fresco de la temporada de verano. 1) Marcador de peso molecular 1000 pb 1.5 μ l (100 ng/ μ l). 2) Control positivo 10 μ l. 3) Tux1 10 μ l. 4) Tux2 10 μ l. 5) Chiltepec 10 μ l. 6) LB1 10 μ l. 7) LB2 10 μ l. 8) LB3 10 μ l. 9) LB4 10 μ l. 10) BJ1 10 μ l. 11) BJ2 10 μ l. 12) BJ3 10 μ l. 13) BJ4 10 μ l. Imagen analizada con ImageJ.

Se realizó la PCR con los oligonucleótidos F=G17-CG y B=GplusR para DGGE. En la Figura 18, se muestra el perfil de bandeo de las poblaciones bacterianas. Cada banda representa a una especie bacteriana. Posteriormente, los perfiles de cada comunidad fueron asociados en grupos mediante el cálculo de una matriz de distancias euclidianas con ayuda del del software BioNumerics (versión 6.6; Applied Maths, Austin Tx)

utilizando la técnica UPGMA, donde se generó un dendograma como resultado del análisis de distancias y mediante porcentajes de semejanza (indicados en los nodos de cada grupo).

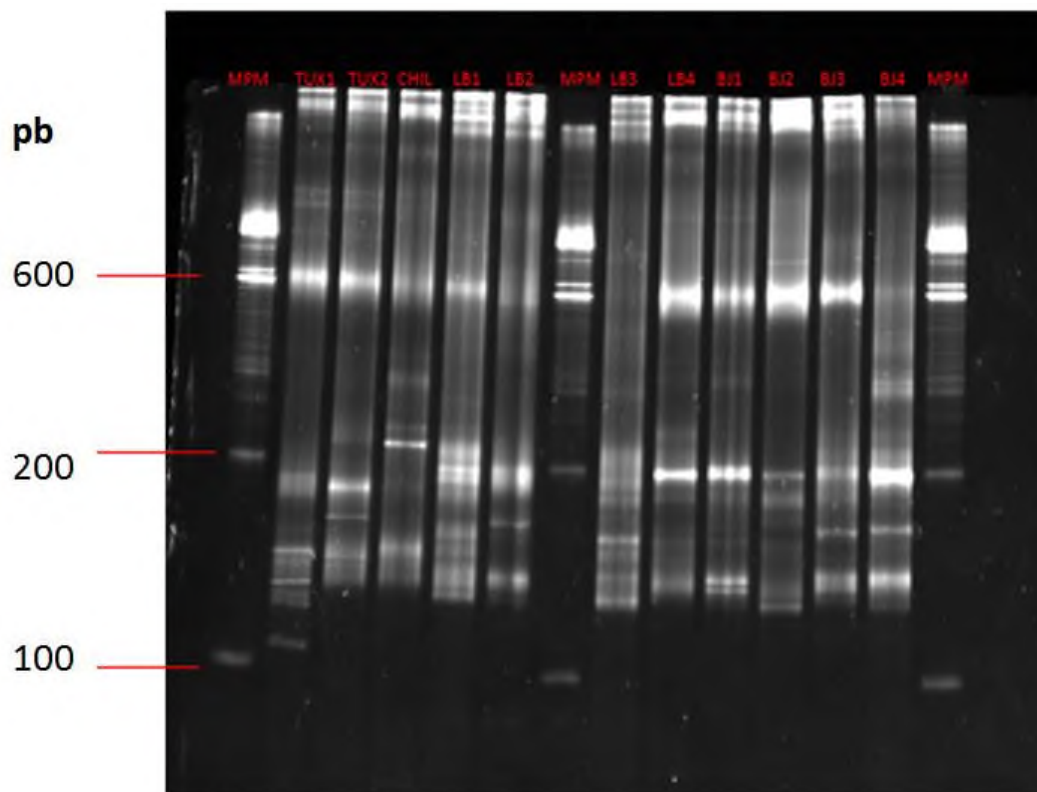


Figura 18. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización al 8% (35%-60%) teñido con SYBR Green I nucleic acid gel stain (Invitrogen™). Vistos con un fotodocumentador de luz UV ImagenQuant 300 (General Electric). Los amplicones corridos fueron obtenidos con las muestras de ADN provenientes de quesos frescos artesanales recolectados en verano.

En la Figura 19 se muestra el dendograma obtenido mediante el cálculo de distancias euclidianas, donde, se aprecia que las agrupaciones se dieron siendo la principal fuente de variación el lugar de origen y modo de preparación, indicados en los nodos formados se muestra el porcentaje de semejanza.

Con los resultados se mostró que, los perfiles originados de las muestras recolectadas en Tuxtepec (TUX1, TUX2) fueron los más parecidos formando un grupo con 66.7% de semejanza, es decir, que en estos dos puntos de muestreo la mayor parte de su diversidad microbiana influyo el lugar de origen y su modo de preparación sobre su diversidad. Para las demás muestras, se vieron más relacionadas entre ellas con un

50.9% de semejanza, donde se formaron grupos y subgrupos. Además de que fueron diferentes al primer grupo con un 43.2 % de semejanza. Estos resultados nos indican que para el resto de las muestras, el lugar de origen y modo de preparación no influye sobre su diversidad bacteriana.

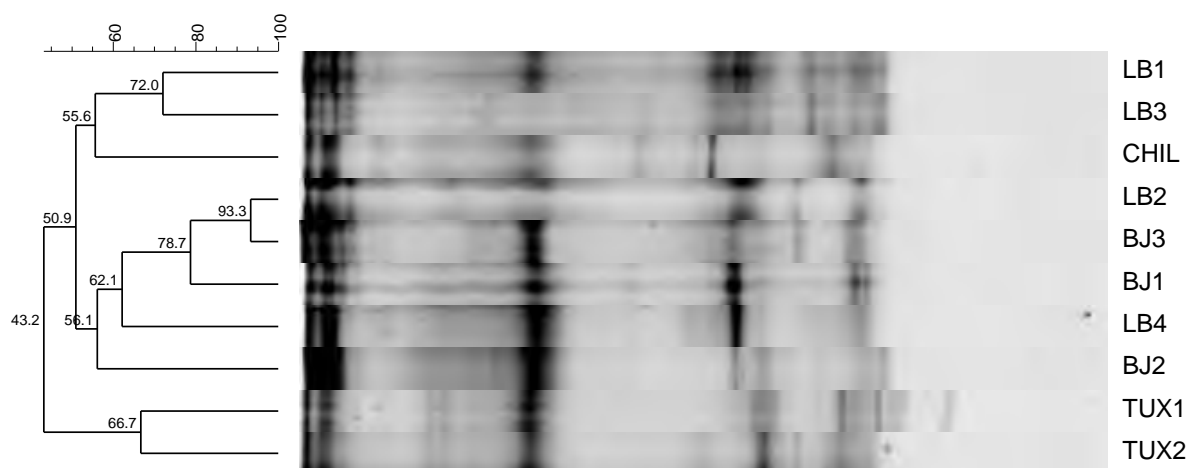


Figura 19. Dendrograma (software BioNumerics versión 6.6; Applied Maths, Austin Tx, utilizando la técnica UPGMA,) de análisis mediante PCR-DGGE de las comunidades bacterianas presentes en los quesos frescos artesanales recolectadas en verano.

Posteriormente, se analizó el gel de PCR-DGGE (Figura 18), donde se eligieron las bandas de interés con base a la intensidad del bandeo o bien a la presencia de algunas bandas sólo en algunas muestras. El ADN contenido de las bandas seleccionadas mostradas en la Figura 20, se reamplificarón con el mismo par de nucleótidos.

Del total de bandas seleccionadas, las número 15, 17, 18, 21, 22, 23 y 26 no se secuenciaron debido a que no se llegó a la concentración y pureza adecuada para su secuenciación. En total se secuenciaron 19 bandas.

A cada secuencia obtenida se le hizo el ensamble de los productos *forward* y *reverse*, obteniendo las secuencias consenso. En anexo 2, se muestran las secuencias obtenidas.

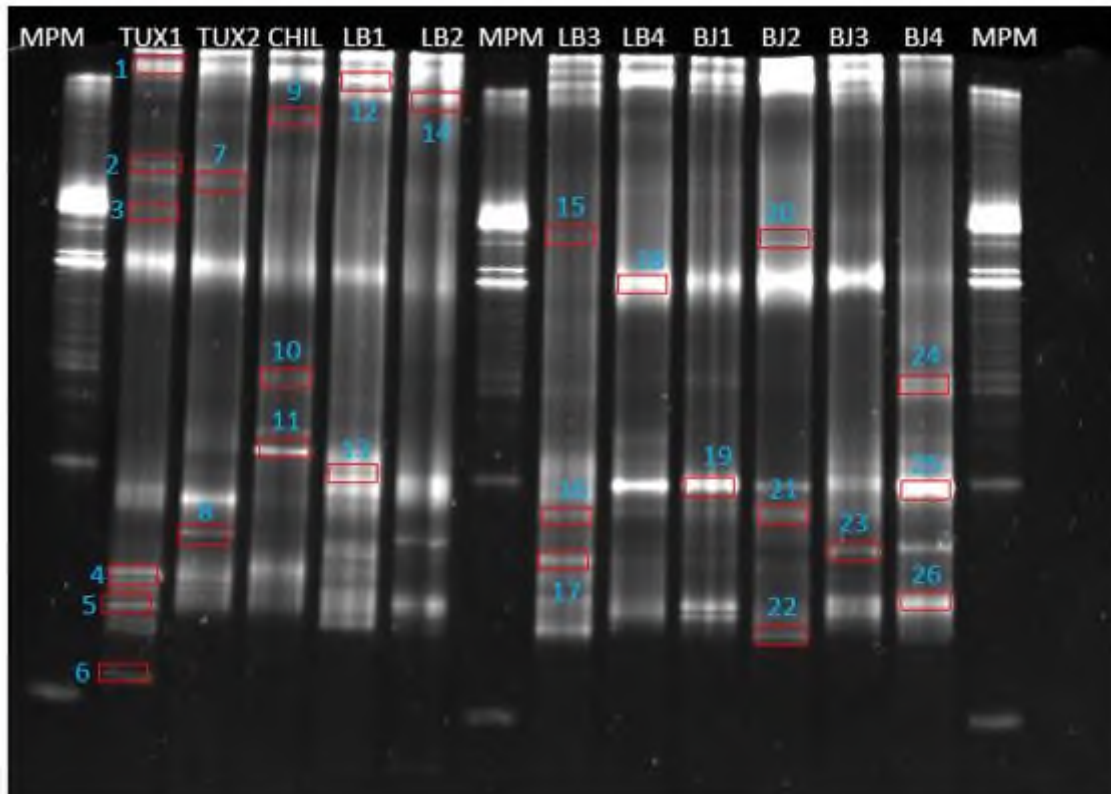


Figura 20. Bandas seleccionadas del gel en DGGE, vistas con ayuda del software BioRad. Los amplicones corridos fueron obtenidos con las muestras de los quesos frescos artesanales recolectados en verano.

En resultados encontrados en la base de datos del GenBank (Tabla 4), se encontró variedad en microorganismos, donde se localizaron *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Deinococcus*, *Enterobacter* y *Halobacteroides*, *Holoterrigena* y *Salmonella*.

De acuerdo con Klaenhammer *et al.*, (2002), los principales géneros del grupo de las BAL presentes en el queso son los *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Streptococcus*. Comparados con nuestros resultados se encontraron estos microorganismos en las muestras de quesos frescos artesanales.

Carrasco *et al.*, (2002) aislaron 27 cepas BAL a partir de quesos artesanales y comerciales, 9 de las cepas mostraron actividad antimicrobiana que deterioran la leche, el queso y otros alimentos. Dentro de esas nueve se encuentran *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Lactococcus* principalmente. *Lactococcus lactis* localizada con el número de banda 13 en la muestra LB1, tiene un gran interés industrial debido a que produce nisina. La nisina es una bacteriocina, que actualmente es la única aprobada por

la FDA, para incluirse en alimentos, para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos (Klenhamer, 1988; Martin del Campo *et al.*, 2008). Sin embargo, se han aislado otras bacteriocinas de otros géneros de bacterias ácido lácticas como, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus helveticus* (Martin del Campo *et al.*, 2008). En el análisis de las secuencias también se localizó *Salmonella entérica*, es una bacteria de origen patógeno responsable de infecciones en humanos y animales domésticos (Porwollik *et al.*, 2004).

Tabla 4. Marcadores de referencia obtenidos en la base de datos del GenBank.

No. de banda DGGE	Identificación taxonómica	% de similitud	No. de acceso
1	<i>Haloterrigena saccharevitans</i> strain JCM 12889 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100	NR_113512.1
2	<i>Pediococcus lolii</i> strain NGRI 0510Q 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99	NR_041640.1
3	<i>Halobacteroides halobius</i> strain DSM 5150 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99	NR_102480.1
4	<i>Streptococcus salivilyoxodontae</i> strain NUM 6306 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100	NR_126178.1
5	<i>Deinococcus peraridilitoris</i> strain DSM 19664 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	92	NR_102475.1
6	-		
7	<i>Pediococcus lolii</i> strain NGRI 0510Q 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99	NR_041640.1
8	<i>Leuconostoc rapi</i> strain LMG 27676 16S ribosomal RNA, partial sequence	98	NR_136799.1
9	<i>Streptococcus oligofermentans</i> strain AS 1.3089 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100	NR_103943.1
10	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CIP 102980 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	96	NR_104927.1
11	<i>Streptococcus oligofermentans</i> strain AS 1.3089 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100	NR_194033.1
12	<i>Pediococcus lolii</i> strain NGRI 0510Q 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100	NR_041640.1
13	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>tractae</i> strain L105 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	82	NR_116443.1
14	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> strain ATCC 15305 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	94	NR_074999.1
16	<i>Enterobacter aerogenes</i> strain KCTC 2190 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100	NR_102493.1
19	<i>Enterococcus faecalis</i> strain LMG 7937 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	91	NR_114782.1
20	<i>Streptococcus oligofermentans</i> strain AS 1.3089 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100	NR_103943.1
24	<i>Enterococcus hirae</i> strain ATCC 9790 16S ribosomal RNA	100	NR_075022.1

25	gene, complete sequence <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium strain LT2 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100	NR_074910.1
----	---	-----	-------------

Las secuencias originales sin hacerle algún cambio, fueron analizadas usando el Secuencer 5.3 (gene code corp, Ann Arbor, MI) y comparadas a las secuencias disponibles en el GenBank usando el programa BLASTN en el NCBI (National Center for Biotechnoly Information) Figura 21. Fueron analizadas de acuerdo con los resultados mostrados en el gel de los productos de DGGE.

En este análisis se observa la variedad de microorganismos por cada muestra localizados en diferentes puntos geográficos de la región de la cuenca del Papaloapan. La bacteria predominante en todas las muestras fue *Halobacteria sp.* excepto en BJ4 y BJ2, sus concentraciones en las muestras fue del 10% al 22%. Su predominio se debe a que crecen en medios salados con temperaturas de 42°C (DasSarma, *et al.* 2006). *Provatella ruminicola* se encontró en la mayoría de las muestras en excepción de TUX1, TUX2 Y CHIL, con concentraciones de 10-15%. *P. ruminicola* es una de las bacterias que lleva a cabo la digestión de las pectinas mediante un proceso fermentativo (Dehority, 1969). La pectina representa del 10 al 20% del total de los carbohidratos que conforman los principales forrajes utilizados en nutrición de rumiantes. La presencia de estas bacterias se asocia con la alimentación del ganado y su producción de leche. Se encontró el género *Mogibacterium sp.* en las muestras de TUX1, TUX2 Y CHIL con porcentajes de 10 a 15 de concentración. Estas bacterias están asociadas a enfermedades bucales moderadas y severas, encontradas en cavidades bucales (incluida la placa dental), lesiones periodontales, infecciones dentales y dentina cariosa (Nakazawa *et al.*, 2000). *Sphingopyxis sp.* se encontró en 8 muestras (CHIL, TUX1, TUX2, BJ2, BJ3, BJ4, LB3 y LB4), estas bacterias se pueden encontrar en una variedad de ambientes, como en aguas saladas, composta, aguas residuales y en aguas contaminadas con hexaclorociclohexano. Es de interés industrial, debido a que este género es capaz de degradar compuestos de hidrocarburos aromáticos mono y policíclicos (Kim J. *et al.*, 2014). También se localizaron géneros lácticos como *Streptococcus*, y *Pediococcus* (Stiles y Holzapfel, 1997). Algunos otros géneros encontrados en menor porcentaje como *Proteus*, *shimia*, *Rhizophyidium*, *Psudomonas*, *Halocella*, *Longilinea*, *Myxococcus*, *Nannocystis*, *Phormidium*, *Serratia* y *Sorangium*.

La mayoría de estos géneros se transmiten la manipulación de los quesos, desde la leche cruda hasta el producto final.

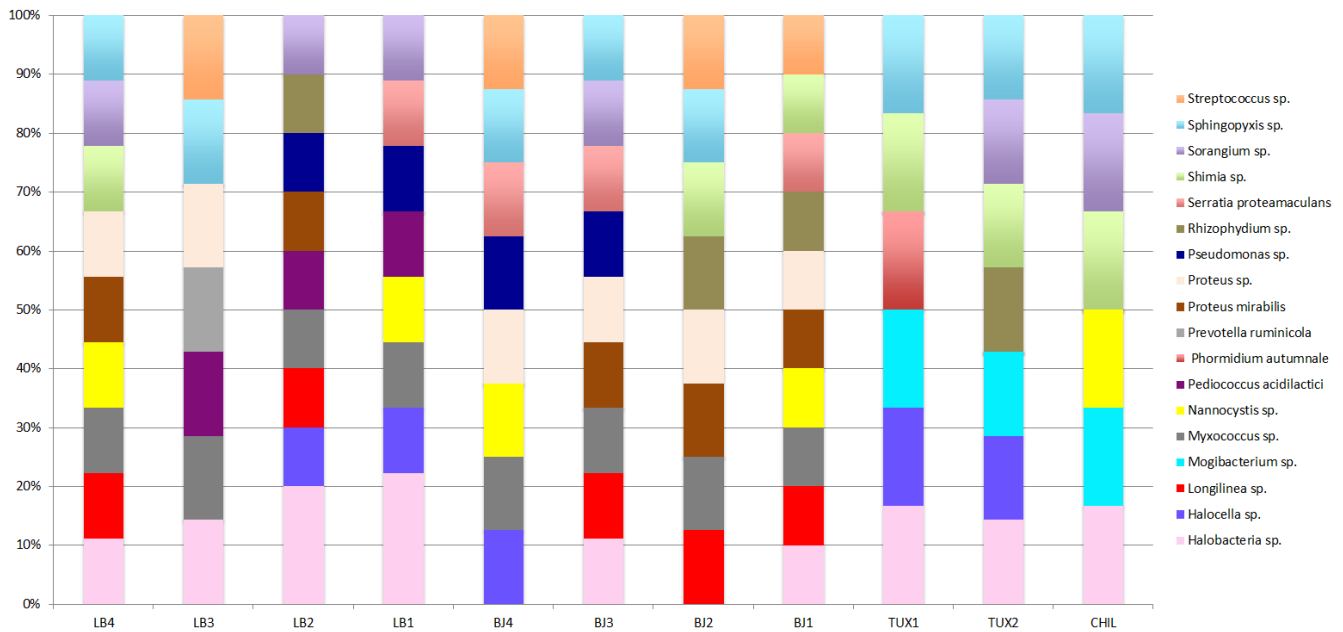


Figura 21. Bacterias encontradas en las muestras de quesos usando el Secuencer 5.3.

En la Figura 21 se puede distinguir que las muestras BJ1, BJ3, LB1, LB2 y LB4 tienen el mayor número de población microbiana, donde, se pueden encontrar las bacterias lácticas así como muchos patógenos generados desde la manipulación de la leche cruda y durante el proceso del producto final. Las muestras LB3 y LB4 cuentan con una diversidad intermedia y las TUX1, TUX2 y CHIL son las de menor número de diversidad, dentro de su diversidad también se encuentran bacterias lácticas y patógenas. Esto se puede ver reflejado a que las bandas de estas muestras contaban con menos intensidad y que no se llegara a la concentración adecuada para ser secuenciada.

6.2.2 Análisis de la temporada invierno.

Las muestras de quesos recolectados en el mes de enero (invierno) de 2015, fueron recolectadas todas en un mismo día. La temperatura para los diferentes lugares de muestreo estuvo entre los 27-31°C.

A las 11 muestras de quesos frescos recolectadas de los mismos lugares anteriormente analizados pero ahora durante el invierno se les extrajo el ADN. Posteriormente se les realizó una amplificación por la técnica de PCR utilizando la Go Taq Green Master Mix (Promega), logrando así una amplificación de aproximadamente entre 300 y 450 pb, observándose fragmentos inespecíficos, usando los oligos B=G+ y G17. Representadas en la figura 22.

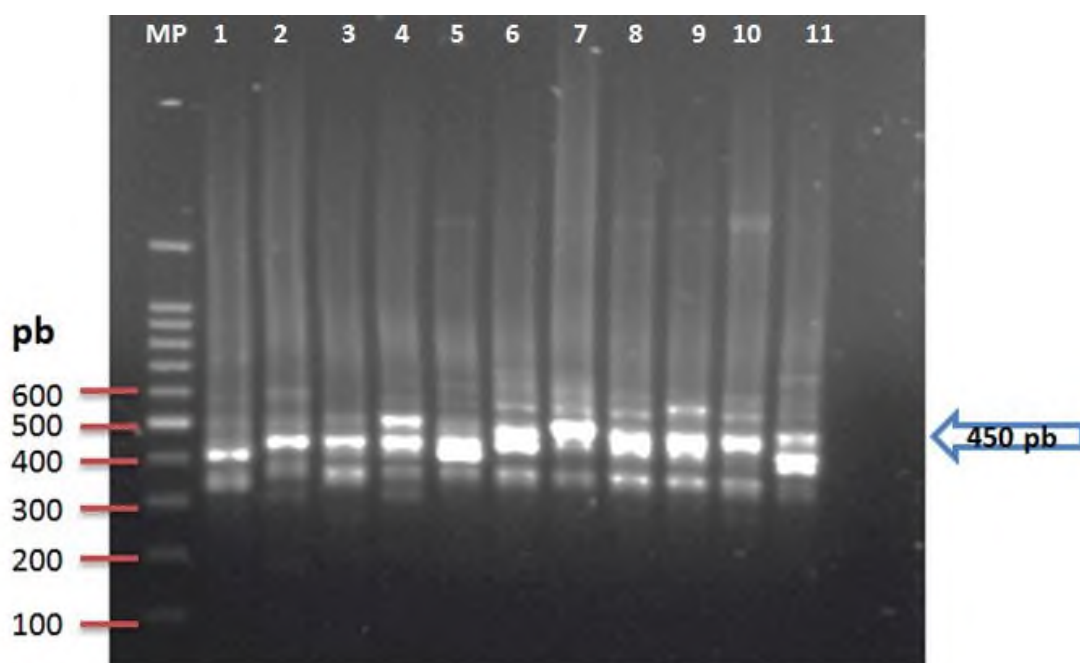


Figura 22. Gel de Electroforesis en agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio de los amplicones de las muestras de queso fresco de la temporada de invierno. MP) Marcador de peso molecular 1000 pb 1.5 μ l (100 ng/ μ l). 1) Chiltepec 10 μ l. 2) Tux1 10 μ l. 3) Tux2 10 μ l. 4) BJ1 10 μ l. 5) BJ2 10 μ l. 6) BJ3 10 μ l. 7) BJ4 10 μ l. 8) LB1 10 μ l. 9) LB2 10 μ l. 10) LB3 10 μ l. 11) LB4 10 μ l. Imagen analizada con ImageJ.

Se realizó la PCR con los oligonucleótidos F=G17-CG y B=GplusR para DGGE. En la Figura 23, se muestra el perfil de bandeo de las poblaciones bacterianas. Cada banda representa a una especie bacteriana. Posteriormente, los perfiles de cada comunidad fueron asociados en grupos mediante el cálculo de una matriz de distancias euclidianas con ayuda del del software BioNumerics (versión 6.6; Applied Maths, Austin Tx)

utilizando la técnica UPGMA, donde se generó un dendograma como resultado del análisis de distancias y mediante porcentajes de semejanza (indicados en los nodos de cada grupo).

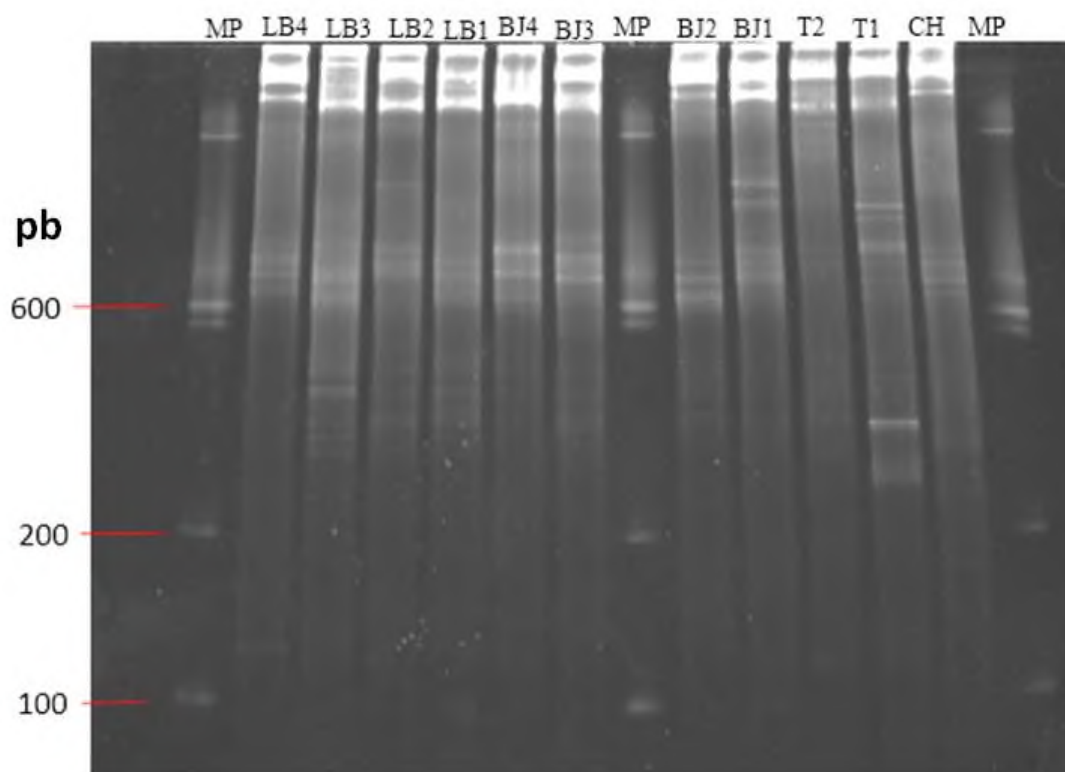


Figura 23. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización al 8% (35%-60%) teñido con SYBR Green I nucleic acid gel stain (Invitrogen™). Vistos con un fotodocumentador de luz UV ImagenQuant 300 (General Electric). Los amplicones corridos fueron obtenidos con las muestras de ADN provenientes de quesos frescos artesanales recolectados en invierno.

En la Figura 24 se muestra el dendograma obtenido mediante el cálculo de distancias euclidianas, donde, se aprecia que las agrupaciones se dieron siendo la principal fuente de variación el lugar de origen y modo de preparación, indicados en los nodos formados se muestra el porcentaje de semejanza.

En los resultados muestran dos grupos, el perfil originado por la muestra TUX1 con un 40.8% de semejanza al resto de las muestras.

Para las demás muestras, se vieron más relacionadas entre ellas con un 57.1% de semejanza, donde se formaron grupos y subgrupos. Estos resultados nos indican que las

muestras, el lugar de origen y modo de preparación influye sobre su diversidad bacteriana.



Figura 24. Dendrograma (software BioNumerics versión 6.6; Applied Maths, Austin Tx, utilizando la técnica UPGMA,) de análisis mediante PCR-DGGE de las comunidades bacterianas presentes en los quesos frescos artesanales recolectadas en invierno.

Se analizó el gel de PCR-DGGE (Figura 23), donde se eligieron las bandas de interés con base a la intensidad del bandeo o bien a la presencia de algunas bandas sólo en algunas muestras. El ADN contenido de las bandas seleccionadas mostradas en la Figura 25, se reamplificarón con el mismo par de nucleótidos.

Del total de bandas seleccionadas, las numero 1, 3, 8, 13, 16, y 18 no se secuenciaron debido a que no se llegó a la concentración y pureza adecuada para su secuenciación. En total se secuenciaron 11 bandas.

A cada secuencia obtenida se le hizo el ensamble de los productos *forward* y *reverse*, obteniendo las secuencias consenso. En el anexo 3, se muestran las secuencias obtenidas.

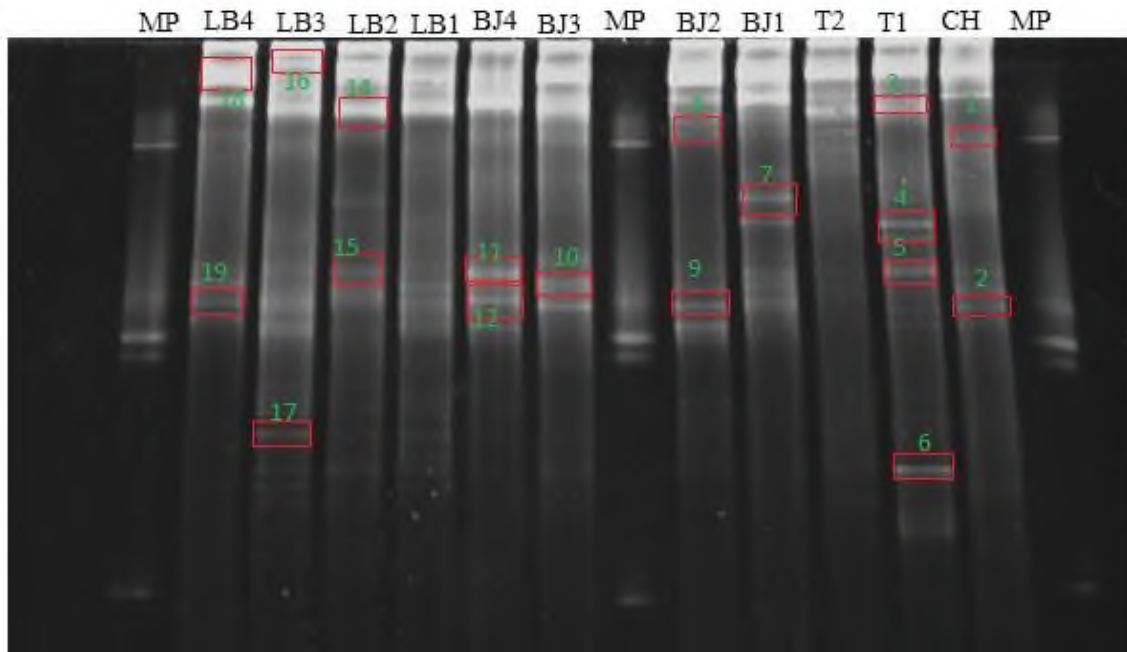


Figura 25. Bandas seleccionadas del gel en DGGE, vistas con ayuda del software BioRad. Los amplicones corridos fueron obtenidos con las muestras de los quesos frescos artesanales recolectados en invierno.

En resultados encontrados en la base de datos del GenBank se encontró variedad en microorganismos predominando la flora láctica, y se identificaron los siguientes microorganismos: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Salmonella*.

De acuerdo con Klaenhammer *et al.*, (2002), los principales géneros del grupo de las BAL presentes en el queso son los *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Streptococcus*. Comparados con nuestros resultados se encontraron la estos microorganismos en las muestras de quesos. *Lactococcus* y *Streptococcus* fueron las más representativas en el perfil de DGGE de las muestras de quesos. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* fueron las bacterias localizadas en dos puntos de muestreo y de las más extendidas. Estas bacterias son capaz de producir lactococcina G, son bacteriocinas que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (Martin del Campo *et al.*, 2008), podrían ser propuestas como iniciadores para la producción de queso.

Tabla 6. Marcadores de referencia obtenidos en la base de datos del GenBank.

No. de banda DGGE	Identificación taxonómica	% de similitud	No. de acceso
2	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i> strain 01A030 16S ribosomal RNA, partial sequence	82	NR_134062.1
4	<i>Pediococcus lolii</i> strain NGRI 0510Q 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	92	NR_041640.1
5	<i>Leuconostoc kimchii</i> strain IMSNU 11154 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	93	NR_075014.1
6	<i>Streptococcus oligofermentans</i> strain AS 1.3089 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	97	NR_103943.1
7	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strain NBRC 100676 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	82	NR_113925.1
9	<i>Enterobacter aerogenes</i> strain KCTC 2190 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100	NR_102493.1
10	<i>Enterococcus hirae</i> strain ATCC 9790 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100	NR_075022.1
11	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium strain LT2 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100	NR_074910.1
12	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strain NBRC 100676 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100	NR_113925.1
14	<i>Streptococcus oligofermentans</i> strain AS 1.3089 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	92	NR_103943.1
15	<i>Staphylococcus pseudolugdunensis</i> strain B006 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100	NR_115938.1
17	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strain NBRC 100676 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94	NR_113925.1
19	<i>Bacillus coagulans</i> strain NBRC 12583 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	NR_041523.1

Las secuencias originales sin hacerle algún cambio, fueron analizadas usando el Secuencer 5.3 (gene code corp, Ann Arbor, MI) y comparadas a las secuencias disponibles en el GenBank usando el programa BLASTN en el NCBI (National Center for Biotechnoly Information) Figura 26. Fueron analizadas de acuerdo con los resultados mostrados en el gel de los productos de DGGE.

En este análisis se observa la variedad de microorganismos por cada muestra localizados en diferentes puntos geográficos de la región de la cuenca del Papaloapan. La bacteria predominante en todas las muestras fue *Bacillus sp.* con un 30-50% de su concentración. La presencia de *Bacillus sp.* en las muestras de queso estar relacionado con la presencia de multicopias del 16S rRNA gen para estos microorganismos como se informó en otros estudios (Dahllof *et al.*, 2000, Cocolin *et al.*, 2004, 2007).

Seguidas de *Aqueabacterium sp* encontradas en la mayoría de las muestras excepto de LB4 y CHIL. *Aqueabacterium sp* han sido encontradas en agua potable (Kalmbach, 1999). *Klebsiella*, *Wautersiella* y *Serratia* se encontraron en CHIL, TUX1, TUX2, BJ1, BJ2, BJ3, LB1, LB2 y LB3. Estas bacterias pueden infectar los sistemas urinario o respiratorio, incluso neumonía (Podschn, 1998). *Candidatus sp.* se encontró en las muestras de TUX2 y BJ1, en concentraciones de 10%. Esta bacteria puede usarse cuando es bien caracterizada debido a que no es cultivable (Murray, 1995). En la muestra LB4 con el 30% de concentración se encontró *Ruminococcus sp.*, también se localizaron en las muestras LB2, LB4 y TUX2 pero en menor concentración. Esta bacteria es de clase *Clostridia*, se encuentran en cantidades significativas en los intestinos de los seres humanos (Liu *et al.*, 2008). *Myxococcales sp.* se presentó LB4, LB3, LB1, BJ4 y BJ3, estas bacterias viven en sitios ricos en materia orgánica como suelos, estiércol, excrementos de animales y restos vegetales. Además son capaces de degradar polisacáridos como la celulosa y quitina (Kiskowski *et al.*, 2004).

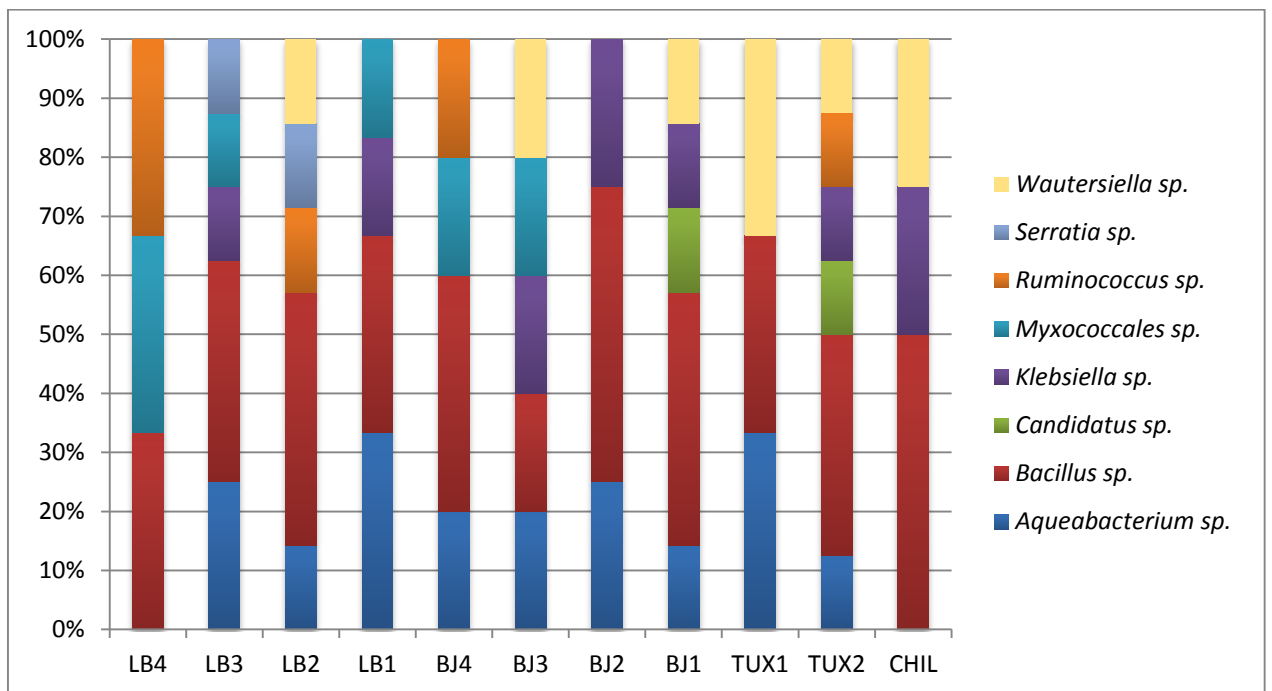


Figura 26. Bacterias encontradas en las muestras de quesos usando el Secuencer 5.3.

El presente estudio se demostró que las principales bacterias ácido lácticas de la diversidad microbiana asociados al queso fresco de la región de la Cuenca del Papaloapan fueron: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Streptococcus*. Otros como *Klebsiella*, *Salmonella*, y otros grupos también se identificaron en algunas muestras y su presencia podría estar asociada a las menores condiciones higiénicas durante la ordeña y proceso de producción.

En los perfiles bacterianos de DGGE, las bandas identificadas con bacterias ácidos lácticas coinciden con la microbiana en medios de cultivos selectivos para las muestras de verano e invierno. En invierno con excepción de *Lactobacillus*, no se coincide con la microbiana de *Lactobacillus* en medio agar MRS. Sin embargo, la selectividad de este medio es conocida a menudo determina y sobreestima el número de *Lactobacillus*, como se observa en otros (Ampe *et al.*, 1999, Randazzo *et al.*, 2002, Ercolini *et al.*, 2003; Dolci *et al.*, 2008).

En los resultados con las secuencias que no fueron modificadas, y que estuvieron vinculadas a los perfiles de DGGE, no coincidieron en los resultados obtenidos con los medios selectivos y las secuencias consenso. En los datos obtenidos por Secuencer 5.3 (gene code corp, Ann Arbor, MI) están más dirigidos a patógenos.

VIII. CONCLUSIONES

En general, todas las muestras se encontraban con grandes cargas microbianas. En los análisis estadísticos se encontró que la flora patógena rebasaba los valores límite de carga microbiana establecida por la norma, por lo que estos quesos no estaban aptos para el consumo humano. El recuento de microorganismos indicó una gran diversidad microbiana de importancia industrial principalmente las bacterias ácido lácticas. Las técnicas moleculares aplicadas al análisis de los quesos frescos artesanales permitieron identificar microorganismos presentes en las muestras. La base de datos del GenBank permitió identificar los microorganismos presentes en la población, en la que predominaron las BAL de las que fueron identificadas principalmente *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, y *Enterococcus*. Estas bacterias fueron encontradas tanto en la temporada invierno como verano. Además se identificaron coliformes totales como la *Salmonella*, *Klebsiella* y otros grupos de origen patógeno. En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio permitieron la identificación de especies microbianas tales como *L. lactis* que están relacionadas con la producción de este queso artesanal. Para las diferencias entre las temporadas verano e invierno, las muestras reveladas en medios de cultivos independientes fueron muy parecidas mientras que el método PCR-DGGE, mostraron perfiles bacterianos específicos para cada muestra en las dos temporadas, donde no se vio una variabilidad de diversidad entre microorganismo. Las temporadas y el lugar de procedencia parecen no afectar la microbiota ni las características típicas de este producto. Los estudios con métodos complementarios demostraron ser muy útiles para obtener información sobre la microbiota del queso fresco artesanal.

IX. PERSPECTIVAS

Este trabajo presenta las bases para el aislamiento y la identificación de BAL, esto da pie para actividades:

Seleccionar las cepas bacterianas benéficas que dan las características sensoriales del queso fresco artesanal y usarlas como cultivo iniciador en el proceso del queso con leche pasteurizada.

Determinar la capacidad antagónica de las cepas lácticas aisladas, en contra de los patógenos.

Producción de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas para la industria de los alimentos, debido al interés de utilizar conservadores biológicos como lo demandan los consumidores y por el interés de los industriales de emplear estas sustancias como una biotecnología relativamente económica, factible de aplicarse a diversos alimentos que requieren de procesos de fermentación.

X. BIBLIOGRAFIA

- Alais Ch. (1985). Ciencia de la leche. Ed. Reverté. España.
- Ampe, F., Omar, N.B., Moizan, C., Wachter, C., Guyot, J. (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. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5464–5473.
- Bedoya, G., Carvajal, L.G., Bermúdez, N.R., Moreno F.L., Márquez M.E., Davies S., Derr J., Ossa J.E., y Ruíz A. (2001). Estructura molecular y poblacional del ganado criollo colombiano (GCC). *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias* 14(2):109-120.
- Bonetta, S., Bonetta S., Carraro E., Rantsiou K. y Cocolin L. (2008). Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano Cheese using PCR-DGGE. *Food Microbiology* 25:786-792.
- Bécquer, A., Leyva V., Lara, C. y Mota L. (1997). *Staphylococcus aureus*, actividad termonucleasa y enterotoxinas en alimentos. *Rev Cubana Aliment Nutr*;11(2):89–9.
- Carrasco, M.S., Scarincini, H.E. y Simonetta A.C. (2002). Antibacterial Activity of Lactic Acid bacteria Isolated from Argentinian Dairy Products. *The Australian Journal of Dairy Technology*. Vol. 57. No. 1, 15-19.
- Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M. y Comi, G. (2004). The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 83–91.
- Cocolin, L., Diez A., Urso, R., Rantsiuo, K., Comi, G., Bergmaier, I. y Beimfohr, C. (2007). Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods. *Int Journal of Food Microbiology* 120:100-109.
- Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R. y Rantsiou, K. (2013). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *Int Juornal of Food Microbiology* 167:29-43.
- Cruz-Nolasco, A. (2014). Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus thuringiensis* productoras de proteína Cry. Tesis profesional, UNPA campus Tuxtepec.
- Cortés-López, N., Montor-Antonio, J., Olvera-Carranza, C., Peña-Castro, J. y Del Moral-Ventura, S. (2014). Metagenómica: una ventana de oportunidad a nuevos

genes y genomas microbianos. Revista Iberoamericana de Ciencias. Vol.1.No.7. ISSN 2334-250.

- Cogan, T.M. (2000). Cheese microbiology. En: Fundamentals of Cheese Science, Eds: P.F. Fox, T. Ginee, T.M. Cogan y P.L.H. McSweeny. Gaithersburg: Aspen publishers.
- Cowan, D., Russell, N., Mamais, A. y Sheppard, D. (2002). Antarctic dry valley mineral soils contain unexpectedly high levels of microbial biomass. *Extremophiles* 6:431-436.
- Chang, H.W., Kim, K.H., Nam, Y.D., Roh, S.W., Kim, M.S., Jeon, C.O., Oh, H.M. y Bae, J.W. (2008). Analysis of yeast and archeal population dynamics in kimchi using denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 126:159-166.
- DasSarma, S., Berquist, B.R., Coker, J.A., DasSarma, P. y Müller, J.A. (2006). Post-genomics of the model haloarchaeon *Halobacterium sp.* NRC-1. *Saline systems* 1448-2-3.
- Dahllof, I.H., Baillie, H. y Kjelleberg, S. (2000). RpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3376–3380.
- Dolci, P., Alessandria, V., Zeppa, G., Rantsiou, K. y Cocolin, L. (2008). Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiol* 25, 392–399.
- Dolci P., Zenato S., Pramotton R., Barmaz A., Alessandria V., Rantsiou K. y Cocolin L. (2013). Cheese surface microbiota complexity: RT-PCR-DGGE, a tool for a detailed picture?. *Int Journal of Food Microbiology* 162:8-12.
- Ercolini, D., Hill P.J. y Dodd E.R. (2003). Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 69:3540-3548.
- Escalante-Lozada, A., Gosset-Lagarda, G., Martínez-Jiménez, A. y Bolívar-Zapata, F. (2004). Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas (Soil bacterial diversity: microbial culture-independent methods of study and biotechnological implications). *Agrociencia* 38:583-592.

- Ferrer, M. (2004). Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables. *Actualidad Sociedad Española de Microbiología* 38:11-17.
- Fernández-Regatillo, M. (1990). Principios Básicos para la Fabricación de Quesos. *Revista del ministerio de Agricultura, pesca y Alimentación S.A. Madrid.*
- Fischer, S.G. y Lerman, L.S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 80:1579-1583.
- Fox, P.F. (1993). *Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol. 1. Elsevier applied science. Estados Unidos.*
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A. y Merrick, J.M. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*. 269:496-512.
- Flórez, A.B. y Mayo, B. (2006). Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology* 110:165-171.
- Grappin, R. y Beuvier, E. (1997). Possible implications of milk pasteurization on manufacture and sensory quality of ripened cheese. *Int Dairy J* 7:751-761.
- Guinane, C.M., Cotter, P.D., Hill, C. y Ross, R.P. (2005). Microbial solutions to microbial problems: Lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology* 98:1316-1325.
- Godálová, Z., Kraková, L., Puškárová, A., Bučková, M., Kuchta T., Píknová, L. y Pangallo, D. (2016). Bacterial consortia at different wine fermentation phases of two typical Central European grape varieties: Blaufränkisch (Frankovka modrá) and Grüner Veltliner (Veltínske zelené). *International Journal of Food Microbiology*, 217, 2016, pp. 110–116. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.015.
- Handelsman, J., Liles, M., Mann, D., Riesenfeld, D. y Goodman, R. M. (2002). Cloning the metagenome: culture-independent access to the diversity and functions of the uncultivated microbial world. *Methods in Microbiology* 33:241-255.

- Harrigan, W.F. (1988). Laboratory methods in food microbiology. 2da. Edition. Academic, San Diego, CA.
- Helander, I.M., Wright, A. y Mattila-Sandholm, T.M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. Trends in Food Science and Technology 8:147-150.
- Herrera, E.C. y Castellanos, F. (2007). Análisis metagenómico de la microbiota edáfica de la reserva de la biósfera de Calakmul. Revista electrónica ide@s del consejo de ciencia y tecnología del estado de Guanajuato 29:802-823.
- Lesk, A. M. 2002. Introduction to Bioinformatics. 1er ed. Editorial Oxford University Press Inc., New York.
- Leroy, F. y De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science and Technology 15:67-78.
- Liu, C., Finegold, S.M., Song Y. y Lawson, P. A. (2008). Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Society for General Microbiology. 58 (8): 1896–1902.
- Lyautey, E. Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols, J.L. y Garabetian, F. (2004). Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16s rDNA PCR-DGGE: Methodological settings and fingerprints interpretation. Water-Research 39:380-388.
- NMX-F-713-COFOCALEC-2014. Sistema producto leche - alimentos lácteos queso y queso de suero denominaciones, especificaciones y métodos de prueba.
- Maturin, L.J. y Peeler, J.T. (1998). Aerobic plate count. In USA FDA, Food and drug administration bacteriological analytical manual. 8th ed. (pp.3.01-3.10). AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Martín del Campo, C.I., Gómez, H.E., y Alaníz de la O, R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Vol. 6, Art. 5.
- Mostafa, R., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M. y Nyrén, P. (1996). Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. Analytical Biochemistry. 242: 84-89.

- Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. 2:317-322.
- Murray, R.G.E., Schleifer, K.H. (1994). Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 174-176.
- Nalbantoglu, U., Cakar, A., Dogan, H., Abaci, N., Ustek, D., Sayood, K. y Can, H. (2014). Metagenomic analysis of the microbial community in kéfir grains. *Food Microbiology* 41:42-51.
- Nakazawa, F., Sato, M., Poco, S. E., Hashimura, T., Ikeda, T., Kalfas, S., Sundqvist, G. y Hoshino, E. (2000). Description of *Mogibacterium pumilum* gen. nov., sp. nov. and *Mogibacterium vescum* gen. nov., sp. nov., and reclassification of *Eubacterium timidum* (Holdeman et al. 1980) as *Mogibacterium timidum* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 679–688.
- Neefs, J.M., Van de Peer, Y., Hendriks, L., De Wachter, R. (1990). Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 18:2237-317.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
- Kalmbach, S., Manz, W., Wecke, J. y Szewzyk, U. (1999). *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. *Int J Syst Bacteriol. Pt 2*:769-77.
- Kirk, L.J., Beaudette, L.A., Hart M., Moutoglou, P., Klironomos, J.M., Lee, H. y Trevors, J.T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58:169-188.
- Karnati, S.K.R., Sylvester, J.T., Ribeiro, C.V.D.M., Gilligan, L.E. y Firkins, J.L. (2009). Investigating unsaturated fat, monensin, or bromoethanesulfonate in continuous cultures retaining ruminal protozoa. I. Fermentation, biohydrogenation, and microbial protein synthesis¹. *J. Dairy. Sci.* 92:3849-3860.
- Keller, M. y Zengler, K. (2004). Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews Microbiology* 2:141-50.
- Kiskowski, M.A., Jiang, Y. y Alber, M.S. (2004). Role of streams in myxobacteria aggregate formation. *Phys Biol.* Dec;1(3-4):173-83.

- Kim, J., Kim, S.J., Kim, S.H., Kim, S. II., Moon, Y.J., Park, S.J., Kahng, H.Y. y Chung, Y.H. (2014). Draft Genome Sequence of *Sphingopyxis* sp. Strain MWB1, a Crude-Oil-Degrading Marine Bacterium. *Genome Announc.* 2(6): e01256-14.
- Klenhamer, T.R. (1988). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Biochimic.* 70: 337-349.
- Klaenhammer, T.R., Altermann, E., y Arigoni, F. (2002). Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:29-58.
- Konings, W.N., Kok, J., Kuipers, O.P. y Poolman, B. (2000). Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Current Opinion in Microbiology* 3:276-282.
- Peña-Castro, J.M., Gregorio-Ramírez, O. y Barrera-Figueroa, B.E. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación Química* 24(2):237-246.
- Peláez, C. y Requena, T. (2005). Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *Int Dairy J* 15:831-844.
- Podschun, R. y Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 11 (4): 589-603.
- Porwollik, S., Boyd, E.F., Choy, C., Cheng, P., Florea, L., Proctor, E. y McClelland, M. (2004). Characterization of *Salmonella enterica* Subspecies I Genovars by Use of Microarrays. *Journal of Bacteriology.* 186(17): 5883–5898.
- Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M. y Vaughan, E.E. (2002). Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1882-1892.
- Riesenfeld, C.S., Goodman, R.M., y Handelsman, J. (2004). Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environmental microbiology* 6:981-989.
- Rincon-Florez, V.A., Carvalhais, L.C. y Schenk, P.M. (2013). Culture-Independent Molecular Tools for Soil and Rhizosphere Microbiology. *Diversity* 5:581-612.
- Rodriguez, J.M., Martinez, M.I., Horn, N. y Dodd, H.M. (2003). Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int Journal of Food Microbiology* 80:101-116.
- Rondon, M.R., Goodman, R.M., y Handelsman, J. 1999. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends in Biotechnology* 17(10):403-409.

- Robinson, R.K. (1987). *Microbiología de Productos Lácteos*. Vol II. Editorial Acribia. Zaragoza- España. 1987.
- Sanger, F., Nicklen S. y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl. Acad. Sci.USA*, 74: 5463-5467.
- Schloss, P.D. y Handelsman, J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Current opinion in Biotechnology* 14:303-314.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.S. y Holt, J.G. (1986). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Stiles, M.E. y Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int Journal of Food Microbiology* 36:1-29.
- Técnicas de análisis microbiológico. (1984). Editorial Acribia. Métodos de prueba. Volumen1. Microorganismos de los alimentos.
- Temmerman, R., Huys, G. y Swings, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science and Technology* 15:348-359.
- Veisseyre, R. (1990). *Lactología Técnica*. 3ªEdición. Editorial Acribia España.
- Walter, J.G.W., Tannock, A., Tilsala-Timisjarvi, S., Rodtong, D.M., Loach, K., Munro y Alatosava, T. (2000). Detection and identification of gastrointestinal lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific pcr primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:297-303.
- Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 51(2):221-71.
- Woese, C.R., Stackebrandt, E., Macke, T.J. y Fox, G.E. (1985). Aphylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst Appl Microbiol.* 6:143-51.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Recuentos de microorganismos en placa temporada Verano

A las 24 horas de incubación

Staphylococcus aureus (BP) 30°C																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Disolucion	-3	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	120	132	354	361	incontable	incontable	211	219	54	49	incontable	incontable	241	234
	-4	353	321	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	81	67	123	98	370	341	36	41	10	11	incontable	incontable	105	93
	-5	82	90	107	120	incontable	incontable	incontable	incontable	13	6	81	63	65	58	16	19	1	1	109	86	32	26
	-6	10	9	24	26	79	93	70	61	2	2	15	11	16	15	0	1	1	0	38	27	2	3
	-7	0	3	5	6	10	16	12	11	0	0	4	1	0	8	0	0	0	0	2	3	2	1
	-8	0	0	0	2	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0

Enterococcus (KAA) 37°C																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Disolucion	-3	incontable	incontable	312	289	incontable	incontable	incontable	incontable	10	12	incontable	incontable	incontable	incontable	98	120	3	5	incontable	incontable	230	213
	-4	118	128	136	149	incontable	incontable	363	364	1	1	130	145	108	58	43	46	2	0	140	96	81	76
	-5	24	26	42	37	30	37	50	65	0	0	56	45	3	5	2	0	0	0	41	49	13	15
	-6	1	0	5	4	4	5	6	2	0	0	8	9	2	1	0	0	0	0	1	4	0	0
	-7	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Coliformes totales (VRB) aerobio 32°C																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Disolucion	-3	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	430	560	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	61	83	incontable	incontable	incontable	incontable	
	-4	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	47	32	incontable	incontable	incontable	incontable	89	102	8	5	389	466	incontable	incontable	
	-5	197	236	131	120	incontable	incontable	incontable	incontable	5	4	384	354	97	121	15	25	0	0	149	126	incontable	incontable
	-6	4	1	65	89	48	55	391	404	0	0	81	112	66	60	2	1	0	0	62	38	98	134
	-7	0	0	0	0	17	19	62	36	0	0	21	24	6	4	0	0	0	0	7	7	27	32
	-8	0	0	0	1	0	0	44	25	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	4

A las 48 horas de incubación

Lactobacillus mesophilus (MRS) 30°C																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Disolucion	-3	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	140	121	24	34	incontable	incontable	incontable	incontable	
	-4	172	164	291	305	incontable	incontable	incontable	incontable	92	105	145	124	93	91	37	39	3	6	incontable	incontable	209	195
	-5	29	49	174	153	incontable	incontable	131	124	45	38	41	54	19	8	3	2	0	0	154	135	42	41
	-6	3	0	43	48	108	141	44	41	2	1	13	15	1	0	0	0	0	0	11	25	5	6
	-7	1	0	3	10	10	21	8	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	1	2
	-8	0	0	2	0	4	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Leuconostoc (MRSV) 30°C																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Disolucion	-3	41	37	incontable	incontable	incontable	incontable	85	74	24	19	51	76	38	45	10	8	12	13	0	1	46	42
	-4	7	2	108	121	281	311	29	38	2	4	15	17	10	8	2	4	1	2	0	0	9	12
	-5	4	0	19	26	101	110	1	3	0	0	6	6	1	0	1	0	0	0	0	0	5	3
	-6	0	0	8	6	13	18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	-7	0	0	2	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Streptococcus mesophilus (M17L) 30°C																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Disolucion	-3	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	186	139	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	
	-4	189	194	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	128	138	incontable	incontable	281	251	60	53	62	65	343	321	incontable	incontable
	-5	57	72	160	184	incontable	incontable	205	181	38	18	105	113	80	73	18	13	10	14	155	142	50	61
	-6	10	8	71	72	121	118	36	63	6	7	38	42	15	26	0	0	2	3	25	29	9	8
	-7	1	0	11	18	12	16	5	8	0	0	15	0	1	0	0	0	0	0	24	16	4	2
	-8	0	0	1	1	4	3	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0

Streptococcus termofilus (M17L) 45°C																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Disolucion	-3	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	152	178	25	21	incontable	incontable	incontable	incontable	
	-4	104	98	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	84	91	198	206	125	152	72	61	7	10	125	152	240	221
	-5	52	23	111	94	incontable	incontable	265	240	19	17	84	66	21	31	4	3	2	3	21	31	58	64
	-6	3	9	13	12	75	84	14	38	2	1	14	17	3	0	0	0	0	0	3	0	7	10
	-7	1	0	0	0	7	6	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

A las 72 horas de incubación

Mohos y Levaduras (PCA) 25°C aerobio																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	
Disolucion	-2	3	64	2	32	1	64	1	15	0	11	0	116	3	48	2	34	1	51	0	0	0	48
	-3	1	12	2	1	1	17	1	3	0	1	0	11	0	2	2	6	0	10	0	1	0	0
	-4	0	2	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
	-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-2	4	61	5	26	0	56	6	19	0	8	2	120	4	45	3	23	1	68	0	1	1	36
	-3	2	11	0	2	0	7	0	1	0	2	0	15	0	5	0	2	0	15	0	0	0	3
	-4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mesofitos (PCA) 30°C aerobio																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	x	x	incontable	incontable	194	163	63	52	x	x	incontable	incontable	incontable	incontable	
Dilusion	-4	70	63	98	116	incontable	incontable	314	363	117	97	119	132	33	38	14	9	11	5	87	94	41	55
	-6	15	18	33	37	79	85	59	69	23	31	42	48	9	6	6	3	4	2	34	28	9	10
	-7	6	3	16	12	12	19	16	21	1	0	1	0	4	3	0	0	2	0	10	12	3	2
	-8	4	2	1	2	0	0	4	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	8	5	1	0
	-9	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0

A las 120 horas de incubación

Lactococcus (M17LV) 25°C anaerobios																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Diadulusion	-2	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	
	-3	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	389	411	incontable	incontable	incontable	incontable	318	291	252	201	incontable	incontable	incontable	
	-4	358	366	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	98	107	333	311	289	230	40	38	32	38	466	422	208	196
	-5	63	68	311	324	398	411	410	354	40	38	94	89	68	71	16	10	18	15	145	166	84	76
	-6	8	11	66	61	171	156	85	63	5	4	31	15	19	16	1	0	2	1	22	35	21	19
	-7	1	0	10	9	11	20	17	12	1	0	0	0	1	3	0	0	1	0	2	2	2	2

Los números marcados de color rojo son aquellos seleccionados para calcular el recuento (UFC/g) debido a que se encuentran entre 20-200.

Recuentos totales temporada verano

	TUX1		TUX2		CHILTEPEC		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
	RECuento (Log UFC/g)																						
<i>Staphylococ</i>	7,91381385	7,95424251	8,38021124	8,41497335	8,89762709	8,96848295	8,84509804	8,78532984	6,90848502	6,8260748	7,90848502	7,79934055	7,81291336	7,76342799	6,5563025	6,61278385	5,73239375	5,69019608	8,5797836	8,43136376	7,50514998	7,41497335	
<i>Enterococcu</i>	7,38021124	7,41497335	7,62324929	7,56820172	7,47712125	7,56820172	7,69897	7,81291336	5	5,07918125	7,74818803	7,65321251	7,03342376	5,76342799	6,53346846	6,66275783	4,47712125	4,69897	7,51278386	7,59019608	6,90848502	5,88081359	
<i>Coliformes t</i>	7,29446623	7,372912	7,81291336	7,94939001	7,68124124	6,69897	8,79239169	8,5563025	5,67209786	5,50514998	8,32221929	8,38021124	7,81954394	7,77815125	6,94939001	7,00860017	4,78532984	4,91907809	8,17318627	8,10037055	8,43136376	8,50514998	
<i>Lac. mesofili</i>	7,452398	7,59019608	8,63346846	8,68124124	9	9,32221929	8,64345268	8,61278386	7,65321251	7,5797836	7,61278386	7,73239376	7,2787536	6,90308999	6,56820172	6,59106461	5,38021124	5,53147892	8,04139269	8,41497335	7,62324929	7,61278386	
<i>Leuconostoc</i>	5,61278386	5,56820172	7,2787536	7,41497335	8,00432137	8,04139269	6,462398	6,5797836	5,38021124	5,2787536	6,70757018	6,88081359	5,5797836	5,65321251	5	4,90308999	5,07918125	5,11394335	#NUM!	#NUM!	5,66275783	5,62324929	
<i>Strep. mesaj</i>	7,75587486	7,8573325	8,85125835	8,8573325	9,08278537	9,07188201	8,5563025	8,79934055	7,5797836	7,25527251	8,5797836	8,62324929	8,17609126	8,41497335	6,7815125	6,72427587	6,79239169	6,81291336	8,39794001	8,462398	7,69897	7,78532984	
<i>Strep. termo</i>	7,71600334	7,36172784	8,04532298	7,97312785	8,87506126	8,92427929	8,14612804	8,5797836	7,2787536	7,23044892	7,92427929	7,81954394	7,32221929	7,49136169	6,8573325	6,78532984	5,39794001	5,32221929	7,32221929	7,49136169	7,76342799	7,80617997	
Mohos	3,60205999	3,47712125	3,30103	3,69897	3	#NUM!	3	3,77815125	#NUM!	#NUM!	#NUM!	3,30103	3,47712125	3,60205999	3,30103	3,47712125	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	3
Levaduras	4,80617997	4,78532984	4,50514998	4,41497335	4,80617997	4,74818803	4,17609126	4,2787536	4,04139269	3,90308999	5,06445799	5,07918125	4,68124124	4,65321251	4,53147892	4,36172784	4,70757018	4,83250891	#NUM!	#NUM!	3	4,68124124	4,5563025
Mesofilos	7,84509804	7,79934055	8,51851394	8,56820172	8,89762709	8,92941893	8,77085201	8,83884909	8,36172784	8,49136169	8,62324929	8,68124124	7,51851394	7,5797836	6,79934055	6,71600334	7,04139269	6,69897	8,53147892	8,44715803	7,61278386	7,74036269	
<i>Lactococcus</i>	7,79934055	7,83250891	8,81954394	8,78532984	9,23299611	9,1931246	8,92941893	8,79934055	7,60205999	7,5797836	7,97312785	7,94939001	7,83250891	7,85125835	6,60205999	6,5797836	6,50514998	6,5797836	8,161368	8,22010809	7,92427929	7,88081359	
	TUX1		TUX2		CHILTEPEC		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	
<i>Staphylococ</i>	7,93402818	0,02858738	8,39759229	0,02458052	8,93305502	0,05010266	8,81521394	0,0422625	6,86727991	0,05827282	7,85391278	0,07717679	7,78817068	0,03499144	6,58454318	0,03993835	5,71129492	0,02983827	8,50557368	0,10494867	7,46006166	0,06376451	
<i>Enterococcu</i>	7,39759229	0,02458052	7,59572551	0,03892451	7,52266149	0,06440362	7,75594168	0,08057012	5,03959062	0,0559896	7,70070027	0,06715783	6,89842587	0,19091583	6,94811314	0,02071072	4,58804563	0,15687076	7,65148997	0,05473871	6,89464931	0,01956665	
<i>Coliformes t</i>	7,33368911	0,05546954	7,88115168	0,09650356	7,19010562	0,09457065	8,6743471	0,16694027	5,58862392	0,11804998	8,35121527	0,0410065	7,79884759	0,02926905	6,97899509	0,04186791	4,85220396	0,0945743	8,13677841	0,05148849	8,46825687	0,05217473	
<i>Lac. mesofili</i>	7,57629704	0,16107757	8,65735485	0,03378045	9,16110965	0,22784345	8,62811827	0,02168613	7,61649806	0,05192209	7,67258881	0,08457697	7,09092179	0,26563429	6,57963317	0,0161665	5,45584508	0,1069624	8,22818302	0,26416142	7,61801657	0,00740018	
<i>Leuconostoc</i>	5,59049279	0,03152433	7,34686347	0,09632191	8,02285703	0,02621338	6,5210908	0,08300415	5,32948242	0,07174139	6,79419188	0,12250159	5,61649806	0,05192209	4,95154499	0,06852573	5,0965623	0,02458052	#NUM!	#NUM!	5,64300356	0,02793676	
<i>Strep. mesaj</i>	7,80660368	0,07174139	8,85426542	0,00429507	9,07733369	0,00770984	8,67782153	0,17185385	7,41752805	0,22946399	8,50151544	0,03073489	8,2955323	0,16891514	6,75121356	0,03809565	6,80265252	0,01451101	8,430169	0,04557868	7,74214992	0,06105562	
<i>Strep. termo</i>	7,53886559	0,25051061	8,00922542	0,05104965	8,89967027	0,0348024	8,36295582	0,30664079	7,25460126	0,03415657	7,87191161	0,07405908	7,40679049	0,11960174	6,82133117	0,05091357	5,36007965	0,05354263	7,40679049	0,11960174	7,78480398	0,03023022	
Mohos	3,53959062	0,08834503	3,5	0,28138608	#NUM!	#NUM!	3,38907563	0,55023603	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	3,53959062	0,08834503	3,38907563	0,12451532	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	
Levaduras	4,7957549	0,01474327	4,46006166	0,06376451	4,777184	0,0410065	4,22742243	0,07259324	3,97224134	0,09779478	5,07181962	0,01041091	4,66722688	0,0198193	4,44660338	0,12003214	4,77003954	0,08834503	#NUM!	#NUM!	4,61877187	0,08834503	
Mesofilos	7,82221929	0,03235543	8,54335783	0,03513457	8,91352301	0,02248022	8,80485055	0,0480812	8,42654476	0,09166498	8,55224526	0,0410065	7,54914877	0,04332419	6,75767195	0,0589283	6,87018134	0,2421294	8,48931847	0,05962387	7,67657327	0,09021186	
<i>Lactococcus</i>	7,81592473	0,02345357	8,80243689	0,02419302	9,21306035	0,02819342	8,86437974	0,0919793	7,59092179	0,01575179	7,96125893	0,01578519	7,84188363	0,01325785	6,59092179	0,01575179	6,54246679	0,05277394	8,19073805	0,04153551	7,90254644	0,03073489	

Recuentos totales de la temporada Invierno

A las 24 horas de incubación

Staphylococcus aureus (BP) 30°C																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Disolucion	-3	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	384	399	incontable	incontable	193	178	102	133	incontable	incontable	247	266	
	-4	197	164	333	331	incontable	incontable	incontable	incontable	90	98	263	221	332	255	28	34	16	9	301	287	145	177
	-5	66	73	133	140	245	267	344	301	17	11	69	89	48	51	9	5	2	1	100	102	41	36
	-6	2	2	21	31	63	80	67	55	2	3	3	15	12	9	0	0	0	0	29	36	1	0
	-7	0	0	0	6	5	6	2	2	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Enterococcus (KAA) 37°C																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Disolucion	-3	301	288	388	325	incontable	incontable	incontable	incontable	32	25	204	199	215	207	184	176	55	83	248	231	163	172
	-4	99	108	88	78	156	233	188	205	13	9	96	113	123	110	34	32	11	19	98	82	56	51
	-5	19	28	32	21	41	33	46	53	5	5	61	53	87	69	6	1	0	0	33	31	7	0
	-6	0	0	1	3	1	3	8	12	0	0	7	11	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0
	-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Coliformes totales (VRB) aerobio 32°C																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Disolucion	-3	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	256	213	163	187	incontable	incontable	incontable	incontable
	-4	231	266	201	167	306	277	incontable	incontable	107	125	348	311	309	266	61	79	49	61	277	281	273	259
	-5	167	199	109	92	110	123	276	233	55	51	299	300	233	159	22	34	9	11	109	88	68	71
	-6	12	7	45	66	45	38	108	128	5	6	112	137	59	42	0	0	0	1	88	68	33	41
	-7	0	0	0	0	0	0	45	46	0	0	44	42	0	0	0	0	0	0	6	0	0	2
	-8	0	0	0	0	0	0	8	12	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A las 48 horas de incubación

Lactobacillus mesofilicus (MRS) 30°C																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chitepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Disolución	-3	241	253	312	342	incontable	incontable	incontable	incontable	257	282	258	254	199	213	123	149	37	46	incontable	incontable	214	198
	-4	167	187	190	204	255	231	289	292	110	145	123	112	82	73	21	19	12	5	185	193	144	174
	-5	32	21	155	142	166	149	133	98	39	29	39	41	20	18	9	4	1	1	122	109	33	26
	-6	0	0	23	31	45	39	56	49	2	7	0	0	0	0	1	0	1	0	17	21	0	0
	-7	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Leuconastoc (MRSV) 30°C																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chitepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Disolución	-3	32	23	124	118	213	184	12	18	19	12	44	65	22	25	8	9	13	9	6	3	15	19
	-4	8	12	58	43	101	122	2	4	6	1	21	15	6	9	2	3	4	6	1	1	6	10
	-5	0	0	18	21	63	58	1	1	0	1	3	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1
	-6	0	0	0	0	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Streptococcus mesofilos (M17L) 30°C																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chitepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Disolución	-3	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	306	287	incontable	incontable	395	356	210	183	126	132	incontable	incontable	incontable	incontable
	-4	212	231	277	258	312	345	247	219	143	169	248	253	300	312	92	72	56	53	236	187	259	213
	-5	76	79	193	184	269	253	151	147	41	32	113	98	219	145	23	26	11	4	121	99	83	91
	-6	15	18	64	56	99	109	42	53	2	3	28	31	21	34	0	1	0	0	68	72	40	37
	-7	1	3	18	14	18	14	12	6	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	31	24	9	5
	-8	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Streptococcus termofilos (M17L) 45°C																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chitepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Disolución	-3	311	287	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	312	365	213	258	incontable	incontable	247	216	13	19	154	167	259	271
	-4	247	193	264	282	231	263	incontable	incontable	193	236	104	79	215	253	66	53	1	3	87	92	154	162
	-5	67	42	89	105	119	132	197	217	56	78	49	45	54	35	13	2	0	0	19	23	32	45
	-6	0	2	19	8	28	31	22	49	11	9	6	7	6	0	1	0	0	0	0	0	0	3
	-7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A las 72 horas de incubación

Mohos y Levaduras (PDA) 25°C aerobio																						
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BI1		BJ2		BJ3		BI4		LB1		LB2		LB3		LB4	
	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras
Disolucion																						
-2	0	21	1	21	1	32	3	16	0	8	2	36	0	12	0	11	0	17	1	4	1	19
-3	3	9	0	0	0	12	1	2	0	2	0	17	0	2	0	0	0	1	0	1	0	0
-4	0	2	0	0	0	6	1	0	0	0	0	4	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
-5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-2	0	24	1	13	0	19	2	9	1	5	0	29	1	8	0	12	0	32	1	3	1	15
-3	0	2	0	3	0	7	0	1	0	0	0	7	0	0	0	2	0	15	0	0	0	6
-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

mesofitos (PCA) 30°C aerobio																						
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BI1		BJ2		BJ3		BI4		LB1		LB2		LB3		LB4	
	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras	mohos	levaduras
Dilusion																						
-4	198	246	269	296	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	327	359	96	83	34	62	43	69	252	194	119	138
-5	55	42	164	183	306	245	261	327	198	117	101	94	45	32	16	4	21	36	106	83	68	72
-6	9	3	49	66	96	112	112	83	66	45	36	51	12	3	3	0	0	0	54	32	16	9
-7	0	0	12	13	32	26	48	62	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0
-8	0	0	1	0	6	1	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A las 120 horas de incubación

Lactococcus (M17LV) 25°C anaerobios																							
Muestra	Tux1		Tux2		Chiltepec		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4		
Diolusion	-2	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	309	376	incontable	incontable	incontable	incontable
	-3	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	incontable	384	426	350	397	238	216	216	266	incontable	incontable	369	382
	-4	incontable	incontable	412	427	incontable	incontable	incontable	incontable	157	214	299	345	231	211	63	43	128	84	incontable	incontable	233	298
	-5	98	110	283	263	276	316	312	296	66	46	107	112	98	111	16	36	48	52	212	175	116	98
	-6	6	0	98	73	114	247	125	139	11	2	63	52	32	37	0	0	5	2	34	39	34	26
	-7	0	0	16	1	27	34	35	39	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Total de recuentos temporada invierno

	TUX1		TUX2		CHILTEPEC		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4	
	RECuento (Log UFC/g)																					
Staphylococ	7,81954394	7,86332286	8,32221929	8,49136169	8,79934055	8,90308999	8,8260748	8,74036269	6,95424251	6,99122608	7,83884909	7,94939001	7,68124124	7,70757018	6,44715803	6,53147892	6,00860017	6,12385164	8,462398	8,5563025	7,61278386	7,5563025
Enterococcus	7,2787536	7,44715803	7,50514998	7,32221929	7,61278386	7,51851394	7,66275783	7,72427587	6,11934335	5,95424251	7,78532984	7,72427587	7,93951925	7,83884909	6,53147892	6,50514998	6,04139269	6,2787536	7,51851394	7,49136169	6,74818803	6,70757018
Coliformes t	7,22271647	7,29885308	7,65321251	7,81954394	7,65321251	7,5797836	8,65321251	8,66275783	6,74036269	6,70757018	8,64345268	8,62324929	7,77085201	7,62324929	6,3424268	6,53147892	5,69019608	5,78532984	7,94448267	7,83250891	7,51851394	7,61278386
Lac. mesofili	7,50514998	7,32221929	8,36172784	8,49136169	8,65321251	8,59106461	8,5563025	8,69019608	7,59106461	7,462398	7,59106461	7,61278386	7,30103	7,25527251	6,32221929	6,2787536	5,56820172	5,66275783	8,23044892	8,32221929	7,51851394	7,41497335
Leuconostoc	5,50514998	5,36172784	7,25527251	7,32221929	7,79934055	7,76342799	5,07918125	5,25527251	5,2787536	5,07918125	6,32221929	6,17609126	5,3424268	5,39794001	4,90308999	4,95424251	5,11394335	4,95424251	4,77815125	4,47712125	5,17609126	5,2787536
Strep. mesof	7,88081359	7,89762709	8,80617997	8,74818803	8,99563519	9,0374265	8,62324929	8,72427587	7,61278386	7,50514998	8,44715803	8,49136169	8,32221929	8,53147892	7,36172784	7,41497335	6,5563025	6,72427587	9,49136169	9,38021124	8,60205999	8,56820172
Strep. termo	7,8260748	7,62324929	7,94939001	8,0211893	8,44715803	8,49136169	8,3424268	8,69019608	7,74818803	7,8920946	7,69019608	7,65321251	7,73239376	7,54406804	6,81954394	6,72427587	5,11394335	5,2787536	7,2787536	7,36172784	7,50514998	7,65321251
Mohos	#iNUM!	#iNUM!	3	3	#iNUM!	#iNUM!	3,47712125	3,30103	#iNUM!	#iNUM!	3	3,30103	#iNUM!	#iNUM!	3	#iNUM!	#iNUM!	#iNUM!	3	3	3	3
Levaduras	4,32221929	4,38021124	4,32221929	4,11394335	4,50514998	4,2787536	4,20411998	3,95424251	3,69897	3,90308999	4,5563025	4,462398	4,07918125	3,90308999	4,04139269	4,07918125	4,23044892	4,50514998	3,60205999	3,47712125	4,2787536	4,17609126
Mesofilos	7,74036269	7,62324929	8,69019608	8,81954394	9,50514998	9,41497335	9,68124124	9,79239169	8,81954394	8,66275783	8,5563025	8,70757018	7,65321251	7,50514998	6,54406804	6,79239169	7,32221929	7,5563025	8,73239376	8,50514998	7,83250891	7,8573325
Lactococcus	7,99122608	8,04139269	8,99122608	8,86332286	9,43136376	9,53147892	9,54406804	9,59106461	7,81954394	7,66275783	8,79934055	8,71600334	7,50514998	7,56820172	6,79934055	6,63346846	7,68124124	7,71600334	8,53147892	8,59106461	8,53147892	8,41497335
	TUX1		TUX2		CHILTEPEC		BJ1		BJ2		BJ3		BJ4		LB1		LB2		LB3		LB4	
	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD
Staphylococ	7,8414334	0,03095637	8,40679049	0,11960174	8,85121527	0,07336193	8,78321875	0,06060762	6,97273429	0,02615133	7,89411955	0,07816423	7,69440571	0,01861737	6,48931847	0,05962387	6,06622591	0,0814951	8,50935025	0,06640051	7,58454318	0,03993835
Enterococcus	7,36295582	0,11907991	7,41368464	0,12935153	7,5656489	0,0666589	7,69351685	0,04349982	6,03409293	0,11292555	7,75480285	0,04317167	7,88918417	0,07118455	6,51831445	0,01861737	6,16007314	0,16783951	7,50493782	0,01919954	6,7278791	0,02872116
Coliformes t	7,26078477	0,05383671	7,73637822	0,11761408	7,61649806	0,05192209	8,65798517	0,00674956	6,72396643	0,02318781	8,63335098	0,01428595	7,69705065	0,10437089	6,4369508	0,13368295	5,73776296	0,06726972	7,88849579	0,0791774	7,5656489	0,0666589
Lac. mesofili	7,41368464	0,12935153	8,42654476	0,09166498	8,62213856	0,04394521	8,62324929	0,09467706	7,5267313	0,09098103	7,60192423	0,01535783	7,27815125	0,03235543	6,30048645	0,03073489	5,61547978	0,06686126	8,27633411	0,06489145	7,46674364	0,07321425
Leuconostoc	5,43343891	0,10141477	7,2887459	0,04733853	7,78138427	0,02539401	5,16722688	0,12451532	5,17896742	0,14111897	6,24915528	0,10332812	5,37018134	0,03925668	4,92866625	0,0361703	5,03409293	0,11292555	4,62763625	0,21286035	5,22742243	0,07259324
Strep. mesof	7,88922034	0,01188894	8,777184	0,0410065	9,01653085	0,02955091	8,67376258	0,07143658	7,55896692	0,07610865	8,46925986	0,03125671	8,42684911	0,1479689	7,38835059	0,03765026	6,64028919	0,11877511	9,43578647	0,07859524	8,58513086	0,02394141
Strep. termo	7,72466205	0,1434193	7,98528965	0,05076977	8,46925986	0,03125671	8,51630938	0,24591293	7,82014131	0,10175732	7,6717043	0,02615133	7,6382309	0,13316639	6,7719099	0,0673647	5,19634848	0,11653844	7,32024072	0,05867164	7,57918125	0,10469602
Mohos	#iNUM!	#iNUM!	3	0	#iNUM!	#iNUM!	3,38907563	0,12451532	#iNUM!	#iNUM!	#iNUM!	#iNUM!	#iNUM!	#iNUM!	#iNUM!	#iNUM!	#iNUM!	#iNUM!	3	0	3	0
Levaduras	4,35121527	0,04010065	4,21808132	0,14727333	4,39195179	0,16008641	4,07918125	0,17669006	3,80103	0,14433462	4,50935025	0,06640051	3,99113562	0,12451532	4,06028697	0,02672055	4,36779945	0,19424298	3,53959062	0,08834503	4,22742243	0,07259324
Mesofilos	7,68180599	0,08281168	8,75487001	0,09146275	9,46006166	0,06376451	9,73681646	0,07859524	8,74115088	0,11086452	8,63193634	0,1069624	7,57918125	0,10469602	6,66822987	0,17559133	7,4392609	0,16552182	8,61877187	0,16068562	7,8449207	0,01755292
Lactococcus	8,01630938	0,03547315	8,92727447	0,09044123	9,48142134	0,0707921	9,56756633	0,03323159	7,74115088	0,11086452	8,75767195	0,0589283	7,53667585	0,04458432	6,7164045	0,11728928	7,69862229	0,02458052	8,56127176	0,04213345	8,47322613	0,08238188

Anexo 2. Secuencias obtenidas de los productos de PCR-DGGE de la temporada Verano.

No. de banda	Secuencia
1	<p>CTCGCGTTCAACGCCGGACATCTCACCAGCATCGACAATGTGCAGTGAAG GTCAGGTTGATGACCTTACCGGAGCCATTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCC GTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCTGTAAAGTCAGGCAACGAGCGAGACC CGCACTCCTAATTGCCAGCAACACCTAGCGGTGGTTGGGTACATTAGGAGG ACTGCCAGTGCCAAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTCAGTATG CCCC GAATGTGCTGAGGGGAGTCTTAACCCCGTTCCCTAATAGAATTTGG TTGAACGACCGTCTCCAAAACCGAGAAGGGGGTTTTTAACGCCGAGCCGA CGAGACGAGGGAGCAGGTGTAAAAAGTGCTCATATACAGGACGT</p>
2	<p>AGCAGATCGAAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAAACC GCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCATTCAGTTCGGACTGTAGGCTG CAACTCGCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGGAATA ATAGGCTTCTTATTGATTAACCTTCTATAGCTAGAAGAAGTGATCAAATC CAAACTGTAAGGATGACGAGGCTAAGAGACTGATGAACGACGGCGG</p>
3	<p>ATATTCACCAGAGCGCATTGAGTGATTCTGGTTCGTAGTTATCCATCATCC ATAATGTAATATCTAAGGCATGAGTACCAATATCAATCATTAGTAGTGAAT AACTGCTAGAATTGACGGTACCTTTAAAGGAAGCCCCGGCTAATTACGTGC CAGCAGCCGCGGTAACACGTAAGGGGCTAGCGTTGTCCGGAATTACTGGG CGTAAAGGGTACGCAGGCGGTCTAGCAAGTCAGAGGTGAAATCCATTGGC TTAATGAAGTGCCTTTGAAACTGTTAGACTTGAGAGCAAGAGAGGAAGA TGAATTCCTGGTGTAGTGGTGAAATTAAGAAGCGTGTCTGGACTCCACA GCCCGCCAGCGGCGTGCCCGCAAAGCCTTGGAGGCTCTGGAGCAGG</p>
4	<p>CTCCGGCACGTACATGATCCTTACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTA CACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGG ATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCA ACCCGGGAGGTCTTGCTGATGTCTTCAGCCCTCAAGGAGCGAGTGTCTCTA TCGAGACGTGAGAAACGCAGGGTATAAGGACAGAGGTGGCAGGAGCACC TCCTTTCTAAGGAAAACAT</p>
5	<p>ACCGCGTTTATATAAGTATCTTGACATCTTCCTTCTTTGTGGTTCGACGCC GTGCCTGCTGGGAGGCCAGGGGCGGGAGACGCTGATATATGCGATCTCT CGCTCGGTTCACTCGTTTGTGATGCTGCTCGGCCCTGTGGGCCCTGCTT TCGCAGGTCTTACATCTTGCACTGAACGCAGAGTCTTGTC AACCTTTCTG CAAATCTGCAGTTGCTTTCAGCACTCAAACCCCCGTTCCAGGGGTTTCC TGTGTTGAACTATAAAAATTGAAGATGACGCGGAAAATGCTTGAGAGCAA CTGTAGAAAGGAGGTGATGCAACCCGACCTTCCGGTACAGCTACCTTGTTA CAACTTCACCCCCCGAGGCCCTTCTGGGGCGGGGGGCCCC</p>
6	-
7	<p>CAGATCGAAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAC CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAAACCGC GAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCATTCAGTTCGGATATTGATTAACCT TCTATAGCTAGAAGAAGTGATCAAATCCACA ACTGTAAGGATGACGAGGC TAAGAGACTGATGAACG</p>
8	<p>CTCGGACACAGAAGGAGAAGCAGCTGAGAGGGATGGGCACTCTAGCGAG ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATG</p>

CCCCTTATGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGC
CAACCTGCGAAGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTGACTGCAG
TCTGCAACTCGACTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC
ACGCCCCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCCCGTCACACCAT
GGGAGTTTGTAAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCGTAAGGAGGCTACTA
TCAGAAAGGGTAAGTAATGAAGGGCGCATGGGGAATGCCTTGGTACTAGG
AGCCGATGAAGGACG

9 GTCATCCAGTGAAGTTGCCATCATTGAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCC
GGTAATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCTGGTACAACGAGTCGCAAG
TCGGTGACGGCAAGCTAATCTCTTAAAGCCAGTCTCAGTTTCGGAGATCAGT
AAGGTTAACTTATCAAGGGCTCAGGGCGAACGCCTTGGACTAGGAGCTAT
GAAGGACTGAC

10 GCTCAAATGAAGAACGAGCCGATGAGGGACGTCCTTTATAAGGAATATTG
GAGGAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGG
AACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACCTCCATGTGTAGCG
GTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCT
GGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAAGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCTCGTG
CTCGAGCGG

11 GCAGTATCGGTCAGCACAAGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
GTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAG
GAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAG
GTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAA

12 GCAGTATCGGAAGGAGAGGCGGCCTTGTACACACCGCCCCGTCACACCATG
AGAGTTTGTAAACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACTTTTAGGAGCTAGCCGT
CTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGG
AGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAATAATACGGAACC

13 CGGCGGTCGTTATCGGTTCTTTGTTCCAATTCTATTTTTATGAAGAGCGGCG
AACGGGTGAGTAACGCGTGGGAAATCTGCCGAGTAGCGGGGGACAACGTT
TGAAACGAACGCTAATACCGCATAACAATGAGAATCGCATGATTCTTATT
TGAAAGAAGCAATTGCTTCACTACTTGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAG
TTGGTAGTCTACCAAGGCATACATAGCCGACCTGAGACAAACCGCCCTTCA
TTGGATCCTTTTTACAAATTCACACCGCGCCGGGGTGGGCCGCGGGTA

14 AGCACGCATCGAAGGAAGACTGGACACCCGAAGCCCTGGAGTAACCATT
TATGGAGCTACCCGTCGTTGGTGGGACAAATGATTGGGGTGAAGTCGTAA
CAAGGTAGCCGGGAAGGATACCTCCTTTCCAAGATATATCCATTGCACCGT
CGTCATCGCTTCTTAGTTACCAATTTACCAACTGCCTTATCTATTTTTCTTTT
AAAAATTCCCCATGGGGTCGGCCCGGGGAATTAATAAAAAATACCCCAAGG
GGCCGCTACCCGCCCGTAAAAAACCCCCCCCCCGCTGGGTCCCCCCT
TTTTAAAATTCCCCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGTTTAAGTGTCCA
CAGGGGGGGGAGAGGGGGGGGG

16 TAGATAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCTCCTTACCTTAAAGAACCTGCC
TTTGAGTGCTCACACAGATTGTCTGATGAAAATTAATAGCAAGGCGTCTT
GTTATTGAGACTGCACTGCCCTTCTCTAAAAGCCCAGGAAACCCCTT
TTCCTGGGGGAACCGGGGGTCCAATCCCCTAAGGGAACCCCTTGGTGGTT
CGTGAGTGAAAATAACCTGCCGTCATATCTTAAACTGACTTGCAGGCAT
GTTTGAATAAATTGGTCCTTTAAAACCGGAACCAGCTGAAAATTGGAAC

GGCCCCAGCTCATGGGGGGTCCGATTTCTCCGATTTTGGCCGGAGGAAAG
GGAACCTACTTCGGGGGGGGGGGTGGGGCACCTG

- 19 AGCTCGGTAAAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGC
TGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTTTTTCGCGGATCAGCACG
CCGCTACGTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACACACCACGAGAGTT
TGTAACACCCCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTGGAGCCTCTCTAAGGAT
AATCGG
- 20 CCAGCTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGATAAACGGA
AGCACGTTTGGGTATTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTTGGGGGGCCCTAACCC
CACTGGGAAAGCGCCCGCTTTGCTCCCAGGAAGGCCCGCGGTTCGATCCCC
TAGGCTCCCTTGAAACCAAAGGAAAAGTTTTGTCCCTTGAAAAATGAATTG
TCATATAAAATTCCAAAAGGAATTGATTACCTAAAGATAGGTACCAGAAA
ATAATCCCGATCGGCGGGCATAATTAATGAAGTTGGGCGAAAGGCCCGAC
GCAGGCCCCCCCACCCCGGGCGGTACTCTCTCATATTTCTATGTTAGCAA
CCAAAT
- 24 CCAGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGATATTACGGA
ATACACAAACATTTCTTACGTTGTTTCAGTTTTGAGAGGTTTACTCTCAAACG
ATTGTTCAATTGAAAACCTGGATAGTGAAGTAAAA
- 25 CCAGATAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCTCCTTACCTTAAAGAACCTGC
CTTTGAGTGCCACACAGATTGTCTGATGAAAGTTAAATAGCAAGGCGTCT
TGCGATTGAGACTGCACTTCCCCCTCTCTAAAGGGCCGAGAAACCCCT
TTCACCGCGGTAACCGGGGTCCAATCCCCTAAGGGACCCCTTGTCTGG
TCCGGAAGTAAAGACACCTGGCCGAATATCTCAAACCTGAATTGTCAGTC
ATCGTTGAAAAAATTGGTTTTTAAAAAACCGGATG
-

Anexo 3. Secuencias obtenidas de los productos de PCR-DGGE de la temporada Invierno

No. de banda	Secuencia
2	CCAGCTATGGGAACCTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTAAGGTTAATAACCTTGT CGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC CCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTTTACTGGGCGTA AAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA CCTGGGAACCTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGTTTCTAATAAAATCTGGCCTAG GAATGCTCACAGAGATTGTC
4	AATGTATGAAGGACAGATTGGGCAGATCGAAGGAAGGTGGGGATCAAATC ATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAA CGAGTCGCGAAACCGCGAGGTTTAGCTAATAAAACCATTTCTCAGTTCGGAT ATTGATTAACCTTCTATAGCTAGAAGAAGTGATCAAATCCACAACCTGTAAG GATGACGAGGCTAAGAGACTGATGGCCCCGGTGAAGGGACAG
5	GAGAAGCAGCTGAGAGGGATGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAA CCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCTCATGCCCTTATGCTGGGCT

ACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCTGCGAAGGTG
AGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTGACTGCAGTCTGCACTCGGAATC
GCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTA
CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAAATGCCCAAAGCCGGTGGCCT
AACCGTAAGGAGGCTACTATCAGAAAGGGTAAGTAATGAAGGGCGCATGG
GGAATGCCTTGGTACTAGGAGCCGAT

6 CTCGGATCATAACGGGAAGCGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAATA
TATACAAAGACGTGGGGAGAAAAGTTTATTCAGTTTTGAGGGGATTAGTG
ATAAACCCAATCAAGAATCAAATTCCTGATTGTGGGGCCTTAGCTCAACTG
GRAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGACAGCGGTTCTATCCCGCTAGG
CTCCATTGTCAGACAAGACGTTAAAATCACTTGAACATTGAAAATAAWT
AACAAATATCTAATAACGATAAATAAMCCAAAACCTGTGAATTTTAAAGAA
TTTACCAACTTATACTTGAAAAAARATGATTATAAATCCTCATGGCAAAGT
TAATAAGGGCGTACCGTGGATGCTTTCTTCACCATTAGCCG

7 GAGAATCGTTATCGGTTCTTTGTTCCAATTCTATTTTTATGAAGAGCGGCGA
ACGGGTGAGTAACGCGTGGGAAATCTGCCGAGTAGCGGGGGACAACGTTT
GGAAACGAACGCTAATACCGCATAACAATGAGAATCGCCTTATTTGAAAG
AAGCAATTGCTTCACTACTTGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTCC
AACCTAGTCTACCAAGGCATACATAGCCGACCTGAGACAAACCGCCCTTC
ATTGGATCCTTTTTACAAATTCCACACCGCGCCGGGGTGGGCGGTAAGCC
GAT

9 CCAGATAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCTCCTTACCTTAAAGAACCTGC
CTTTGAGTGCCACACAGATTGTCTGATGAAAGTTAAATAGCAAGGCGTCT
TGCGATTGAGACTGCACTTCCCCCTCCTCTAAAGGGCCGAGAAACCCCTT
TTCACCGCGGTAACCGGGGGTCCAATCCCCTAAGGGACCCCTTGGTTGG
TCCGGAAGTAAAGACACCTGGCCGAATATCTCAAACCTGAATTGTCAGTC
ATCGTTGAAAAAATTGGTTTTTAAAAAACCGGATG

10 CCAGCTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGATAAACGGA
AGCACGTTTGGGTATTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTTGGGGGGCCCTAACCC
CACTGGGAAAGCGCCCGCTTTGCTCCAGGAAGGCCCGCGGTCGATCCCC
TAGGCTCCCTTGAAACCAAAGGAAAAGTTTTGTCCCTTGAAAAATGAATTG
TCATATAAAATTCCAAAAGGAATTGATTACCTAAAGATAGGTACCAGAAA
ATAATCCCGATCGGCGGGCATATTTAATGAAGTTGGGCGAAAGGCCCGAC
GCAGGCCCCCCCACCCTGGGCGGTACTCTCATATTTCTATGTTAGCAA
CCAAAT

11 TAGATAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCTCCTTACCTTAAAGAACCTGCC
TTTGAGTGCTCACACAGATTGTCTGATGAAAATTAATAGCAAGGCGTCTT
GTTATTGAGACTGCACTGCCCTTCTCTAAAAGCCCAGGAAACCCCTT
TTCCTGGGGGAACCGGGGGTCCAATCCCCTAAGGGAACCCCTTGGTGGTT
CGTGAGTGAAAATAACCTGCCGTCATATCTTAAACTGACTTGTGAGGCAT
GTTTGAAAAAATTGGTCTTTAAAAACCGGAACCAGCTGAAAATTGGAAC
GGCCCCCAGCTCATGGGGGGTCCGATTTCTCCGATTTTTGCCGGAGGAAAG
GGAACCTACTTCGGGGGGGGGGTGGGGCACCTG

12 TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGATGTAGGGAGCTATAAGTTCTCTGTATC
GCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTCGTGCTAT
TCCTAGAGATAGGAAGTTCTTCCGGGACACGGGATACAGGTGGTGCATGG

TTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCCTATTGTTAGTTG

14 TTGGGGGGGGGGTACGTCGTATCAGAAGGCGCGGCTGGATCACCTCCTTTC
TAAGGAATATATACCGAGACCTGAGAAAAAACTATATCCTGGTATGATGA
GACAGTGCTCAACCTCAACCAGAATCCAATTCTTGATTGAGGGGCCTTAGC
TCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTCTCGGTTTCGATCCC
GCTAGGCTCCATTGTGACACAAGACGTTAAAATCACTTGAACATTGAAAAC
CAAATAACAATATCTAACAACGATAAATAAACCATACGCTTTTAATTTAA
AGAATTTACAACTTATACTTTTAAACAATTATTATAAATTATCA

15 CCAGCTATCGGAAGGTGCGGCTGGACCACCTCCTTTCTAAGGAATATATAC
AAAGACGTGACGAACAACCTTTATTCAGTTTTGAGGGGTTTAGTGATAAACC
TAGTCAGGACTCAACTTCTTGATTGTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGC
GCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTGACGGTTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTG
TCAGACAAGACGTTAAAATCACTTGAACATTGAAAACCTAAATAACAATAT
CTAATAACGATAAATAAACCAAAAAGCTGTGAATTTTAAAGAATTTACAAA
CTTATACTTGAAAAACGATGATTATTAATCATCATGGCAAAGTTAATAAGG
GTGCACGGCGGATGCCTTGGCTCTAATAACCGATGAAAGACGATGCC

17 CAAACCAGCAGATCGAAGGAAGGTGGGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAAA
CCGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGC
TGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGGAA
TAATAGGCTTCCTTATTGATTAACCTTCTATAGCTAGAAGAAGTGATCAA
TCCACAACGTGAAGGATGACGAGGCTAAGAGACTGATGAACGACGGCGGT
AGGAGCCGAT

19 TGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA
TGGATGGTACAAAGGGCTGCGAGACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCAGAAA
ACCATCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACCCGCCTGCATGAAGCCGGAA
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGTGA
GGAGTCCGATCCTGGGTCAGTAGGGAGCGGGAGAAGAG
