

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN
Y DESARROLLO, A.C.**

“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS
CONSORCIOS MICROBIANOS DEL QUESO CREMA
TROPICAL”

POR:

SARAHÍ DEL CARMEN RANGEL ORTEGA

TESIS APROBADA POR LA:

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

DE ORIGEN ANIMAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

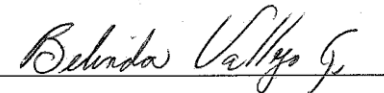
MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

NOVIEMBRE DE 2011

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Sarahí del Carmen Rangel Ortega, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Belinda Vallejo Galland

Directora de tesis



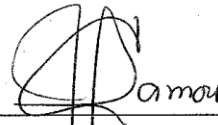
cDr. Aarón Fernando González Córdova

Asesor



Dr. Adrián Hernández Mendoza

Asesor



Dr. Juan Pedro Camou

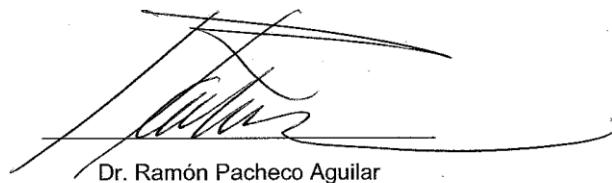
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permite y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin el permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente.

Para reproducción parcial total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director general del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación por escrito del Director de la tesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'R. Pacheco', written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat cursive.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al término de esta etapa, quiero expresar un profundo agradecimiento a quienes con su apoyo, paciencia y comprensión hicieron posible una meta más de mi vida.

Principalmente a Dios que es mi mayor fuente de paz, fe y fortaleza, por llenarme de tantas bendiciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo en la realización de la maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD) por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y por ser mi casa durante esta etapa de mi vida.

A mi Alma Terra Mater, la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por promover mi formación y desarrollo profesional.

A mi directora de tesis, la Dra. Belinda Vallejo Galland por haber confiado en mí, por apoyar mis decisiones, por su tiempo y dedicación, así como por la dirección de este trabajo. Muchas Gracias.

Al cDr. Aarón Fernando González Córdova, por tus opiniones y consejos, especialmente por la enorme paciencia ante mi persistencia. Fuiste parte fundamental en esta investigación.

A Dr. Adrián Hernández Mendoza, por tus consejos durante la realización de ésta investigación, agradezco también tus palabras de ánimo y particularmente la disponibilidad que siempre mostraste.

A Dr. Juan Pedro Camou, por su participación indispensable en la culminación de este trabajo.

A Dr. Danilo Ercolini, por abrirme las puertas de su laboratorio y por la enorme paciencia y disposición en la realización de esta investigación a pesar de tantos inconvenientes, así como por los conocimientos transmitidos.

A la Dra. Gloria Yepiz por su apoyo como coordinadora de docencia.

A la M. en C. Ana Luisa Martínez López, por tu gran apoyo, tus preciados consejos y por tantos gratos momentos compartidos, pero en especial gracias por tu amistad. Te quiero amiga.

Al M. en C. Ricardo Reyes Díaz, Dra. Ma. de Jesús Torres Llanez, M. en C. Carmen Estrada Montoya, y Q.B. Karla Martínez Robinson por su apoyo técnico que fue indispensable en esta investigación.

Al Ing. Ulises Marroquín, a los productores de queso Crema Tropical del estado de Chiapas, especialmente al Sr. Hernán Corzo Jiménez, a la IBQ. Elena Corzo y a la IBQ. Ángeles Aguilera por su colaboración con material e información valiosa para esta investigación.

Al personal de CIAD: Fernando Leyva, Gerardo Reyna, Laura García, Verónica Araiza, Argelia Marín, Héctor Galindo, Héctor Cota. Por su apoyo durante mis estudios de postgrado.

Gracias también a todos mis compañeros del área de productos lácteos, por todo su apoyo y por permitirme entrar en su vida en este tiempo. Priscilia, José Carlos, Isidro, Lilia, Jesús Sosa, Jesús Monzón, Sergio, Rocío, Alejandro, José Miguel, Eleazar, Geovanni, Roberto, Montserrat, Trinidad, Elvia, Fausto, Cristobal y Rogelio.

A las excelentes personas que conocí en CIAD y que fueron parte importante de mi estancia en este lugar. Jorge, Vanessa, Lulú, Vania, Gustavo, Nalleli, Nidia y Teresita.

A mis entrañables amigos, Anita†, Manolo, Rosy, Lis, Francisco, Juan, Oscar, Betsy, Raquel, Claudia y Luis Fernando, por conservar esta amistad a través de la distancia. Los quiero.

A Clorinda Malmo, Veronica di Martino, Francesco Esposito, Evelina Fasano, Silvia Ruocco, Roberta Villano y Giuseppe Blaiotta. Por su amistad e incondicional apoyo durante mi estancia en la Universidad de Napoles “Federico II”.

A Marcela Caseres, Nelson Valero e Irving Monfante, por darme la oportunidad de conocerlos, de maravillarnos con lo desconocido, de valorar nuestras raíces y por aprender tantas cosas de ustedes.

DEDICATORIA

A mis padres José Rangel Vázquez y María del Carmen Ortega Carrillo

A mis hermanos Orlando y Monteserrat

A mi abuelita Ma. Isabel Carrillo Laboríco

A mi novio Breznev

Por ser mi principal inspiración, por su ánimo, su apoyo incondicional, por darme siempre las mejores palabras de aliento. Este logro también es suyo, los amo...

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE CUADROS.....	XI
RESUMEN.....	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Queso.....	2
2.2 Quesos Mexicanos.....	2
2.3 Queso Crema Tropical	4
2.3.1 Características.....	4
2.3.2 Proceso de elaboración	5
2.4 Microbiología de la Leche.....	8
2.4.1 Hongos	8
2.4.2 Levaduras	9
2.4.3 Bacterias.....	9
2.4.3.1 Bacterias ácido lácticas.....	10
2.4.3.2 Bacterias deteriorantes	11
2.4.3.3 Bacterias patógenas.....	11
2.4.3.3.1 <i>Escherichia coli</i>	11
2.4.3.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	11

2.4.3.3.3 <i>Salmonella spp</i>	12
2.4.3.3.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	12
2.5 Efectos de la Pasteurización en Leche para Quesería.....	12
2.6 Cultivos Lácticos	14
2.7 Técnicas de Caracterización de Bacterias Ácido Lácticas	16
2.7.1 Técnicas convencionales.....	16
2.7.2 Técnicas moleculares	17
2.8 Electroforesis en Gel con Gradientes Desnaturalizantes (DGGE)	20
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS	26
5.1 General.....	26
5.2 Específicos	26
6. METODOLOGÍA.....	27
6.1 Muestreo	27
6.2 Análisis Físicoquímicos	27
6.3 Análisis Microbiológicos	29
6.3.1 Microorganismos indicadores	29
6.3.2 Bacterias ácido lácticas	29
6.3.3 Bacterias patógenas	30
6.4 Extracción de DNA de las Muestras de Quesos.....	30
6.5 Condiciones de Amplificación por PCR	31
6.6 Condiciones de DGGE	32
6.7 Secuenciación de Bandas de DGGE	33
6.8 Análisis Estadístico	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1 Análisis Físicoquímicos	35

7.2 Análisis Microbiológicos	37
7.2.1 Microorganismos indicadores	37
7.2.2 Bacterias ácido lácticas	41
7.2.3 Bacterias patógenas	42
7.3 Análisis mediante DGGE de la población de bacterias ácido lácticas del queso Crema Tropical	46
8. CONCLUSIONES	57
9. BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Queso Crema Tropical.....	4
Figura 2. Proceso de elaboración del queso Crema Tropical	5
Figura 3. Métodos dependientes e independientes de cultivo para identificación y caracterización de comunidades microbianas.....	19
Figura 4. Obtención de huellas digitales de comunidades microbianas en alimentos por el método de DGGE	21
Figura 5. Principales regiones productoras de queso Crema Tropical en el estado de Chiapas, México.....	28
Figura 6. Perfil DGGE del lote de Octubre (2010) de los quesos Crema Tropical de Chiapas.....	48
Figura 7. Perfil DGGE del lote de Abril (2011) de los quesos Crema Tropical de Chiapas.....	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Quesos genuinos mexicanos	3
Cuadro 2. Funciones de los cultivos lácticos en los alimentos	14
Cuadro 3. Bacterias ácido lácticas usadas en cultivos lácticos para desarrollar sabores y aromas en productos lácteos fermentados.....	15
Cuadro 4. Identificación de bacterias ácido lácticas dominantes en diferentes quesos artesanales mediante DGGE.....	22
Cuadro 5. Lista de los quesos en estudio	28
Cuadro 6. Composición fisicoquímica del queso Crema Tropical de Chiapas..	36
Cuadro 7. Composición microbiológica del queso Crema Tropical de Chiapas	39
Cuadro 8. Presencia de coliformes fecales, <i>E. coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> en el queso Crema Tropical de Chiapas en los lotes muestreados en Octubre (2010) y Abril (2011)	45
Cuadro 9. Información de las secuencias de las bandas de DGGE obtenidas al analizar la región V3 del rDNA del gen 16S de DNA extraído directamente de las muestras de queso Crema Tropical del lote de Octubre (2010).....	49
Cuadro 10. Información de las secuencias de las bandas de DGGE obtenidas al analizar la región V3 del rDNA del gen 16S de DNA extraído directamente de las muestras de queso Crema Tropical del lote de Abril (2011).....	54

RESUMEN

El queso Crema Tropical (QCT) es un alimento artesanal con características organolépticas únicas gracias a las bacterias ácido lácticas (BAL) endógenas de la leche. Sin embargo, por ser elaborado a partir de leche sin pasteurizar, podrían estar presentes otros grupos de microorganismos. Por ello, obtener información de la composición de las BAL del QCT, permitiría entender la dinámica, estructura y función de éstas bajo un enfoque comunitario. El objetivo de este trabajo fue determinar la composición fisicoquímica del QCT, así como identificar y caracterizar los consorcios presentes en su comunidad microbiana. Se determinó la composición fisicoquímica del QCT y se determinaron las cuentas de diferentes grupos microbianos tales como indicadores, patógenos y BAL presentes en el QCT. Por último se determinó la diversidad y dinámica del consorcio de BAL por medio de electroforesis en gel con gradientes desnaturizantes (DGGE) basado en el análisis del rDNA región V3 del gen 16S del DNA extraído directamente del QCT. La composición fisicoquímica de los quesos de las diferentes regiones mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para las variables de humedad, sólidos totales, grasa y proteína. Las BAL fueron el grupo dominante en la microflora de los quesos, sin embargo, la presencia de patógenos dependió de la época del año del muestreo. La dinámica poblacional de BAL según DGGE mostró ser diferente tanto en estructura como en diversidad y dependió de la época del año y región de producción. Los géneros de BAL dominantes en todos los quesos muestreados fueron *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Lactococcus*. Por lo anterior, las BAL identificadas podrían ser utilizadas para formar parte de cultivos iniciadores en la elaboración de QCT a partir de leche pasteurizada, sin que queso pierda sus características organolépticas.

1. INTRODUCCIÓN

Los quesos artesanales son elaborados a partir de leche sin pasteurizar por lo que poseen una flora microbiana nativa compleja. La norma NOM-243-SSA1-2010 exige el uso de leche pasteurizada en la elaboración de quesos, esto con el propósito de eliminar a las bacterias patógenas. Sin embargo, la pasteurización de la leche también reduce la población de las bacterias involucradas en el desarrollo de las características sensoriales de los quesos artesanales, tales como las BAL.

El queso Crema Tropical (QCT) es uno de los quesos artesanales mexicanos con gran potencial por sus cualidades sensoriales (Villegas, 2004). Sin embargo, poco se conoce de la microflora presente en este queso. Los métodos modernos para la caracterización de BAL hacen uso de técnicas moleculares fundamentadas en el estudio del DNA de las bacterias, las cuales han permitido analizar a los consorcios poblacionales de las BAL de diferentes productos artesanales.

Por lo anterior, es importante identificar a las BAL presentes en el QCT como primer paso para la elaboración de cultivos lácticos a partir de la flora nativa. La utilización de un cultivo láctico permitiría fabricar el producto usando leche pasteurizada pero conservando las cualidades sensoriales características del QCT artesanal. El objetivo de este trabajo fue determinar la composición fisicoquímica del QCT, así como identificar y caracterizar los consorcios presentes en la comunidad microbiana de este queso.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Queso

Una de las formas más eficientes de preservar la leche es procesarla para la elaboración de queso. La amplia variedad de quesos (más de 900 tipos diferentes) hace difícil dar una definición, a pesar de esto último, Baduí (1999), define en términos generales al queso como el producto resultante de la precipitación de las caseínas de la leche, quedando suero como residuo. Los pasos fundamentales en su elaboración son la coagulación de la leche, el cortado de la cuajada, eliminación del suero, salado, prensado y en algunos casos la maduración. La industria quesera, es una industria importante que absorbe un tercio de la producción mundial de la leche, produciéndose en el año 2010 más de 20.6 millones de toneladas de queso (OECD-FAO, 2011).

2.2 Quesos Mexicanos

En México, existen más de 30 tipos de quesos, algunos de ellos se muestran en el Cuadro 1. Alrededor de cinco, son procesados con leche pasteurizada, el resto con leche cruda. Los quesos manufacturados a partir de leche cruda son elaborados por la pequeña o mediana industria bajo métodos artesanales, rústicos y deficientes. Dando como resultado productos heterogéneos en su composición organoléptica y de limitada conservación (Villegas, 1993). A pesar de esto último, en el país existe preferencia por el consumo de quesos artesanales elaborados a partir de leche cruda (Torres-Llanez, 2002). El CQT es uno de los quesos genuinos mexicanos de importancia comercial en la región de Chipas, Tabasco y Veracruz (Villegas, 1993 y Cervantes *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Quesos genuinos mexicanos

	QUESO	ZONA GEOGRÁFICA DE PRODUCCIÓN	CARACTERÍSTICAS DE MADURACIÓN
Elaborados con leche pasteurizada	Chihuahua	Chihuahua, Durango, Zacatecas, Coahuila	Madurado
	Tipo Manchego	Varios estados del país	Madurado
	Panela	Varios estados del país (principalmente en la zona templada)	Fresco
	Chapingo	Chapingo, Estado de México	Fresco
Elaborados con leche bronca o cruda	Oaxaca	En todo el país	Fresco
	Asadero	estados del norte y centro	Fresco
	Cotija	Chiapas, Huasteca potosina, Michoacán, Jalisco, Tabasco	Madurado
	Molido de aro	Varios estados del país	Fresco
	Sierra	centro del País (bajío)	Fresco, madurado
	Adobera	Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Querétaro, Hidalgo	Fresco, madurado
	Crema Tropical	Chiapas y Tabasco	Fresco, madurado
	Queso de sal	Costa de Chiapas	Fresco, madurado
	Ranchero	Centro de Veracruz	Fresco
	Queso de Cincho	Morelos	Fresco
	Guaje(bola)	Huasteca potosina y veracruzana	Fresco
	Queso de Hoja	Centro de Veracruz	Fresco
	Queso de Poro	Zona de los Ríos Tabasco	Fresco, madurado

Modificada de Villegas, 1993.

2.3 Queso Crema Tropical

2.3.1 Características

El QCT, es un producto artesanal elaborado con leche cruda, entera o parcialmente descremada proveniente de ganado de doble propósito, Cebú-Pardo Suizo (Martínez, 1999). Debido al cuajado ácido-enzimático prolongado a temperatura ambiente, la pasta es blanda y fácilmente tajable, blanca o ligeramente amarilla de acuerdo al contenido de grasa, así como de sabor ácido y salado (Cervantes *et al.*, 2008). La presentación de este queso (piezas rectangulares de 250 a 1000 g), resulta visualmente atractiva por las tres capas de envoltura que son, encerado, estaño y celofán que cubren al queso del interior al exterior respectivamente (Figura 1) (Cervantes *et al.*, 2008).



Figura 1. Queso Crema Tropical

El QCT se fabrica para ser consumido fresco; sin embargo, debido a una comercialización tardada, sufre una maduración involuntaria que puede ser de uno hasta varios meses (Villegas, 1993). Los estados de Tabasco y Chiapas se disputan el origen de este queso; no obstante, se sugiere que es la zona de Chiapas limítrofe con Tabasco de donde es procedente. Su elaboración se registra desde hace medio siglo en la costa de Chiapas (Cervantes *et al.*, 2008).

2.3.2 Proceso de elaboración

A continuación (Figura 2) se describe el proceso de elaboración artesanal de éste queso, donde se involucran diferentes etapas de importancia para la obtención de las características finales del producto.

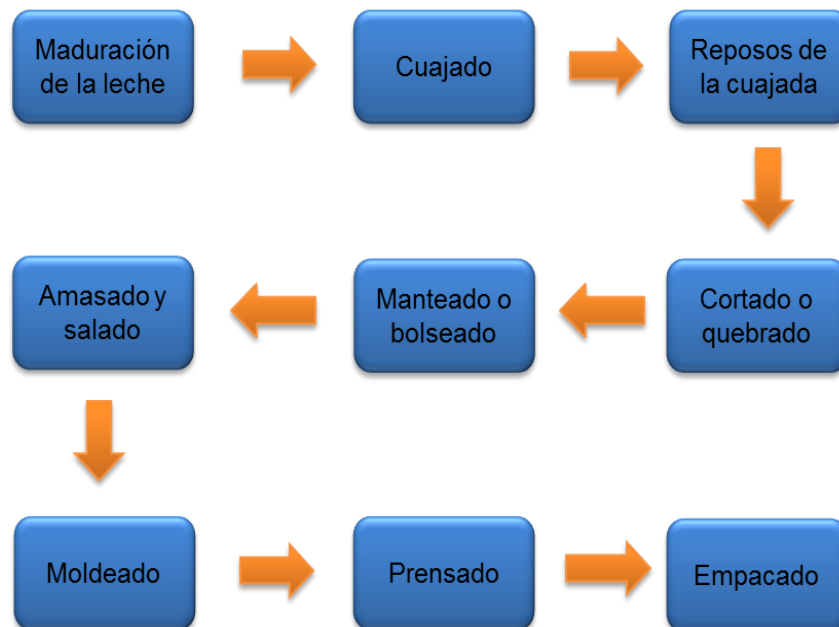


Figura 2. Proceso de elaboración del queso Crema Tropical (Modificada de Villegas de Gante, 2004)

- Maduración de la leche. Reposo de la leche cruda de 3 a 5 h a temperatura ambiente (20 a 38 °C) para la multiplicación de la microflora natural y para descremar parcialmente por flotación.

- Cuajado. Se agrega cuajo líquido (3 mL de cuajo/100 L de leche)

- Reposo de la cuajada. Se deja reposar de 14 a 24 h a temperatura ambiente (20 a 38 °C), buscando una cuajada ácida altamente desmineralizada.

- Cortado o quebrado. Una vez cuajada la leche, al sobrenadar una delgada capa de suero, se corta la cuajada. El corte es amplio (cubos de aproximadamente 2 cm) y en ocasiones se realiza también con la mano, hablándose de un quebrado de la cuajada.

- Manteado o bolseado. La cuajada cortada se coloca dentro de una bolsa de algodón o plástico. Este paso se prolonga hasta que la cuajada deje de exudar suero.

- Amasado y salado. La cuajada seca se coloca en una bandeja de madera y es manualmente amasada, incorporándosele sal común al 5- 7%.

- Moldeado. Se emplean moldes de caoba rectangulares, cubiertos previamente con paños de tela y son llenados con la cuajada, presionando manualmente.

- Prensado. Los moldes son llevados a una prensa de madera rústica por 12 h.

- Empacado. Una vez que los moldes salen de la prensa, los queso son retirados de estos, se cortan los bordes sobrantes y se dejan airear, los quesos se envuelven en tres tipos de papel, encerado, estaño y celofán; uno después de otro respectivamente.

Cuando los quesos se elaboran en forma artesanal a partir de leche cruda como el QCT, las características de estos productos se ven influenciados principalmente por el área de producción, las condiciones ambientales, las herramientas tradicionales, el proceso de manufactura y la leche empleada (Bonetta *et al.*, 2008). Esto sin mencionar que la microflora de la leche desempeña un papel fundamental en la fermentación y es uno de los parámetros más importantes que afecta la calidad de los quesos (Marino *et al.*, 2003).

Como un ecosistema alimenticio no es estático. Las características de crecimiento y la bioquímica de los microorganismos son afectados por diferentes reacciones en respuesta a cambios físicos y a las condiciones químicas que ocurren en el microambiente del alimento (ej. pH, sal, temperatura) (Cocolin y Ercolini, 2008).

2.4 Microbiología de la Leche

La biodiversidad de los microorganismos involucrados en la producción de quesos tradicionales puede considerarse un factor fundamental para el mantenimiento de sus características típicas (Marino *et al.*, 2003). Son tres los principales grupos de microorganismos presentes en la leche cruda que de menor a mayor importancia tecnológica en la elaboración de los quesos son: hongos, levaduras y bacterias.

2.4.1 Hongos

La presencia de hongos nativos en leche cruda es indeseable. Estos microorganismos se instalan en la corteza y en ocasiones en el cuerpo de los quesos semiduros y duros que son madurados prolongadamente sin ningún tipo de protección (Villegas, 2004), modificando negativamente las características organolépticas de los quesos. Además producen micotoxinas que representan un riesgo potencial de salud (Torkar, 2008).

Sin embargo, existen ciertos tipos de quesos como el Camembert, Cabrales, Azul, etc. Que son madurados gracias a estos microorganismos, en este caso son considerados de importancia tecnológica en la leche. El rasgo distintivo de los quesos madurados por hongos es una lipólisis y proteólisis extensa, ya que sus lipasas y proteasas liberan ácidos grasos y péptidos que contribuyen en el desarrollo de sabor y aroma de éstos quesos (Torkar, 2008).

2.4.2 Levaduras

Su incidencia en leche cruda es menor que la de las bacterias, por lo general se presentan en leches producidas bajo condiciones pobres de higiene. Se encuentran en la corteza de los quesos en proceso de maduración y en la pasta de quesos frescos elaborados con leche bronca (Villegas, 2004). Como parte de la comunidad microbiana junto con las bacterias, las levaduras pueden contribuir al desarrollo de las características de gusto y sabor de diferentes variedades de quesos (Fadda *et al.*, 2010).

Las levaduras por si solas no ocasionan defectos en los productos lácteos, a menos que fermenten la lactosa. En este caso, pueden crecer rápidamente y producir sabores característicos a levadura y fruta así como también producir gas. Éstas, metabolizan el ácido láctico en el queso, elevan el pH del microambiente en el área adyacente a la superficie y permiten un buen crecimiento de las bacterias. Adicionalmente la lisis de células de levaduras libera vitaminas y aminoácidos que estimulan a la bacteria y proveen de compuestos del sabor (Torkar, 2008).

2.4.3 Bacterias

La carga microbiana de la leche cruda depende de las condiciones de manejo e higiene con la que ésta es obtenida. En México, se ha estimado que la cuenta total de bacterias mesófilas aerobias en la leche cruda para el sistema de producción de doble propósito en los estados de Tabasco y Chiapas es de alrededor de 500 mil a más de 2 millones de UFC/mL (Villegas, 2004). Son

diferentes los grupos de bacterias presentes en la leche. Algunas pueden ser indeseables como las patógenas y las deteriorantes o deseables como las bacterias ácido lácticas (BAL).

2.4.3.1 Bacterias ácido lácticas. Dentro de la compleja comunidad bacteriana de la leche cruda para elaboración de quesos, las BAL son consideradas como la microflora dominante. Son necesarias en el proceso de maduración de la cuajada para lograr el sabor y aroma finales del producto a través de una acidificación y actividad proteolítica apropiadas (Coppola *et al.*, 2001).

Estas bacterias tienen como función principal la fermentación láctica, destacan los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*. Son bacterias inmóviles no esporuladas, morfológicamente se presentan en forma de cocos o bacilos, son negativas a la prueba de la catalasa y positivas a la tinción de Gram. La temperatura óptima de crecimiento de las BAL se encuentra entre los 30-42 °C, pudiendo ser mesófilas o termófilas (Mozzi *et al.* 2010). Producen ácido láctico como el principal producto resultante de la fermentación de los azúcares, esto mediante diferentes vías metabólicas (Cabeza, 2006; Neubauer y Mollet, 2001).

Las BAL homofermentativas, generan ácido láctico como mayor producto de la fermentación de la lactosa, haciéndose tolerantes al pH ácido (5 o menor). Las bacterias heterofermentativas producen CO₂, ácido acético y etanol, además del ácido láctico de la fermentación de la lactosa, usando la vía alterna de pentosa monofosfato (Carr *et al.*, 2002). Las BAL necesitan factores complejos de crecimiento como vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas (Cabeza, 2006; Hemme y Foucaud, 2004).

2.4.3.2 Bacterias deteriorantes. Varios cambios organolépticos y físicos indeseables en la leche cruda son causados por estos microorganismos que crecen a bajas temperaturas (5 °C). Sabores a malta, rancidez, amargo, fruta y pútrido, se asocian al crecimiento de estos microorganismos psicrotrofos. Se requieren niveles de 10^6 - 10^7 UFC/mL antes de que los defectos organolépticos se hagan presentes. Algunas especies incluidas en este grupo de bacterias pertenecen a los géneros *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Aeromonas* y *Alcaligenes* (ICMSF, 2000).

2.4.3.3 Bacterias patógenas. Las bacterias patógenas que pueden encontrarse en leche son de origen animal, humano o ambiental (Ayres *et al.*, 1980). Son las causantes de enfermedades en quienes consumen la leche o sus derivados (Krause y Hendrick, 2011). Algunas de las principales bacterias patógenas presentes en la leche cruda y por consecuencia en los subproductos que con esta se elaboran son:

2.4.3.3.1 *Escherichia coli*. Las principales fuentes de contaminación de este microorganismo son el suelo y la materia fecal de las vacas (Harding, 1995). Puede causar insuficiencia renal, fiebre y muerte (Krause y Hendrick, 2011).

2.4.3.3.2 *Staphylococcus aureus*. Su incidencia en leche se debe principalmente a ubre bovina con problemas de mastitis o por contaminación humana. (ICMSF, 2000). Este microorganismo genera una potente enterotoxina (Pahissa, 2009) que puede ocasionar náuseas, vómito y diarrea (Krause y Hendrick, 2011).

2.4.3.3.3 *Salmonella spp.* Su fuente principal de contaminación es el ganado mismo o bien por portadores humanos y el agua (Magariños, 2000). Puede provocar náuseas, vómitos, dolor abdominal, dolor de cabeza, escalofríos, diarrea y fiebre (Krause y Hendrick, 2011).

2.4.3.3.4 *Listeria monocytogenes.* Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, principalmente en heces de animales, de humanos y en el suelo (Rossi *et al.*, 2008). Puede ocasionar síntomas similares a los de la gripe, diarrea, meningitis y aborto (Krause y Hendrick, 2011).

Es evidente que con la leche cruda y sus derivados, existe el latente riesgo de la presencia de patógenos que puedan sobrevivir, y si las condiciones son favorables, incluso crecer causando una amenaza potencial de salud pública (Cremonesi *et al.*, 2009). Generalmente aplicando tratamientos térmicos a la leche en tiempos determinados, se eliminaría este riesgo (Harding, 1995).

Por lo anterior y a manera de prevención, las normas oficiales mexicanas NOM-121-SSA1-1994 y NOM-243-SSA1-2010 establecen que la leche destinada para la elaboración de productos lácteos, deberá ser sometida a tratamientos térmicos que garanticen su inocuidad, como la pasteurización.

2.5 Efectos de la Pasteurización en Leche para Quesería

La razón de aplicar un tratamiento térmico a la leche como la pasteurización (por lo general 72 °C por 15 segundos), sin tomar en cuenta el producto al que esta será transformada, es la de eliminar microorganismos patógenos y

oportunistas, consiguiendo así inocuidad en los alimentos generados. Sin embargo, la pasteurización no sólo elimina las bacterias indeseables como las patógenas y deteriorantes, al mismo tiempo reduce la concentración de BAL y de enzimas endógenas comúnmente presentes en la leche cruda (Hutkins, 2006).

Debido a que dichas BAL y las enzimas contribuyen al conjunto de propiedades (sabor y textura) del queso terminado, especialmente si el queso es añejo, pueden existir grandes diferencias entre las características de los quesos elaborados con leche cruda de aquellos elaborados con leche pasteurizada (Hutkins, 2006).

Adicionalmente se ha reportado que el tipo e intensidad del aroma de los quesos depende del tratamiento térmico aplicado a la leche. La intensidad del aroma tarda más en desarrollarse en quesos elaborados con leche pasteurizada, que en los que se elaboran con leche cruda (Ortigosa *et al.*, 2001).

Para producir quesos a partir de leche pasteurizada con las mismas características de aquellos elaborados con leche cruda, es necesario reincorporar a las BAL eliminadas por el tratamiento térmico (Ortigosa *et al.*, 2001). Por lo anterior en procesos industrializados de producción de quesos, se recurre al uso de cultivos de BAL seleccionados, obteniendo así poca variabilidad en la microflora de los productos lácteos.

Por otra parte, en los quesos artesanales se lleva a cabo una fermentación espontánea de la leche con cultivos bacterianos no seleccionados, lo que

resulta en una gran variedad de productos con diferentes sabores, consistencias y calidades microbiológicas. Esto los coloca como una interesante y potencial fuente de nuevas cepas para su uso en fermentación de leche en forma de cultivos (Marino *et al.* 2003).

2.6 Cultivos Lácticos

Son cultivos puros de una o más bacterias lácticas, en proporciones definidas que se emplean para inducir la disminución del pH en el queso, a través de la transformación de la lactosa en ácido láctico. La acidez del medio promueve la sinéresis de la cuajada quesera, ayudando al drenado del suero para darle textura y cuerpo (Olvera, 1999). Otras funciones importantes de los cultivos lácticos en los alimentos se muestran en la Cuadro 2, siendo altamente apreciados en el plano sensorial la generación de sabor y aroma (Villegas, 2004).

Cuadro 2. Funciones de los cultivos lácticos en los alimentos

Preservación	Acidificación, y generación de sustancias antimicrobianas
Beneficios en la salud	Exclusión de patógenos, inmunomodulación
Textura	Masa celular bacteriana, enzimas proteolíticas
Sabor y aroma	Productos metabólicos primarios y secundarios, actividades enzimáticas

Modificada de Neubauer y Mollet, 2001.

El sabor y aroma típico en los productos lácteos fermentados es el resultado de la transformación enzimática de los principales componentes de la leche, a

compuestos volátiles (Gutiérrez, 2008). Tales como, dimetilsulfuro, 3-metilbutanal, metional, diacetilo, ácido propiónico, ácido butírico, ácido acético y butanona. Las BAL contribuyen de manera decisiva en la transformación bioquímica de la lactosa, lípidos, citrato y caseína a estos compuestos volátiles (Smit *et al.*, 2005). En el Cuadro 3, se enlistan algunas de las bacterias usadas en cultivos lácticos para generar sabor y aroma en diferentes productos lácteos.

Cuadro 3. Bacterias ácido lácticas usadas en cultivos lácticos para desarrollar sabores y aromas en productos lácteos fermentados

Productos lácteos fermentados	BAL empleadas
Quesos, yogurt	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
productos probióticos	<i>Leuconostoc lactis</i>
mantequillas	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>

Modificado de Villegas, 2004.

Nuevos cultivos lácticos pueden ser específicamente seleccionados de entre un gran número de cepas de BAL propias de alimentos fermentados (Ramírez *et al.* 2005) como los quesos artesanales. Dirigiéndose principalmente a aquellas cepas de BAL que puedan igualar el sabor y aroma de productos lácteos artesanales elaborados a partir de leche cruda. Se busca también, que éstas BAL mejoren las propiedades organolépticas de otros productos ya existentes en el mercado (Gutiérrez, 2008; Pianpumepong y Noomhorm, 2010).

La tecnología de los cultivos ha avanzado a tal punto que cada cepa que los integran, puede ser seleccionada de acuerdo a la función específica deseada. De tal manera que el cultivo puede contribuir a una variación considerable en el queso terminado, incluso pequeños cambios en la composición o cantidad del cultivo pueden ocasionar grandes diferencias en los quesos (Hutkins, 2006).

La identificación de la microflora de productos lácteos se basa en el aislamiento de los microorganismos cultivables a través de la selección de substratos adecuados (Coppola *et al.*, 2001), así como mediante el conocimiento de la bioquímica metabólica de las mismas (técnicas convencionales). Aunado a los avances de técnicas de microbiología moderna, como la biología molecular (Cogan *et al.*, 2007 y Sybesma *et al.*, 2006).

2.7 Técnicas de Caracterización de Bacterias Ácido Lácticas

2.7.1 Técnicas convencionales

Las bases generales para la clasificación e identificación de los géneros de BAL se fundamentan en pruebas clásicas de sus características fenotípicas. Tales Como: morfología bacteriana (bacilos y cocos), producción de CO₂, crecimiento a ciertas temperaturas, osmotolerancia, tolerancia a condiciones ácidas y alcalinas. Así como formación de diferentes isómeros del ácido láctico durante la fermentación de la glucosa (Seppo *et al.*, 1998).

Los quesos artesanales andino ahumado de Venezuela (Rivas *et al.*, 2007), blanco en escabeche de Turquía (Dagdemiir y Ozdemiir 2008), así como los quesos Blanco (Torres- Llanez *et al.*, 2006) y Cocido (Heredia, 2011) de Sonora, México son algunos productos a los que se les ha realizado una caracterización convencional de sus BAL. Sin embargo, la identificación segura de nuevos géneros y especies de BAL, resulta insuficiente mediante el uso de estas técnicas. Debido a la gran variedad de estas bacterias presentes en un producto, en las última décadas se han usado métodos de biología molecular para la identificación a nivel de especie (Ventura *et al.*, 2007). Aun así, la caracterización clásica fenotípica es importante para conocer las propiedades de género (Seppo *et al.*, 1998).

2.7.2 Técnicas moleculares

La identificación de especies ácido lácticas en quesos mediante técnicas moleculares puede realizarse, ya sea con técnicas dependientes o no de cultivo (Díaz y Wachter, 2003). Los métodos dependientes de cultivo consisten en el aislamiento y cultivo de las BAL antes de su identificación, de acuerdo a sus características morfológicas y bioquímicas (Cocolin y Ercolini, 2008; Jean-Luca y Georges, 2008). Seguido de la detección del polimorfismo del DNA entre especies o cepas, y difieren en su poder de discriminación taxonómica, reproducibilidad y facilidad de interpretación y estandarización (Amor *et al.*, 2007).

Por otra parte, se ha reportado que sólo una pequeña fracción de microorganismos puede ser analizada mediante métodos cultivables. Con frecuencia las cepas aisladas no parecen representar el complejo ecosistema

de los microorganismos y la actividad de sus genes en el hábitat seleccionado. Mas del 90 % de éstos, no son cultivables por que dependen de las actividades de otros microorganismos, o porque no se conocen aún las condiciones para su cultivo. En consecuencia, no se percibe una visión clara de la diversidad microbiana del ambiente en estudio (Díaz y Wachter, 2003 y Mayo *et al.*, 2008).

En contraste, los métodos independientes de cultivo proveen una visión más real de la diversidad microbiana en un ambiente (Coppolla, 2001). Es por ello que, se han estudiado con mayor frecuencia comunidades bacterianas mediante métodos independientes de cultivo. Basados en el análisis inmediato del DNA que es extraído directamente del alimento. Estos métodos se fundamentan en la relación evolutiva entre microorganismos, dicha relación es inferida mediante la comparación de secuencias de genes individuales, para esto, se usa DNA.

Ésta comparación entre organismos es medida por las diferencias en la secuencia de nucleótidos de DNA homólogos. El DNA debe estar distribuido universalmente en el grupo que se desea estudiar, además de ser funcionalmente homólogo para cada organismo. Es por eso que los genes que codifican para el DNA ribosomal son los más utilizados (Mayo *et al.*, 2008).

Los métodos independientes de cultivo son rápidos y adecuados para el análisis de las comunidades microbianas a través del tiempo y exploran la dinámica de la microflora a detalle. La mayoría de éstas técnicas usan la amplificación del DNA a través del método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Jean-Luca y Georges, 2008).

La Figura 3 muestra las diferentes técnicas dependientes e independientes de cultivo para la identificación y caracterización de comunidades microbianas en alimentos. La técnica molecular independiente de cultivo más ampliamente usada en la última década para la identificación de BAL de quesos artesanales es DGGE (Electroforesis en gel con gradientes desnaturalizantes) (Díaz y Wacher, 2003).

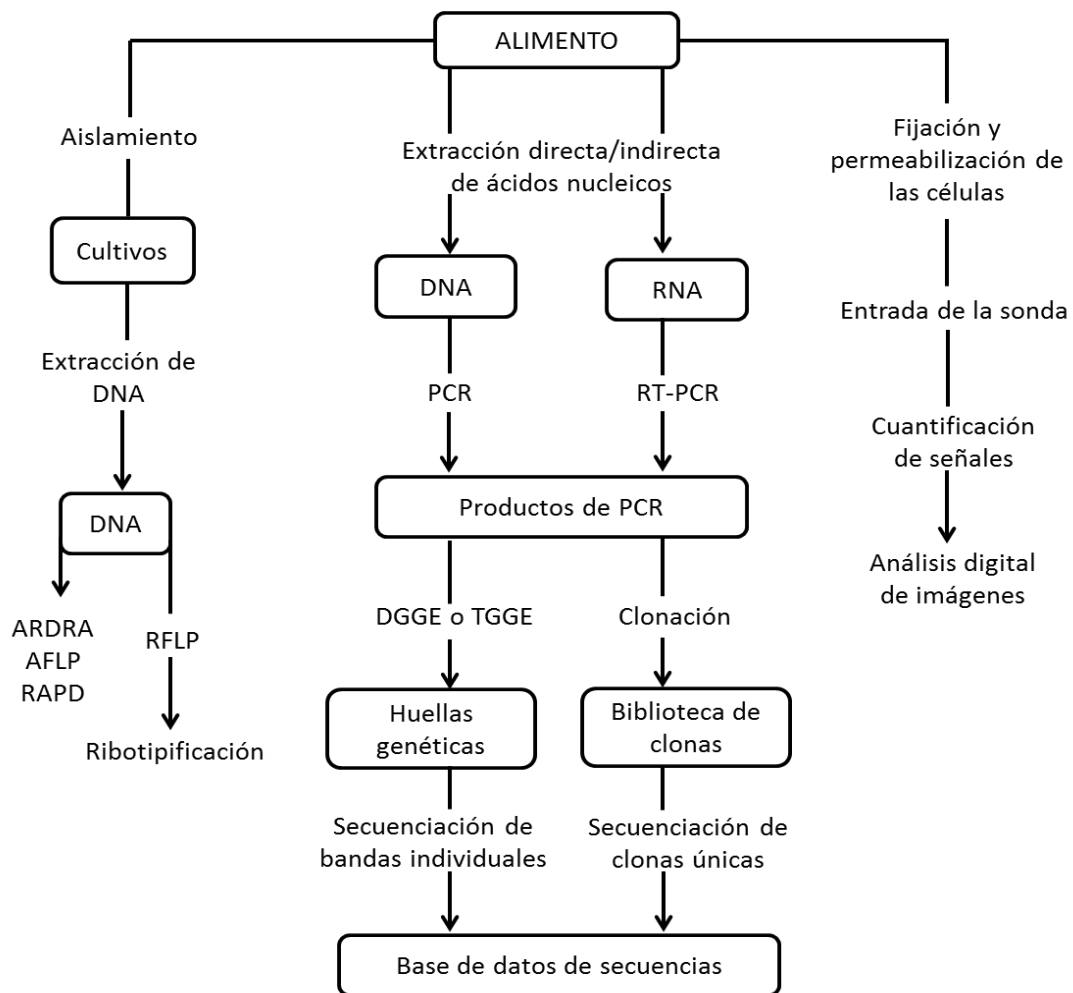


Figura 3. Métodos dependientes e independientes de cultivo para identificación y caracterización de comunidades microbianas. (Modificado de Díaz y Wacher, 2003)

2.8 Electroforesis en Gel con Gradientes Desnaturalizantes (DGGE)

Esta técnica tiene como objetivo construir un perfil o patrón de la diversidad genética de una comunidad microbiana (Mayo *et al.*, 2008). El primer paso en esta técnica es la extracción y purificación del DNA de la muestra, seguido de la amplificación mediante PCR de ciertas regiones (cebadores o primers) del gen ribosomal 16S.

Dependiendo del grupo de microorganismos a estudiar se usan cebadores que pueden ser generales o muy específicos. Los fragmentos de rDNA amplificados se separan por electroforesis en geles con gradientes desnaturalizantes, que permiten separar fragmentos de la misma longitud, pero con diferentes secuencias (Figura 4). Estas secuencias son las características del DNA de una comunidad microbiana obtenidas mediante la amplificación de regiones de los genes ribosomales.

Los agentes desnaturalizantes consisten en una mezcla de urea y formamida, que provocan la separación de las cadenas dobles del rDNA que contienen dominios con temperaturas de fusión características. De tal manera que, al alcanzar una determinada concentración desnaturalizante, la molécula se funde total o parcialmente y disminuye su migración en el gel. Las temperaturas de fusión de estos dominios dependen de las variaciones en sus secuencias de bases. Por lo que, fragmentos correspondientes a microorganismos diferentes tendrán posiciones diferentes en el gel. Para evitar la separación completa de las dos cadenas, se une una secuencia de guanina y citocina (ésta requiere condiciones drásticas de desnaturalización) llamada grapa "GC" en el extremo 5' de uno de los cebadores, que se amplifican en el fragmento de rDNA.

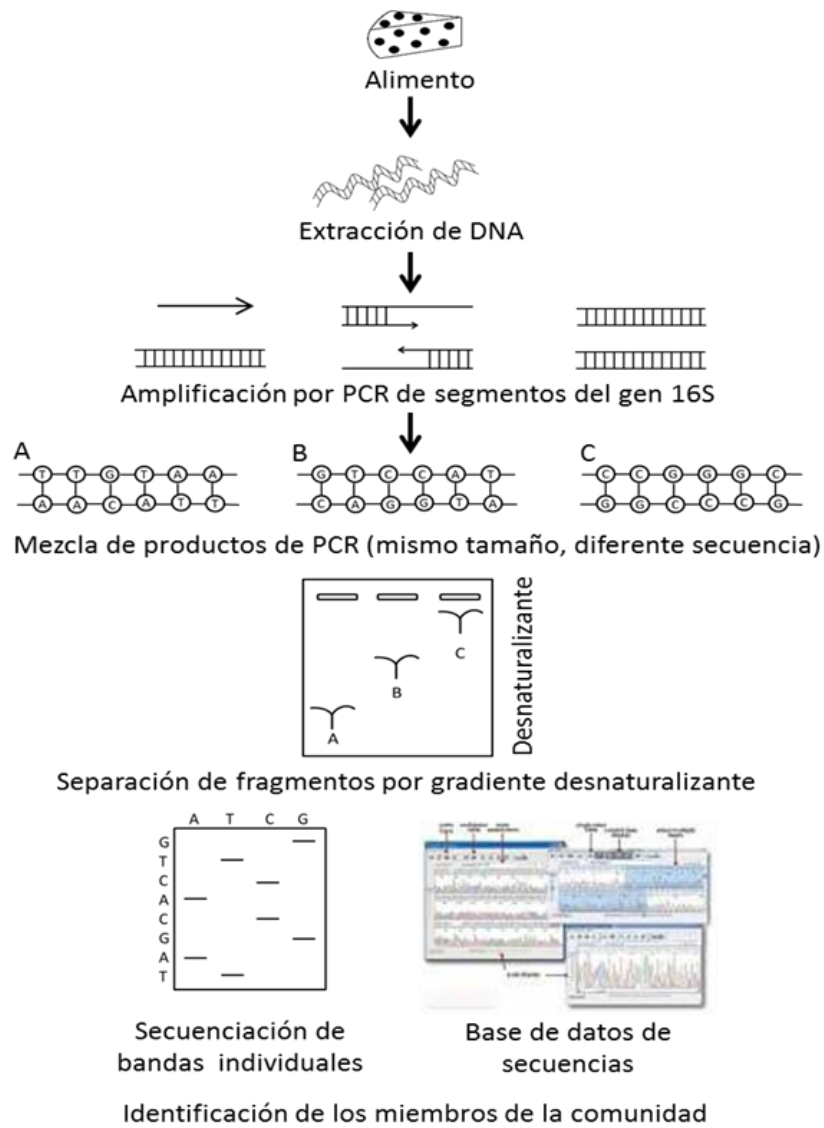


Figura 4. Obtención de huellas digitales de comunidades microbianas en alimentos por el método de DGGE (Modificado de Díaz y Wachter, 2003)

Las bandas generadas se visualizan al teñirse el gel. Estas bandas son secuenciadas y comparadas con bases de datos disponibles (Díaz y Wachter, 2003; Jean-Luca y Georges, 2008). Los principales grupos de BAL de algunos

quesos artesanales de diferente origen geográfico han sido identificados mediante esta técnica y se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Identificación de bacterias ácido lácticas dominantes en diferentes quesos artesanales mediante DGGE

REFERENCIA	TIPO DE QUESO	PAÍS DE ORIGEN	PRINCIPALES CEPAS ENCONTRADAS
Coppola <i>et al.</i> , 2001	Mozzarella	Italia	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Leuc. lactis</i> <i>Lc. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lc. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Bonetta <i>et al.</i> , 2008	Robiola di Roccaverano	Italia	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Streptococcus macedonicus</i> <i>Lactococcus garvieae</i> <i>Streptococcus parauberis</i> <i>Lactococcus</i> spp.
Kafili <i>et al.</i> , 2009	Tradicional Irani	Iran	<i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus sakei</i>
Alegría <i>et al.</i> , 2009	Casín	España	<i>Lactococcus garvieae</i> <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>
Flórez y Mayo, 2006a	Cabrales de vena azul	España	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus garvieae</i> <i>Lactococcus raffinolactis</i>

Debido al gran potencial económico de las BAL, uno de los principales objetivos de los microbiólogos es desarrollar un claro perfil de la microflora presente en

los diferentes productos lácteos. Así como la forma en la que ésta se modifica durante su proceso.

En los quesos, es en la maduración donde ocurren complejas interacciones entre los consorcios de la comunidad microbiana. Se entiende por consorcio al conjunto de microorganismos directamente relacionados que tienen una función común. Por otro lado, una comunidad microbiana es el conjunto integrado de poblaciones microbianas que están presentes e interactúan dentro de un determinado lugar llamado hábitat o ecosistema (Cocolin y Ercolini, 2008). La identificación de estas bacterias es indispensable para entender su contribución individual en la manufactura del producto. Permitted desarrollar cultivos lácteos específicos para la mejora de la calidad de estos derivados lácteos (Coeuret *et al.*, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

Por ser de origen artesanal, el QCT cuenta con características sensoriales particulares generadas por las BAL de la leche. Sin embargo, debido a que es elaborado a base de leche cruda, no solo, no cumple con los lineamientos establecidos por las NOM-243-SSA1-2010 y NOM-121-SSA1-1994, sino que además pudiera ser portador de microorganismos patógenos que podrían representar un riesgo para la salud del consumidor.

Por otro lado, poco se conoce acerca de la microflora del QCT en relación con la región y época de producción, así como en relación al tiempo de maduración que sufre este producto durante su comercialización. Aunado a lo anterior, las técnicas independientes de cultivo ayudarían a obtener un perfil claro de la dinámica y evolución de la población de las BAL del QCT. Este conocimiento serviría de base para la generación de cultivos lácticos iniciadores que permitieran elaborar QCT con leche pasteurizada. De esta manera, se generaría un queso inocuo con características organolépticas similares al elaborado artesanalmente.

4. HIPÓTESIS

Los consorcios presentes en la comunidad microbiana del queso Crema Tropical están en función de la época del año del muestreo y de la región de producción, así como del proceso de maduración de este producto.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar la composición fisicoquímica del queso Crema Tropical e identificar y caracterizar los consorcios presentes en su comunidad microbiana.

5.2 Específicos

- 1.-Evaluar la composición fisicoquímica del queso Crema Tropical.
- 2.-Determinar las cuentas totales de los principales grupos microbianos del queso Crema Tropical.
- 3.-Identificar la población de bacterias ácido lácticas presentes en el queso Crema Tropical de acuerdo a la época del año y región de muestreo, así como su dinámica a través del tiempo de maduración.

6. METODOLOGÍA

6.1 Muestreo

Se recolectaron tres muestras de QCT de las tres principales regiones productoras de este queso en el estado de Chiapas. Región costa, norte y Frailesca (Figura 5). Se muestrearon dos lotes en cada región, el primero durante el otoño (Octubre del 2010) y el segundo en primavera (Abril del 2011). Dando un total de dieciocho unidades experimentales (Cuadro 5). Las muestras fueron recolectadas en bolsas estériles, y transportadas hasta el laboratorio de análisis manteniendo una temperatura de 4 °C hasta el momento de su análisis. Para realizar la técnica de DGGE, muestras de cada queso fueron almacenadas en congelación (-20 °C) a los 15 y 30 días de maduración a hasta el momento de su análisis.

6.2 Análisis Fisicoquímicos

Las variables de humedad, sólidos totales, grasa (método de Babcock), proteína (Método de Kjeldahl), cenizas, acidez, pH y NaCl de cada muestra de queso fueron determinadas por triplicado conforme a la metodología estándar de la AOAC (2002).

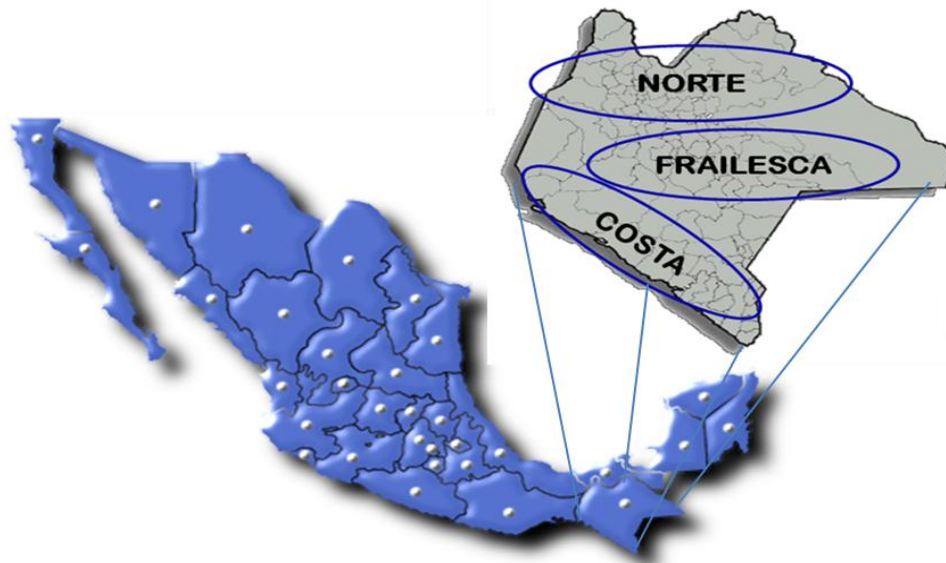


Figura 5. Principales regiones productoras de queso Crema Tropical en el estado de Chiapas, México

Cuadro 5. Lista de los quesos en estudio

Región	Queso	Lote
Costa	A	1,2
	B	1,2
	C	1,2
	D	1,2
Norte	E	1,2
	F	1,2
	G	1,2
Frailesca	H	1,2
	I	1,2

Lote 1: muestreo en Octubre de 2010
 Lote 2: muestreo en Abril de 2011

6.3 Análisis Microbiológicos

Se realizó el conteo de diferentes grupos microbianos a cada muestra de queso. Para ello, se prepararon diluciones seriadas de cada muestra siguiendo la metodología establecida en la NOM-110-SSA1-1994.

6.3.1 Microorganismos indicadores

El conteo de bacterias mesófilas aerobias (BMA) se llevó a cabo según la NOM-092-SSA1-1994. Los hongos y levaduras fueron contabilizados siguiendo los lineamientos de la NOM-111-SSA1-1994 y las bacterias coliformes totales y fecales, fueron contabilizadas conforme lo marca la NOM-112-SSA1-1994 por la técnica del número más probable (NMP).

6.3.2 Bacterias ácido lácticas

Los *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, fueron determinados según la metodología propuesta por Marino *et al.* (2003) y por Dagdemir y Ozdemir (2008). *Lactobacillus* se contabilizó por la técnica de vaciado en placa en agar MRS (Difco), las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis a 35 ± 2 °C por 48 h.

Para la cuantificación de *Lactococcus* y *Streptococcus* se realizó la técnica de difusión en placa sobre agar M17 (Difco) enriquecido al 5% con una solución de lactosa al 10%, las placas fueron incubadas a 30 y 42 ± 2 °C por 48 h, respectivamente.

6.3.3 Bacterias patógenas

Las determinaciones de *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, y *Staphylococcus aureus* se realizaron siguiendo las metodologías de NOM-114-SSA1-1994, NOM-143-SSA1-1995 y NOM-115-SSA1-1994 respectivamente. Mientras que la determinación de *Escherichia coli* mediante lo reportado por Feng *et al.*, (2002).

6.4 Extracción de DNA de las Muestras de Quesos

La extracción se realizó bajo el protocolo descrito por el Kit de extracción DNA Wizard (Promega, Madison, Wis) con algunas modificaciones. Cinco gr de cada queso se homogenizaron en una bolsa Stomacher con 40 mL de solución Ringer (Sigma) por 30 s. Se sedimentó la materia sólida por 5 min y se recuperó el sobrenadante para extraer el DNA. El sobrenadante (1 mL) se centrifugó a 17, 000 rpm por 10 min a 4 °C. El pellet resultante se resuspendió en 100 µL de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, Sigma). Se agregaron y mezclaron 160 µL de una solución (1:4.16) de 0.5M EDTA/Solución de lisis nucleica (Wizard DNA purification kit; Promega). Después se agregaron 15 µL de pronasa E (20 mg/mL, Sigma). Se incubó a 37 °C por 90 min, mezclándose cada 10 min. Posteriormente, se agregó un volumen de acetato de amonio (5 M), seguido de un período de incubación de 15 min a -4 °C. Se continuó con la centrifugación de las muestras a 1,400 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol, las muestras se mezclaron lentamente y se centrifugo a 1400 rpm por 5 min. El pellet resultante, se resuspendió con 500 µL de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó a 1400 rpm por 5 min. Se permitió secar el

pellet y se resuspendió en 50 μ L de una solución de rehidratación de DNA y se incubó a 60 °C por 60 min. Por último, se agregaron 5 μ L de Rnasa (10 mg/mL, Sigma) y se incubó a 37 °C por 30 min.

6.5 Condiciones de Amplificación por PCR

La región variable V3 del DNA ribosomal 16S fue enzimáticamente amplificada por PCR con primers de regiones conservadas de genes del 16S de RNA ribosomal. Los primers utilizados fueron: forward (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') y reverse (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). Además, se agregó una grapa o secuencia rica de GC (CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG) al primer forward, de acuerdo con la metodología reportada por Muyzer *et al.* (1993). Estos primers fueron usados para amplificar la subunidad 16S del DNA ribosomal (rDNA) en las diferentes especies bacterianas. Correspondiendo a las posiciones 341-534, de *Escherichia coli*, obteniendo productos de PCR de 200 pares de bases.

Las amplificaciones por PCR se realizaron con modificaciones del protocolo reportado por Ercolini *et al.*, (2006) en un termociclador (Techne; Progene, Italy). Cada mezcla (50 μ L de volumen final) se preparó con 2 μ L de templado de DNA, 0.1 μ L de cada primer, 0.5 μ L de mezcla de desoxinucleosidos trifosfato (Guanina, timina, adenina y citocina), 2.5 μ L de MgCl₂, 5 μ L de buffer PCR 10x (Invitrogen, Milano, Italia) y 0.5 μ L de *Taq* polimerasa (Invitrogen).

La mezcla para PCR se llevó a una temperatura inicial de 94 °C por 5 min, con el fin de incrementar la especificidad de la amplificación y de reducir la formación de falsos productos Muzer *et al.*, (1993). La temperatura inicial de alineamiento fue 10 °C por encima de la temperatura esperada (65 °C). La temperatura se redujo 1 °C cada dos ciclos, hasta que la temperatura alcanzara los 55 °C. Se llevaron a cabo 10 ciclos adicionales a 55 °C. La extensión del primer se llevó a cabo a 72 °C por 3 min. Finalmente, las muestras se incubaron a 72 °C por 10 min como extensión final.

Para verificar que las amplificaciones de DNA resultaron en productos de 200 pb, y antes de realizar electroforesis DGGE, una alícuota de cada producto de PCR (10 µL) fue sometida a electroforesis convencional en geles de agarosa (1.5%). Los geles de agarosa se corrieron a 100V por 30 min.

6.6 Condiciones de DGGE

Una vez confirmado el tamaño de los productos resultantes de PCR, estos, fueron analizados mediante electroforesis en gel con gradientes desnaturizantes usando un equipo Dcode (Bio-Rad Labs, Hércules CA) como lo reporta Ercolini *et al.*, (2001). Los productos de PCR se corrieron en geles de poliacrilamida al 8% (p/v) en buffer TAE 1X. La electroforesis se llevó a cabo a 60 °C usando geles de gradientes de desnaturización de 25 a 50% de urea y formamida (correspondiendo 100% al 7M de urea y 40% de formamida [p/v]). La concentración de urea incremento en dirección a la electroforesis. Los geles se corrieron en electroforesis a 200V por 4 h, después se tiñeron con bromuro de etidio por 5 min y se destiñeron en agua destilada por 10 min.

6.7 Secuenciación de Bandas de DGGE

Se cortaron las bandas seleccionadas del gel de DGGE con ayuda de puntas (1 mL) estériles para pipeta. Las piezas se rehidrataron en 20 μ L de agua ultra pura estéril y se incubaron a 4 °C toda la noche. Se usaron 2 μ L del agua para realizar nuevamente una reamplificación por PCR, usando los mismos primers y las condiciones descritas anteriormente. Los productos de PCR se corrieron en electroforesis por DGGE. Como control se utilizó el DNA amplificado del respectivo perfil de DGGE de donde fueron cortadas las bandas.

Las bandas consideradas como puras, fueron aquellas que migraron en el gel como una única banda y que coincidieron con la posición del control de donde fueron cortadas. Los productos purificados se limpiaron con el kit para purificación de PCR QIAkit (QIAGEN, Milán, Italia). Las muestras purificadas se prepararon según las indicaciones de Primm biotech (Milan, Italia) para ser enviadas a secuenciar. Para ello cada producto puro de DNA se ajustó a un volumen de 10 ng/mL, se agregaron 2 μ L del primer sin grapa "GC", y se complementó con agua ultrapura, hasta alcanzar un volumen final de 6 μ L. La identificación de la similitud de DNA se llevó a cabo usando la base de datos GenBank con el programa de búsqueda NCBI, BLAST (Villani *et al.*, 2007).

6.8 Análisis Estadístico

Para determinar si existían diferencias significativas entre los quesos muestreado se realizó un diseño completamente al azar mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía al 95% de confianza. Se consideraron las variables fisicoquímicas, las cuentas de BMA, hongos y levaduras, y BAL. Así como las dos fechas de muestreo. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey-Kramer, con un nivel de significancia de 0.05. El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico NCSS 2007 (Hintze, 2007).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis Físicoquímicos

La composición físicoquímica del QCT se presenta en el Cuadro 6. Se encontraron diferencias ($p < 0.05$) entre los quesos analizados para las variables de humedad, sólidos totales, grasa y proteína. Por otro lado, las variables de ácido láctico, NaCl y pH fueron semejantes ($p > 0.05$) en las nueve muestras. Las diferencias en composición podrían ser atribuidas a que el proceso de elaboración del QCT es muy heterogéneo y cada quesería adecua el proceso de acuerdo a las instalaciones con las que cuenta. Por ejemplo, algunos productores descremaron la leche por flotación antes de la fermentación de la leche, mientras que otros no la descremaron. Por otro lado, el tiempo de reposo de la leche a temperatura ambiente antes de ser cuajada varió entre 4 y 12h, y el tiempo y fuerza de prensado también fueron diferentes en cada quesería.

De acuerdo a los análisis físicoquímicos realizados, los valores promedio para humedad, sólidos totales, grasa, proteína, NaCl, cenizas y ácido láctico fueron de 44.59, 55.39, 26.0, 22.16, 3.53, 3.4 y 1.75 %, respectivamente. Además el pH promedio para todas las muestras fue de 4.07. Romero-Castillo *et al.* (2009), evaluaron la composición físicoquímica del QCT del municipio de Tonalá Chiapas de la región Costa. Estos autores encontraron valores similares a los reportados en este estudio para grasa (25.08 %) y pH (4.5), mientras que los valores para humedad (56.6 %), proteína (35.58 %) y cenizas (5.7%) fueron mayores que los encontrados en este estudio.

Cuadro 6. Composición fisicoquímica del queso Crema Tropical de Chiapas

%	Región								
	Costa			Norte			Frailesca		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Humedad	52.78±0.05 ^a	44.9 ±1.72 ^{ab}	42.2±9.45 ^{ab}	42.99±1.09 ^{ab}	35.4±3.49 ^b	41.72±0.9 ^{ab}	47.57±5.38 ^{ab}	40.18±2.03 ^{ab}	53.49±1.94 ^a
Sol. Tot.	47.24±0.09 ^b	55.05±1.72 ^{ab}	57.8±9.45 ^{ab}	57±1.09 ^{ab}	64.33±3.87 ^a	58.28±0.89 ^{ab}	52.48±5.29 ^{ab}	59.81±2.03 ^{ab}	46.50±1.94 ^b
Grasa	13 ±1.41 ^b	28 ±2.83 ^{ab}	28.5±9.19 ^{ab}	31.5±3.54 ^a	31.5 ±6.36 ^a	28 ±1.41 ^{ab}	25.5 ±4.95 ^{ab}	32±1.41 ^a	23.5 ±0.71 ^{ab}
Proteína	23.20±1.18 ^{ab}	21.13±0.48 ^{abc}	23.28±0.95 ^{ab}	22.08±0.23 ^{abc}	23.56±1.73 ^{ab}	25.32±0.93 ^a	20.97±1.60 ^{bc}	21.48±0.52 ^{abc}	18.4 ±0.98 ^c
Cenizas	4.78±2.23 ^a	4.9±0.57 ^a	3.33 ±0.72 ^a	2.59 ±0.59 ^a	2.27 ±0.41 ^a	3.43 ±0.59 ^a	3.37±0.25 ^a	2.44±0.28 ^a	3.47±0.97 ^a
Ac. láctico	2.31±0.99 ^a	1.25 ±0.21 ^a	2.01 ±0.40 ^a	2.11 ±0 ^a	0.87 ±0.04 ^a	2.18 ±0.68 ^a	1.74 ±0.34 ^a	1.75 ±0.2 ^a	1.52 ±0.11 ^a
NaCl	5.19±1.97 ^a	2.8±0.62 ^a	3.04±0.66 ^a	3.97±1.40 ^a	3.03±0.16 ^a	3.5±0.17 ^a	3.32±0.34 ^a	3.03±0.44 ^a	3.84±0.55 ^a
pH	4.59 ±0.49 ^a	3.91±0.10 ^a	4.15 ±0.27 ^a	3.86±0.10 ^a	4.08±0.15 ^a	4.08 ±0.28 ^a	3.87 ±0.08 ^a	3.92 ±0.35 ^a	4.10 ±0.22 ^a

Cada valor representa la media de los 2 lotes muestreados.

Promedio ± DE. Medias con diferente literal en una fila son estadísticamente diferentes (p<0.05).

Esta diferencia podría deberse a que Romero-Castillo *et al.* (2009) evaluaron el QCT en los meses de Enero a Abril, que es temporada cálida y de sequía en el estado de Chiapas (INEGI, 2004). Se ha reportado que existe un aumento en la cantidad de sólidos totales y disminución de la humedad en la leche según la época del año. Durante el otoño e invierno los porcentajes de grasa y proteína son altos, y disminuyen durante primavera y verano. Estos cambios se relacionan con el alimento disponible así como a las condiciones climáticas (Walner *et al.*, 2011).

Existen varias clasificaciones para el QCT de acuerdo a sus características fisicoquímicas. Según la norma general para el queso CODEX STAN 283-1978, este queso se clasifica como un queso firme/semiduro por su consistencia en función al porcentaje de humedad sin materia grasa (HSMG), y como no madurado/ fresco por sus principales características de maduración. Según la NOM-243-SSA1-2010, el QCT se clasifica como un queso fresco acidificado. Además, Villegas (2004), clasifica a éste queso como fresco ligeramente madurado de pasta blanda, no texturizada y prensada, elaborado con leche ligeramente madurada.

7.2 Análisis Microbiológicos

7.2.1 **Microorganismos indicadores**

Las cuentas de bacterias mesófilas aerobias (BMA) mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras A, B, C y H, mientras que el resto de las muestras fueron similares ($p > 0.05$) (Cuadro 7). Los quesos de la región Norte

fueron los que mostraron ser similares ($p > 0.05$) entre ellos y con el resto de las muestras. Romero-Castillo *et al.* (2009), reportaron para el QCT de la región Costa, un promedio de $7.2 \log_{10}$ UFC/g de BMA, que fue similar al promedio de $6.79 \log_{10}$ UFC/g encontrado en este estudio para las tres muestras procedentes de la misma región.

Por otro lado, Ramos-izquierdo *et al.* (2009) reportaron $3.17 \log_{10}$ UFC/ g en el QCT de Tabasco que fue cuatro ciclos logarítmicos por debajo de las cuentas reportadas en este estudio. Esta diferencia puede estar en función del nivel tecnológico del proceso de producción de los quesos, si bien, ambos quesos son artesanales, el queso de Tabasco fue elaborado por una empresa regional que cuenta con mayor control de las condiciones del proceso. Por otro lado, la manufactura del QCT de Chiapas se realizó en su mayoría por pequeñas microempresas familiares que no cuentan con el conocimiento ni el control de las condiciones de proceso.

Las cuentas de hongos y levaduras en los nueve quesos analizados (Cuadro 7), fueron estadísticamente similares ($p > 0.05$). El promedio para este grupo de microorganismos ($3.24 \log_{10}$ UFC/g) en el QCT de Tabasco fue dos ciclos logarítmicos menor al promedio encontrado en este estudio ($5.84 \log_{10}$ UFC/g). La NOM-121-SSA1-1994 establece en las disposiciones sanitarias para quesos frescos, un límite máximo de 500 UFC/g de hongos y levaduras, equivalente a $2 \log_{10}$ UFC/g. Obedeciendo a este límite, tanto las muestras de QCT analizadas, como el QCT de Tabasco estuvieron fuera de norma.

La alta incidencia de estos microorganismos en el QCT se debe al hecho de que quesos de alta acidez ($\text{pH} < 4.5$) son normalmente deteriorados por hongos y levaduras (Varnam y Sutheorland, 1994). La proliferación de hongos y levaduras en alimentos se ve favorecida por el ambiente ácido creado por las BAL.

Cuadro 7. Composición microbiológica del queso Crema Tropical de Chiapas

Región	Muestra	Cuenta viable (Log ₁₀ UFC/g)				
		Mesófilos aerobios	Hongos y levaduras	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
Costa	A	6.32±0.11 ^{bc}	5.3±0.62 ^a	6.45±0 ^{bc}	5.99±0.74 ^b	5.93±0.65 ^a
	B	5.56±0.05 ^c	5.69±0.25 ^a	6.22±0.10 ^c	5.87±0.67 ^b	5.88±0.56 ^a
	C	8.50±0.11 ^b	6.10±0.09 ^a	8.45±0.03 ^a	8.57±0.03 ^a	5.67±0.31 ^a
Norte	D	7.76±0.70 ^{abc}	5.57±0.60 ^a	7.82±0.80 ^{abc}	7.36±0.72 ^{ab}	7.02±1.03 ^a
	E	7.43±0.07 ^{abc}	5.82±0.82 ^a	7.57±0.42 ^{abc}	7.24±0.67 ^{ab}	6.31±1.23 ^a
	F	7.17±0.01 ^{abc}	6.52±0.83 ^a	8.19±0.28 ^{ab}	8.17±0.79 ^{ab}	6.81±0.88 ^a
Frailesca	G	8.10±0.37 ^{abc}	5.70±0.07 ^a	7.43±1.06 ^{abc}	7.74±0.09 ^{ab}	7.04±0.59 ^a
	H	9.19±3.12 ^a	5.54±0.49 ^a	7.02±0.23 ^{abc}	7.06±0.93 ^{ab}	6.58±0.38 ^a
	I	6.95±0.38 ^{abc}	5.89±0.02 ^a	6.28±0.02 ^{bc}	7.97±0.12 ^{ab}	5.89±0.38 ^a

Cada valor representa la media de los 2 lotes muestreados.

Promedio ± DE. Medias con diferente literal en una columna son estadísticamente diferentes (p<0.05).

Por otro lado, el crecimiento bacteriano es estimulado por la presencia de levaduras que pueden proveer de factores de crecimiento, como vitaminas y compuestos nitrogenados solubles (Mugula *et al.*, 2003). El promedio de pH en los nueve quesos fue de 4.07 ± 0.22 , que es una condición favorable para el desarrollo de hongos y levaduras.

Se encontró presencia de bacterias coliformes fecales en el lote de Octubre en ocho de las nueve muestras (Cuadro 8). Por el contrario, los valores para bacterias coliformes fecales en el lote de Abril disminuyeron considerablemente, ya que las únicas muestras con presencia de coliformes fecales fueron D y E. En el resto de los quesos, la presencia de estos microorganismos fue indetectable por la técnica empleada.

El valor promedio de coliformes fecales fue de $3.24 \log_{10} \text{NMP/g}$ en el lote de Octubre. Este valor representa un ciclo logarítmico por arriba del reportado ($2.4 \log_{10} \text{NMP/g}$) para el QCT de Tabasco (Ramos-Izquierdo *et al.*, 2009). Por otro lado, el QCT del municipio de Tonalá en la región Costa, presentó un promedio de $7.44 \log_{10} \text{UFC/g}$ (Romero-Castillo *et al.*, 2009). La NOM-121-SSA1-1994 establece un límite máximo permitido de bacterias coliformes fecales de 100 NMP/g para quesos frescos. Por lo tanto, en el muestreo de Octubre solo los quesos A y B cumplieron con la norma, mientras que para el lote de Abril, todos los quesos cumplieron con la norma (Cuadro 8). Los coliformes son microorganismos de origen fecal, y la presencia de estos en los quesos pone de manifiesto la falta de higiene en el proceso.

Es importante mencionar que el mes de Abril en Chiapas es temporada cálida, a diferencia del mes de Octubre, que es una época en la que abundan las lluvias copiosas con duración de más de 24 h (INEGI, 2004). Estas condiciones generan un ambiente húmedo propicio para el desarrollo de coliformes.

Adicionalmente, la falta de condiciones higiénicas en los establos y en la ordeña, así como la mala limpieza de los recipientes en donde se transporta la leche son factores que contribuyen a la presencia de coliformes.

Se observó que la mayoría de las queserías carecían de buenas prácticas de higiene en las instalaciones y equipo. Además, el personal directamente involucrado en el proceso no hacía uso de cofias ni de cubre bocas. Asimismo, algunas queserías no contaban con las instalaciones adecuadas, es decir, procesaban al aire libre o bien sin ninguna barrera que impidiera el paso de corrientes de aire, insectos, roedores, etc., al sitio de proceso. Ninguna quesería empleó agua previamente tratada y el equipo utilizado en las queserías fue mayoritariamente de madera, lo que dificultó la limpieza pudiendo generar recontaminación.

7.2.2 Bacterias ácido lácticas

Las cuentas de las BAL se presentan en el Cuadro 7. Se observaron diferencias ($p < 0.05$) entre los quesos para las cuentas de *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Por otro lado, las cuentas de *Streptococcus* no mostraron diferencias ($p > 0.05$). De acuerdo al promedio general de las cuentas de las BAL, fueron los *Lactobacillus* con 7.27 Log₁₀UFC/g el grupo dominante, seguido de los *Lactococcus* (7.33 Log₁₀UFC/g) y *Streptococcus* (6.37 Log₁₀UFC/g). Ramos-Izquierdo *et al.* (2009) reportaron cuentas de *Lactobacillus* en QCT de Tabasco, en un promedio de 7.67 Log₁₀UFC/g, valor similar al encontrado en este estudio. Sin embargo no se reportaron cuentas de *Streptococcus* y *Lactococcus* para el QCT de Tabasco.

Ciertas BAL, son bacterias mesófilas en función a la temperatura óptima a la que crecen, por lo tanto son consideradas en las cuentas de bacterias mesófilas aerobias. En este estudio, se consideró una temperatura de 35 °C ± 2 para las

bacterias mesófilas. El género de *Lactobacillus* fue incubado a esta misma temperatura, por lo tanto, se considera parte de las bacterias mesófilas. El valor promedio registrado para el género de *Lactobacillus* fue de 7.27 Log₁₀UFC/g, mientras que el valor promedio de mesófilos aerobios fue de 7.47 Log₁₀UFC/g. Esto implica que la mayor parte de las bacterias mesófilas en el QCT de Chiapas pertenecen al grupo de las BAL.

La alta incidencia de BAL se ve reflejada en el contenido de ácido láctico y bajo pH en los quesos, que son factores que desempeñan un papel importante en el desarrollo de las características organolépticas del QCT de Chiapas.

7.2.3 Bacterias patógenas

El crecimiento de bacterias patógenas en los quesos está en función de parámetros intrínsecos y extrínsecos. Los factores intrínsecos son humedad, pH, acidez, contenido de nutrientes, presencia de compuestos antimicrobianos y la presencia de flora competitiva. Los factores extrínsecos son las condiciones de almacenamiento, pasos en la elaboración del producto y tipo de empaque, entre otros (Fox *et al.*, 2004).

En este estudio, no se detectó presencia de *Salmonella* spp. en ninguna de las muestras analizadas en los dos lotes muestreados. Por otro lado, se ha reportado presencia de *Salmonella* spp. (Romero-Castillo *et al.*, 2009) en el QCT del municipio de Tonalá de la región Costa. La muestra con presencia de *Salmonella* spp. fue la que registró el promedio menor de NaCl, a una concentración de 3.13 %. Se ha demostrado crecimiento de *Salmonella* spp. a concentraciones de 3 a 4 % de NaCl (Juneja y Sofos, 2010).

El promedio de NaCl en las muestras de este estudio fue de 3.5%. Tomando en cuenta lo anterior, a esta concentración de NaCl puede desarrollarse este patógeno en el QCT. Sin embargo, la ausencia de *Salmonella* spp. en las muestras analizadas, pudiera explicarse en función del pH ya que se ha demostrado que *Salmonella* spp. crece en un rango de pH de 4.5-9.5 (Juneja y Sofos, 2010). Los quesos de este estudio se encontraron en un rango promedio de pH de 3.8 a 4.15, con excepción de la muestra A (pH 4.5), los cuales se encuentran por debajo del mínimo en el que se desarrolla *Salmonella* spp. Aunque el pH es un factor importante para el crecimiento de este microorganismo, podrían estar en juego otros factores como el porcentaje de NaCl, humedad, flora competitiva, bacteriocinas, entre otras (Leisther y Gould, 2002).

De igual manera *L. monocytogenes* no fue detectada en ninguno de los nueve quesos de los dos lotes muestreados. No existen estudios previos que hayan reportado presencia de este patógeno en el QCT. Sin embargo, se sabe que *L. monocytogenes* tiene la capacidad de crecer en un rango de pH entre 4.3 y 9 (Ryser, 2004). Estas bacterias se adaptan a condiciones ácidas, mediante el fenómeno de respuesta ácido tolerante, logrando incluso sobrevivir a pH de 3.87. La capacidad que muestran las especies del género *Listeria* para crecer a pH bajo, está influenciada por la naturaleza del acidulante. Así en medios acidificados con ácido láctico no se detecta crecimiento hasta pH de 4.8 (Rodríguez *et al.*, 2009). Por otra parte, uno de los pasos en la producción del QCT, es el reposo de la leche a temperatura ambiente para generar un medio ácido por acción de las BAL. Esto resulta en un queso acidificado a causa principalmente del ácido láctico. El promedio de pH mayor encontrado en los nueve quesos bajo estudio fue de 4.5, por lo que estas condiciones pudieron inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*.

Las nueve muestras de QCT de Chiapas bajo estudio, estuvieron dentro de los límites permitidos por las normas NOM-121-SSA1-1994 y NOM-243-SSA1-2010 que establecen las especificaciones sanitarias para quesos frescos. Estas normas establecen ausencia en 25 g de muestra para los patógenos *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes*.

Staphylococcus aureus fue detectado solo en los tratamientos H e I en el mes de Octubre con cuentas de 100 y 200 UFC/g respectivamente. En el mes de Abril el tratamiento H nuevamente fue el único que mostró presencia de éste patógeno, registrando 500 UFC/g (Cuadro 8). No se encontraron reportes previos que hayan estudiado la incidencia de *Staphylococcus aureus* en QCT.

Staphylococcus aureus crece en un rango de pH entre 4.5 a 9.3, es una bacteria altamente tolerante al NaCl y resistente a los nitritos. Para que esta bacteria pueda causar enfermedades transmitidas por alimentos, debe encontrarse a una concentración suficiente que le permita producir la enterotoxina. Esto sucede aproximadamente a una concentración de 10^5 a 10^8 UFC/g (Heredia *et al.*, 2009). Es por esta razón que las NOM-121-SSA1-1994 y NOM-243-SSA1-2010 establecen un límite máximo permitido de 1000 UFC/g (10^2 UFC/g) de ese patógeno para quesos frescos. Esto, como medida preventiva ante el riesgo de la posible presencia de la enterotoxina generada por *Staphylococcus aureus*.

Por lo tanto, los nueve quesos en estudio se consideran dentro de las normas oficiales respecto a la presencia de *Staphylococcus aureus*, ya que las cuentas registradas en los tratamientos H e I tanto en el lote de Octubre como en el de Abril, se encontraron por debajo de los límites permitidos.

Cuadro 8. Presencia de coliformes fecales, *E. coli* y *Staphylococcus aureus* en el queso Crema Tropical de Chiapas en los lotes muestreados en Octubre (2010) y Abril (2011)

Región	Tratamiento	Octubre 2010			Abril 2011		
		coliformes fecales NMP/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>Staphylococcus aureus</i> UFC/g	coliformes fecales NMP/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>Staphylococcus aureus</i> UFC/g
Costa	A	<3	<3.0	<100	<3	<0.3	<100
	B	9	<3.0	<100	<3	<0.3	<100
	C	>1100	>1100	<100	<3	20	<100
Norte	D	240	240	<100	23	15	<100
	E	1100	>1100	<100	93	460	<100
	F	210	<3.0	<100	<3	3.0	<100
Frailesca	G	1100	15	<100	<3	9.2	<100
	H	>11000	>1100	100	<3	9.2	500
	I	1100	>1100	200	<3	3.0	<100

Se registró presencia *E. coli* en seis quesos del lote de Octubre (C, D, E, G, H e I) y en siete del lote de Abril (C, D, E, F, G, H e I) (Cuadro 8). La NOM-243-SSA1-2010 permite 100 UFC/g de este patógeno en quesos frescos, quedando fuera de norma para este parámetro cinco quesos del lote de Octubre (C, D, E, H, e I) y uno del lote de Abril (E).

E. coli es capaz de crecer a 8% de NaCl y además muestra una notable resistencia a niveles extremos de acidez. Se ha registrado sobrevivencia de *E. coli* en alimentos de pH bajo como jugos, mayonesas, salchichas y productos lácteos (Heredia *et al.*, 2009). Los coliformes se desarrollan en las primeras etapas de fabricación del queso, antes de ser inhibidas y parcialmente destruidas por la acidificación causada por las BAL (Villegas, 2004).

Esto explicaría la presencia de *E. coli* en el QCT de Chiapas. Además ya que la carga de coliformes fecales en la leche para la elaboración de este queso fue considerablemente alta, estas bacterias se pudieron multiplicar en las etapas tempranas del proceso y no se vieron afectadas por el porcentaje de NaCl y el nivel de ácido láctico del medio.

7.3 Análisis mediante DGGE de la población de bacterias ácido lácticas del queso Crema Tropical

Se aisló el DNA total microbiano de los dos muestreos (Octubre y Abril) de cada uno de los nueve quesos a los 15 y 30 días de madurez. Los amplicones de PCR generados pertenecientes a la región V3 del DNA ribosomal microbiano 16S se muestran en los perfiles de DGGE en las Figuras 6 y 7. Se mostró que los perfiles de bandeo presentes en cada uno de los nueve quesos de cada lote,

no mostraron diferencias entre los 15 y los 30 días de madurez. Este comportamiento se observó tanto en el lote de Octubre como en el de Abril.

En el lote de Octubre, se encontraron un total de quince bandas entre los diferentes quesos, las cuales fueron identificadas con un porcentaje de similitud del 98 a 100% (Figura 6). Sin embargo, la banda 2 no pudo ser identificada en el banco de datos del GenBank. En general, los perfiles de la mayoría de los quesos consistieron en una mezcla de bandas de poca intensidad. Sin embargo, algunos perfiles de quesos, mostraron bandas de alta intensidad, como lo fueron los quesos G, H e I de la región Frailesca. Las bandas que mostraron mayor intensidad en este lote fueron como sigue: banda 3 (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) en los quesos G y H, banda 12 (*Lb. plantarum* cepa ZJ316) en el queso F, banda 9 (*Lc. lactis* subsp. *lactis* cepa 2BA36) y banda 13 (*Lc. lactis* subsp. *lactis*) en los quesos H e I y banda 14 (*Strep. salivarius*) en los quesos E, G e I (Figura 6, Cuadro 9). Se sabe que la intensidad de una banda individual es una medida semicuantitativa de la abundancia de una secuencia en una población (Muyzer *et al.*, 1993). Esto sugiere que la población microbiana de BAL en algunos de los quesos de este estudio está dominada por algunas bacterias en particular. Por otro lado, en otros quesos, las bacterias que conforman la población de BAL se encontraron en proporciones equivalentes ya que la intensidad de las bandas fue muy similar.

Algunas bandas fueron comunes a la mayoría de las muestras, sin embargo ninguna fue común en el total de los nueve quesos bajo estudio. Por ejemplo, la banda 14 (*Strep. salivarius*) estuvo presente en los quesos A, B, C, D, E, G, H e I, la banda 3 (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) en los quesos A, B, D, E, F, G, H e I y por último, la banda 13 (*Lc. lactis* subsp. *lactis*) en los quesos B, C, D, E, F, H e I.

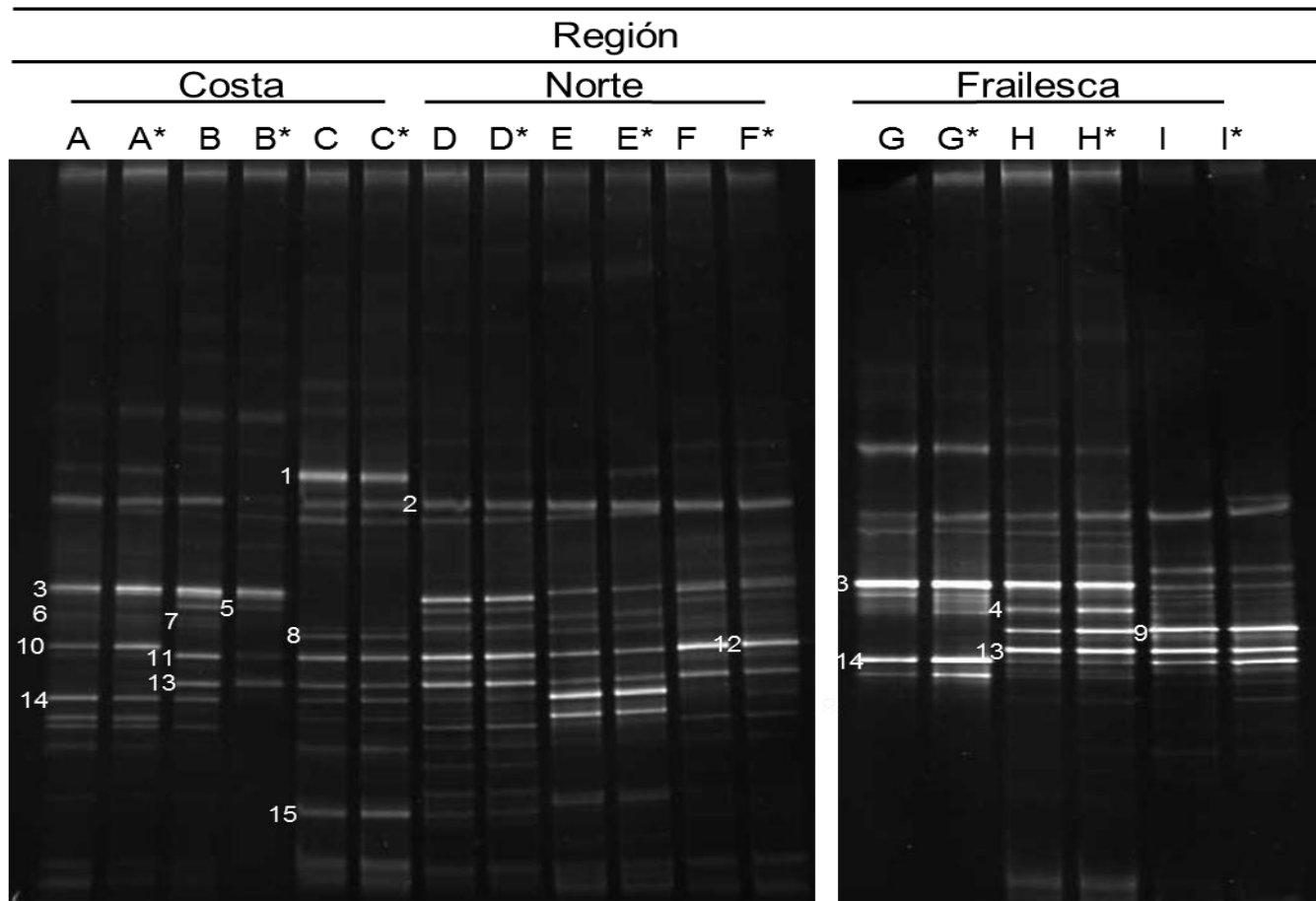


Figura 6. Perfil DGGE del lote de Octubre (2010) de los quesos Crema Tropical de Chiapas
 Letras A-I son quesos a los 15 días de madurez, letras A*-I* son quesos a los 30 días de madurez.
 (La identificación de las bandas se encuentra en el Cuadro 9)

Cuadro 9. Información de las secuencias de las bandas de DGGE obtenidas al analizar la región V3 del rDNA del gen 16S de DNA extraído directamente de las muestras de queso Crema Tropical del lote de Octubre (2010)

Banda ^a	Microorganismo identificado	% Similitud	No. de acceso al GenBank
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa C8-1	98	FJ378889.1
2	No identificada	–	–
3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	99	JF720004.1
4	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>Infantarius</i>	99	AF429762.1
5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i>	98	FR683103.1
6	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	98	EF412985.1
7	<i>Streptococcus macedonicus</i>	100	AB563247.1
8	<i>Streptococcus bovis</i>	100	HQ721264.1
9	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> cepa 2BA36	100	JF297358.1
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa F092482	98	AB300211.1
11	<i>Streptococcus pasteurianus</i>	100	JN581989.1
12	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa ZJ316	98	JN126052.1
13	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> cepa B-2-4	100	JN194197.1
14	<i>Streptococcus salivarius</i>	99	CP002888.1
15	<i>Enterobacter cloacae</i>	99	JF513137.1

^a Los números corresponden a las bandas mostradas en la Figura 6

Comparando los perfiles de bandeo entre los quesos de cada región del lote de Octubre (Figura 6, Cuadro 9), se deduce que en los quesos de la región Costa, *Strep. salivarius*, *Strep. pasteurianus* y un microorganismo de secuencia no identificada (bandas 15, 11 y 2, respectivamente) fueron detectados en las tres muestras (A, B y C). Por el contrario, *Lb. plantarum* cepa F092482 (banda 10) solo se presentó en el queso A, *Strep. macedonicus* y *Lb. gallinarum* (bandas 7 y 5) en el queso B, mientras que *Strep. bovis* y *Lb. plantarum* cepa C8-1 (bandas 8 y 1) en el queso C. Así mismo, fue este último queso, el único de los nueve quesos bajo estudio en el que se identificó *Enterobacter cloacae* (banda 16).

Comparando los perfiles de bandeo entre los quesos D, E y F de la región Norte del lote de Octubre, estos presentaron bandas en común, a excepción de la banda 7 (*Strep. macedonicus*) y banda 12 (*Lb. plantarum* cepa ZJ316) (Figura 6, Cuadro 9), Una característica importante en el perfil de DGGE de estos quesos, es que mostraron nueve bandas (2, 3, 5, 7, 8, 11, 12, 13 y 14) de las quince identificadas. Los quesos de esta región presentaron la mayor diversidad de BAL en este lote. En tanto que el perfil de los quesos de la región Frailesca fue el que presentó menor número de bandas (2, 3, 4, 9, 13 y 14), siendo la banda 14 (*Strep. salivarius*) común a los tres quesos.

En el lote de Abril, se encontraron un total de doce bandas entre los diferentes quesos, las cuales fueron identificadas con un porcentaje de similitud del 97 a 100% (Figura 7, Cuadro 10). En este lote, los perfiles que presentaron bandas con mayor intensidad fueron nuevamente los perfiles de los quesos G e I de la región Frailesca. La banda 5 (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) se encontró en el queso G, la banda 9 (*Lc. lactis* subsp. *lactis* cepa 2BA36) en el queso I y la banda 8 (*Lc. lactis* subsp. *lactis* cepa B-2-4) en ambos quesos.

Por otra parte, los microorganismos con mayor incidencia en los quesos del lote de Abril fueron: *Lb. amylovorus* (banda 2) en los quesos A, B, D, E, F, G, H, e I; *Lc. lactis* subsp. *lactis* cepa B-2-4 (banda 8) en los quesos B, C, D, E, F, G, H, e I; *Streptococcus* spp. (banda 7) en los quesos B, C, E y F, y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (banda 5) en los quesos G, H e I de la región Frailesca (Figura 7, Cuadro 10). Cabe señalar, que a excepción de *Lb. amylovorus* (banda 2), la presencia de estos microorganismos no cambió en el lote de Abril con respecto al de Octubre. En el lote de Octubre fueron identificados *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en la banda 3, *Streptococcus pasteurianus* en la banda 11, y *Lc. lactis* subsp. *lactis* en la banda 13 (Figura 6, Cuadro 9). Sin embargo, en el caso del lote de Abril, la banda 7 solo pudo ser identificada a nivel de género (Figura 7, Cuadro 10).

Los perfiles de bandeo en los quesos de la región Costa del lote de Abril, fueron diferentes respecto a los perfiles del lote de Octubre en la mayoría de las bandas identificadas, con excepción de *Lc. lactis* subsp. *lactis* (banda 13 en la Figura 6, y banda 8 en la Figura 7). Sin embargo, la diferencia entre los microorganismos identificados fue a nivel de especie, conservándose entre éstos el mismo género.

Enterobacter cloacae (banda 15 en la Figura 6, Cuadro 9) identificado en el queso C del lote de Octubre, no fue encontrado en el lote de Abril. El número de bandas en los quesos de la región Norte del lote de Abril (bandas 1, 2, 7, 8, 10, y 11 en la Figura 7), fue menor que el número de bandas del lote de Octubre (2, 3, 5, 7, 8, 11, 12, 13 y 15 en la Figura 6). Fueron los quesos de la región Frailesca los que en el lote de Abril mantuvieron entre ellos un perfil de bandeo similar. *Lc. lactis* subsp. *lactis* cepa 2BA36 (banda 9) se encontró solo en el queso I, siendo esta la única diferencia entre los perfiles de estos quesos. Así mismo, *Strep.*

infantarius (banda 4 en la Figura 6) que fue detectado en el lote de Octubre, no lo fue en el lote de Abril (Figura 7).

La presencia o ausencia de bandas en DGGE, así como su intensidad revela cambios en la estructura y diversidad de las poblaciones microbianas (Flórez y Mayo, 2006b). La diferencia en cantidad e intensidad de bandas de los perfiles del lote de Octubre en relación al de Abril, evidencia cambios estructurales importantes entre los diferentes quesos de acuerdo a la temporada de producción (Figuras 6 y 7). Incluso existe diferencia estructural entre quesos de la misma región, como es el caso de los quesos A, B y C de la región Costa que mostraron diferentes perfiles entre ellos en ambos lotes (Figuras 6 y 7). Esto sugiere que la población microbiana podría estar asociada con un productor en particular, indicando que cada quesería pudiera estar dominada por una microbiota independiente (Flórez y Mayo, 2006b).

En general, las especies del género *Enterobacter* no son consideradas como patógenas para el hombre. *Enterobacter cloacae* es el principal responsable de brindar características sensoriales de sabor y formación de ojos al queso venezolano Palmita (Cabrera y Ferrer, 1994). Incluso se han realizado diferentes mezclas de cultivos lácticos a partir de este microorganismo para mejorar la calidad sanitaria de este queso (Cabrera y Ferrer, 1994). Sin embargo, la banda correspondiente a *Enterobacter cloacae* (banda 15 en Figura 6, Cuadro 9), fue de poca intensidad y no se presentó en el lote de Abril.

Los géneros dominantes identificados en los patrones de bandeo de DGGE fueron *Lactobacillus* (40% en Octubre y 41.6% en Abril), *Streptococcus* (33% en Octubre y 41.6% en Abril), y *Lactococcus* (13% en Octubre y 16.6% en Abril).

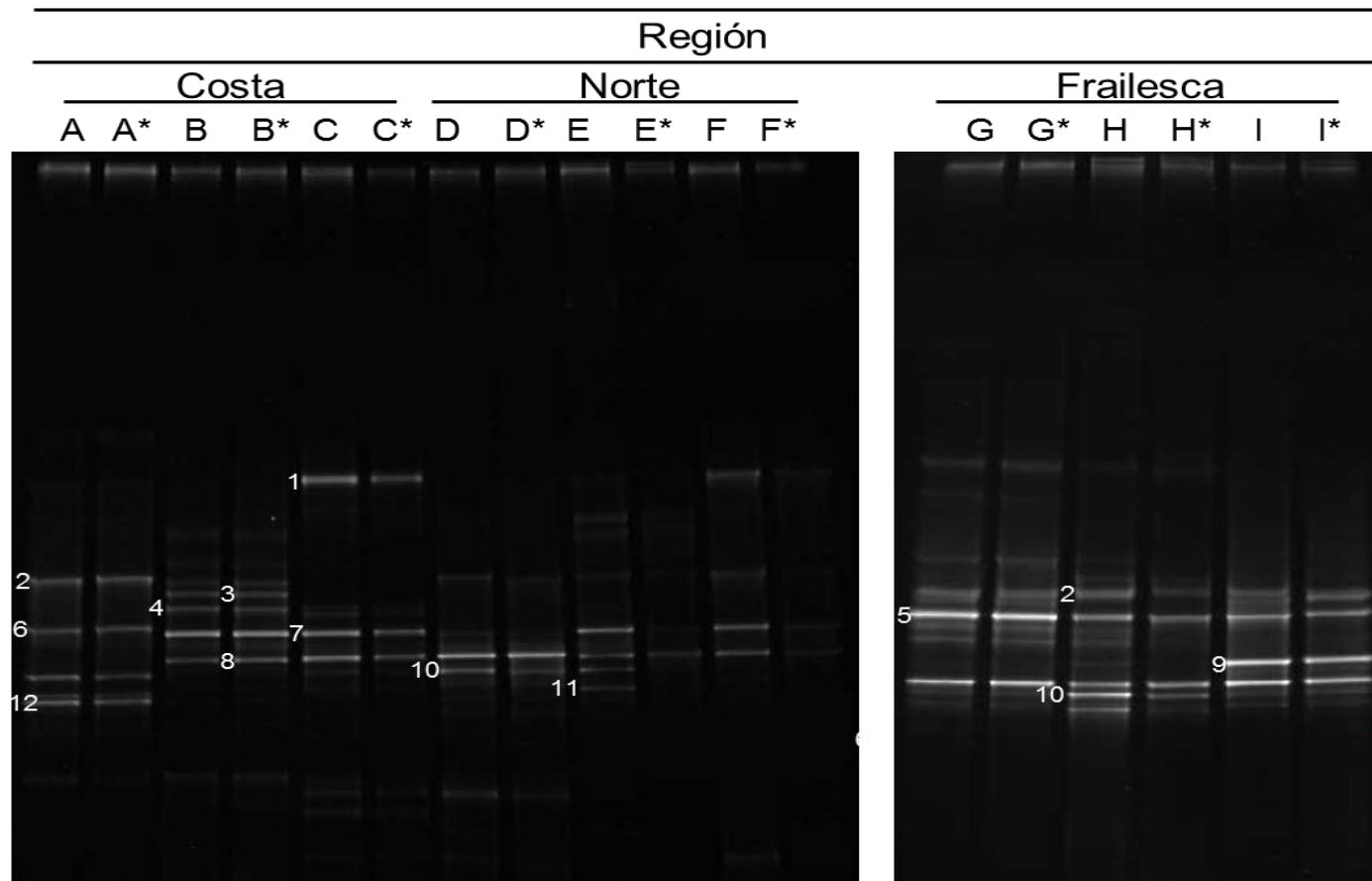


Figura 7. Perfil DGGE del lote de Abril (2011) de los quesos Crema Tropical de Chiapas. Letras A-I son quesos a los 15 días de madurez, letras A*-I* son quesos a los 30 días de madurez. (La identificación de las bandas se encuentra en el Cuadro 10)

Cuadro 10. Información de las secuencias de las bandas de DGGE obtenidas al analizar la región V3 del rDNA del gen 16S de DNA extraído directamente de las muestras de queso Crema Tropical del lote de Abril (2011).

Banda ^a	Microorganismo identificado	% Similitud	No. de acceso al GenBank
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	AB300211.1
2	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	99	AB627836.1
3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	97	FR683100.1
4	<i>Streptococcus infantarius</i>	99	EU163504.1
5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	98	JF720004.1
6	<i>Lactobacillus crustorum</i>	97	AM285450.1
7	<i>Streptococcus</i> spp.	98	HQ452825.1
8	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> cepa B-2-4	100	JF922121.1
9	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> cepa 2BA36	100	JF297358.1
10	<i>Streptococcus salivarius</i> 57.1	99	CP002888.1
11	<i>Streptococcus salivarius</i> cepa C2420	99	JF803598.1
12	<i>Streptococcus thermophilus</i>	98	HQ721278.1

^a Los números corresponden a las bandas mostradas en la Figura 7

Se ha reportado que *Lc. lactis* subsp. *Lactis*, *Strep. salivarius*, *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* han sido empleadas como cultivos lácticos para quesos con función acidificante. Estas bacterias tienen un alto poder acidificante (de 60 a 180°Dornic), así mismo, son clasificadas como termófilas según su temperatura de crecimiento (Villegas, 2004). Por lo tanto, el microambiente del QCT de Chiapas es un ambiente termófilo y acidificante. El QCT es elaborado siempre a temperatura ambiente de aproximadamente 35 °C que es la temperatura promedio del estado de Chiapas (INEGI, 2004) y presenta un pH promedio menor a 4.07.

Lb. gallinarum (banda 6 en Figura 6, Cuadro 9) también fue identificado en QCT, que es un microorganismo que también ha sido identificado a partir de gránulos de Kefir mediante DGGE (Garbers *et al.*, 2004). Además Forsythe, (2010) reportó que ha sido empleado como microorganismo probiótico.

Las bacterias identificadas en este estudio como *Strep. bovis*, *Strep. infantarius* subsp. *infantarius*, *Strep. Macedonicus* y *Strep. pasteurianus*, pertenecen al grupo *bovis* de los *Streptococcus*. Es importante enfatizar, que este grupo se encuentra formado por especies que principalmente habitan en el canal intestinal de los animales y que en ocasiones, infectan a los humanos ocasionando septicemias (Montes y García-Arenzana, 2007).

La presencia de *Streptococcus* del grupo *bovis*, fue predominante en el lote de Octubre (Figura 6, Cuadro 9), pero no en el de Abril (Figura 7, Cuadro10). Esto pudiera explicarse debido a que en Octubre es temporada de lluvias en el estado de Chiapas (INEGI, 2004), aunado a las malas prácticas de higiene observadas tanto en establos como en la ordeña, podrían aumentar la

presencia de estos microorganismos en la leche y en el queso. Por el contrario, en el lote de Abril solo se detectó *Strep. infantarius* (banda 4 Figura7) de los *Streptococcus* que pertenecen al grupo *bovis*.

8. CONCLUSIONES

Las diferencias en la composición fisicoquímica de los quesos analizados, indicaron que existen variaciones de acuerdo a la región del muestreo y a los procesos de elaboración utilizados en las queserías. Así mismo, los valores para las cuentas viables de hongos y levaduras, así como de coliformes fecales y *E.coli*, evidencian la falta de pasteurización de la leche y la falta de higiene en la producción del queso Crema Tropical de Chiapas

De las poblaciones estudiadas, las bacterias ácido lácticas fueron el consorcio dominante en el queso QCT. Además, se encontró que existen cambios en la estructura y diversidad de la población de bacterias ácido lácticas de acuerdo a la época del año y de la región de producción más no a los días de maduración del producto.

Las bacterias ácido lácticas identificadas en los perfiles de DGGE como *Lc. lactis* subsp. *Lactis*, *Strep. Salivarius*, *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *Lactis*, podrían formar parte de cultivos lácticos iniciadores para este tipo de queso y podrían jugar un papel importante en la calidad organoléptica y sanitaria de los mismos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alegría A., Álvarez M. P., Sacristán N., Fernández E., Delgado S., Mayo B. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*. 136, 44-51.
- Amor K. B., Vaughan E. E., and M. de Vos W. 2007. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *The journal Applied and Environmental*. 137, 741S-747S.
- A.O.A.C. 2002. *Official Methods of Analysis*. Association of official chemists. Keneth Helrich Ed. Vol I y II.
- Ayres J. C., Mundt J. O., Sandine W. E. 1980. *Microbiology of Foods*. Ed. W.H. Freeman and Company. Pp. 354,355.
- Baduí D. S. 1999. *Química de los Alimentos*. Longam de México editores. México. Pp. 608-609.
- Bonetta S., Bonetta S., Carraro E., Rantsiou K., Cocolin. 2008. Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR– DGGE. *Food Microbiology*. 25, 786-792.
- Cabeza H. 2006. Conferencia: Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. Simposio Regional de Microbiología "Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo". Universidad Libre, Barranquilla, Colombia. 15 y 16 de Septiembre.
- Cabrera de P. L., Ferrer O. A. 1994. Evaluación de cepas de *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Enterobacter* como cultivos iniciadores para la elaboración de queso tipo Palmita venezolano con leche pasteurizada. *Revista científica, FCV-LUZ*. 2, 73-78.
- Carr F. J., Chill D., Maida N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28, 281-370.

- Cervantes E., Villegas de Gante, Caseín Vargas, Espinoza Ortega. 2008. Los quesos mexicanos genuinos: patrimonio cultural que debe rescatarse. 1a. edición. México D.F. Mundi-prensa. Pp 59-61.
- Cocolin L., Ercolini D. 2008. Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods. Ed. Springer. NY. Pp.3, 51-67.
- CODEX STAN 283-1978. Norma general del CODEX para el queso. Disponible en:
http://www.codexalimentarius.net/search/advancedsearch.do?key=&cat=&type=&doctext=&hitcount=10&com_txt=&titletext=clasificacion+de+quesos&qlang=ES&hitfrom=0. Fecha de acceso: 1 de Noviembre del 2011.
- Coeuret V., Dubernet S., Bernardeau M., Gueguen M., Vernoux J. P. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. INRA, EDP Sciences Lait. 83, 269-306.
- Cogan T. M., Beresford T. P., Steele J. Broadbent J., Shah N.P., Ustunol Z. 2007. Advances in starter cultures and cultures foods. Journal of Dairy Science. 90, 4004-4021.
- Coppola S., Blaiotta G., Ercolini D., Moschetti G. 2001. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. Journal of Applied Microbiology. 90, 414-420.
- Cremonesi P., Pisoni G., Severgnini M., Consolandi C., Moroni P., Raschetti M., Castiglioni B. 2009. Pathogen detection in milk samples by ligation detection reaction-mediated universal array method. Journal of Dairy Science. 92, 3027–3039.
- Dagdemir E., Ozdemir S. 2008. Technological characterization of the natural lactic acid bacteria of artisanal Turkish White Pickled cheese Society of Dairy Technology. 61,133-140.
- Díaz R. G., Wachter R. C. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. Revista Latinoamericana de Microbiología. 45, 134-156.
- Ercolini D., Moschetti G., Blaiotta G., Coppola S. 2001. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. Current Microbiology. 42,199-202.

- Fadda M.E., Viale S., Deplano M., Pisano M.B., Cosentino S. 2010. Characterization of yeast population and molecular fingerprinting of *Candida zeylanoides* isolated from goat's milk collected in Sardinia. *International Journal of Food Microbiology*. 136,376–380
- Feng P., Weagant D. S., Grant A. M. 2002. *Bacteriological analytical manual*. Chapter 4, Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. FDA.USA. Disponible en: <http://www.fda.gov/food/scienceresearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm064948.htm>. Fecha de acceso: 2 de Noviembre del 2011
- Flórez A. B., Mayo B. 2006a. PCR-DGGE as a tool for characterizing dominant microbial populations in the Spanish blue-veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal*. 16, 1205-1210.
- Flórez A. B., Mayo B. 2006b. Microbial diversity and sucession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology*. 111,165-171.
- Forcite J. S. 2010. *The microbiology of safe foods*. Blackwell publishing. USA. Pp. 345.
- Fox F. P., McSweeney L H. P., Cogan M. T., Guinee p.T. 2004. *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. Third edition. Ed. Elsevier. UK. Pp. 544.
- Garbers I-M., Britz T.J., Witthuhn R.C. 2004. PCR-based denaturing gradient gel electrophoretic typification and identification of the microbial consortium present in kefir grains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20, 687-693.
- Gutiérrez-Méndez N. 2008. Capacidad de *Lactococcus lactis* de biosintetizar α -cetoglutarato asociado con su potencial de producir aroma. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Alimentación y desarrollo A.C. Sonora, México.
- Kafili T., Hadi R., Djomeh E., Reza N., Álvarez M., Mayo B. 2009. Microbial characterization of Iranian traditional Lighvan cheese over manufacturing and ripening via culturing and PCR-DGGE analysis: identification and typing of dominant lactobacilli. *Europe Food Research and Technology*. 229, 83-92.

- Hemme D., Foucaud-Scheunemann C. 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*. 14, 467-494.
- Heredia Castro Priscilia. 2011. Caracterización del proceso de producción del queso cocido artesanal y de las principales bacterias ácido lácticas generadoras de aroma. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Alimentación y desarrollo A.C. Sonora, México
- Heredia N., Wesley I., García S. 2009. *Microbiologically safe foods*. Ed. Wiley. USA. Pp. 33.
- Hintze, J. 2007. *NCSS and Pass. Number Cruncher Statistical Systems*. Kaysville, Utha. WWW.NCSS.COM.
- Hutkins R. W. 2006. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Chapter 3 Cheese. Blackwell Publishing. USA. Pp. 16-18, 51.
- ICMSF. 2000. *Microorganism in foods*. Aspen publishers, Inc. Maryland, USA. Pp. 529-531
- INEGI. 2004. Cuaderno estadístico municipal, Tuxtla Gutiérrez, estado de Chiapas. Edición 2003. Aguascalientes, México. (ISBN 970-13-4448-0). Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Clima_de_Tuxtla_Guti%C3%A9rrez. Fecha de acceso: 1 Noviembre del 2011
- Jean-Luc J., Georges B. 2008. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology*. 25, 839-848.
- Juneja K. Vijay., Sofos N. John. 2010. *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions*. American Society for microbiology USA. Pp. 110.
- Krause D., Hendrick S. 2011. *Zoonotic Pthatogens in the Food Chain*. CABI Ed. Uk. Pp.111, 112.
- Leistner L., Gould G. 2002. *Hurdle tecnologies, combination tratmentes for food stability safety and quality*. Plenum Publishers. New York. Pp. 15.
- Magariños H. 2000. *Producción higiénica de la leche cruda*. Produccion y servicios incorporados A., C. Guatemala. Pp. 29,30.

- Marino Marilena, Maifreni Michela, Rondinini Gabriella. 2003. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 229, 133-140.
- Martínez Nieto M. G. 1999. Elaboración de queso crema tropical con leche pasteurizada. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Mayo B., Marzotto M., Flórez A. B., Sandra T. 2008. Chapter 1 Culture-independent microbial techniques in dairy microbiology: The state of the art. In: *Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications*. Ed. Research Signpost. Pp. 1-27.
- Montes M., García-Arenzana J. M. 2007. Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 3, 14-20.
- Mozzi Fernanda, Raya R. Raúl, Vignolo M. Graciela. 2010. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel Applications*. Blackwell, publishing. Pp 178
- Mugula, J.K., Narvhus J.A., Sørhaug T. 2003. Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of togwa, a Tanzanian fermented food. *International Journal of Food Microbiology*. 83,307- 318
- Muyzer G., Waal C. E., Uiterlinden G. A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59, 695-700.
- Neubauer H., Mollet B. 2001. *Biotechnological research and the dairy industry: A functional Interaction*. Kluwer Academic Publishers. Pp. 399-412.
- Norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Norma oficial mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- Norma oficial mexicana NOM-111-ssa1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Norma oficial mexicana NOM-112-SSA1-1994, bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. técnica del número más probable.

- Norma oficial mexicana NOM-114-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
- Norma oficial mexicana NOM-115-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos
- Norma oficial mexicana NOM-121-SSA1-1994, bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. especificaciones sanitarias
- Norma oficial mexicana NOM-143-SSA1-1995, bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. determinación de *Listeria monocytogenes*.
- Norma oficial mexicana NOM-243-SSA1-2010. Secretaria de salud. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Diario oficial de la federación.
- OECD-FAO. 2011. Se incrementará la producción mundial de quesos. Todoagro. Disponible en: <http://www.todoagro.com.ar/todoagro2/nota.asp?id=14649>. Fecha de acceso: 21 de Noviembre de 2011
- Olvera Montoya V. H. 1999. Elaboración de queso Asadero con leche Pasteurizada y acidificación mixta. Tesis de Licenciatura. Chapingo, México.
- Ortigosa M., Torre P., Izco J. M. 2001. Effect of pasteurization of ewe's milk and use of a native starter culture on the volatile components and sensory characteristics of Roncal cheese. *Journal of Dairy Science*. 84, 1320-1330.
- Pahissa Albert. 2009. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Ed. Marge. Barcelona, España. Pp 15.
- Pianpumepong P., Noomhorm A. 2010. Isolation of probiotic bacteria from turmeric (*Curcuma longa* Linn.) and its application in enriched beverages. *International Journal of Food Science and Technology*. 45, 2456-2462
- 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 y ciencia del Trópico Humedo. 25(2):159-171

- Rivas C. A., Chacón R. Z., Otoniel R. J., Guerrero C. B., López C. G. 2007. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso venezolano ahumado andino artesanal. Su uso como cultivo iniciador. Revista científica, FCV-LUZ. 3, 3001-3008.
- Rodríguez G. E., Cabrera S. L., Colina P.G. 2009. *Listeria monocytogenes* en queso amarillo madurado tipo Edam y su resistencia al pH y salinidad. NOVA-Publicación científica en ciencias biomédicas. 124, 71-79.
- Romero-Castillo, P.A; Leyva-Ruelas, G.; Cruz-Castillo, J.G.; Santos-Moreno, A. 2009. Evaluación de la calidad sanitaria de quesos Crema tropical mexicano de la región de Tonalá, Chiapas. Revista mexicana de ingeniería química. 8, 111-119.
- Rossi M. L., Paiva A., Tornese M., Chianelli S., Troncoso A. 2008. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. Revista Chilena de Infectología. 25, 328-335.
- Ryser E. T. 2004. Public Health concerns. In: Marth EH, Steele JL. Ed. Applied Dairy Microbiology Marcel Dekker. New York. Pp. 397
- Sybesma W., Hugenholtz J., M. de Vos W., Smid E. J. 2006. Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups, and industry. Journal of Biotechnology. 9, 425-466.
- Seppo S., Wright V. A., Ouwehand A. 1998. Lactic Acid Bacteria, microbiology and Functional Aspects. 2d Edition. Ed. Marcel Dekker. Inc. USA. Pp. 203-344.
- Smit G., Smit B. A., Engels W. J. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. FEMS Microbiology Reviews. 29, 591-610.
- Torres Llanez M. J. 2002. Diseño de un cultivo láctico para la biogeneración del queso fresco regional. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Alimentación y desarrollo A.C. Sonora, México.
- Torres-Llanez M.J., Vallejo-Cordoba B., Díaz-Cinco M.E., Mazorra-Manzano M.A., González-Córdova A.F. 2006. Characterization of the natural

- microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control*. 17, 683–690.
- Torkar K. G., Vengus A. 2008. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control*. 19 570–577.
- Varnam H. A., Sutherland P. J. 1994. *Milk and milk products*. Ed, Chapman and Hall,UK. Pp. 340,341.
- Ventura M., Canchaya C., Fitzgerald G., Gupta R. 2007. Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal*. 91, 351–372.
- Villani F., Casaburi A., Pennacchia C., Filosa L., Russo F., Ercolini D. 2007. Microbial ecology of the soppressata of vallo di Diano, a traditional dry fermented sausage from southern Italy, and in vitro and in situ selection of autochthonous starter cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 5453-5463.
- Villegas de Gante, A. 1993. *Los quesos Mexicanos*.1a edición. CIESTAAM. México. Pp. 60,163-170.
- Villegas de Gante, A. 2004. *Tecnología Quesera*. Primera Edición. Editorial Trillas. México D.F. Pp. 53-141.
- Waldner N. D., Stokes R. S., Jordan R. E., Looper L. M., 2011. *Cartel científico, Managing Milk Composition: Normal Sources of Variation*. Oklahoma, state Univesity. Disponible en:
<http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2028/ANSI-4016.pdf> Fecha de acceso: 1 de Noviembre de 2010.