



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS  
CAMPUS CORDOBA  
POSTGRADO EN AGROINDUSTRIAS

## **IDENTIFICACIÓN MORFOLOGICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE QUESO JAROCHO EN EMPRESAS LÁCTEAS DEL ESTADO DE VERACRUZ**

RAMIRO CEJUDO VALENTÍN

### **T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRIA TECNOLÓGICA EN AGROINDUSTRIA**

CORDOBA, VERACRUZ

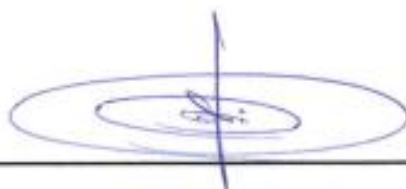
2014

La presente tesis titulada: "**Identificación morfológica y molecular de bacterias ácido lácticas de queso jarocho en empresas lácteas del estado de Veracruz**", realizada por el alumno: **Ramiro Cejudo Valentín**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRIA TECNOLÓGICA EN AGROINDUSTRIA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO: \_\_\_\_\_



**Dr. Francisco Hernández Rosas**

ASESOR: \_\_\_\_\_



**Dra. Katia Angélica Figueroa Rodríguez**

ASESOR: \_\_\_\_\_



**Dr. José Andrés Herrera Corredor**

**Córdoba, Veracruz, 2014**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, porque siempre ha estado presente en los momentos más complicados de mi vida y he sentido su apoyo y compañía.

Al Dr. Francisco Hernández Rosas por su amistad y por la oportunidad de aceptarme como tesista en su área de trabajo.

A mis asesores la Dra. Katia Angélica Figueroa Rodríguez y al Dr. José Andrés Herrera Corredor por su disposición, apoyo y revisión del presente trabajo de titulación.

A la Universidad Tecnológica de Tehuacán y al Colegio de Postgraduados, por los permisos necesarios para lograr concluir satisfactoriamente la maestría y el procesos de titulación.

## DEDICATORIAS

A mi amiga y compañera de toda la vida Alicia, por tu amor, compañía y ayuda en todos los momentos desde que nuestros corazones se unieron.

A mis pequeños David y Diego porque desde que llegaron a mi vida han sido una bendición e inspiración en cada proyecto que realizo.

A mis padres, porque siempre dedicaron a mis hermanos y a mí su tiempo, amor y cuidados; para que lográramos nuestros objetivos como personas, gracias Manuel y Cristina los quiero mucho.

A mis hermanos, Manolo, Hugo, Paty y Mauricio, porque siempre hemos sido una hermosa familia en la convivencia diaria de nuestras vidas, gracias por su apoyo y compañía.

Gracias Dios Mío, por brindarme la oportunidad de la vida y tener siempre abierto el sendero de tu camino, y a ti mamá te dedico de forma especial mi trabajo que Dios te bendiga siempre.

# INDICE

INDICE .....	IV
INDICE DE FIGURAS .....	VI
INDICE DE CUADROS .....	VII
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCION .....	3
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
REVISION DE LITERATURA. ....	1
Quesos genuinos artesanales en México. ....	1
Agroindustria quesera en México.....	3
Queso Jarocho en la región y su importancia. ....	5
Cultivos lácticos. ....	7
Caracterización fenotípica clásica de bacterias ácido lácticas. ....	9
Métodos genotípicos.....	1
RAPD´s-PCR en bacterias ácido lácticas .....	4
ITS en bacterias ácido lácticas .....	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	1
Muestreo.....	1

Análisis fisicoquímico de las muestras de queso.....	2
Identificación morfológica de las bacterias ácido lácticas.....	3
Extracción de ADN.....	4
Identificación molecular de las bacterias ácido lácticas.....	6
Amplificación ADN ITS-PCR.....	6
Amplificación RAPD.....	11
Análisis estadístico de los resultados de RAPD´s – PCR.....	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
Análisis fisicoquímico de las muestras de queso.....	15
Identificación morfológica de las bacterias ácido lácticas.....	19
Extracción de ADN.....	24
Identificación molecular de las bacterias ácido lácticas.....	25
Amplificación ADN ITS-PCR.....	25
Amplificación RAPD.....	29
Análisis estadístico de los resultados de RAPD´s – PCR.....	31
CONCLUSIONES.....	36
LITERATURA CITADA.....	38

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Georeferencia de las queserías del Estado de Veracruz (Barragán, 2011) .....	6
Figura 2. Estructura básica de un coco lactofermentador (Villegas, 2004). .....	8
Figura 3. Porcentaje de humedad de las muestras de queso jarocho.....	16
Figura 4. pH de las muestras de queso jarocho. ....	17
Figura 5. Porcentaje de sólidos totales de las muestras de queso jarocho. ....	18
Figura 6. Observación macroscópica de las BAL´s aisladas. ....	19
Figura 7. a) <i>Lactobacillus</i> aislado del queso jarocho gram (+), b) <i>Lactobacillus casei</i> cepa <i>shirota</i> (Yakult®).....	20
Figura 8. Imagen de ADN concentrado (izquierda), el cual fue comparado con el DNA Mass Ladder Bio Rad® de 100pb (derecha), líneas de la 1 – 5: primeras cinco bacterias ácido lácticas de las 42 analizadas, La banda superior indica la presencia y posición del ADN total y el barrido indica el grado de impurezas presentes en la muestra. ....	24
Figura 9. Muestras de PCR – ITS de <i>Lactobacillus</i> en gel de agarosa 1.5 %. (De izquierda a derecha) Iniciador ITS F357 – R518, Línea 1: MPM 100 pb, Línea 2: 1 Línea 3: 2 Línea 4: 3 Línea 5: 4 Línea 6: 5 Línea 7: 6, Oligo UF1 – UR1 Línea 8: 1 Línea 9: 2 Línea 10: 3. Línea 11: 4, Línea 12: 5, Línea 13: 6, Línea 14: MPM 100 pb (BIORAD), Línea 15: Sin Carga (SET AXYGEN).....	25
Figura 10. Cepas encontradas mediante ITS con similitud a los 42 aislamientos de queso jarocho .....	29
Figura 11. Muestras de PCR – RAPD´S de <i>Lactobacillus</i> en gel de agarosa 1.5 %. (De izquierda a derecha) iniciador Lac 211, Línea M: MPM 500 pb (Biorad), Línea 1: 31, Línea	

2: 32, Línea 3: 33, Línea 4: 34, Línea 5: 35, Línea 6: 36, Línea 7: 37, Línea 8: 38, Línea 9: 39, Línea 10: 40, Línea 11: 41, Línea 12: 42, Línea 13: Yakult®, Línea M: MPM 1 Kb (Axygen). .....	30
Figura 12. Dendrograma del Iniciador M13 en los 42 aislamientos. ....	32
Figura 13. Dendrograma del Iniciador 211 de los 42 aislamientos. ....	33
Figura 14. Dendrograma del Iniciador 272 de los 42 aislamientos. ....	34

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Relación de lugares muestreados. ....	1
Cuadro 2. Iniciadores para PCR – ITS, sintetizados en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en Cuernavaca, Morelos, México.....	6
Cuadro 3. Programa de amplificación para PCR – ITS de <i>Lactobacillus</i> . ....	7
Cuadro 4. Mezcla de reacción para PCR – ITS set Invitrogen. ....	8
Cuadro 5. Iniciadores sintetizados en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en Cuernavaca, Morelos, México. ....	11
Cuadro 6. Programa de amplificación para PCR – RAPD – <i>Lactobacillus</i> .....	12
Cuadro 7. Iniciadores para PCR – RAPD, sintetizados en el Instituto de Biotecnología. (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en Cuernavaca, Morelos, México.....	13
Cuadro 8. Porcentaje de características morfológicas de las bacterias aisladas.....	20
Cuadro 9. Caracterización morfológica de bacterias aisladas del queso jarocho .....	21
Cuadro 10. Porcentaje de similitud de las 42 Bacterias aisladas en el BAST de la NCBI. 27	



Cuadro 11. Descripción de iniciadores seleccionados para los 42 aislamientos de BAL. ...31

## RESUMEN

Se analizaron 42 muestras de bacterias ácido lácticas aisladas de queso jarocho de empresas lácteas del estado de Veracruz, con el propósito de identificarlas morfológica y molecularmente, las bacterias se aislaron en agar MRS (Man Rogosa Sharpe), realizando pruebas de tinción Gram, catalasa y oxidasa, así como el análisis molecular mediante las técnicas de PCR, específicamente la Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPDs por sus siglas en ingles) y la técnica de Transcripción de Espacios Internos (ITS, por sus siglas en ingles), los resultados obtenidos mediante el análisis morfológico resultó en formas de colonias características de bacterias ácido lácticas (aspecto circular, una ligera elevación, convexas y de borde entero), 42 bacterias Gram positivas, 32 catalasa negativas, 10 catalasa positiva, 32 oxidasa negativas y 10 oxidasa positiva. Molecularmente, se obtuvo un total de 9 cepas de *Lactobacillus murinus* cepa AU06, 5 del género *Enterococcus* especies: *faecalis* Bal 1 15, *faecium* cepas M1523J1L, Cd109-16 y Bal 1 5. 20 cepas del género *Bacillus*, 5 especies del género *Lactobacillus*: *casei*, *curvatus*, *paracasei*, *plantarum* y *ramnosus* y 1 bacteria no cultivable clon PB2\_aai21a12. La prueba de RAPD's – PCR no logró agrupar adecuadamente las bacterias y solo complementó la información lograda con la identificación morfológica y de ITS –PCR.

**Palabras clave:** Queso jarocho, bacterias ácido lácticas, ITS – PCR.

## ABSTRACT

42 samples of lactic acid bacteria isolated from Jarocho cheese dairies in the state of Veracruz, in order to identify morphological and molecularly analyzed bacteria were isolated in MRS agar (Man Rogosa Sharpe). We're testing by Gram stain, catalase and oxidase and molecular analysis using techniques of the PCR, specifically RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and Internal Transcribed Spacer technique (ITS), the results obtained by morphological analysis resulted in forms of colonies characteristics of lactic acid bacteria (loop aspect, a slight elevation, convex and integer edge ). Were 42 Gram-positive, 32 catalase negative, 10 catalase positive, 32 negative and 10 positive oxidase. By molecular technique found a total of 9 strains of *Lactobacillus murinus* AU06 strain, 5 *Enterococcus* species was obtained: *faecalis* BAL1 15, strains *faecicum* M1523J1L, *Bal* 1 5 and Cd109-16, and 20 strains of the genus *Bacillus*, 5 species *Lactobacillus*: *casei*, *curvatus*, *paracasei*, *plantarum* and *rhamnosus* and one uncultivable bacteria clone *PB2\_aai21a12*. The test RAPD's - PCR failed to properly group the bacteria and only complemented the information obtained with morphological identification and ITS -PCR.

**Keywords:** Jarocho Cheese, Lactic Acid Bacteria, ITS - PCR.

## INTRODUCCION

La industria quesera en México presenta una tendencia de crecimiento anual del 5% del 2007 al 2011 como lo muestran las cifras emitidas por el SIAP (2012), de tal manera que resulta importante conocer y controlar el proceso de producción de esta industria tanto en el aspecto de seguridad alimentaria como en las características organolépticas, de acuerdo a Cervantes *et al.* (2006) la inocuidad, la calidad nutricional y los atributos de valor determinan la calidad de un alimento. Los quesos mexicanos genuinos cumplen con estas características, con excepción de tener la inocuidad adecuada principalmente para los pequeños productores en el mercado nacional, se conocen cerca de 25 a 30 tipos de quesos artesanales, sin embargo este sector se encuentra amenazado por quesos importados y análogos (Villegas, 2004). Para lograr los atributos de valor y la inocuidad, los cultivos lácteos entre ellos las bacterias ácido lácticas son parte fundamental ya que imparten al queso características sensoriales genuinas y abatimiento del pH que constituye un factor de conservación. Dentro de este grupo de quesos mexicanos se encuentra el queso jarocho, el cual se produce en la zona centro de Veracruz considerado como fresco, de pasta blanda prensada, con forma cilíndrica y prismático-rectangular, salado y con un peso de 250 g hasta 20 kg, comercializado principalmente en los municipios más cercanos al lugar donde se produce (Villegas, 2004).

Dada la importancia que tienen las bacterias ácido lácticas en los atributos sensoriales, se han realizado aislamientos e identificación de las mismas para

utilizarlas como cultivos iniciadores (Ramos *et al.*, 2009), o para conocer la microbiota de los quesos analizados para su caracterización, otra parte importante es la capacidad probiótica de estas bacterias como microorganismos benéficos en la alimentación humana y su viabilidad (Kourkoutas, 2006). La caracterización e identificación se ha abordado en aspectos fenotípicos y genotípicos de la microflora donde se aprovechan sus reacciones de fermentación (homo o heterofermentativas). Por lo anterior, el presente trabajo se centra en la identificación de las bacterias ácido lácticas a nivel molecular con las técnicas de ITS y RAPD's-PCR, además de realizar una identificación morfológica.

### **OBJETIVO GENERAL**

- Realizar la identificación morfológica y molecular de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de queso jarocho de empresas lácteas del Estado de Veracruz.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar la identificación morfológica y fenotípica de las bacterias ácido lácticas presentes en el queso jarocho.
- Realizar una identificación molecular mediante la técnica de RAPD's-PCR de las bacterias ácido lácticas presentes en el queso jarocho.

- Realizar la identificación molecular con la técnica de ITS-PCR para las bacterias ácido lácticas del queso jarocho

## REVISION DE LITERATURA.

### **Quesos genuinos artesanales en México.**

Queso es el nombre genérico para el alimento resultante de la coagulación de la leche de varios mamíferos (v.g. vaca, cabra y oveja) y la subsiguiente deshidratación del gel por medio de varias operaciones (cortado, agitación del suero/cuajada, etcétera) y “formateado” por moldeo y prensado (Villegas y Cervantes, 2011), no obstante, es mucho más que una simple cuajada de leche, es también un bien cultural alimentario, soporte de una red o cadena agroalimentaria local de importancia económica, que puede contribuir al desarrollo regional (Gerrini y Prost, 2003).

De acuerdo a lo comentado por Cervantes *et al.* 2006, en México existen más de 30 variedades de quesos genuinos que no son conocidos, debido a la falta de investigación para rescatar estas variedades y darlas a conocer a la mayoría de la población. Se entiende por quesos mexicanos genuinos, aquellos elaborados a partir de leche fluida de vaca, con el empleo mínimo de aditivos, incorporando los permitidos por las normas vigentes. No incluyen grasa vegetal, ni derivados proteicos, a excepción de pequeñas cantidades de estos últimos, solamente para estandarizar la relación % de grasa/ % de proteínas (Villegas, 2004).

Aunado a lo anterior la elaboración de un queso genuino artesanal puede incorporar varios elementos más a los antes ya mencionados, con respecto al territorio donde son elaborados, tales como: un saber tradicional, una reputación vinculada a una región reconocida, una calidad de leche y microflora láctica vinculadas con los recursos naturales y saber hacer ganadero de la región, una cultura de producción y un buen funcionamiento de la cadena productiva (Villegas y Cervantes, 2011).

Sin embargo la industria quesera artesanal se encuentra amenazada por la amplia variedad de quesos análogos o también llamados quesos de imitación, puesto que ofrecen precios mucho más bajos, el déficit de leche nacional de buena calidad, la creciente oferta externa de “polvos lácteos proteicos” (v.g. leche en polvo y caseinatos); y nuevos hábitos de consumo que privilegian los productos con grasa vegetal, bajos en colesterol, y la falta de una normatividad clara y operativa que regule estos productos productiva (Villegas y Cervantes, 2011).

Dentro de los principales quesos genuinos artesanales conocidos en México se encuentran: el Oaxaca con un tipo de pasta hilada, el chihuahua con una pasta prensada no cocida o ligeramente cocida, panela con características de fresco y blando, el queso Veracruz cilíndrico de pasta blanda y prensada, entre muchos otros (Villegas y Cervantes, 2011), como ya se mencionó una de las características principales de los quesos genuinos es que se elaboran con leche cruda, el 27 de septiembre de 2010 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, en la cual se prohíbe la



elaboración de quesos con leche cruda, por tal motivo toda la industria quesera deberá utilizar leche pasteurizada o sometida a un tratamiento térmico, para eliminar los microorganismos patógenos, sin embargo la solución no está en la prohibición sino en las adecuadas prácticas zootécnicas que permita producir leche en hatos libres de enfermedades transmisibles a las personas y el manejo higiénico en todo el proceso de transformación, ya que al también se eliminan los microorganismos benéficos propios de la leche o bacterias ácido lácticas (BAL), determinantes en el sabor y olor, lo que deriva en quesos de mucho menor atractivo sensorial (Espinoza *et al.* 2010).

### **Agroindustria quesera en México.**

La producción de leche de bovino se realiza en la mayor parte del territorio nacional con una producción en 2012 de 10.88 toneladas, con un valor de 56.445 millones de pesos (SIAP, 2012). Según datos del censo agrícola y forestal 2007, el país cuenta con alrededor de 1.13 millones de unidades de producción de ganado bovino y cerca del 60% de estas unidades tienen como actividad principal el desarrollo o engorda de bovinos, además practican cuatro sistemas de producción: especializado, semi-especializado, familiar y de doble propósito, Los tres últimos corresponden a pequeños y medianos productores (Cervantes *et al.*, 2007). El sistema predominante es el especializado, con excepción de Veracruz con sistema doble propósito y Jalisco con sistema semi-especializado. La SAGARPA reporta que el 50.6% de la producción total de leche se genera en

sistemas especializados, el 21.3% en sistemas semi-especializados, el 18.3% por el ganado de doble propósito y el sistema familiar produce el 9.8%. Según los datos reportados por el INEGI, generados a partir del último censo ganadero, la producción de leche nacional proviene en un 63 por ciento de ganado especializado y el 37 por ciento restante de ganado de doble propósito. De acuerdo a estos datos, los estados con mayor producción de leche proveniente de ganado especializado son Jalisco con un 18.8 por ciento, Región Lagunera con 19.2 por ciento, Chihuahua con 9.3 por ciento y Veracruz con 6.9 por ciento. De la leche proveniente de ganado de doble propósito el principal estado productor es Veracruz con 15 por ciento, seguido de Jalisco con 10 por ciento, Sinaloa con 8 por ciento, Sonora con 6 por ciento y Chiapas con 5.5 por ciento. En el año 2000, los lecheros de pequeña escala aportaron prácticamente la mitad del volumen nacional producido (49%), sin embargo, su importancia relativa está disminuyendo ya que en 1980 contribuían con tres cuartas partes del mismo (76%). Los datos reflejan dos realidades: la gran significación que ha tenido y tiene la pequeña ganadería en la oferta lechera nacional y el abandono de la actividad por pequeños productores que no han logrado sobrevivir a los diferentes escenarios de crisis que ha padecido el subsector (Cervantes *et al.*, 2007).

En México, la industria quesera artesanal se puede clasificar convencionalmente en tres estratos (según el volumen de leche que procese diariamente): pequeña, transforma volúmenes menores a 2 000 L/día; mediana, procesa entre 2 000 y 20 000 L/día; gran industria, que maneja volúmenes superiores a 20 000 L/día (Villegas, 2004). La producción de queso en México de acuerdo a cifras emitidas

por SIAP 2012, tiene una tendencia positiva ya que se reportan cifras que van de 229,632 ton en el año 2007 y para el año 2011 ya se tenía una producción de 275,413 ton.

### **Queso Jarocho en la región y su importancia.**

La producción de leche en la región del centro de Veracruz se ha caracterizado por pequeñas unidades de producción familiar, a pesar de su potencial pecuario y lechero en dicha región y en otras regiones del estado, existe un desarrollo demasiado lento en la agroindustria de productos lácteos (Barragán, 2011). En el estado de Veracruz se pueden encontrar una gran cantidad de pequeñas agroindustrias de quesos regionales como el queso jarocho, queso enreatado, queso ahumado, entre otros. Dichos productores no han logrado establecer una marca colectiva para su producto que les permita tener ventajas comerciales y competitivas frente a otras empresas y productos que se expenden en la misma región (Chombo, 2002).

Barragán (2011) reporta una investigación de la inocuidad de queserías rurales de la región centro-sur del estado de Veracruz, la zona de la Joya en la región centro-norte y la zona de Tlacotalpan (**Figura 1**) en la cual realizó un trabajo en campo, para georreferenciar los principales productores de dicha región, Se reportan un total de 97 productores de los cuales la mayoría desarrollan queso jarocho existe cierta dificultad para estimar la confiabilidad de dicha cantidad, sin embargo el



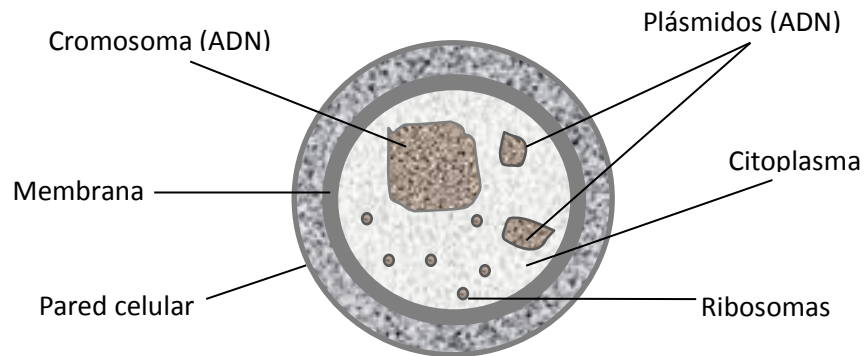
productos lácteos, esto refleja la orientación quesera de las empresas entrevistadas ya que el 74.7% considera que la producción de dicho queso es muy importante comparado con el restante 25.3% que lo consideran poco importante o igual de importante que otros productos (Barragán, 2011).

### **Cultivos lácticos.**

Los cultivos lácticos se pueden definir como una cepa de microorganismos que se propaga o cultiva para inocularse o “sembrarse” en la leche de proceso y así poder orientar o controlar una fermentación deseada que imparta propiedades sensoriales atractivas en un producto lácteo (Villegas, 2004). Las bacterias ácido lácticas (BAL), están ampliamente difundidas en la naturaleza ya que las podemos encontrar en diferentes medios tales como: leche cruda, carne, vegetales crudos y algunas especies son habitantes normales del cuerpo humano. Las BAL son organismos unicelulares, procarióticos, de estructura relativamente simple, morfológicamente son cocos, estreptococos y bacilos, son grampositivas y anaerobias, pero aerotolerantes, no motiles, no pigmentadas, no reducen los nitratos y son catalasa negativa (no la producen), se reproducen en repartición o división binaria (mitosis) y solo pueden presentar un tiempo de generación del orden de 30 a 90 min en condiciones óptimas (Villegas, 2004).

La estructura celular de las bacterias ácido lácticas destaca por la pared celular que contiene enzimas involucradas en el fraccionamiento de las proteínas de la

leche y el material nuclear se reduce a un cromosoma formado por una doble hélice de ADN (Figura 2).



**Figura 2.** Estructura básica de un coco lactofermentador (Villegas, 2004).

La clasificación de las BAL estuvo basada mucho tiempo en sus características fenotípicas, sin embargo con el uso de técnicas moleculares principalmente sabemos ahora que las bacterias ácido lácticas están constituidas por 20 géneros: *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Allaiococcus*, *Atopobium*, *Dolosigranulum*, *Globicatella*, *Lactosphaera*, *Paralactobacillus* y *Bifidobacterium*. Las últimas siete bacterias están relacionadas con las bacterias ácido lácticas, tanto fisiológica como filogenéticamente (Collins *et al.*, 1993). En la industria alimentaria las bacterias ácido lácticas tienen un papel importante, específicamente en productos derivados de la leche, en quesos además de aportar un medio ácido y preservar alimentos de las esporas, también benefician

características organolépticas como el sabor, la textura, el olor y aroma de dichos alimentos fermentados (Axelsson *et al.*, 1993).

Las bacterias ácido lácticas también se han clasificado por el tipo de fermentación de la lactosa que desarrollan, homofermentativas (producen solamente ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias, y según la temperatura de crecimiento en mesófilos y termófilos), (Betrand *et al.*, 2003)

### **Caracterización fenotípica clásica de bacterias ácido lácticas.**

La caracterización fenotípica tradicional o clásica de bacterias en general y por ende de bacterias ácido lácticas, es desarrollada en la mayoría de los laboratorios de microbiología, estos constituyen la base de la descripción formal de la taxa de las especies y subespecies hasta género y familia (Wayne *et al.* 1987).

El uso de la caracterización fenotípica en bacterias lácticas tuvo importantes progresos cuando se reconoció la similitud de las bacterias acidificantes de la leche y las bacterias productoras de ácido láctico, provenientes de otros ambientes, Orla Jensen se basó en un número limitado de características para la clasificación: morfología, agrupamiento celular, forma de fermentación de la glucosa (homo o heterofermentativo), temperaturas de crecimiento (10 y 45 °C) y la utilización de varios azúcares para su crecimiento (Ingram, 1975), el trabajo aportado por este personaje ha tenido un fuerte impacto en la clasificación y sistemática de las bacterias ácido lácticas y aun cuando ha sido revisada en muchas ocasiones, algunos de sus conceptos aún prevalecen, la caracterización

fenotípica comprende pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas y han sido ampliamente estudiadas a nivel de grupo y para la diferenciación de especies en particular (Williams, 1975).

Ramos *et al.* (2009) realizó la identificación de 20 cepas de bacterias ácido lácticas de queso crema tropical, de acuerdo al tipo de fermentación producida, utilizando el sistema API 50 CH (BioMerieux), además de realizar pruebas de hidrólisis de amonio, este tipo de pruebas se combinan con otras más sofisticadas y novedosas para garantizar un diagnóstico más certero y real. Existen otros parámetros que son útiles en una caracterización fenotípica tales como: el pH, acidez, actividad proteolítica, actividad lipolítica, entre otros, ya que apoyan al análisis principal y son determinantes por si solos (Acabanda *et al.* 2013; Ishikawa *et al.* 2006).

Comúnmente las especies de lactobacilos y bifidobacterias han sido identificadas en base a la morfología celular, análisis de productos de fermentación y asociación de actividad enzimática y la capacidad de utilizar varios sustratos carbohidratados, la aplicación de estas características en la clasificación e identificación de BAL's, sin embargo los métodos fenotípicos sufren de una carencia en la reproducibilidad generada por condiciones de cultivo relacionadas a diferentes laboratorios y a la diversidad de biotipos que comprende las especies reconocidas (Hammes y Vogel, 1995).



## Métodos genotípicos

A diferencia de los métodos fenotípicos, los análisis de los ácidos nucleicos proveen una base para los métodos de identificación que son reproducibles de un laboratorio a otro, debido a que las secuencias nucleotídicas de este tipo de moléculas no cambian con las condiciones de cultivo (Tannock, 1999). Como ya se mencionó los métodos genotípicos son aquellos basados en el uso de moléculas de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) y ARN (Ácido Ribonucleico), estos métodos actualmente dominan el estudio taxonómico moderno como una consecuencia del progreso tecnológico (Vandamme *et al.*, 1996).

Una de las herramientas que ha generado la biología molecular es la denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa o Reacción de Polimerización en Cadena (PCR –Polimerase Chain Reaction- por sus siglas en inglés), la cual es una novedosa técnica ampliamente utilizada por diversas áreas de la ciencia, que tiene la finalidad de amplificar en condiciones *in vitro* el ADN de cualquier genotipo (Mullis, 1990).

La PCR desarrolla metodologías con la aplicación de marcadores moleculares, como son los marcadores denominados Amplificación Aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés: Random Amplified Polymorphic DNA), Fragmentos de Restricción de Longitudes Polimórficas (RFLP, por sus siglas en inglés: Restriction Fragment Length Polymorphisms), entre otras, que permiten la diferenciación a nivel molecular entre variedades o cultivares analizados dentro de una misma especie (Valadez y Günter, 2000).

Los análisis y construcciones de mapas genéticos hasta el inicio de la década de los 90's, generalmente se realizaba con la segregación de Fragmentos de Restricción de Longitudes Polimórficas (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism, por sus siglas en inglés-) entre la progenie de un cruce sexual, pero esta técnica resultaba ser muy complicada y con riesgos de radiación (Deragon y Landry, 1992). Ante este riesgo, Williams *et al.* (1990) proponen un nuevo ensayo de polimorfismo de ADN, proceso sencillo basado en la amplificación de segmentos de ADN al azar con iniciadores de secuencia de nucleótidos arbitraria, que al ser comparada con los RFLP's resultó que los amplificadores de segmentos de ADN al azar pueden proveer marcadores de ADN en regiones genómicas en las cuales no tiene acceso el análisis RFLP debido a la presencia de secuencias repetitivas de ADN.

El RAPD fue utilizado inicialmente para producir patrones genéticos (fingerprints) de ADN de *Staphylococcus* sp. (Williams *et al.*, 1990) y posteriormente se utilizó para diferenciar bacterias ácido lácticas (Vogel *et al.*, 1994).

Una desventaja de la técnica RAPD es la poca reproducibilidad que se puede tener con ella; si ésta se quiere mantener, es necesario optimizar las concentraciones de ADN, MgCl<sub>2</sub>, los iniciadores y los dNTPs, así como la clase y fuente de ADN polimerasa y el uso del termociclador, ya que cualquier cambio en la polimerasa o el termociclador puede afectar los patrones de bandeo; cuando éstos no sean reproducibles, aun cuando se tomen en cuenta las precauciones necesarias, no pueden ser publicados (Valadez y Günter 2000). La técnica RAPD ha sido usada para asociar patrones específicos e índices de patogenicidad

mediante comparación del número y tamaño de fragmentos generados entre individuos usando secuencias sencillas de iniciadores (Hodge *et al.* 1995; Soll, 2000).

Aunado a lo anterior existe una pequeña región espaciadora altamente polimórfica denominada ITS por sus siglas en inglés: Internal Transcriber Spacer, los cuales son utilizados en estudios de filogenética y taxonómicos, normalmente se encuentran entre una serie de bloques o unidades repetidas de secuencias altamente conservadas con longitudes cercanas a 6 Kb, constituyendo a los genes del ADN ribosomal (rDNA) Los módulos repetidos de rDNA pueden ocurrir en uno o varios cromosomas y el número de copias varían de acuerdo al genoma. La ocurrencia de estas múltiples copias de rDNA abre la posibilidad de mayores regiones polimórficas intra individuales. Se han diseñado y descrito iniciadores específicos para amplificar las regiones ITS 1 y 2, se han diseñado partidores universales que amplifican estas zonas genéticamente conservadas y con ello se establece el nivel de diversidad (White *et al.* 1990). La variabilidad en las regiones ITS e IGS ha sido usada para reconocimientos de especies a género y de población a subespecie respectivamente. Dado que las regiones 18S y 28S son muy conservadas entre organismos con parentesco lejano, y sus secuencias han sido determinadas de diferentes eucariontes, los iniciadores complementarios para las secciones de esas regiones son usados para amplificar y obtener las regiones polimórficas ITS e IGS para análisis. La región ITS es particularmente usada para estudios de caracterización molecular de hongos (White *et al.* 1990).

## RAPD´s-PCR en bacterias ácido lácticas

Schneider *et al.*, 2004, reportan la identificación de bacterias ácido lácticas mediante la técnica RAPD para diferenciar los microorganismos aislados a nivel de género y especie, pero no para detectar las diferencias entre cepas de una misma especie, del total de los aislamientos, un 37% fueron identificados como *Pediococcus acidilactici*, otro 22 % como *Lactobacillus farciminis*, un 14 % como *L. reuteri*, un 9 % como *Enterococcus faecalis*, un 9 % como *E. faecium*, un 6 % como *L. salivarius* y un 3 % como *L. casei*. Cuando se estudian especies bacterianas estrechamente relacionadas o cepas dentro de una misma especie, el poder discriminante de la técnica basada en el estudio del 16S rDNA también puede ser limitado (McCartney, 2002). Andrighetto *et al.*, (2001) llevaron a cabo la identificación y diferenciación específica de 53 lactobacilos aislados de carne fermentada de la región de Veneto Italia, la mayoría de los aislamientos fueron asignados a las especies *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus curvatus* comentan que el método RAPD es fácil y se puede desarrollar rápidamente y que podría utilizarse en estudios de las poblaciones de *Lactobacillus* presentes en productos cárnicos principalmente los fermentados y podría ayudar a seleccionar los candidatos principales para ser utilizados como cultivos iniciadores en la fermentación de carne.

El género de *Lactobacillus* y los miembros de este género han sido ampliamente estudiados, es bien sabido que la taxonomía en el conocimiento de este género es

hasta el momento insatisfactorio. El género fenotípicamente es muy heterogéneo (Kandler y Weiss, 1986) y la identificación de cepas de *Lactobacillus* depende principalmente de su fisiología y criterios bioquímicos. Estas técnicas consumen mucho tiempo y a menudo son muy ambiguas. Por ejemplo, *L. acidophilus* y *L. gasseri* son encontrados en hábitats similares y no pueden ser distinguidos por simples criterios fenotípicos. Para ello se utilizan marcadores morfológicos. La técnica de amplificación aleatoria polimórfica del ADN (RAPD, por sus siglas en inglés) en conjunción con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), han sido utilizadas exitosamente para identificar principalmente organismos a nivel de cepas (Welsh y McClelland, 1990). El genoma entero es utilizado para la generación de perfiles de ADN (Williams *et al.*, 1990) y esto recientemente ha sido usado para distinguir entre cepas de *Bifidobacterium*.

Daud *et al.* (1997) realizaron una identificación y análisis filogenético de *Lactobacillus* usando multiplex RAPD-PCR, este método ha sido fortuitamente desarrollado e incluye el uso de dos primers en una misma reacción (Du Plessis y Dicks, 1995), en esta ocasión se obtuvo un perfil RAPD-PCR que proporcionó información suficiente para desarrollar un dendrograma de relaciones genéticas entre cepas de una colección de la Escuela de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Nueva Gales del Sur y cepas de *Lactobacillus* aislados del tracto digestivo de ratón, concluyendo que esta técnica es útil para la caracterización e inferencia de relaciones de *Lactobacillus* aislados.

## ITS en bacterias ácido lácticas

El uso de la técnica de Espacios Transcritos Intergénicos (ITS por sus siglas en inglés) ha sido utilizada principalmente en organismos eucariontes, debido a que los genes del ADN ribosomal (rADN) en estos generalmente existen como elementos en bloques repetidos. Cada unidad repetida se compone de secuencias altamente conservadas de una longitud cercana a 6 Kb, que contiene además esta pequeña región espaciadora altamente variable (ITS) utilizada para estudios filogenéticos y taxonómicos. Los módulos repetidos de rADN pueden ocurrir en uno o varios cromosomas y el número de copias varían de acuerdo al genoma. La ocurrencia de estas múltiples copias de rADN abre la posibilidad de mayores regiones polimórficas intraespecíficas (Avisé, 1994). Sin embargo también se ha utilizado en investigaciones con bacterias lácticas, como la de Drake *et al.*, 1996, ellos realizaron una diferenciación de cepas de *Lactobacillus helveticus* utilizando ITS en la región 16s a la 23s, logrando agrupar a un total de 60 cepas. Por otra parte Jacobsen *et al.*, (1999) realizaron la identificación de 47 cepas probióticas activas de *Lactobacillus* spp.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo

Se recolectaron originalmente 42 muestras de queso jarocho, elaborado artesanalmente por pequeños productores de empresas lácteas de diferentes municipios del estado de Veracruz (Cuadro 1). Las muestras fueron colectadas utilizando guantes de látex, se depositaron en bolsas Ziploc<sup>®</sup> en condiciones asépticas, los especímenes fueron transportados en una hielera con geles refrigerantes a una temperatura de 4 °C, y trasladadas al Laboratorio de Biotecnología Microbiana Aplicada, del Colegio de Postgraduados (COLPOS) Campus Córdoba. Tras la recepción de muestras, fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C hasta su procesamiento.

**Cuadro 1.** Relación de lugares muestreados.

No Muestra	Origen	No Muestra	Origen	No Muestra	Origen	No Muestra	Origen
1	Quesería y salchichonería Juquilita	13	Efraín Lobato	25	Tlalixcoyan	37	Quesería Liz
2	Cremería Mary	14	Artemia García	26	Tlalixcoyan	38	Quesería Liz
3	Cremería Isabel	15	Loc. Camarón y Soledad	27	Tlalixcoyan	39	Lucía Farfán
4	Cremería Isabel	16	Carlos Paredes	28	Tlalixcoyan	40	Lucía Farfán
5	Cremería Ruíz	17	Carlos Paredes	29	Queso Enlatado o enriatado	41	Felicitas Alarcón
6	Cremería Llanos	18	Cremería El Mangal	30	Queso Enlatado o	42	Isidoro Reyes

					enriatado
7	Cremería Llanos	19	Luis Gamboa	31	Judith
8	Cremería Peña	20	Luis Gamboa	32	Judith
9	Javier Castillo	21	Felipe Cruz	33	Judith
10	Javier Castillo	22	Tlalixcoyan	34	Judith
11	Evaristo Lagunes	23	Tlalixcoyan	35	Lucia
12	Efraín Lobato	24	Tlalixcoyan	36	Lucia

## **Análisis fisicoquímico de las muestras de queso**

Se realizaron las determinaciones de sólidos solubles en el queso, tomando una gota de suero y depositándola en el refractómetro Atago®. Para la determinación de pH, se colectaron 20 mL de suero del queso y se tomó lectura en el potenciómetro Denver Instrument®. Finalmente para la determinación de porcentaje de humedad y porcentaje de sólidos totales se tomaron 3 g de queso y se colocaron en el medidor de humedad Ohaus®. Para la evaluación de microorganismos presentes en cada muestra de queso se realizó la cuantificación de Unidades Formadoras de Colonia (UFC), que consistió en tomar 1 g de queso, se depositó en un tubo Corning® con 10 mL de agua destilada estéril, se homogenizó con el agitador intermitente (Vortex) Labnet International Inc®. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales hasta 10<sup>-10</sup> utilizando tubos Eppendorf®. Las siembras se realizaron por duplicado con la técnica de vertido en placa, para ello se utilizó medio de cultivo sólido Man Rogosa y Sharpe (MRS Difco®), se depositó 0.1 mL de la dilución en el centro de la placa con agar y por capilaridad con un tubo de vidrio en forma de “L” se distribuyó alrededor de la caja



Petri (90 x 15 mm). Las diluciones sembradas fueron incubadas a 37 °C por 24, 48 y 72 h, una vez desarrollado el crecimiento bacteriano, se calcularon las UFC presentes en cada cultivo.

### **Identificación morfológica de las bacterias ácido lácticas**

Se realizó la identificación de bacterias ácido lácticas considerando el crecimiento de las colonias mediante UFC de acuerdo a Alexander y Strete (2001), fueron aisladas en medio de cultivo sólido Man Rogosa y Sharpe (MRS Difco™) e incubadas a 37 °C entre 24 y 48 h de acuerdo a las condiciones de crecimiento. Las bacterias que no presentaron crecimiento óptimo, para su reactivación, se inocularon en medio de cultivo líquido MRS Difco™ a 37 °C y se agitaron a 190 rpm durante 48 h. La preservación de bacterias, se llevó a cabo tomando rodajas con sacabocados No. 5 (0.5 cm de diámetro), depositadas en tubos de propileno de 2 mL (viales criogénicos), se le agregó glicerol al 10% y fueron almacenadas a 4 °C.

Se realizó la tinción Gram de acuerdo al procedimiento del kit de colorantes HYCEL®, se realizaron las pruebas de catalasa (peróxido de hidrogeno al 30%) y oxidasa (procedimiento de discos BIORAD®) (Holt *et al.*, 1994), se verificaron las características fenotípicas de las colonias aisladas utilizando el estereoscopio marca Zeiss®, con lo que se identificó la forma, borde, elevación, superficie, entre

otras características (Alexander y Strete, 2001) y que serán reforzadas con la caracterización molecular.

## **Extracción de ADN**

Se realizó la extracción de DNA de las bacterias obtenidas de medio de cultivo líquido bajo las condiciones descritas anteriormente, se procedió a la extracción de ADN genómico de Bacterias Acido Lácticas (BAL), con el método modificado de purificación de plásmidos con lisis alcalina sin gradiente de CsCl (Sambrook y Russell, 2001). Primeramente se Inoculó la cepa de BAL preservada, en medio de cultivo sólido agar Man Rogosa y Sharpe (MRS Difco<sup>®</sup>), se incubó a 37 °C/24 h (se verificó visualmente que no hubiera cristalización de las bacterias), posteriormente se inoculó una colonia de bacteria en MRS Broth (Difco<sup>®</sup>) utilizando tubos Eppendorf<sup>®</sup> de 1.5 mL, se desarrolló el crecimiento en agitación continua a 190 rpm durante 48 h como mínimo, se centrifugó el cultivo a 6000 rpm durante 8 minutos, se resuspendió la pastilla en 350 µL de Solución Birboim I (Glucosa 50 mM, Tris - HCl 25mM, pH 8.0), se agregaron 650 µL de solución Birboim II (para 5 mL se agregó: 250 µL de SDS 20% + 100 µL de NaOH 10N y el resto de agua millipore estéril) se agitó por inversión dos veces, se adicionaron 400 µL de solución Birboim III (Acetato de potasio + ácido acético pH 4.8. – se pesaron 176.6 g de acetato de potasio, se disolvieron en 200 mL de agua, se ajustó pH y se aforó a 600 mL de agua – Nota: se utilizan ~350 mL de ácido acético glacial), se agitó

por inversión dos veces, se mantuvo en hielo por 30 minutos, se centrifugó 9000 rpm por 10 minutos, se colectó el sobrenadante en tubos Eppendorf® y se adicionó un volumen de isopropanol frío, se mantuvo a -20 °C 1 hora, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla, se resuspendió la pastilla en 350 µL de agua millipore, se agregó 1 µL de RNasa e incubó en Termoblock por 30 minutos a 37°C, se adicionó la décima parte del volumen total de acetato de amonio 10 N mezclando en Vortex, se adicionaron 350 µL de Fenol – Tris, se mezcló en Vortex y centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm, se pasó a un tubo nuevo la fase acuosa, a la fase acuosa para limpiar remanentes de fenol –Tris, se agregaron 350 µL de cloroformo, se mezcló con Vortex y centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm, se pasó a un tubo nuevo la fase acuosa, se colectó la fase acuosa y añadió 2 volúmenes de Isopropanol frío, se mezcló por inversión, se mantuvo la fase acuosa 5 minutos a -20°C, se centrifugó por 5 minutos a 13200 rpm para compactar el ADN, se descartó el sobrenadante y lavó 2 veces la pastilla con 0.7 mL de etanol (EtOH) 70% frío, se secó la pastilla en un sistema Savant SpeedVac® de Thermo Scientific y se resuspendió en 200 µL de Tris – EDTA (TE) (10 mM – 1 mM, pH8) de acuerdo al tamaño de la pastilla. Por último la calidad del ADN se visualizó en un gel de agarosa al 1.2% en buffer de corrimiento TBE (Tris 0.89M, ácido bórico 0.089M, EDTA 0.002M) 0.5X, teñido con bromuro de etidio (0.5µg/mL) durante 20 min, se fotografió el gel con un fotodocumentador utilizando el programa Quantum®, y se utilizaron marcadores de peso molecular DNA Mass Ladder Gibco BRL<sup>MR</sup>

## Identificación molecular de las bacterias ácido lácticas

### Amplificación ADN ITS-PCR

Se estandarizó con 3 pares de iniciadores para la amplificación por el método PCR – ITS, los iniciadores fueron F357 [5'-biot-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'] – R518 [5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'] (Zwart *et al.*, 2003), UF1 – UR1 y Lca1 – Lca2, de las 42 bacterias se utilizaron la 6 primeras, se trabajó con el set de la marca Axygen®, se ajustaron las cantidades para realizar la mezcla de los componentes y se ocupó el programa de amplificación para PCR - ITS.

**Cuadro 2.** Iniciadores para PCR – ITS, sintetizados en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en Cuernavaca, Morelos, México.

Marcador molecular	clave	Nucleótidos	Secuencia	Espécimen
ITS	F357	15	TAC GGG AGG CAG CAG	<i>Lactobacillus</i>
ITS	R518	17	ATT ACC GCG GCT GCT GG	<i>Lactobacillus</i>
ITS	UF1	20	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	<i>Lactobacillus</i>
ITS	UR1	18	GCT GGC ACG TAG TTA GCC	<i>Lactobacillus</i>
ITS	Lca1	36	GTC TCA GGT AGA TGT CGA ATC AAT CAG TTC	<i>Lactobacillus casei</i>

AAG AGC				
ITS	Lca2	29	GTT TTC CCC GCA CAT	<i>Lactobacillus</i>
			GCG GGG GTG ATC CY	<i>casei</i>

La mezcla de reacción para PCR-ITS se llevó a un volumen final de 25 µL con 2.5 µL PCR Buffer A 10X (set AXYGEN®), 2.5 µL Enhancer 10X (set AXYGEN®), 2.5 µL MgCl<sub>2</sub> 25mM. (set AXYGEN®), 3.0 µL iniciador 10 µM, 3.0 µL iniciador 10 µM, 1.0 µL dNTP'S 10 mM. (Set SIGMA ALDRICH®), 2.0 µL DNA, 8.30 µL H<sub>2</sub>O millipore, 0.20 µL Taq Polimerasa 5U/µL. (set AXYGEN®) y con el ciclo específico para ITS como se muestra en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Programa de amplificación para PCR – ITS de *Lactobacillus*.

PCR-ITS	Etapas	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	Predesnaturalización	94°C	4 min
15 ciclos	Desnaturalización	94°C	15 s
	Alineamiento	48°C	15 s
	Extensión	72°C	15 s
20 ciclos	Desnaturalización	94°C	15 s
	Extensión	55°C	15 s
Extensión final		72°C	15 s
Conservación		4°C	

Después se realizó electroforesis de cámara horizontal de los iniciadores con los cuales había amplificación (F357 – R518, UF1 – UR1), con marcador de peso molecular de 100 pb. Se decidió trabajar con los iniciadores F357 – R518 para amplificar las 42 bacterias por el método PCR – ITS, ya que las bandas que se obtuvieron en la estandarización estuvieron en el rango de entre los 100 y 200 pb, la mezcla de reacción y el programa de amplificación que se utilizaron fueron de acuerdo a la mezcla ya mencionada y al programa referido en el cuadro 3, también se estandarizo sustituyendo algunos reactivos por la marca invitrogen® (cuadro 4). Se mandó a secuenciar el producto de los iniciadores F357 – R518.

**Cuadro 4.** Mezcla de reacción para PCR – ITS set Invitrogen.

<b>Componente</b>	<b>Volumen por Rx (µL)</b>	<b>Concentración Final</b>
PCR Buffer 10X (set INVITROGEN)	3.0 µL	1.2 X
MgCl <sub>2</sub> 25mM. (set INVITROGEN)	1.0 µL	1 mM
Iniciador 10 µM	1.0 µL	0.4 µM
Iniciador 10 µM	1.0 µL	0.4 µM
dNTP'S 10 mM. (set SIGMA ALDRICH)	1.0 µL	0.4 mM
DNA	1.5 µL	Variable
H <sub>2</sub> O millipore	16.3 µL	X
Taq Polimerasa 5U/µL. (INVITROGEN)	0.20 µL	0.04U
<b>Volumen Total</b>	<b>25 µL</b>	<b>-</b>

Posterior a la visualización de los geles en el Transiluminador Quantum-1000/20M®, se aislaron las bandas de PCR – ITS ubicadas entre 100 y 200 pb y se purificaron con el kit de Axygen, mediante la extracción de ADN en gel por el método de centrifugación: Se cortó el trozo del gel de agarosa que contiene el fragmento de ADN de interés, con un bisturí limpio, afilado y estéril, bajo iluminación ultravioleta. Se colocó el trozo de gel cortado sobre papel absorbente para eliminar los residuos del tampón. Se transfirió el trozo de gel a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, previamente tarado, Se anotó la diferencia de pesos y Se calculó el peso aproximado del trozo de gel. Se picó el gel en trozos pequeños y se pesó. En esta aplicación, el peso del gel se consideró como equivalente al del volumen. Por ejemplo, 100 mg de gel es equivalente a un volumen de 100 µL. Se centrifugó el tubo durante 30 segundos a 12.000 rpm para sedimentar el gel en la parte inferior del tubo. Se usaron las graduaciones del tubo para estimar el volumen del gel de agarosa. Se añadió un volumen de muestra 3X de Buffer DE-A, el color rojo de este buffer sirvió para añadir contraste en el siguiente paso, de manera que los trozos de agarosa, sin solubilizar pueden ser visualizados. Se resuspendió por agitación el gel en tampón de DE-A. Se calentó a 75 °C hasta que el gel estuviera completamente disuelto (6-8 minutos) y a 40 °C. Se agitó constantemente (cada 2-3 minutos) para acelerar la solubilización del gel. Se verificó que el gel estuviera totalmente disuelto y no se calentó el gel por más de 10 minutos. Se Añadió un volumen de 0.5X de Buffer DE-B al Buffer DE-A, se mezcló. (Se verificó que el fragmento de ADN fuera inferior a 400 pb, para complementar con un volumen de muestra 1X de isopropanol). El color de la mezcla se tornó amarillo tras la adición de tampón DE-B. Se observó que el

contenido tuviera un color uniforme amarillo antes de continuar. Se colocó dentro de un tubo de 2 mL para Microcentrifuga una columna miniprep. Se transfirió la agarosa solubilizada en la columna. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 minuto. Se descartó el filtrado del tubo de 2 mL. Se devolvió la columna Miniprep al tubo de 2 mL y se añadieron 500 µL de Buffer W1. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 segundos. Se descartó el filtrado del tubo para microcentrífuga de 2 ml. Se devolvió la columna Miniprep al tubo y se añadieron 700 µL de Buffer W2. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 segundos. Se verificó que el 95-100% de etanol haya sido añadido a Buffer W2 concentrado. Se anotó en la etiqueta de la botella para futuras referencias. Se descartó el filtrado del tubo para microcentrífuga de 2 ml. Se colocó de nuevo la columna Miniprep al tubo de 2 mL. Se añadió una segunda alícuota de 700 µL de Buffer W2 y se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 minuto. Se descartó el filtrado del tubo de microcentrífuga de 2 ml. Se colocó la columna Miniprep en el tubo de 2 mL. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 minuto. Se transfirió la columna Miniprep a un tubo Eppendorf 1,5 ml para microcentrífuga. Para eluir el ADN, se añadió de 25-30 µL de agua desionizada o Eluyente en el centro de la membrana. Se dejó reposar durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 minuto. Nota: Pre-calentar el eluyente a 65 °C por lo general mejora la eficiencia de elución. Nota: El agua desionizada también puede ser utilizado para la elución de los fragmentos de ADN. Una vez purificados los productos de PCR – ITS, se realizó electroforesis en gel de agarosa 1.5 %, se tiñeron con Bromuro de Etidio (BrEt) y se visualizaron en el Transiluminador Quantum-1000/20M®. Los productos se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM



(IBT) y las secuencias se alinearon en el BLAST (por sus siglas en inglés, Basic Local Alignment Search Tool), de la NCBI (por sus siglas en inglés, National Center for Biotechnology Information).

## Amplificación RAPD

Se utilizaron iniciadores para BAL (Bacterias Ácido Lácticas) RAPD a 10  $\mu$ M = 10 pmol/ $\mu$ L sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuadro 2). En nuestra investigación, para la amplificación por el método RAPD se estandarizó con los iniciadores Lac 272, 277, 211, 282, 245; de las 42 bacterias se utilizaron 4 bacterias: 5, 6, 7, y 8 para dicho propósito, se trabajó con el set de la marca Qiagen®.

**Cuadro 5.** Iniciadores sintetizados en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en Cuernavaca, Morelos, México.

Marcador molecular	iniciador	Clave	Nucleótidos	Secuencia	Espécimen
RAPD	642	Lac 272	10	5'-AGC GGG CCA A-3'	BAL *
RAPD	643	Lac 277	10	5'-AGG AAG GTG C-3'	BAL
RAPD	645	Lac 211	10	5'-GAA GCG CGA T-3'	BAL
RAPD	647	Lac 282	10	5'-GGG AAA GCA G-3'	BAL
RAPD	649	Lac 245	10	5'-CGC GTG CAA G-3'	BAL

\*BAL: bacteria ácido láctica

Se utilizaron tubos Eppendorf de 0.2 mL, el volumen final de mezcla fué de 25 µL, y contenía 2.5 µL de PCR Buffer 10X (Set Qiagen®), 5.0 µL de Q solución 5X (set Qiagen®), 1.5 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM (set Qiagen®), 4.0 µL de iniciador 10 µM (IBT®), 0.125 µL dNTP 10 mM de cada uno (set SIGMA ALDRICH®), 2.0 µL de ADN, 1U Taq polimerasa 5U/µL (set Qiagen®) y 9.3 µL de agua millipore. Se amplificó en Termociclador Techne® TC – 412, utilizando el siguiente programa (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Programa de amplificación para PCR – RAPD – *Lactobacillus*.

PCR-RAPD	Etapas	Temperatura	Tiempo
4 ciclos	Desnaturalización	94°C	5 min
	Alineamiento	36°C	5 min
	Extensión	72°C	5 min
30 ciclos	Desnaturalización	94°C	1 min
	Alineamiento	36°C	1 min
	Extensión	72°C	2 min
	Extensión Final	72°C	6 min
	Conservación	4°C	

Las muestras amplificadas fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C, posteriormente se visualizaron en gel de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio, se incluyó marcador de peso molecular de 100 y 500 pb de BIORAD®. De acuerdo a los resultados obtenidos de la estandarización PCR - RAPD, se decidió utilizar 4 de los 5 iniciadores para trabajar (272, 211, 282, 245) debido al mayor polimorfismo, resolución y reproducibilidad experimental.

Posterior a la anterior estandarización se trabajó con 3 iniciadores más para la amplificación por el método PCR – RAPD, fueron M13, P4, P7 (Cuadro 7), de las 42 bacterias se utilizaron 5 bacterias las cuales fueron 1,2,3,4 y 5 se trabajó con el set de la marca Axygen®. Realizada la mezcla de todos los componentes, se depositaron 25 µL en un tubo para PCR para 200 µL, y se amplificó en Termociclador Techne® TC – 412, utilizando el programa predeterminado para RAPD (tabla 3). Los productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio.

**Cuadro 7.** Iniciadores para PCR – RAPD, sintetizados en el Instituto de Biotecnología. (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en Cuernavaca, Morelos, México.

<b>Marcador molecular</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>clave</b>	<b>Nucleótidos</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Espécimen</b>
RAPD/ MICROSAT ELITES	656	M13	15	5´- GAG GGT GGC GGT TCT-3´	<i>Lactobacillus</i>
RAPD	658	P4	10	5´-CCG CAG CGT T- 3´	<i>Lactobacillus</i>
RAPD	657	P7	10	5´-AGC AGC GTG G- 3´	<i>Lactobacillus</i>

### **Análisis estadístico de los resultados de RAPD´s – PCR**

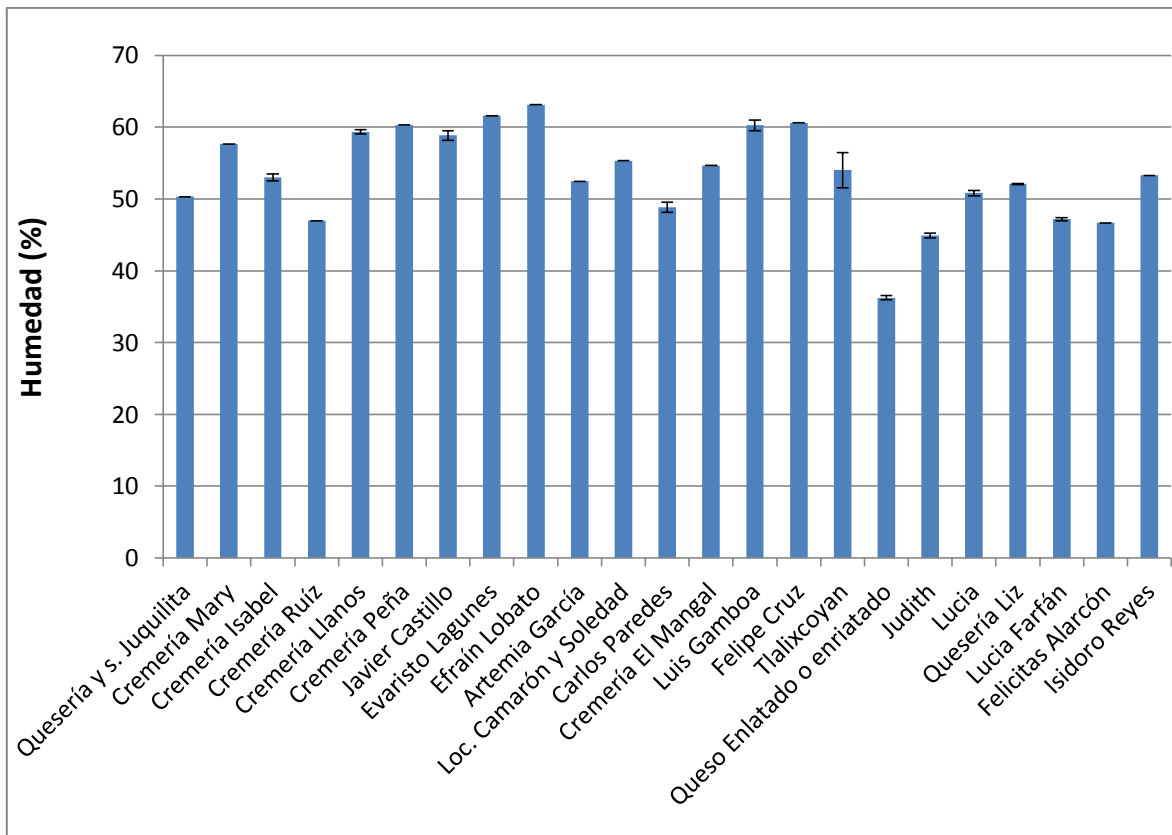
Para el establecimiento de las huellas genéticas derivadas de cada uno de los iniciadores evaluados mediante marcadores moleculares de RAPD´s – PCR con la combinación del se construyó una matriz binaria asignando valores de 0, en caso

de ausencia de la banda y 1 cuando la banda está presente de cada uno de los aislamientos. Con lo anterior se construye una matriz binaria de proximidad mediante el coeficiente de similitud de Jaccard, que cuantifica el grado de similitud entre cada par de objetos. El análisis se sometió a un reagrupamiento (Bootstrapping) con 1000 réplicas mediante el programa FreeTree® (Pavlicek *et al.*, 1999). El dendrograma se visualizó con el programa TreeView®.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

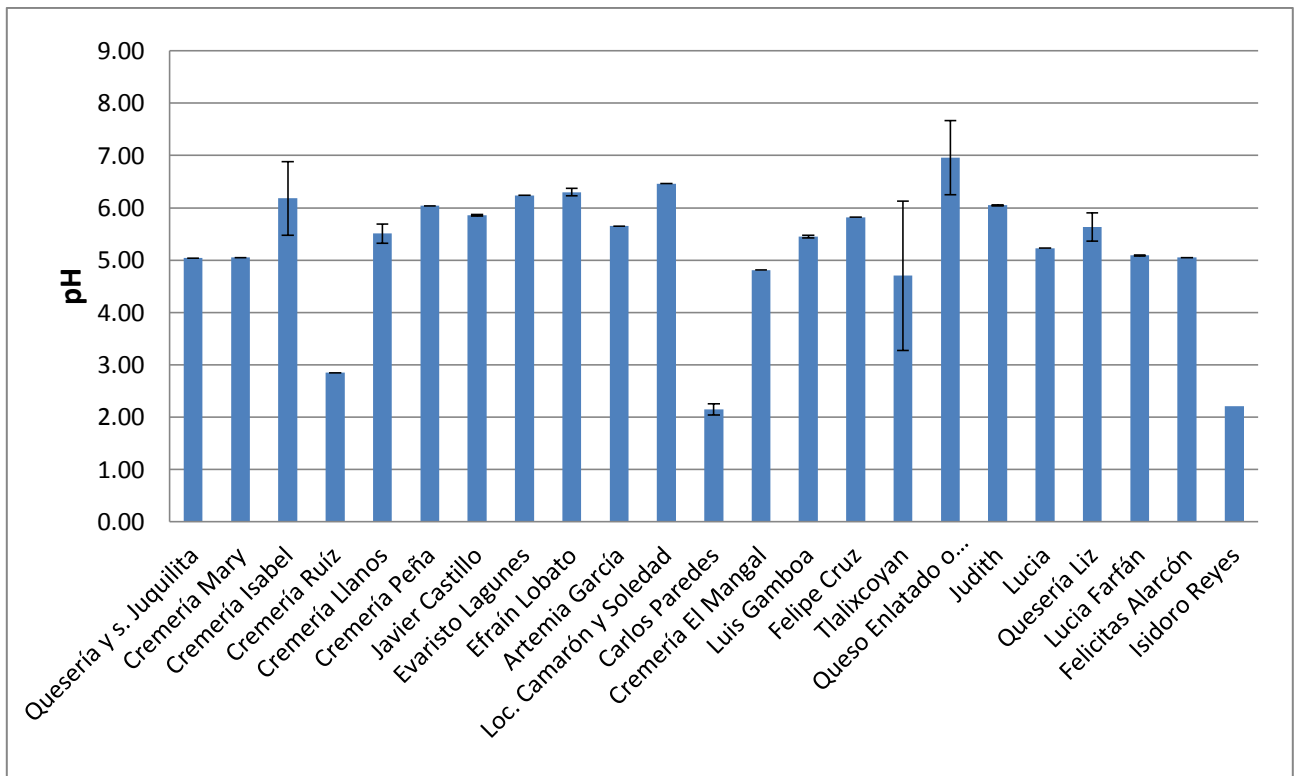
### **Análisis fisicoquímico de las muestras de queso**

Las características fisicoquímicas del queso jarocho tales como: porcentaje de humedad, pH y sólidos totales, de acuerdo a las distintas zonas del centro, sur y norte del estado de Veracruz y en diferentes puntos del proceso de producción, cabe mencionar que se utilizaron promedios de los puntos de muestreo para el análisis de los siguientes datos, los resultados mostraron mucha variación. Además, esto nos indica que como es un proceso artesanal no se cuenta con un sistema completamente estandarizado sin el apego absoluto de las normas de calidad e inocuidad dentro del proceso de producción y a cada muestra se midió la humedad, pH y sólidos totales (Figura 3, 4 y 5).



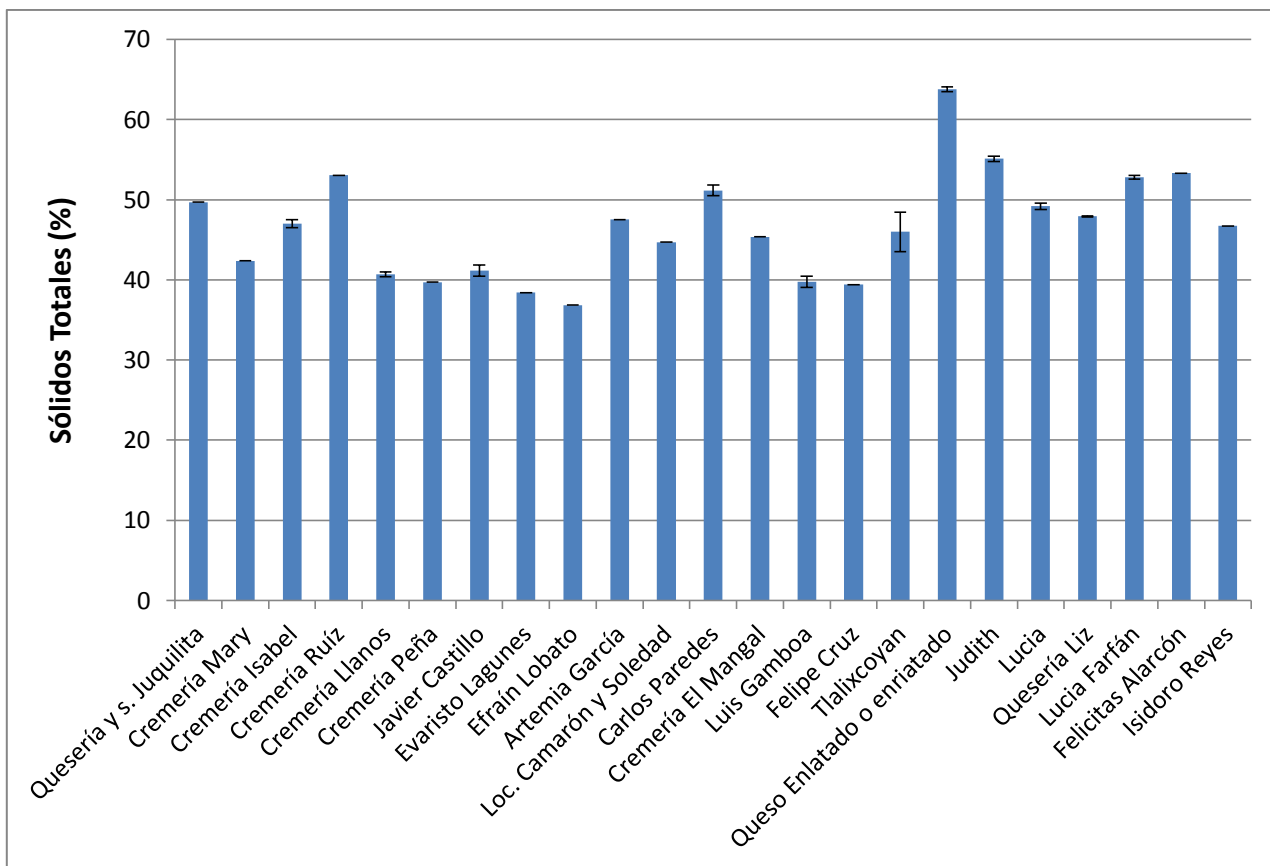
**Figura 3.** Porcentaje de humedad de las muestras de queso jarocho.

De acuerdo a la NOM 243 SSA1-2010, el porcentaje de humedad de los quesos frescos es alto, el queso jarocho está considerado dentro de esta clasificación, algunos productores tienen porcentajes de humedad por encima del 60% como es el caso de Javier Castillo, Evaristo Lagunés, Cremería Peña y Felipe Cruz esta variabilidad se da principalmente por las condiciones de manejo y almacenamiento, aunado a la diferencia en los procesos productivos, sin embargo el caso del queso enlatado el porcentaje de humedad a diferencia del resto se presentó con un promedio del 36.22%, lo que nos indica el control de este parámetro cuidando las condiciones de almacenamiento y manejo postproducción.



**Figura 4.** pH de las muestras de queso jarocho.

De acuerdo a la gráfica anterior podemos observar mayor error con respecto a la desviación estándar en la micro región de Tlaxicoyan, puesto que se abarcaron un número mayor de productores de esta zona y como ya se ha comentado los procesos productivos son muy variados entre cada productor, el pH de este tipo de es considerado por arriba de 4 puesto que es la característica de los quesos frescos, sin embargo el caso de Cremería Ruiz, Carlos Paredes e Isidoro Reyes, muestran valores muy por debajo de los establecido por las normas mexicanas, quizás y muy seguramente esto debido al bajo control de la actividad bacteriana y enzimática propias de este tipo de productos.



**Figura 5.** Porcentaje de sólidos totales de las muestras de queso jarocho.

Existe una relación inversamente proporcional entre el contenido de humedad y el porcentaje de sólidos totales de las muestras analizadas, puesto que se puede observar en la **Figura 5** el alto contenido de sólidos totales en las muestras de queso enlatado o enreatado, además de otras más como Cremería Ruiz y Judith.



## Identificación morfológica de las bacterias ácido lácticas

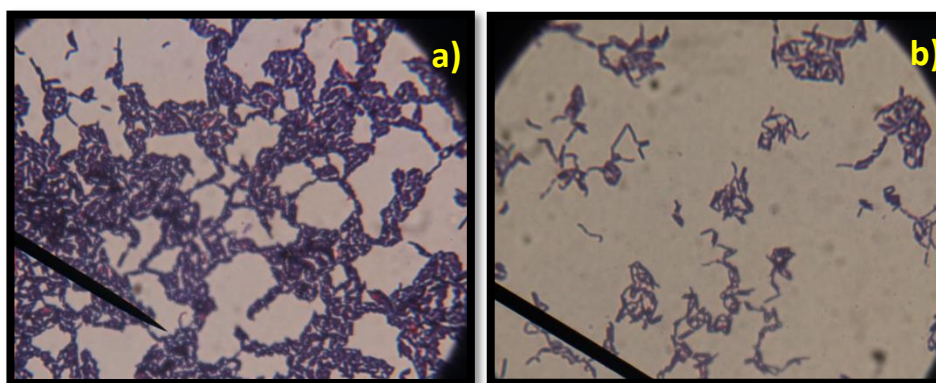
Las 42 colonias seleccionadas como bacterias ácido lácticas, presentaron un aspecto circular, una ligera elevación, convexas y de borde entero, como se muestra en la imagen macroscópica de una de las bacterias evaluadas (Figura 6).



**Figura 6.** Observación macroscópica de las BAL's aisladas.

## Tinción de Gram

Se obtuvieron 32 formas bacilares y 10 cocos, el 100% de las muestras resultaron ser Gram positivas (cuadro 8), la referencia utilizada en este estudio es el *Lactobacillus casei* cepa *shirota* producto de la marca Yakult® (Figura 7b).



**Figura 7.** a) *Lactobacillus* aislado del queso jarocho gram (+), b) *Lactobacillus casei* cepa *shirota* (Yakult®).

**Cuadro 8.** Porcentaje de características morfológicas de las bacterias aisladas

Característica	Cantidad	Porcentaje
Gram (+)	42	100
Bacilo	32	76.2
Coco	10	23.8

#### Prueba de catalasa y peroxidasa.

32 aislamientos presentaron catalasa negativa puesto que no descomponen el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, lo que corresponde a una característica propia de las bacterias ácido lácticas (Stainer, *et al.*, 1986), las restantes 10 cepas presentaron una prueba de catalasa positiva que no correspondería a una bacteria ácido láctica puesto que hay descomposición del peróxido de hidrogeno.

Puesto que las bacterias ácido lácticas son anaerobias y carecen del sistema citocromo, los 32 aislamientos mencionados en la prueba de catalasa de queso jarocho fueron negativos a la prueba de oxidasa y 10 mostraron respuesta positiva a dicha prueba (cuadro 9).

En el cuadro 9 se muestra el resumen de los resultados obtenidos respecto a la caracterización morfológica de bacterias ácido lácticas del queso jarocho, en el cual podemos observar y confirmar que se seleccionaron las bacterias de acuerdo a su morfología macroscópica mostrando relación con las colonias de bacterias ácido lácticas. El 100% de las bacterias fueron Gram positivas, solo 2 muestras de bacterias mostraron bordes rugosos, el rango total de tamaño fue de 0.2 mm a 3.0 mm, las 42 bacterias mostraron fácil emulsificación, con una opacidad ente transparente y opaca, consistencia cremosa propio de bacterias ácido lácticas, también mostraron una textura suave y una cromogenicidad blanca - crema (Stainer *et al.*, 1986).

**Cuadro 9.** Caracterización morfológica de bacterias aisladas del queso jarocho

BAL	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>FORMA</b>	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR
<b>ELEVACIÓN</b>	CONVEXO	CONVEXA	CONVEXO	CONVEXA	CONVEXO	CONVEXA	CONVEXO	CONVEXO
<b>TAMAÑO</b>	1.0 - 2.0 mm	1.5 - 2.0 mm	0.1 - 3.0 mm	1.0 - 2.0 mm	1.0 - 2.0 mm	1.0 - 1.5mm	0.5 - 1.0 mm	0.5 - 1.0mm
<b>BORDE</b>	LISO	LISO	LISO	LISO	RUGOSO	LISO	LISO	LISO
<b>TEXTURA</b>	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE
<b>CONSISTENCIA</b>	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA
<b>EMULSIFICACIÓN</b>	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL
<b>OPACIDAD</b>	TRANSPARENTE	OPACA	OPACA	OPACA	TRANSPARENTE	BRILLOSA	OPACA	OPACA
<b>CROMOGENICIDAD</b>	BLANCA	CREMA	CREMA	CREMA	BLANCA	BLANCA	BLANCA	BLANCA
<b>GRAM</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>ESTRUCTURA</b>	BACILO	COCO	BACILO	BACILO	BACILO	BACILO	BACILO	BACILO
<b>OXIDASA</b>	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
<b>CATALASA</b>	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)

BAL	9	10	11	12	13	14	15	16
FORMA	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	IRREGULAR	CIRCULAR	CIRCULAR
ELEVACIÓN	CONVEXA	CONVEXO	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXO	CONVEXA	CONVEXA
TAMAÑO	0.5 - 1.0 mm	1 mm	1.0 - 2.0 mm	1.0 mm	1.0 - 1.5 mm	1.5 - 3.0 mm	0.5 - 1.0 mm	0.5 - 1.5 mm
BORDE	LISO	RUGOSO	LISO	LISO	LISO	RUGOSO	LISO	LISO
TEXTURA	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE
CONSISTENCIA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA
EMULSIFICACIÓN	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL
OPACIDAD	OPACA	OPACA	BRILLOSA	BRILLOSA	BRILLOSA	OPACA	BRILLOSA	BRILLOSA
CROMOGENICIDAD	CREMA	BLANCA	BLANCA-GRIS	BLANCA	BLANCA	BLANCA	BLANCA	BLANCA-GRIS
GRAM	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ESTRUCTURA	BACILO	BACILO	BACILO	BACILO	BACILO	BACILO	BACILO	BACILO
OXIDASA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CATALASA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

BAL	17	18	19	20	21	22	23	24
FORMA	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR
ELEVACIÓN	CONVEXA	CONVEXO	CONVEXA	CONVEXO	CONVEXA	CONVEXO	CONVEXA	CONVEXA
TAMAÑO	0.5 - 1.0 mm	0.5 - 1.5 mm	0.5 - 1.0 mm	1 mm	0.2 - 1.0 mm	0.2 - 0.5 mm	1.0 - 2.0 mm	0.5 - 1.0 mm
BORDE	LISO	LISO	LISO	LISO	LISO	LISO	LISO	LISO
TEXTURA	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE
CONSISTENCIA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA
EMULSIFICACIÓN	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL
OPACIDAD	BRILLOSA	BRILLOSA	OPACA	TRANSPARENTE	BRILLOSA	TRANSPARENTE	BRILLOSA	BRILLOSA
CROMOGENICIDAD	BLANCA	BLANCA-GRIS	BLANCA-GRIS	BLANCA	BLANCA	BLANCA	BLANCA-GRIS	BLANCA
GRAM	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ESTRUCTURA	BACILO	BACILO	COCO	COCO	BACILO	BACILO	BACILO	BACILO
OXIDASA	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
CATALASA	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)

BAL	25	26	27	28	29	30	31	32
FORMA	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR
ELEVACIÓN	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXA
TAMAÑO	0.5 - 2.0 mm	0.5 - 1.0 mm	0.2 - 0.5 mm	0.5 - 1.0 mm	0.5 - 1.0 mm	1.0 - 3.0 mm	1.0 - 3.0 mm	1.0 - 1.5 mm
BORDE	LISO	LISO	LISO	LISO	LISO	LISO	LISO	LISO
TEXTURA	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE
CONSISTENCIA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA

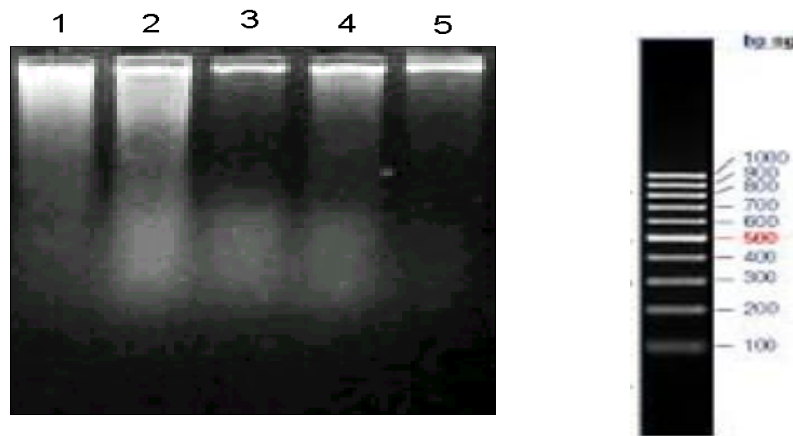
<b>EMULSIFICACIÓN</b>	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL
<b>OPACIDAD</b>	BRILLOSA	OPACA	BRILLOSA	OPACA	OPACA	BRILLOSA	BRILLOSA	BRILLOSA
<b>CROMOGENICIDAD</b>	BLANCA	BLANCA	CREMA	BLANCA-GRIS	CREMA	BLANCA	BLANCA-GRIS	BLANCA-GRIS
<b>GRAM</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>ESTRUCTURA</b>	BACILO	BACILO	COCO	BACILO	BACILO	BACILO	COCO	COCO
<b>OXIDASA</b>	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
<b>CATALASA</b>	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)

<b>BAL</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>
<b>FORMA</b>	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR
<b>ELEVACIÓN</b>	CONVEXO	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXA
<b>TAMAÑO</b>	2.0 - 3.0 mm	0.5 - 2.0 mm	1.0 - 1.0 mm	0.5 - 1.0 mm	0.5 - 1.0 mm	0.5 -1.0 mm	0.2 - 0.5 mm	0.5 - 1.0 mm
<b>BORDE</b>	LISO	LISO	LISO	LISO	LISO	LISO	LISO	LISO
<b>TEXTURA</b>	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE	SUAVE
<b>CONSISTENCIA</b>	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA
<b>EMULSIFICACIÓN</b>	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL	FACIL
<b>OPACIDAD</b>	BRILLOSA	OPACA	BRILLOSA	BRILLOSA	BRILLOSA	TRANSPARENTE	TRANSPARENTE	BRILLOSA
<b>CROMOGENICIDAD</b>	BLANCA-GRIS	CREMA	BLANCA	BLANCA-GRIS	BLANCA	ANARANJADO	CREMA	BLANCA-GRIS
<b>GRAM</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>ESTRUCTURA</b>	COCO	COCO	BACILO	BACILO	BACILO	BACILO	BACILO	COCO
<b>OXIDASA</b>	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
<b>CATALASA</b>	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)

<b>BAL</b>	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>Yakult®</b>
<b>FORMA</b>	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR
<b>ELEVACIÓN</b>	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXA
<b>TAMAÑO</b>	0.5 - 1.0 mm	0.8 mm - 1.0 mm	0.2 - 0.5 mm
<b>BORDE</b>	LISO	LISO	LISO
<b>TEXTURA</b>	SUAVE	SUAVE	SUAVE
<b>CONSISTENCIA</b>	CREMOSA	CREMOSA	CREMOSA
<b>EMULSIFICACIÓN</b>	FACIL	FACIL	FACIL
<b>OPACIDAD</b>	BRILLOSA	BRILLOSA	BRILLOSA
<b>CROMOGENICIDAD</b>	BLANCA	BLANCA-GRIS	BLANCA
<b>GRAM</b>	(+)	(+)	(+)
<b>ESTRUCTURA</b>	BACILO	COCO	BACILO
<b>OXIDASA</b>	(-)	(-)	(-)
<b>CATALASA</b>	(-)	(-)	(-)

## Extracción de ADN

Se obtuvo el resultado cualitativo de la pureza, concentración y degradación del ADN en gel de agarosa al 1.5%. En la **Figura 8** se muestran las cinco primeras cepas de bacterias ácido lácticas, en la numero 1 y 2 que se puede observar la presencia de un barrido por debajo de la banda principal superior (ADN) y representa las impurezas de las muestras, en el 90% de las extracciones se logró obtener una pureza mayor a las muestras 1 y 2, el espesor de la primer banda no se pudo definir con claridad debido al barrido que presenta, sin embargo se supone que se encuentra entre las 200 y 1200 pb del Mass Ladder, la misma observación se realiza con las demás muestras.

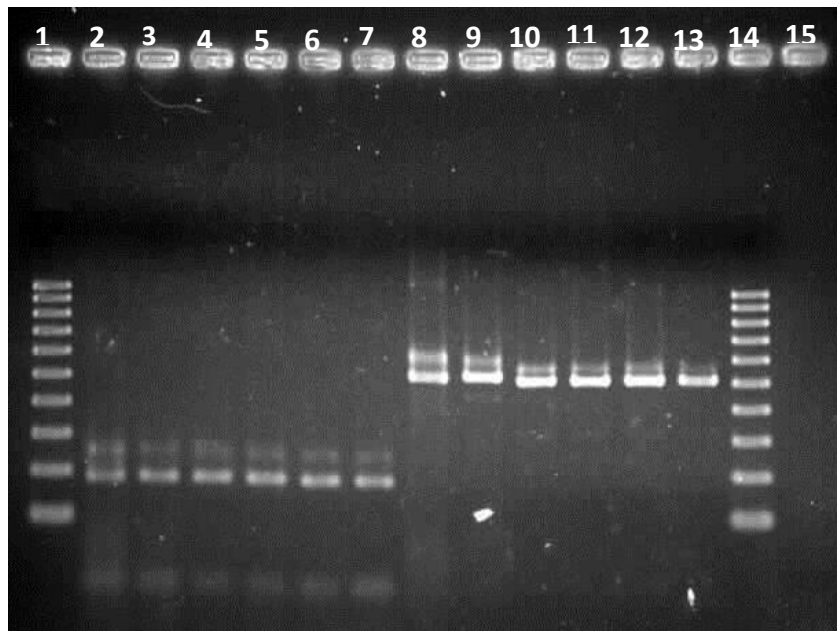


**Figura 8.** Imagen de ADN concentrado (izquierda), el cual fue comparado con el DNA Mass Ladder Bio Rad® de 100pb (derecha), líneas de la 1 – 5: primeras cinco bacterias ácido lácticas de las 42 analizadas, La banda superior indica la presencia y posición del ADN total y el barrido indica el grado de impurezas presentes en la muestra.

## Identificación molecular de las bacterias ácido lácticas

### Amplificación ADN ITS-PCR

En la Figura 9 se observan las amplificaciones logradas utilizando los iniciadores F357 – R518, UF1 – UR1, Para las primeras 5 muestras de bacterias, se obtuvo el producto de la región ITS entre las 100 y 200 pb, el cual se utilizó para la secuenciación.



**Figura 9.** Muestras de PCR – ITS de *Lactobacillus* en gel de agarosa 1.5 %. (De izquierda a derecha) Iniciador ITS F357 – R518, Línea 1: MPM 100 pb, Línea 2: 1 Línea 3: 2 Línea 4: 3 Línea 5: 4 Línea 6: 5 Línea 7: 6, Oligo UF1 – UR1 Línea 8: 1 Línea 9: 2 Línea 10: 3. Línea 11: 4, Línea 12: 5, Línea 13: 6, Línea 14: MPM 100 pb (BIORAD), Línea 15: Sin Carga (SET AXYGEN).

Los resultados obtenidos en la prueba de PCR-ITS muestran (cuadro 10) que existe correspondencia con el análisis morfológico debido a que las 42 bacterias son Gram (+), 32 catalasa (-) y 10 oxidasa (-) y que coincide el mismo agrupamiento para el género *Lactobacillus*. Es decir, con mayor frecuencia encontramos a *Lactobacillus murinus* y de acuerdo a Hemme *et al.* (1980) corresponde a *L. murinus* identificada como la cepa AU06 reportada en el NCBI al comparar las secuencias con un porcentaje de similitud del 97 % y donde se describe que es una bacteria ácido láctica presente en el tracto digestivo de los roedores. Dicha bacteria está presente en 9 muestras de los 42 aislamientos analizados. Además, encontramos 4 aislamientos de *Enterococcus faecalis* y de acuerdo Pieniz *et al.*, 2008 se reportó a la cepa Bal 1-15 reconocida como bacteria del orden *Lactobacillaceas* presentes en la flora bacteriana de animales de sangre caliente y presente en los procesos de fermentación en los quesos frescos (que no sufren procesos de pasteurización), 3 cepas de *Lactobacillus paracasei* clone CX007 y 3 de *Lactobacillus paracasei* cepa ChPRI-str39, las cuales son bacterias ácido lácticas propias de productos lácteos (Villegas A. 2004) junto con *Lactobacillus curvatus* cepa LA3 16S y *Lactobacillus plantarum* cepa SSK03 encontradas en dos aislamientos cada una de ellas y por último, en este grupo de bacterias ácido lácticas se presentaron *Lactobacillus casei* strain KT1B, *Lactobacillus rhamnosus* clone UT037 y *Lactobacillus rhamnosus* clone UT059 en una sola ocasión. Por otra parte *Enterococcus faecium* gene M1523J1L (encontrada en dos muestras), *Enterococcus faecium* cepa Cd109-16, *Enterococcus faecium* cepa Bal 1 5 y *Enterococcus sp. enrichment* cultivo DGGE pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas pero su hábitat más común es el



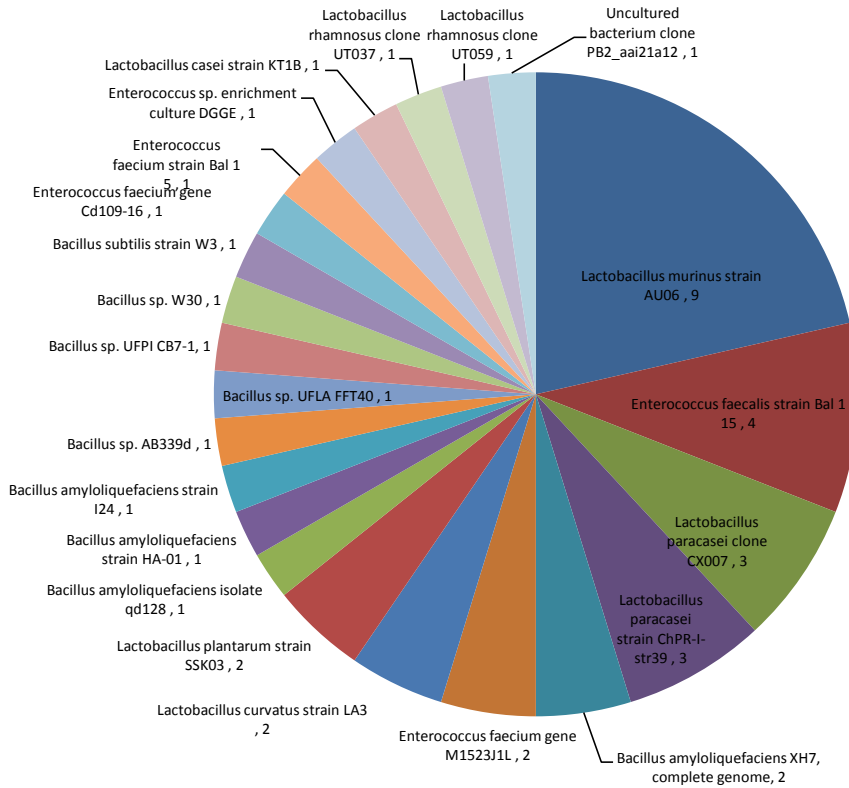
sistema digestivo de los animales de sangre caliente (Schleifer *et al.*, 1995). El resto de las cepas se encontraron en una ocasión no son propias de los procesos fermentativos de los productos lácteos como es el caso de: *Bacillus amyloliquefaciens* cepas qd128, HA-01 y I24, *Bacillus* sp. Cepas AB339d, UFLA FFT40, UFPI CB7-1 y W30 16S, *Bacillus subtilis* cepa W3. Se encontró una bacteria no cultivable *Uncultured bacterium* clone PB2\_aai21a12. Cabe mencionar que 41 secuencias son parciales y una es el genoma completo (*Bacillus amyloliquefaciens* XH7).

**Cuadro 10.** Porcentaje de similitud de las 42 Bacterias aisladas en el BAST de la NCBI.

Cepa	Porcentaje de similitud BLAST	Cantidad de cepas
<i>Lactobacillus murinus</i> strain AU06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97	9
<i>Enterococcus faecalis</i> strain Bal 1 15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	4
<i>Lactobacillus paracasei</i> clone CX007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	3
<i>Lactobacillus paracasei</i> strain ChPR-I-str39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> XH7, complete genome	97	2
<i>Enterococcus faecium</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, isolate: M1523J1L	97	2
<i>Lactobacillus curvatus</i> strain LA3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	2
<i>Lactobacillus plantarum</i> strain SSK03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	2
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> isolate qd128 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	88	1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain HA-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94	1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain I24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97	1
<i>Bacillus</i> sp. AB339d partial 16S rRNA gene, isolate AB339d	99	1
<i>Bacillus</i> sp. UFLA FFT40 16S ribosomal RNA gene, partial	98	1

sequence		
<i>Bacillus</i> sp. UFPI CB7-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98	1
<i>Bacillus</i> sp. W30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1
<i>Bacillus subtilis</i> strain W3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91	1
<i>Enterococcus faecium</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Cd109-16	99	1
<i>Enterococcus faecium</i> strain Bal 1 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98	1
<i>Enterococcus</i> sp. enrichment culture DGGE gel band 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1
<i>Lactobacillus casei</i> strain KT1B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> clone UT037 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> clone UT059 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94	1
Uncultured bacterium clone PB2_aai21a12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93	1

En la **Figura 10** se observa de manera gráfica las cantidades de presencia de las bacterias aisladas en las 42 muestras de queso jarocho, se visualiza como ya se mencionó anteriormente que *Lactobacillus murinus* cepa AU06 es la más abundante con 9 aislamientos, le sigue *Enterococcus faecalis* cepa Bal 1 15 con 4, *Lactobacillus paracasei* clon CX007 y ChPR-I-str39 en 3 aislamientos, el resto de las muestras están presentes en una y dos ocasiones, es importante señalar que el 99.9% de las muestras solo están representando secuencias parciales del genoma bacteriano.

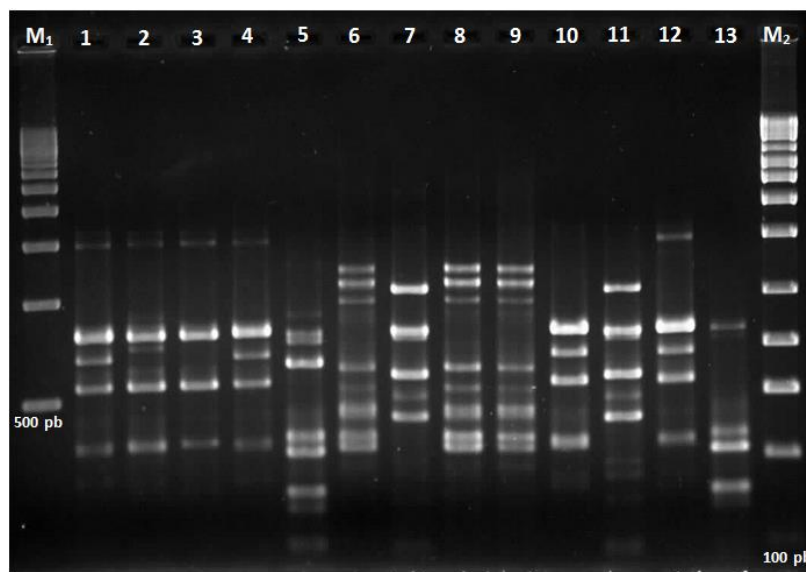


**Figura 10.** Cepas encontradas mediante ITS con similitud a los 42 aislamientos de queso jarocho

## Amplificación RAPD

Los patrones obtenidos de la amplificación polimórfica con el marcador molecular RAPD-PCR presentaron el polimorfismo para poder relacionar y diferenciar las bacterias ácido lácticas analizadas, en la **Figura 11** se observan los productos generados con el iniciador 211 de las muestras 31 a la 42 y el carril 13 la referencia *Lactobacillus casei* cepa *shirota*, se utilizaron dos marcadores moleculares de 500 y 100 pb BioRad ® (carril M<sub>1</sub> y M<sub>3</sub> respectivamente), el polimorfismo es evidente en las muestras presentadas. Al final de la

estandarización se decidió utilizar los iniciadores Lac 211, Lac 272 y M13 puesto que presentaron mayor polimorfismo, en el cuadro 11 se muestran las bandas amplificadas por cada iniciador para las 42 bacterias aisladas junto con la referencia yakult® (*Lactobacillus casei* cepa *shirota*), se puede observar que la cantidad de bandas es muy parecido entre los tres iniciadores seleccionados como es el caso de la cepa 12 en la cual aparecen 9, 10 y 10 bandas amplificadas para los iniciadores 211, 272 y M13 respectivamente, es importante señalar que los porcentajes de Guanina más Citosina (G+C) es mayor al 60 % requisito necesario en este tipo de marcadores (Williams *et al.*, 1990).



**Figura 11.** Muestras de PCR – RAPD´S de *Lactobacillus* en gel de agarosa 1.5 %. (De izquierda a derecha) iniciador Lac 211, Línea M: MPM 500 pb (Biorad), Línea 1: 31, Línea 2: 32, Línea 3: 33, Línea 4: 34, Línea 5: 35, Línea 6: 36, Línea 7: 37, Línea 8: 38, Línea 9: 39, Línea 10: 40, Línea 11: 41, Línea 12: 42, Línea 13: Yakult®, Línea M: MPM 1 Kb (Axygen).

**Cuadro 11.** Descripción de iniciadores seleccionados para los 42 aislamientos de BAL.

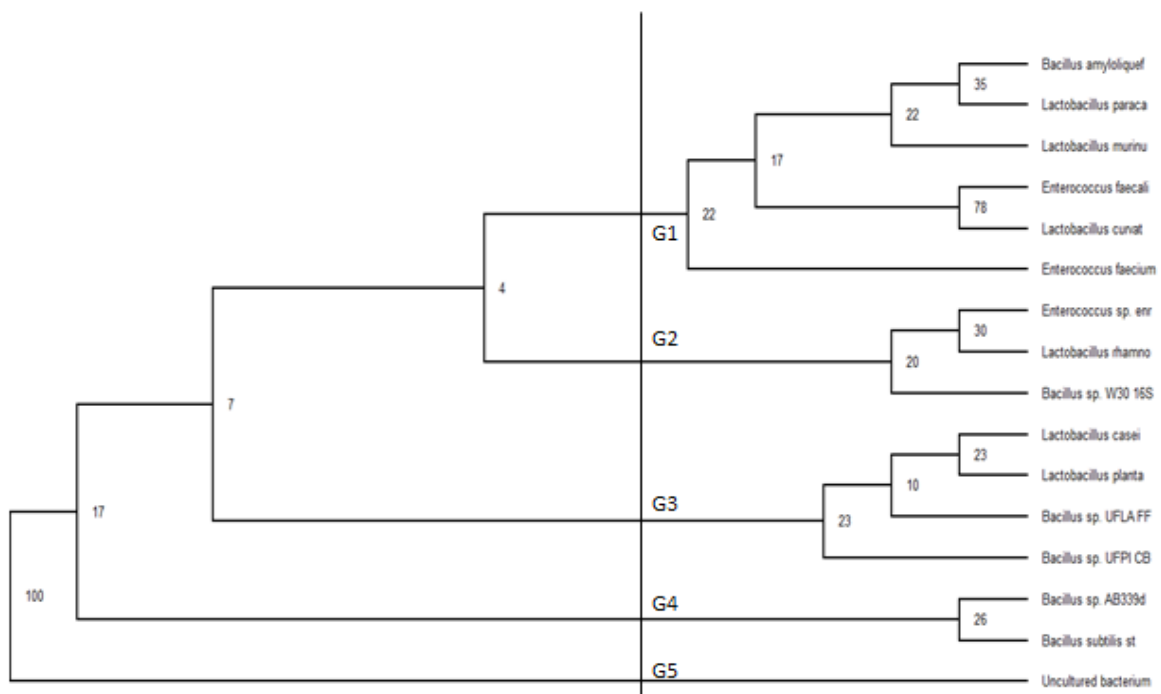
Iniciador	Secuencia (5'-3')	% G+C	Bandas amplificadas (por bacteria aislada)										
			1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Lac 211	GAA GCG CGA T	60.0	5	7	5	7	7	7	5	7	6	8	6
Lac 272	AGC GGG CCA A	70.0	4	7	5	6	6	1	5	5	6	6	6
M13	GAG GGT GGC GGT TCT	66.6	5	7	5	7	7	7	5	7	6	8	6
			Bandas amplificadas (por bacteria aislada)										
			12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Lac 211	GAA GCG CGA T	60.0	9	8	9	7	7	7	8	6	7	7	8
Lac 272	AGC GGG CCA A	70.0	10	5	7	5	5	6	3	4	4	4	7
M13	GAG GGT GGC GGT TCT	66.6	10	9	9	7	7	7	8	6	7	8	8
			Bandas amplificadas (por bacteria aislada)										
			23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
Lac 211	GAA GCG CGA T	60.0	6	8	7	9	8	4	7	8	7	7	6
Lac 272	AGC GGG CCA A	70.0	3	4	5	7	7	3	7	6	7	6	5
M13	GAG GGT GGC GGT TCT	66.6	6	8	7	9	8	4	7	8	8	7	6
			Bandas amplificadas (por bacteria aislada)										
			34	35	36	37	38	39	40	41	42	Yakult®	
Lac 211	GAA GCG CGA T	60.0	9	8	9	6	8	8	8	8	9	6	
Lac 272	AGC GGG CCA A	70.0	7	5	7	5	7	6	7	8	8	3	
M13	GAG GGT GGC GGT TCT	66.6	9	8	9	6	8	8	8	8	9	6	

\*Bacterias aisladas de las 42 muestras de queso jarocho

## Análisis estadístico de los resultados de RAPD's – PCR

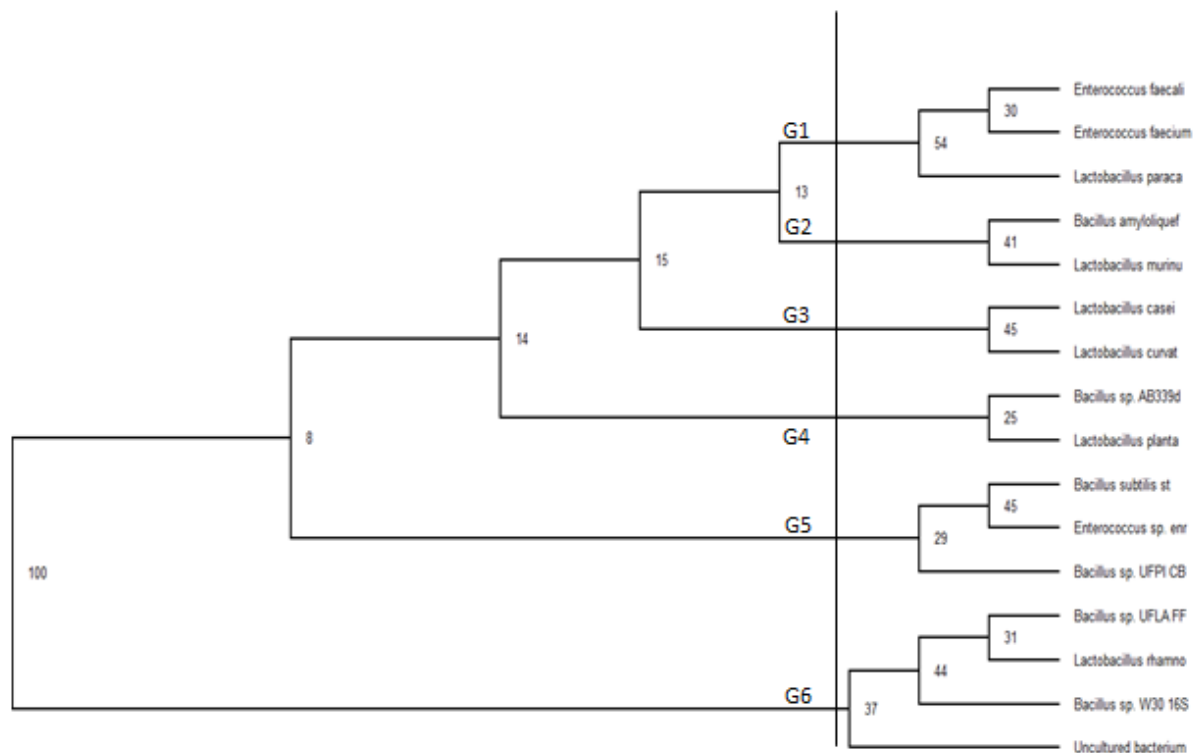
Se generaron tres dendrogramas de los iniciadores M13, Lac 211 y Lac 272, en los que se observan los agrupamientos por índice de similitud y agrupamiento por pares no ponderados con 1000 repeticiones, para el iniciador M13 (**Figura 12**) se distingue la similitud de un 23 % entre la referencia utilizada en este análisis que es el *Lactobacillus casei* cepa *shirota* y el *Lactobacillus plantarum* cepa *SSK03*, la cepas que tiene mayor similitud son *Lactobacillus curvatus* cepa *LA3* y *Enterococcus faecalis* cepa *Bal 1 15* con 78 y la bacteria no cultivable clon *PB2\_aai21a12* tiene 100 % de disimilitud, considerando una similitud mayor o igual al 20 % se formaron 5 grupos con el 22 % el grupo G1 en el que se

encuentran los aislamientos *Bacillus amyloliquefaciens* XH7, *Lactobacillus paracasei* clon CX007 y cepa ChPR-I-str39, *Lactobacillus murinus* cepa AU06, *Enterococcus faecalis* cepa Bal 1 15, *Lactobacillus curvatus* cepa LA3 y *Enterococcus faecium* gen M1523J1L, cepa Cd109-16 y cepa Bal 1 5. El grupo G2 con 20 % de similitud con *Enterococcus* sp. *enrichment* cultivo DGGE, *Lactobacillus rhamnosus* clon UT037 y clon UT059 y *Bacillus* sp. W30. El grupo G3 con 23 % de similitud *Lactobacillus casei* cepa KT1B y cepa shirota, *Lactobacillus plantarum* cepa SSK03, *Bacillus* sp. UFLA FFT40 y *Bacillus* sp. UFPI CB7-1. El grupo G4 con 26 % de similitud en el cual se encuentra a *Bacillus* sp. AB339d, *Bacillus subtilis* cepa W3 y el grupo G5 con 100 % de disimilitud *Uncultured bacterium* clon PB2\_aai21a12.



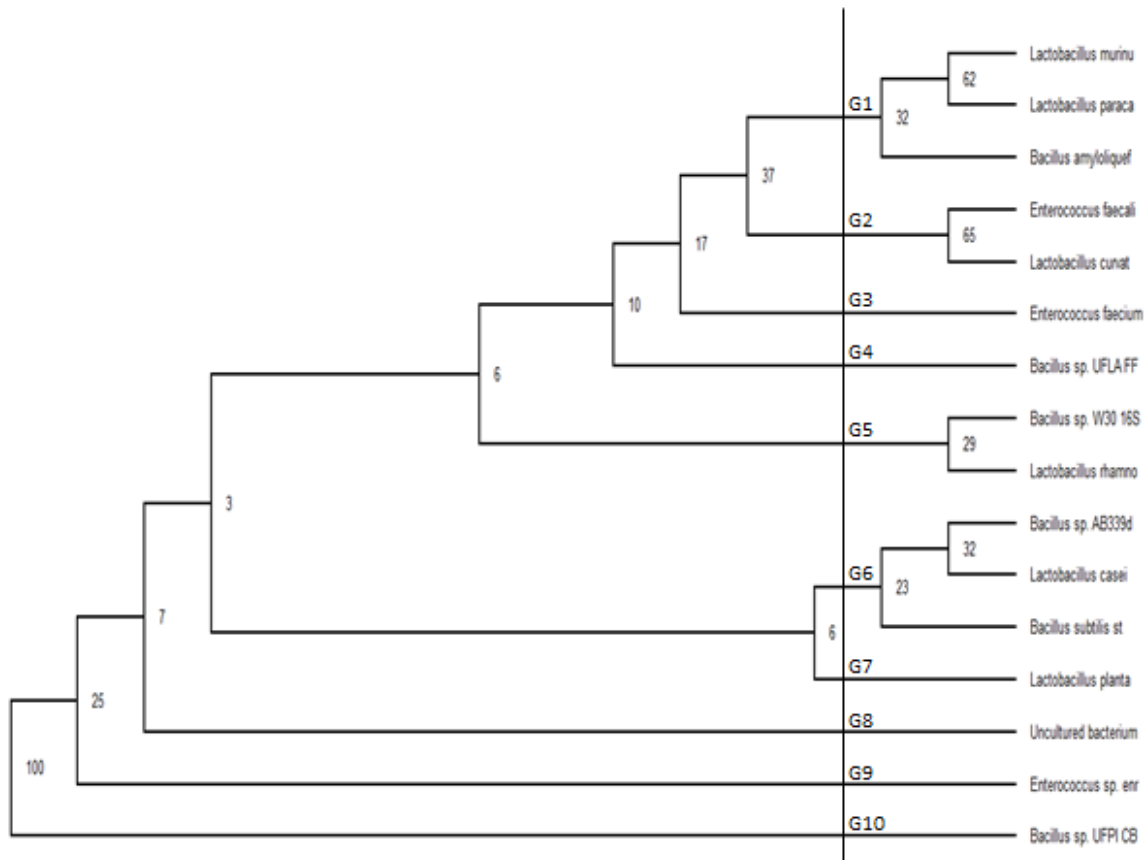
**Figura 12.** Dendrograma del Iniciador M13 en los 42 aislamientos.

En la **Figura 13** se muestra el dendrograma del iniciador Lac 211 en el cual se formaron 6 grupos con un porcentaje de similitud mayor o igual al 25 %, la mayor similitud la encontramos en el grupo G1 con un 54 % en el que se encuentra *Enterococcus faecalis* cepa Bal 1 15, *Enterococcus faecium* gen M1523J1L, cepa Cd109-16 y cepa Bal 1 5, *Lactobacillus paracasei* clon CX007 y cepa ChPR-I-str39, el grupo que tiene menor similitud es el G4 con un 25 % con *Bacillus* sp. AB339d y *Lactobacillus plantarum* cepa SSK03, y la referencia *Lactobacillus casei* cepa shirota tiene la mayor similitud con *Lactobacillus curvatus* cepa LA3 en el grupo G3 con un 45 %.



**Figura 13.** Dendrograma del Iniciador 211 de los 42 aislamientos.

El dendrograma generado con el iniciador Lac 272 (**Figura 14**) presentó la formación de 10 grupos si consideramos el corte en un porcentaje mayor o igual que 23 %, en el cual la referencia *Lactobacillus casei* cepa *shirota* mostro mayor similitud con *Bacillus* sp. *AB339d*, este dendrograma muestra mayor discrepancia en los resultados puesto que los G8, G9 y G10 están agrupados por su disimilitud que va de 7 % con el grupo G8 *Uncultured bacterium* clon *PB2\_aai21a12* al 100 % con el grupo G10 *Bacillus* sp. *UFPI CB7-1*.



**Figura 14.** Dendrograma del Iniciador 272 de los 42 aislamientos.



En general el iniciador Lac 211 esta relacionando grupos con mayor identidad con respecto al género del que se trate como es el caso del grupo G1 (**Figura 13**) en el que se encuentra el género *Enterococcus* con las especies *Faecalis* y *Faecicum*, el grupo G3 con el género *Lactobacillus* con las especies *casei* y *curvatus*. Sin embargo en el caso del presente estudio el agrupamiento logrado con estos tres iniciadores no fue el esperado debido a que los iniciadores funcionan completamente al azar y se insertan en fragmentos cualesquiera de la cadena de ADN desnaturalizada en la etapa de alineamiento (Williams *et al.*, 1990). La técnica RAPD's – PCR generalmente es utilizada en la diferenciación de especies o géneros inclusive variedades (Schneider *et al.*, 2004; Nigatu A. 2000) sin embargo debido al polimorfismo es difícil identificar dichas muestras, de tal manera que se debe apoyar de otras técnicas que en este caso son las pruebas morfológicas en conjunto con la técnica molecular ITS (por sus siglas en inglés, Espacios Internos Transcritos).

## CONCLUSIONES

Se aislaron 42 bacterias ácido lácticas del queso jarocho y con el estudio morfológico se identificaron las características macroscópicas y microscópicas en cuanto: al aspecto circular, una ligera elevación, convexas, de borde entero, catalasa negativa (para 32 muestras) dado que no degradan el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno molecular (Stainer, *et al.*, 1986) y 10 positivas, oxidasa negativa en 32 muestras ya que no cuentan con sistema citocrómico y 10 positivas y el 100 % de las cepas fueron Gram positivas.

Con respecto a la identificación molecular mediante la técnica de ITS los aislamientos encontrados fueron (Villegas A. 2004): Se encontraron 9 cepas de *Lactobacillus murinus* cepa AU06 que de acuerdo a Hemme *et al.* (1980), son parte de la flora bacteriana del sistema digestivo de los roedores, 7 muestras del género *Enterococcus* especies *faecalis* cepa Bal 1 15 (4 cepas), *faecium* gen Cd109-16, cepa M1523J1L y cepa Bal 1 15, y la sp. Cd109-16. Las bacterias propias de los productos lácteos encontradas fueron: *Lactobacillus paracasei* clon CX007 (3 cepas) *Lactobacillus paracasei* cepa ChPR-I-str39 (3 cepas), *Lactobacillus curvatus* cepa LA3 (2 cepas), *Lactobacillus plantarum* cepa SSK03 (2 cepas), *Lactobacillus casei* cepa KT1B, *Lactobacillus rhamnosus* clon UT037, *Lactobacillus rhamnosus* clon UT059 de estas tres últimas una cepa encontrada de cada una. También se encontraron cepas del género *Bacillus* que no son teóricamente propias del proceso de fermentación del queso jarocho puesto que su principal hábitat es el suelo (Turnbull, 1996).

La identificación de las bacterias ácido lácticas no se logró con la técnica de RAPD's – PCR, solo se encontraron algunos agrupamientos relacionados con los géneros de las bacterias encontradas, sin embargo la recomendación es utilizar otros marcadores moleculares por ejemplo microsatélites, secuencias simples repetidas, API 50 CH, entre otros, que nos ayuden a identificar adecuadamente dichas bacterias.

## LITERATURA CITADA

- Akabanda Fortune, Owusu-Kwarteng James, Tano-Debrah Kwaku, L.K. Glover Richard, Dennis S. Nielsen, Jespersen Lene. (2013).** Taxonomic and molecular characterization of lactic acid bacteria and yeasts in nunu, a Ghanaian fermented milk product, *Food Microbiology* 34 (2013) 277-283.
- Alexander Steve K. and Strete Dennis. 2001.** *Microbiology: A Photographic Atlas for the Laboratory*, USA, Editorial: Benjamin Cummings.
- Andrighetto C., Zampese L., and Lombardi A. 2001.** RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Letters in Applied Microbiology*, 33, 26-30.
- Avise JC, 1994.** *Molecular markers*. Chapman and Hall. New York.
- Axelsson L. 1993.** *Lactic acid bacteria classification and physiology*. Salminen, S. y von Wright, A. Ed. Nueva York: Marcel Dekker.
- Barragán A. Moisés, 2011,** *Inocuidad en queserías rurales en la zona centro-sur del estado de Veracruz*. Tesis Maestría Tecnológica en Agroindustria, Colegio de Postgraduados, Córdoba, Veracruz.
- Bertrand, C., Ivanova I.V., Dalgarrondo M., Haertlé M. 2003.** Choose an option to locate/access this article: Evolution of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -

lactalbumin content during yoghurt fermentation, International Dairy Journal, Volume 13, Issue 1, 2003, Pages 39–45.

**Cervantes Escoto F., Villegas de Gante A., Cesín Vargas A., Espinoza Ortega**

**A. (2006)**, Los quesos mexicanos genuinos: un saber hacer que se debe rescatar y preservar, III Congreso Internacional de la Red SIAL, alimentación y territorios, España.

**Cervantes, E.; Cesín A. y S. L. Pérez (2007)** "El abandono de la ganadería

lechera y reconversión productiva en Chipilo, Puebla" en Técnica Pecuaria. 45(2): 195-208.

**Chombo Morales P. 2002**, La denominación de origen del queso Cotija,

Acompañamiento tecnológico para la certificación y revaloración de productos artesanales. Seminario internacional nuevas tendencias en el análisis socioeconómico de la lechería en el contexto de la globalización, México, UAEM/CIESTAAM/UAM-Xochimilco.

**Collins M. D., Samelis J., Metaxopouls J. and Wallbanks S. (1993)**. Taxonomic

studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weisella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. J. Appl. Bacteriol. 75: 595 – 603.

**Deragon J. M. and Landry B. S. 1992**. RAPD and other PCR-based analysis of

genomes using DNA extracted from small leaf disks. Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISSN 1054-9803/92: 175-180.

**Drake, M. A., C. L. Small, K. D. Spence, and B. G. Swanson.1996.**

Differentiation of *Lactobacillus helveticus* strains using molecular typing methods.

**Du Plessis, E. M. and Dicks, L.M.T. (1995).** Evaluation random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasserii*, and *Lactobacillus johnsonii*. *Curr. Microbiol.* 31, 114 – 118.

**Espinoza Ortega A., Cervantes Escoto F., Villegas de Gante A. y Cesin**

**Vargas A. (2010)**, Los quesos tradicionales mexicanos: nuevos ilegales, La jornada del campo, 13 de febrero Número 29, consultado en: <http://www.jornada.unam.mx/2010/02/13/quesos.html>.

*Food Res. Int.*29:451–455.

**Gerrini, P. y A. Prost (2003)**, “Conjuguer l’ Elaboration, Techniques, et Enjeux Socioeconomiques. Construction de L’ AO Broccio Corse” en Seminaire INRA- INAO. Systemes d’ Elevage et Tipicité des Produits Laitieres. 15-16 de enero.

**Hammes, W. P. and R. F. Vogel. 1995.** The genus *Lactobacillus*, p. 19-54. In: B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (ed.), *The lactic acid bacteria. Volume 2. The genera of lactic acid bacteria.* Blackie Academic and Professional, London.

**Hemme D, Raibaud P, Ducluzeau R, Galpin JV, Sicard P, Van Heijenoort J.**

**1980.** *Lactobacillus murinus* n. sp., a new species of the autochthonous dominant flora of the digestive tract of rat and mouse (author's transl). *Ann microbiology, Paris, May-Jun*;131(3):297-308.

**Hodge KT, Sawyer AJ, Humber RA, 1995.** RAPD-PCR for identification of

*Zoophthora radicans* isolates in biological control of the potato leafhopper. *Journal of Invertebrate Pathology* 65: 1–9.

**Holt J., Krieg N., Sneath P., Spaley J., Williams F. 1994.** Bergey' s manual of

determinative bacteriology. 9 Ed. Baltimore, EE.UU. p. 565-570.

**Ingram, N. 1975.** The lactic acid bacteria-a broad view. In lactic acid bacteria in

beverages and food. I. ed. J. G. Carr, C. V. Cutting and G.C. Whiting (eds), Academic press London, UK. pp. 1-13.

**Ishikawa, M; Kodama, K.; Yasuda, H.; Okamoto-Kainuma, A.; Koizumi, K. &**

**Yamasato, K. (2006).** Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. *J Appl Microbiol.* 44: 308-313.

**Jacobsen, C. N., V. Rosenfeldt Nielsen, A. E. Hayford, P. I. Moller, K. F.**

**Michaelsen, A. Paerregaard, B. Sandstro M, M. Tvede, and M. Jakobsen.**

**1999.** Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans, *Applied and Environmental Microbiology*, Nov. 1999, p. 4949–4956.

**Kandler O. and Weiss N. (1986).** In: Bergey's manual of systematic Bacteriology (Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G., Eds.), Vol. 2, pp. 1209 – 1234. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

**Kourkoutas Y., Bosnea L., Taboukos S., Baras C., Lambrou D., and Kanellaki M. (2006),** Probiotic Cheese Production Using *Lactobacillus casei* Cells Immobilized on Fruit Pieces, *J. Dairy Sci.* 89:1439–145, American Dairy Science Association.

**McCartney, A. L. 2002.** Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *Brit. J. Nutr.* 88 (Suppl. 1): S29-S37.

**Mullis K. B. 1990.** The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American.* 262: 43-46.

**NOM-243-SSA1-2010,** Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

**Nigatu A. 2000.** Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. Ethiopian Health and Nutrition Research Institute, Addis Ababa, Ethiopia, *Journal of Applied Microbiology* 2000, 89, 969 y 978.



**Pavlicek, A., Hrda, S., Flegr, J. (1999).** Free-Tree: Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia* Folia Biol. (Praha) 45:97–99.

**Pieniz,S., Andrezza,R., Okeke,B., Camargo,F. and Brandelli,A. 2008.** Antimicrobial activity and antioxidant capacity of lactic acid bacteria, Biology, AUM/ UFRGS, 7061, Senators Dr., Montgomery, AL 36124, USA.

**Ramos-Izquierdo B., Bucio-Galindo A., Bautista-Muñoz C., Aranda-Ibáñez E., Izquierdo-Reyes F., (2009),** Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical, Universidad 25(2):159-171,2009

**Sambrook J. and Russell David W. 2001.** Molecular Cloning a laboratory manual, third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

**Schleifer, Karl-Heinz Mathias Ehrmann, Claudia Beimfohr, Elke Brockmann, Wolfgang Ludwig & Rudolf Amann. 1995.** Application of Molecular Methods for the Classification and Identification of Lactic Acid Bacteria, Int. Dairy Journal 5 (1995) 1081-1094.

**Schneider, R., Rosmini, M., Ehrmann, M. & Vogel, R. 2004.** Identificación de bacterias lácticas componentes de la microbiota típica de los terneros criados en condiciones artificiales, Revista FAVE - Ciencias Veterinarias 3 (1-2). ISSN 1666.

**SIAP (2012)**, Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera, Boletín de leche enero-mar 2012, SAGARPA.

**Soil RD, 2000.** The ins and outs of ADN fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 13 (2): 332-370.

**Stainer, R. Y., Adelberg, E.A. y Ingraham, J. L. 1986.** Microbiología, Versión Española actualizada de la 4ª edición de “The Microbial World”, Ediciones Repla, S.A. Mexico, D.F. pp 296.

**Turnbull Peter C. B. 1996.** *Medical Microbiology*. 4th edition, Baron S, editor, University of Texas Medical Branch at Galveston

**Valadez M. E. Y Günter K. 2000.** Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Mundi-Prensa México. 147 p.

**Vandamme P., Pot B., Gillis H., de Vos P., Kersters K. and Swings J. 1996,** Polyphasic taxonomy a consensus approach to bacterial systematics, *Microbiol. Rev.*, 60(2):407.

**Villegas de Gante Abraham (2004)**, Tecnología quesera, Editorial Trillas, México.

**Villegas de Gante Abraham y Cervantes Escoto Fernando (2011)**, La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos, *Estudios Sociales*, vol. 19, núm. 38, julio-diciembre, pp. 146-164, Coordinación de Desarrollo Regional.

**Vogel, R. F., G. Bocker, P. Stolz, M. Ehrmann, D. Fanta, W. Ludwig, B. Pot, K. Kersters, K. H. Schleifer, and W. P. Hammes. 1994.** Identification of

lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov.  
Int. J. System. Bacteriol. 44: 223-229.

**Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, P. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr, and H. G. Trüper. 1987.** Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:463–464.

**Welsh, J. and McClelland, M. (1990).** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18, 7213 – 7218.

**White TJ, Bruns TD, Lee S & Taylor J. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols, a guide to methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds. Academic Press. San Diego, California.

**Williams J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski J. A. And Tingey S. V. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

**Williams, R.A.D. 1975.** A review of a biochemical techniques in the classification of lactobacilli. In Lactic Acid Bacteria in Beerages and Food. J. G. Carr, C.V. Cutting and G.C. Whiting (eds). Academic Press. London, UK. pp. 351-365.

**Zwart Gabriel, Erik J. van Hannen, Miranda P. Kamst-van, Agterveld, Katleen Van der Gucht, Eva S. Lindstrom, Jeroen Van Wichelen, Torben Lauridsen, Byron C. Crump, Suk-Kyun Han and Steven Declerck. 2003.** Rapid screening for Freshwater Bacterial Groups by Using Reverse Line Blote Hibritdization. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69(10):5875. DOI: 10.1128/AEM.69.10.5875-5883.