



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**“DIVERSIDAD Y DINÁMICA DE LAS POBLACIONES
MICROBIANAS DURANTE LA MANUFACTURA Y
ALMACENAMIENTO DEL QUESO CHIHUAHUA”**

Por:

Ángel Martín Ortiz Estrada

TESIS APROBADA POR LA

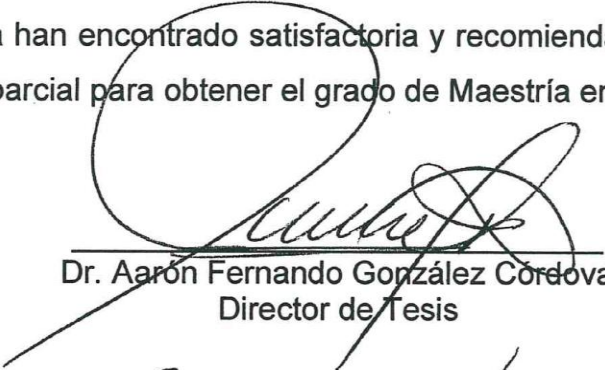
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

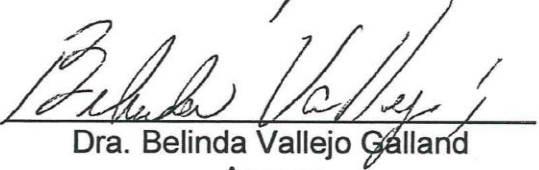
MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN


Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ángel Martin Ortiz Estrada, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.




Dr. Aaron Fernando González Córdoba
Director de Tesis



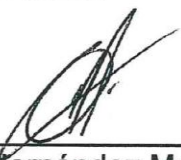
Dra. Belinda Vallejo Galland
Asesor



Dra. Evelia Acedo Félix
Asesor



Dra. Susana María Scheuren Acevedo
Asesor



Dr. Adrián Hernández Mendoza
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

Sin ánimos de divagar, agradezco infinitamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por apoyarme con una beca para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias y auspiciarme una estancia académica en la Università degli Studi di Torino (Universidad de Turín) en Turín, Italia.

Mi más sincero agradecimiento al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD) por abrirme las puertas del saber. A partir de hoy CIAD será mi ALMA MÁTER.

Agradezco a Dios por darme la fuerza necesaria para poder concluir esta etapa de mi vida.

Aprovecho la oportunidad para agradecer a mi director de tesis, el Dr. Aarón Fernando González Córdova por asesorarme durante el desarrollo de esta tesis. Eres ejemplo de vida para mí en muchos aspectos. Agradezco el tiempo dedicado a este trabajo, tu comprensión y por el apoyo recibido para la realización de una estancia académica en Turín, Italia. Sólo me resta agradecerte Aarón. MIL GRACIAS.

Agradezco enormemente a los miembros del comité que dirigieron esta tesis, Dra. Belinda Vallejo Cordoba, Dra. Evelia Acedo Félix, Dra. Susana María Scheuren y Dr. Adrián Hernández Mendoza por asesorarme y apoyarme durante la realización de este trabajo de investigación. Sin lugar a dudas, sin sus valiosas críticas y comentarios este trabajo no hubiese podido concluirse. MIL GRACIAS.

Mi más sincero agradecimiento a las Coordinaciones Regionales del CIAD Cd. Delicias y Cd. Cuauhtémoc, especialmente a los Doctores Esteban Sánchez, David Sepúlveda y Sandra Mónica Alvarado por el apoyo brindado en la realización de los muestreos a las distintas queserías que participaron en el presente estudio. Así mismo, agradezco al Dr. Alfonso Gardea Béjar por el apoyo recibido para y durante la realización de los muestreos en las queserías ubicadas en Cd. Cuauhtémoc. MUCHAS GRACIAS.

Agradezco enormemente a los Doctores Luca Simone Cocolin y Valentina Alessandria por recibirme en su laboratorio y apoyarme en mi entrenamiento en la técnica DGGE. El trabajar con personas tan profesionales y comprometidas como ustedes marcó y marcará el rumbo de mi vida personal y profesional. GRAZIE MILLE.

Agradezco a los productores de queso Chihuahua que proporcionaron las muestras utilizadas para la realización del presente estudio. Sin su valiosa ayuda y disposición este trabajo no hubiese podido realizarse. MIL GRACIAS.

Agradezco a todos los integrantes de la Coordinación de Programas Académicos, en especial a la Dra. Gloria Yepiz por ser siempre un ejemplo académico a seguir, sus comentarios y consejos fueron siempre un aliciente. MUCHAS GRACIAS.

Agradezco al M. en C. Ricardo Reyes por ser mi amigo incondicional. Tus consejos y ayuda nunca los olvidaré. Así mismo, por el apoyo en la revisión de este manuscrito. MUCHAS GRACIAS.

Agradezco a la M. en C. Carmen Estrada Montoya por haberme brindado apoyo técnico durante mi estadía en el laboratorio.

Agradezco a la Dra. María de Jesús Torres Llanez por su apoyo técnico durante la realización de mi trabajo experimental. MIL GRACIAS.

Agradezco al Sr. Gerardo Reyna por brindarme su amistad y proporcionarme material bibliográfico, el cual fue crucial para desarrollo y culminación de este trabajo. MUCHAS GRACIAS.

Aprovecho la oportunidad para agradecer a mis amigos Jesús Martín Moreno Hernández, Monserrat Félix y José Alfredo Quintana por brindarme su amistad en cada momento por fácil o difícil que este fuera, es un placer conocer a personas con calidad humana como ustedes. MUCHAS GRACIAS.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio por brindarme su amistad, por apoyarme y escucharme a lo largo de mi estadía en el laboratorio. MIL GRACIAS.

Agradezco infinitamente a mi familia. Ustedes son el motor que me ha ayuda sobreponerme a todos los obstáculos que se me han presentado en la vida. ESTE LOGRO ES DE USTEDES Y PARA USTEDES.

Por último, pero no menos importante, quiero hacer un agradecimiento especial a Ángeles de la Rosa por ser mi compañera durante todas las noches de desvelos, por alentarme a ser mejor ser humano, por nunca permitir que decayera mi ánimo, y por ser incondicional durante el desarrollo de este trabajo, sin lugar a dudas, este logro también es tuyo. MUCHÍSIMAS GRACIAS.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo al ser que me ha dado todo en la vida. Ese ser es incondicional, siempre me ha llevado de la mano en cada momento de mi vida y nunca ha permitido que mi ánimo decaiga. MUCHAS GRACIAS DIOS.

Dedico este trabajo a mi familia. Ustedes son el motor que motiva a seguir y que me permite sostenerme y realizar cada una de mis sueños. Este logro sin lugar a dudas también es de ustedes. LOS AMO FAMILIA.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) en Hermosillo, Sonora, México.

El trabajo de tesis formó parte de los objetivos del **macro-proyecto** de investigación intitulado: **Mejoramiento de la Productividad, Competitividad y Sustentabilidad de la Cadena Productiva de Leche de Bovinos en México** (SAGARPA-CONACYT-2010-144591), dentro del **sub-proyecto** 5.- Programa de Desarrollo en la Integración de Valor en los Eslabones de la Cadena Productiva: **Fortalecimiento de la Quesería Artesanal a través de Intervenciones Tecnológicas para Asegurar la Calidad, Inocuidad y Trazabilidad de los Quesos Mexicanos.**

Durante el desarrollo de esta tesis, el estudiante de maestría realizó una estancia de investigación, auspiciada por el Programa de Becas Mixtas convocatoria 2012-2013 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) en el Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari de la Università degli Studi di Torino (Universidad de Turín) en Turín, Italia; bajo la conducción de los Doctores Luca Simone Cocolin y Valentina Alessandria.

“Imagination is more important in making scientific breakthroughs than knowledge”

Albert Einstein

CONTENIDO

Página

LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE TABLAS	XV
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN.....	5
II. ANTECEDENTES.....	7
2.1 Quesos Mexicanos: Historia y Situación Actual	7
2.1.1 Queso Chihuahua: Características y Proceso de Manufactura	9
2.2 La Diversidad de la Microbiota de los Quesos	12
2.2.1 Factores que Influyen en la Diversidad Microbiana: Una Visión General de las Biopelículas Microbianas	12
2.2.2 Factores que Afectan la Supervivencia y Crecimiento Microbiano	14
2.2.3 Bacterias Ácido Lácticas Inicadoras y Cultivos Inicadores	15
2.2.4 Microbiota Secundaria	18
2.2.4.1 Bacterias ácido lácticas no iniciadoras.....	18
2.2.4.2 Bacterias ácido propiónicas.	20
2.2.4.3 Hongos.	21
2.2.4.4 Bacterias de la superficie de quesos maduros y levaduras.....	23
2.2.5 Bacterias Deteriorativas	25
2.2.6 Bacterias Patógenas.....	26
2.3 Ecología Microbiana de los Ecosistemas Alimentarios Complejos: Alimentos Fermentados.....	28

CONTENIDO (continuación)

	Página
2.3.1 Diversidad y Dinámica de las Poblaciones Microbianas en Productos Lácteos Fermentados	29
2.3.2 Técnicas Independientes de Cultivo: Un Enfoque a la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante y sus Aplicaciones.....	30
III. HIPÓTESIS	36
IV. OBJETIVOS	37
V. MATERIALES Y METODOS	38
5.1 Estrategia de Muestreo	38
5.1.1 Condiciones de Almacenamiento.....	39
5.2 Caracterización de la Diversidad Microbiana y Dinámica de Poblaciones por Técnica Microbiológicas Convencionales	39
5.2.1 Microorganismos Indicadores de Calidad.....	40
5.2.2 Microorganismos Patógenos	41
5.2.3 Bacterias Ácido Lácticas	42
5.3. Caracterización de la Diversidad y Dinámica de las Poblaciones Microbianas por Técnicas de Microbiología Molecular	43
5.3.1 Extracción de ADN.....	43
5.3.2 Amplificación por PCR.....	44
5.3.3 Análisis DGGE	45
5.3.4 Secuenciación de las Bandas Obtenidas por DGGE	46
5.4 Análisis Estadístico	47
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	48
6.1 Conteos Microbianos	48
6.1.1 Microorganismos Indicadores de Calidad.....	48
6.1.2 Microorganismos Patógenos	55
6.1.3 Bacterias Ácido Lácticas	60
6.2 Perfiles Microbianos DGGE.....	64

CONTENIDO (continuación)

Página

VII. CONCLUSIONES.....	75
VIII. RECOMENDACIONES	77
IX. BIBLIOGRAFÍA	79

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Imagen de un típico queso Chihuahua artesanal	10
Figura 2. Diagrama general del proceso de elaboración del queso Chihuahua	11
Figura 3. Perfil DGGE de bacterias presentes en muestras del proceso de manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua de la quesería A.	65
Figura 4. Perfil DGGE de bacterias presentes en muestras del proceso de manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua de la quesería B.	66
Figura 5. Perfil DGGE de bacterias presentes en muestras del proceso de manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua de la quesería C.	67
Figura 6. Perfil DGGE de bacterias presentes en muestras del proceso de manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua de la quesería D.	68
Figura 7. Perfil DGGE de bacterias presentes en muestras del proceso de manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua de la quesería E.	69
Figura 8. Perfil DGGE de bacterias presentes en muestras del proceso de manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua de la quesería F.	70

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Cultivos iniciadores usados en la elaboración de distintas variedades de queso.....	17
Tabla 2. Estudios de ecología microbiana realizados en diferentes productos lácteos mediante la técnica DGGE.....	33
Tabla 3. Conteos de microorganismos indicadores de calidad en muestras colectadas durante la manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua.	50
Tabla 4. Conteos de Staphylococcus y detección de toxina estafilocócica en muestras colectadas durante la manufactura y almacenamiento de queso Chihuahua	56
Tabla 5. Conteos de bacterias ácido lácticas en muestras colectadas durante la manufactura y almacenamiento de queso Chihuahua.....	61
Tabla 6. Identidad de las bandas de los geles DGGE de las muestras obtenidas durante la manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua.	71

RESUMEN

El queso Chihuahua (QC), es un queso mexicano elaborado principalmente en el estado de Chihuahua. A pesar de que algunos estudios han logrado identificar parte de la composición de su microbiota, la totalidad de la misma se desconoce debido a que algunas especies no son cultivables. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la diversidad y dinámica de las poblaciones microbianas durante la manufactura y almacenamiento del QC mediante la técnica independiente de cultivo electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, por sus siglas en inglés). Muestras de leche cruda (LC), leche pasteurizada (LP), suero (S), cuajada (C) y queso con 0 días de almacenamiento (Q0) fueron colectadas en dos muestreos realizados en 5 queserías (2 artesanales y 3 semitecnificadas), ubicadas en Cd. Delicias y Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua. Muestras de Q0 fueron almacenadas experimentalmente en condiciones controladas a 4 °C durante 15 (Q15) y 30 (Q30) días. A las muestras de LC y queso se les realizaron análisis microbiológicos (microorganismos indicadores de calidad, patógenos, bacterias ácido lácticas, y toxina estafilocócica). Por otra parte, el ADN microbiano de todas las muestras fue extraído y amplificado por PCR usando cebadores universales para bacterias, los amplicones obtenidos fueron analizados mediante la técnica DGGE. Las bandas de distintas poblaciones fueron seleccionadas, re-amplificadas y secuenciadas. Los resultados de los conteos microbianos indicaron que las muestras analizadas presentaron conteos superiores a los permitidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Además, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los conteos debido al nivel tecnológico de las queserías, por el tiempo de

almacenamiento e intraquesería entre los muestreos realizados; evidenciando la falta de estandarización en los procesos de manufactura. Respecto a los análisis DGGE, los perfiles microbianos obtenidos permitieron identificar un consorcio microbiano conformado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* en cada una de las etapas del proceso de manufactura y almacenamiento del QC. Estos resultados sugieren que estos microorganismos son la microbiota predominante durante el proceso de manufactura y almacenamiento del de QC, y la cual probablemente está relacionada con impartir las características organolépticas o sensoriales típicas que identifican al QC.

Palabras clave: Queso Chihuahua, dinámica poblacional, diversidad microbiana, microbiota, DGGE

ABSTRACT

Chihuahua cheese (QC), is a Mexican cheese mainly manufactured in the Chihuahua State. Despite some studies have revealed part of its microbial population; the entire microbiota is still unknown because some species are non-cultivable. Hence, the aim of this study was to characterize the diversity and microbial population dynamics during manufacture and storage of QC by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) independent culture technique. Samples of raw milk (LC), pasteurized milk (LP) whey (S) curd (C) and cheese to 0 days (Q0) of storage were collected at two different times on 5 cheese factories (2 artisanal and 3 semitechnified) located in Ciudad Delicias and Cuauhtémoc, Chihuahua. The Q0 samples were stored under controlled conditions at 4 °C for 15 (Q15) and 30 (Q30) days. At raw milk and cheese samples were performed microbiological analysis (indicator microorganisms, pathogens, lactic acid bacteria, and staphylococcal toxin). Moreover, microbial DNA of all samples was extracted and amplified by PCR using universal primers for bacteria, the amplicons obtained were analyzed by DGGE technique. Bands of different populations were selected, re-amplified and sequenced. The results indicated that microbial counts of samples analyzed were counts above to the limits allowed by the Official Mexican Standard NOM-243-SSA1-2010. Besides, we found significant differences ($p < 0.05$) in microbial counts between samples most like due to the technological level of cheese dairies and storage time; these results evidenced lack of standardization in manufacturing processes. On the other hand, DGGE analysis allowed the identification of a microbial consortium conformed by *Streptococcus thermophilus* *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* in each step of manufacturing process and QC storage. These results suggest that these

microorganisms may be the predominant microbiota during manufacturing process and storage of QC and probably are related to the development of organoleptic and sensory characteristics that identify to QC.

Key words: Chihuahua cheese, population dynamics, microbial diversity, microbiota, DGGE

I. INTRODUCCIÓN

El queso Chihuahua (QC) es uno de los quesos mexicanos más populares a nivel nacional. Actualmente presenta altos volúmenes de producción, posicionándolo como uno de los más consumidos en México (Cervantes-Escoto *et al.*, 2008; SIAP, 2013). Algunas investigaciones realizadas al QC han logrado identificar una microbiota muy diversa de bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales han sido asociadas con sus características típicas de sabor, aroma y textura (Bricker *et al.*, 2005; Renye *et al.*, 2011). Sin embargo, aún se desconoce qué tipo de poblaciones microbianas están presentes en cada etapa de su elaboración y qué cambios ocurren en estas poblaciones a lo largo de la manufactura y almacenamiento.

Durante las últimas dos décadas se ha logrado estudiar y comprender mejor la ecología microbiana de diversos ecosistemas alimentarios mediante el uso de técnicas de biología molecular, las cuales han constituido una herramienta poderosa en el estudio de la diversidad y dinámica de poblaciones microbianas en diversas matrices alimentarias (Giraffa y Carminati, 2008). Lo anterior ha permitido el avance del conocimiento sobre los cambios en las diferentes poblaciones de microorganismos durante la elaboración de alimentos fermentados, sobre todo durante la manufactura y maduración de algunos quesos.

En este trabajo se reporta la caracterización de la diversidad y dinámica de las poblaciones microbianas durante la manufactura y almacenamiento del

QC, mediante el uso de técnicas de microbiología convencional complementadas con la técnica independiente de cultivo electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, por sus siglas en inglés), la cual permitió conocer los perfiles microbianos de las bacterias asociadas a este alimento. La información obtenida en el presente estudio permitió caracterizar e identificar las poblaciones microbianas que componen la microbiota del QC así como caracterizar la dinámica de poblaciones durante las diferentes etapas de su la manufactura y almacenamiento.

II. ANTECEDENTES

2.1 Quesos Mexicanos: Historia y Situación Actual

Actualmente, la industria del queso es una de las más importantes en México. De acuerdo a cifras oficiales, en 2012 cerca del 27 % del total de la leche que se produjo en el país fue utilizada por esta industria, y generó divisas cercanas a los 13 mil millones de pesos (SIAP, 2013). Sin embargo, se estima que una cifra similar de leche es usada por pequeñas queserías artesanales. De hecho, la importancia de la quesería artesanal es tal, que cerca del 70 % de los quesos que se consumen en México son producidos en este tipo de queserías (Cervantes-Escoto *et al.*, 2008); de los cuales, los quesos frescos son los más populares (Jiménez-Guzmán *et al.*, 2009; Torres-Vitela *et al.*, 2012). Además de los quesos frescos, en México existen algunas variedades que pueden ser semimadurados o madurados (Pomeon, 2007; Van Hekken *et al.*, 2007). Generalmente, los quesos mexicanos son producidos a partir de leche de vaca; sin embargo se ha reportado que algunas variedades como el Panela pueden elaborarse además con leche de cabra, oveja o sus mezclas (Rodríguez-Nogales y Vázquez, 2007).

Aunque la elaboración de queso es una actividad cotidiana en México, este alimento no es oriundo del continente Americano; fue durante la colonización de la Nueva España que se trajeron los primeros rebaños de cabras, ovejas y ganado criollo. Con la leche de estos animales se elaboraban distintos quesos, los cuales fueron modificados con ingredientes locales por la población nativa y

posteriormente adaptados a su gastronomía (Cervantes-Escoto *et al.*, 2008; Yescas, 2012). Como producto de esta mezcla gastronómica, se obtuvieron nuevas variedades de quesos, algunos de las cuales existen a la fecha y constituyen la quesería tradicional mexicana.

En México, se reconoce la existencia de al menos de 40 variedades de quesos tradicionales. De estos, los más importantes, por sus volúmenes de producción a nivel artesanal, semitecnificado o tecnificado son: el Fresco, Panela, Oaxaca y Chihuahua (Cervantes-Escoto *et al.*, 2008; Villegas de Gante y Cervantes-Escoto, 2011; SIAP, 2013). El resto, son elaborados en ciertas regiones del país, lo cual los ha posicionado como productos de consumo de carácter local. Esto ha provocado que la mayoría de los quesos mexicanos no sean conocidos por gran parte de la población en México, y por lo tanto sean poco valorados (Cervantes-Escoto *et al.*, 2008). Aunado a esto, durante algunos años, los quesos “estilo mexicano” han sido catalogados como productos de alto riesgo en Estados Unidos de América (USA, por sus siglas en inglés), debido a que se les ha asociado con algunos brotes de enfermedades por la presencia de microorganismos patógenos (MacDonald *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2011).

Por otro lado, en los pocos quesos mexicanos que han sido estudiados solo se ha logrado caracterizar parte de la composición fisicoquímica, procesos de manufactura, calidad microbiológica y atributos sensoriales (Pomeon, 2007; Cervantes-Escoto *et al.*, 2008; Tunick *et al.*, 2008; De Oca-Flores *et al.*, 2009; Hernández-Morales *et al.*, 2010). Sin embargo, poco se conoce acerca de la composición y diversidad de la microbiota de estos quesos, lo cual ha derivado en la falta de conocimiento sobre el tipo de poblaciones inherentes a los quesos mexicanos y el rol que desempeñan estas poblaciones microbianas (principalmente BAL) sobre las características de sabor, olor y textura típicas de este tipo de quesos (Torres-Llanez *et al.*, 2006; Van Hekken *et al.*, 2006;

Moreno-Enriquez *et al.*, 2007; Flores-Magallón *et al.*, 2011; Renye *et al.*, 2011; Torres-Vitela *et al.*, 2012; Villanueva-Carvajal *et al.*, 2012). La ausencia de estos estudios aunado a la falta de estandarización en los procesos de manufactura artesanales y la falta de organización de los queseros, ha colocado a los quesos mexicanos tradicionales en una posición desfavorable frente a quesos elaborados a escala tecnificada, ocasionando que algunas variedades de quesos artesanales mexicanos estén en riesgo de desaparecer (Cervantes-Escoto *et al.*, 2008; Villegas de Gante y Escoto, 2011).

2.1.1 Queso Chihuahua: Características y Proceso de Manufactura

El QC (Figura 1), es un queso tradicional que es elaborado principalmente en el estado de Chihuahua, México. Se caracteriza por ser un queso semiduro, prensado, mínimamente madurado (3-6 semanas), con notas de sabor amargo, agrio y salado, y con capacidad para fundirse (Van Hekken *et al.*, 2006; Cervantes-Escoto *et al.*, 2008). El origen de este queso está ligado a las comunidades Menonitas que se asentaron en el norte de México en la década de 1920 (Cervantes-Escoto *et al.*, 2008). Sin embargo, a la fecha, el QC se elabora en regiones donde no hay asentamientos Menonitas, lo cual ha derivado en la existencia de diversas variedades de QC, cada una con características propias pero compartiendo su tipicidad.

El QC es uno de los pocos quesos en México que cuenta con una norma de referencia que tiene por objeto implementar directrices para lograr la estandarización de su producción (COFOCALEC, 2010). Sin embargo, a pesar de que la normativa mexicana (SSA, 2010) establece que toda leche destinada para su elaboración debe ser sometida a un proceso de pasteurización, actualmente se sigue elaborando a partir de leche cruda (LC) en queserías artesanales, debido a que es más suave en textura e intenso en sabor respecto al QC elaborado con leche pasteurizada (LP) (Van Hekken *et al.*, 2006).



Figura 1. Imagen de un típico queso Chihuahua artesanal

El QC es una versión del queso Cheddar; incluso el proceso de elaboración (Figura 2) es similar en ambos (Van Hekken *et al.*, 2007). El QC surgió a partir de la elaboración del Cheddar por las comunidades Menonitas, las cuales al intentar producirlo en México, debido a las condiciones del entorno geográfico, dio como el resultado el QC. La etapa más crítica en la manufactura del QC es la cheddarización, proceso donde se lleva a cabo la acidificación de la pasta, la cual debe encontrarse específicamente entre 32-38 grados Dornic (°D), hecho que es crucial en el desarrollo de las características deseables de este queso.

Durante algunos años, se han realizado diversos estudios al QC con el fin de conocer sus características fisicoquímicas y reológicas, perfil sensorial, textura, inocuidad e identificación de los microorganismos predominantes en este queso, incluso se ha explorado el potencial antimicrobiano, producción aroma y capacidad proteolítica para generar péptidos bioactivos por BAL aisladas del QC (Bricker *et al.*, 2005; Van Hekken *et al.*, 2006; Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008; Tunick *et al.*, 2008; Renye *et al.*, 2009; Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2010; Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2010; Renye *et al.*, 2011; Paul *et al.*, 2012).

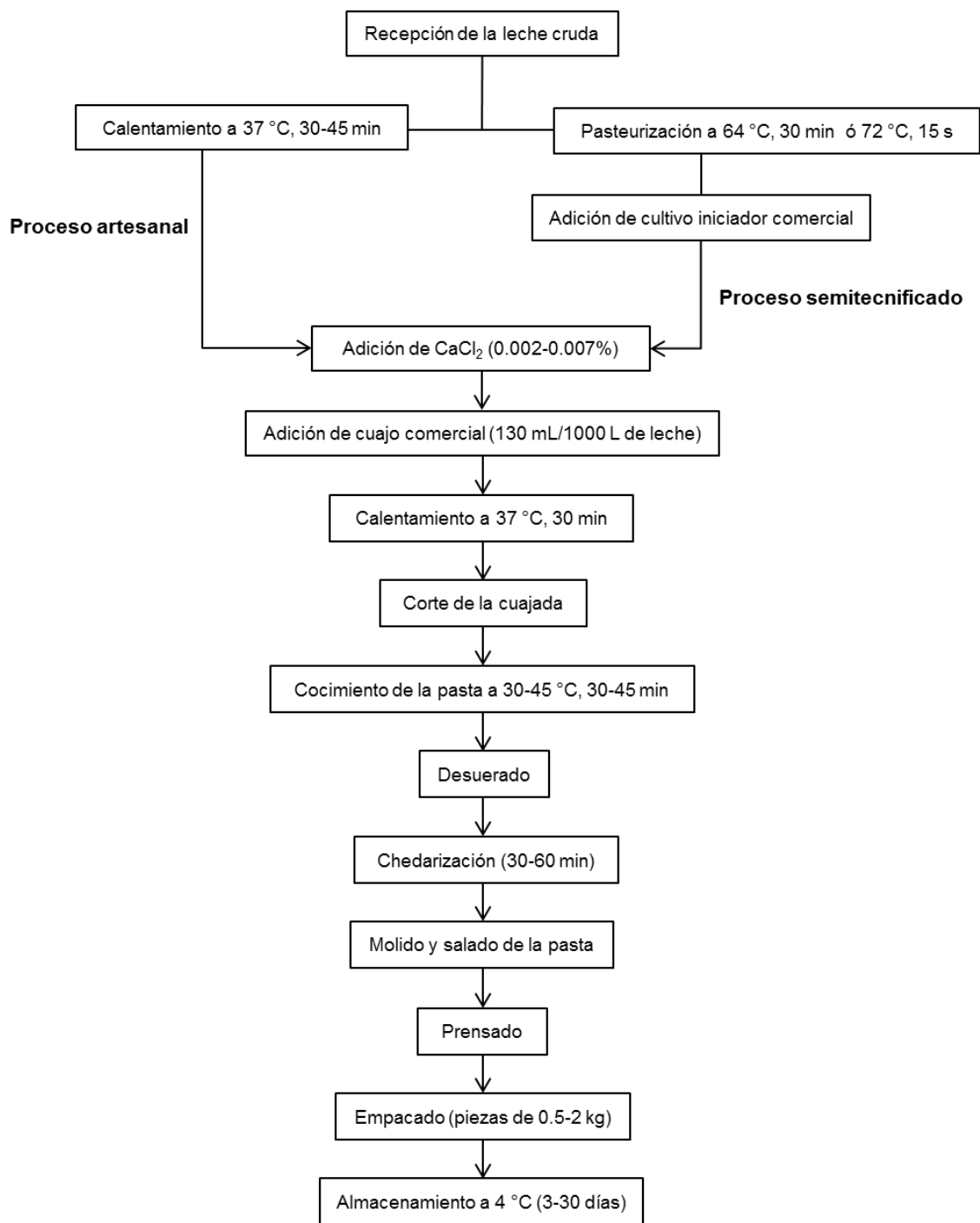


Figura 2. Diagrama general del proceso de elaboración del queso Chihuahua

Sin embargo, a pesar de estos estudios, a la fecha, se desconoce la totalidad de la microbiota del QC, debido a que sólo se ha logrado identificar aquellos microorganismos que pueden crecer en medios de cultivo sintéticos, lo cual ha limitado el conocimiento del papel que tienen estos microorganismos en las características típicas de este queso.

2.2 La Diversidad de la Microbiota de los Quesos

La microbiota asociada a los quesos durante su manufactura y maduración es extremadamente diversa. Sin embargo, ha sido dividida en dos grandes grupos: bacterias ácido lácticas iniciadoras (SLAB, por sus siglas en inglés) y microbiota secundaria. Las SLAB están involucradas en la producción de ácido láctico durante la manufactura, mientras que microbiota secundaria, aunque no contribuye a la producción de ácido, generalmente tiene un rol significativo junto con las SLAB durante el proceso de maduración (Beresford *et al.*, 2001; Beresford y Williams, 2004). Por otro lado, aunque las bacterias deteriorativas y patógenas no forman parte de las SLAB y de la microbiota secundaria, su presencia es casi inevitable en el queso. Por lo tanto, es prudente mencionar que aunque su presencia no es deseable, forman parte de la diversidad microbiana del queso.

2.2.1 Factores que Influyen en la Diversidad Microbiana: Una Visión General de las Biopelículas Microbianas

La leche en la ubre de animales sanos es esencialmente estéril, pero durante su recolección, almacenamiento, transporte y procesamiento para la elaboración de queso u otros productos lácteos, es susceptible de contaminarse con microorganismos que pueden afectar su calidad (Flint *et al.*, 1997; Beresford y Williams, 2004). La entrada de los microorganismos a los quesos,

ya sea de forma deliberada como parte de los cultivos iniciadores (CIs) o asociada naturalmente a los ingredientes usados en la manufactura (leche, cuajo y sal principalmente) constituyen la principal fuente de incorporación de microorganismos a estos alimentos (Beresford y Williams, 2004). Sin embargo, la microbiota asociada a los equipos usados en la manufactura y el ambiente de procesamiento, también influyen en la diversidad microbiológica del queso.

Sesenta años han transcurrido desde que se reportó por primera vez la presencia de biopelículas microbianas en superficies sólidas (Zobell, 1943). A la fecha, existe evidencia de biopelículas en los aparatos de ordeño, tanques de almacenamiento, tuberías, pasteurizadores, y en general en casi todos los instrumentos y aparatos utilizados en la manufactura de productos lácteos contribuyendo de manera significativa en la microbiota de estos productos (Sharma y Anand, 2002b; Teixeira *et al.*, 2005).

Las biopelículas en ambientes lácteos son un ecosistema microbiano organizado para resistir ambientes hostiles; están conformados por uno o varios tipos de microorganismos, que se caracterizan por la excreción de una matriz protectora de sustancias poliméricas extracelulares, que se adhieren a superficies sólidas en presencia de agua, restos de leche y fosfato de calcio (Flint *et al.*, 1997; Sauer *et al.*, 2007; Simões *et al.*, 2010).

Las biopelículas son difíciles de erradicar, ya que pueden resistir a los desinfectantes que son utilizados en la limpieza y desinfección de los equipos (Simões *et al.*, 2006). Hoy en día, constituyen un grave problema para la industria láctea, debido a que biopelículas de bacterias deteriorativas y patógenas han sido encontrados en los equipos usados en la manufactura de productos lácteos, los cuales al entrar en contacto con estos alimentos, ocasionan una carga excesiva de microorganismos, lo cual promueve su deterioro o puede ocasionar brotes de enfermedades de origen alimentario, que

ha ocasionado graves pérdidas económicas para esta industria (Flint *et al.*, 1997; Lindsay *et al.*, 2002; Sharma y Anand, 2002a; Sharma y Anand, 2002b; Latorre *et al.*, 2010; Pagedar *et al.*, 2012; Teh *et al.*, 2014).

Sin embargo, en algunos casos la presencia de biopelículas microbianas (principalmente de BAL) en los instrumentos utilizados en la elaboración de quesos artesanales promueve el desarrollo de algunas características deseables en este tipo de quesos; incluso está demostrado que algunas biopelículas pueden ayudar a inhibir el crecimiento de patógenos y proporcionar un efecto protector (Mariani *et al.*, 2007; Guillier *et al.*, 2008; Lortal *et al.*, 2009; Mariani *et al.*, 2011; Didienne *et al.*, 2012; Settanni *et al.*, 2012).

2.2.2 Factores que Afectan la Supervivencia y Crecimiento Microbiano

El proceso de fabricación juega un papel importante en la definición de las características finales de los quesos. Este entorno es altamente selectivo y ejerce un impacto importante en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos durante el procesamiento y maduración de este alimento. La fabricación de la mayoría de las variedades de queso consiste en la coagulación de la leche a temperaturas de 30-37 °C, y una posterior cocción de la pasta a 37-54 °C. La temperatura de coagulación facilita el crecimiento de la mayoría de microorganismos; sin embargo, la temperatura alcanzada durante la cocción tiene el potencial de inhibir el crecimiento de algunos microorganismos (Beresford y Williams, 2004). Además del proceso de manufactura, factores tales como el contenido y actividad de agua, concentración de sal, pH y potencial redox influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos en los quesos (Beresford *et al.*, 2001).

2.2.3 Bacterias Ácido Lácticas Iniciadoras y Cultivos Iniciadores

La función primaria de las SLAB es producir ácido láctico durante el proceso de fermentación de la leche para la producción subsecuente de queso. Así mismo, también contribuyen a la maduración, ya que enzimas producidas por esta microbiota están implicadas en la proteólisis y la conversión de aminoácidos en compuestos de sabor en el queso. Las SLAB pueden ser definidas como microorganismos capaces de producir suficiente ácido para reducir a por lo menos 5.3 el pH de la leche en 6 horas a 30-37 °C, dependiendo de la variedad de queso. En este sentido, *Lactococcus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus helveticus* son considerados como SLAB, las cuales pueden ser añadidas deliberadamente como CIs durante la manufactura o bien pueden ser contaminantes naturales de la leche, como en el caso de muchos quesos artesanales elaborados con LC (Beresford *et al.*, 2001; Beresford y Williams, 2004).

Los CIs son preparaciones microbianas de un gran número de células de al menos un tipo de microorganismo, que se añaden intencionalmente a materias primas para la fabricación de diversos alimentos fermentados (Leroy y De Vuyst, 2004; Saithong *et al.*, 2010; Suroño y Hosono, 2011; Di Cagno *et al.*, 2013; Ciuciu Simion *et al.*, 2014). En la manufactura de quesos, la adición de CIs es esencial para la producción de ácido láctico a una velocidad predecible y controlada. El lograr un control sobre la producción de ácido es clave en la fabricación, ya que permite controlar el pH, humedad y contenido de lactosa de la cuajada. Estos factores, a su vez tienen una gran influencia en los cambios bioquímicos durante la maduración, ayudando de manera significativa al desarrollo de sabores típicos de cada variedad de queso (Parente y Cogan, 2004; Powell *et al.*, 2011).

Los cultivos usados en la elaboración de queso pueden ser cepas definidas o indefinidas de microorganismos (ver Tabla 1), los cuales están compuestos predominantemente por BAL, aunque algunas otras bacterias y levaduras pueden también estar implicadas (Carminati *et al.*, 2010; Powell *et al.*, 2011). Generalmente, los CIs usados para producir queso a escala industrial son mezclas de cepas microbianas definidas (Kongo, 2013). En cambio, en la elaboración de quesos artesanales, se utilizan cultivos naturales (cultivos artesanales) obtenidos a partir de la fermentación bajo, condiciones controladas, de una pequeña porción de leche o suero del proceso de elaboración de un día anterior, técnica conocida como “backslopping”. Los cultivos backslopping, aunque por lo general se desconoce su composición microbiana, a la fecha son ampliamente utilizados en la elaboración de distintos quesos, debido a que proporcionan sabores más intensos (Parente y Cogan, 2004; Kongo, 2013).

Recientes estudios de caracterización han logrado identificar cepas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus. helveticus*, *Lactobacillus.delbrueckii* subsp. *bulgaricus/lactis* y *Lactobacillus. fermentum* como principales componentes de algunos sueros iniciadores usados en la elaboración de quesos Italianos (de Candia *et al.*, 2007; Rossetti *et al.*, 2008; Settanni *et al.*, 2012). Sin embargo, la composición microbiana de estos sueros puede variar según la estación del año y región geográfica. Otros tipos de cultivo utilizado en la manufactura de quesos tipos suizos e italianos, son los cultivos mixtos. Estos cultivos surgieron de una cuidadosa selección y propagación controlada de los cultivos artesanales, y aunque en los cultivos mixtos se desconoce su composición microbiana, la estabilidad de dicha composición es más homogénea que en los cultivos obtenidos por backslopping (Parente y Cogan, 2004). Debido a la gran diversidad de microorganismos que pueden ser usados como CIs, la caracterización de su funcionalidad en la producción de alimentos fermentados es motivo de una exhaustiva investigación.

Tabla 1. Cultivos iniciadores usados en la elaboración de distintas variedades de queso

Nombre del queso	Tipo de cultivo iniciador	Microorganismos que conforman el cultivo iniciador ^a	Función del cultivo iniciador ^b	Referencia
Gruyère	Definido	ST, LDB, PS	PAL, PG, P	Parente y Cogan (2004)
Caciocavallo Silano DOP ^c	Artesanal	LD, LH, ST	PAL	Ercolini <i>et al.</i> (2008)
Grana Padano	Artesanal	LDB, LH, ST	PAL	Rossetti <i>et al.</i> (2008)
Roqueforti	Definido	LMC, LL, PR	PAL, PC, P	Parente y Cogan (2004)
Emmental	Cultivo mixto	ST, LH, PS, PF, LDB	PAL, PC, P	Parente y Cogan (2004); Falentin <i>et al.</i> (2012)

^a*Propionibacterium shermanii* (PS); *Propionibacterium freudenreichii* (PF); *Lactobacillus delbrueckii* (LD); *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LDB); *Lactobacillus helveticus* (LH); *Lactobacillus fermentum* (LF); *Streptococcus thermophilus* (ST); *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (LMC); *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y/o *cremoris* (LL); *Penicillium roqueforti* (PR)

^b Producción de ácido láctico (PAL); producción de ácido propiónico y gas (PG); producción de CO₂ (PC); proteólisis (P)

^c DOP (Denominación de Origen Protegida)

2.2.4 Microbiota Secundaria

La microbiota secundaria son microorganismos que no forman parte de las SLAB, por lo tanto no están involucrados en la producción de ácido. Sin embargo, su presencia y desarrollo en el queso se debe a que estos microorganismos están presentes en la materia prima, utensilios y ambiente de procesamiento. Además, algunos microorganismos como levaduras tales como *Geotrichum candidum* y *Debaryomyces hansenii*, hongos como *Penicillium camemberti* y *Penicillium roqueforti* así como otras bacterias tales como *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium* y *Lactobacillus* heterofermentativos forman parte de la microbiota secundaria. Por otro lado, la microbiota secundaria puede estar presente en el queso como cultivos secundarios o adjuntos incorporados en forma intencional (Beresford *et al.*, 2001; Chamba y Irlinger, 2004).

La microbiota secundaria puede ser dividida en grupos primarios que incluyen: (i) bacterias ácido lácticas no iniciadoras, conformadas por *Lactobacillus* no iniciadores, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*, (ii) bacterias ácido propiónicas, (iii) hongos y (iv) otras bacterias y levaduras, que crecen en la superficie de quesos madurados (Beresford y Williams, 2004).

2.2.4.1 Bacterias ácido lácticas no iniciadoras. El grupo más importante de microorganismos que constituyen a la microbiota secundaria son las bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB, por sus siglas en inglés). Las NSLAB se desarrollan espontáneamente en los quesos debido a que se encuentran presentes en la leche y en el ambiente de procesamiento de las queserías (Fox *et al.*, 1998). Las NSLAB son altamente especializadas en resistir y sobrevivir en nichos ecológicos hostiles específicos, que se caracterizan por la presencia de sal, baja humedad, valores bajos de pH (4.9 a 5.3), bajas temperaturas y deficientes de nutrientes (Settanni y Moschetti, 2010).

Por lo general, las NSLAB se encuentran en bajas concentraciones durante la manufactura de los quesos, y posteriormente se convierten en la microbiota dominante durante la etapa de maduración; lo cual implica una fuerte influencia en los cambios bioquímicos de la maduración de la cuajada (lipólisis, proteólisis y degradación de lactosa residual), y que contribuye en gran medida al desarrollo de la textura y formación de compuestos relacionados con el olor y sabor típico de cada variedad de queso (Casey *et al.*, 2006; Franciosi *et al.*, 2008; Settanni y Moschetti, 2010). La presencia de las NSLAB en el queso es prácticamente incontrolable. A la fecha, en todos los quesos que han sido analizados (ya sea artesanales o elaborados con procesos tecnificados), se ha encontrado al menos uno de los cuatro grupos que conforman la microbiota NSLAB (Casey *et al.*, 2006).

El rol de las NSLAB en los quesos es motivo de controversia (Burns *et al.*, 2012). Algunos autores consideran que son responsables de hasta el 80 % de los defectos encontrados en los quesos, principalmente asociados con la post-acidificación, formación de sabores indeseables, hendiduras, gas (en aquellas variedades de queso donde no es deseable) y cristales de calcio (Thomas y Crow, 1983; Laleye *et al.*, 1987; Somers *et al.*, 2001). Sin embargo también se sabe que ciertas cepas seleccionadas de NSLAB agregadas como cultivos adjuntos, ayudan de manera significativa en la formación de sabores agradables y la extensión de la vida útil del queso, debido a la producción de compuestos antimicrobianos, competencia y antagonismo contra microorganismos indeseables y patógenos (Crow *et al.*, 2001; Di Cagno *et al.*, 2011; Settanni *et al.*, 2011). Esta controversia ha despertado el interés de algunos grupos de investigación, lo cual ha derivado en la búsqueda incesante de cepas de NSLAB con buenas propiedades tecnológicas que puedan ser aplicadas como parte de los cultivos iniciadores o adjuntos en la manufactura de diversas variedades de quesos (Van Hoorde *et al.*, 2010; Pedersen *et al.*, 2013; Lynch *et al.*, 2014).

2.2.4.2 Bacterias ácido propiónicas. Las bacterias ácido propiónicas (BAP) son un grupo filogenético de bacterias Gram positivas, de morfología de bastones pleomorfos (aunque también pueden encontrarse en forma cocoide, bífida o ramificada), no motiles, no productoras de esporas, a menudo catalasa positiva, aerobias o aerobiotolerantes, neutrófilas, que viven y crecen lentamente a un pH de 5.0 a 5.2 (el pH de los quesos suizos) (Gautier, 1999; Hutkins, 2007).

Actualmente, se conocen 12 especies del género *Propionibacterium* (Euzéby, 2013), las cuales, se dividen en dos grupos: BAP cutáneas y BAP clásicas o lácticas. Las BAP lácticas comprenden cuatro especies: *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii*, *P. acidipropionici*, las cuales son de importancia industrial en la producción de quesos, ensilados, vitamina B12, ácido propiónico, y recientemente como probióticos y como cultivos biopreservantes en alimentos (Merry y Davies, 1999; Meile *et al.*, 2008; Cousin *et al.*, 2011; Thierry *et al.*, 2011).

P. freudenreichii es el microorganismo más utilizado como cultivo adjunto en la elaboración de quesos estilo suizo tales como Emmental, Gruyère, Appenzeller y Raclettes, debido a que durante la maduración de este tipo de quesos, este microorganismo convierte el lactato producido por las SLAB, produciendo una gran cantidad de CO₂, el cual migra hacia el exterior, ocasionando los ojos característicos de los quesos tipo suizos. Sin embargo, durante la fermentación del lactato, *P. freudenreichii* también produce ácido propiónico, ácido acético y otra serie de compuestos que brindan el sabor a nuez dulce, típico de los quesos suizos (Fröhlich-Wyder y Bachmann, 2004; Hojo *et al.*, 2007). Sin embargo, no todos los quesos que contienen BAP desarrollan los ojos típicos por ejemplo en los quesos Bergkäse y Reclatte, se encontraron valores de hasta 3000 mg kg⁻¹ de propionato (Eliskases-Lechner *et al.*, 1999) y conteos de BAP de hasta 1.5 x10⁸ UFC/g (Thierry *et al.*, 2005) respectivamente, en ambos

casos se encontró un incremento de los compuestos de sabor típicos de los quesos suizos, pero sin desarrollar ojos, que en ambos casos es indeseable.

Aunque, se han realizado una diversidad de estudios a la mayoría de las BAP, existen algunas interrogantes aún por resolver. La secuencia del genoma recientemente disponible de *P. freudenreichii* le ha permitido entrar a la era post-genómica y esto favorecerá su uso en diversos ámbitos hasta ahora inexplorados. Lo anterior, ayudará a elucidar los mecanismos moleculares implicados en las vías claves para su adaptación en diversos nichos, efecto probiótico, su rol en la maduración y bioconservación del queso, hasta ahora parcialmente conocidos (Thierry *et al.*, 2011).

2.2.4.3 Hongos. En la mayoría de los quesos, la presencia de hongos es considerado indeseable, debido a que algunas especies producen cantidades excesivas de enzimas (lipasas, proteasas, carbohidrasas) que contribuyen al deterioro de las propiedades sensoriales de los quesos. Sin embargo, el principal riesgo ocasionado por la presencia de hongos en los alimentos es debido a que estos microorganismos son capaces de producir micotoxinas, las cuales son metabolitos secundarios que a menudo pueden llegar a representar un riesgo considerable para la salud de los seres humanos y animales, incluso la ingesta de pequeñas cantidades de este metabolito puede llegar a ser letal (Filtenborg *et al.*, 1996; Edite Bezerra da Rocha *et al.*, 2014). Diversos estudios han demostrado que *Penicillium*, *Aspergillus* y *Mucor* son las principales especies de hongos relacionados con alterar las características finales de los quesos (Hayaloglu y Kirbag, 2007; Chebeňová-Turcovská *et al.*, 2011; Panelli *et al.*, 2012). A menudo, el aire en los ambientes de procesamiento de las queserías representa el principal foco de contaminación por esta microbiota en los quesos (Kure *et al.*, 2004).

Al contrario a lo antes mencionado, algunos hongos son imprescindibles en la elaboración de distintas variedades de quesos, debido a que son esenciales para alcanzar las características deseables de algunos quesos madurados (Beresford *et al.*, 2001; Cantor *et al.*, 2004; Spinnler y Gripon, 2004). En general, los quesos madurados con hongos (QMH) están divididos en dos grupos: 1) aquellos que son madurados debido a la presencia de *Penicillium roqueforti*, el cual crece y forma venas azules dentro de quesos tales como el Roquefort, Gorgonzola, Stilton y Danablu y 2) aquellos que son madurados con *Penicillium camemberti*, los cuales crecen y desarrollan en la superficie de quesos como el Camembert y Brie (Beresford *et al.*, 2001).

Los hongos pueden también estar presentes en la superficie de otras variedades de quesos como el St. Nectaire y Tome de Savoie, los cuales están cubiertos por una microbiota constituida por *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Epicoccum* y *Sporotrichum*, mientras que *Penicillium* y *Mucor* han sido reportados en la superficie del queso Taleggio y *Geotrichum* en la del Robiola di Roccaverano. Sin embargo, su impacto durante la maduración de estos quesos es poco conocido (Beresford *et al.*, 2001).

El queso Gorgonzola fue el primer queso elaborado con alguna especie de hongo reportado en la literatura en el año 879, seguido del Roquefort, reportado en el año 1070. En ambos casos, *Penicillium roqueforti* juega un rol central en el desarrollo de las características finales de estos quesos, debido a que se adapta, sobrevive e interactúa con la biota láctica y levaduras presentes en el núcleo del queso, un ambiente pobre en O₂. Este hongo, produce una serie de compuestos de aroma y sabor en el queso, derivados de la degradación de los lípidos principalmente así como compuestos volátiles, péptidos y aminoácidos como resultado de la proteólisis de los péptidos de la caseína residual, que imparten olores agradables, sabores dulces o amargos característicos de los quesos azules (Beresford *et al.*, 2001; Cantor *et al.*, 2004).

Por otro lado, en los quesos donde se utiliza *Penicillium camemberti* durante la maduración, al igual que *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti* es crucial en las características finales de los quesos madurados con este hongo. En el queso Camembert, *Penicillium camemberti* se desarrolla en su superficie, debido a la alta concentración de O₂ disponible, necesario para su desarrollo. Este hongo, contribuye a la textura suave típica del Camembert, la cual se origina por la desacidificación de la cuajada, que en un principio es dura y quebradiza, derivado de la conversión del ácido láctico producido por la microbiota láctica, convirtiéndola en CO₂ y H₂O principalmente. Esta capacidad metabólica de *Penicillium camemberti* provoca que el pH de la superficie del queso aumente por encima de 5.8, originando un ambiente adecuado para el desarrollo de bacterias sensibles a ambientes ácidos tales como *Brevibacterium linens*, *Arthrobacter*; *Micrococcus*, *Corynebacterium* y *Brachybacterium*, las cuales en conjunto con algunas levaduras y *Penicillium camemberti* contribuyen a la textura, sabor y aroma de este tipo de quesos (Spinnler y Gripon, 2004).

2.2.4.4 Bacterias de la superficie de quesos maduros y levaduras. Muchos quesos se caracterizan por el desarrollo de crecimiento microbiano en su superficie durante la maduración. Este tipo de quesos son conocidos como quesos de superficie madurada (QSM), y se dividen en quesos madurados con hongos o bacterias en la superficie, en función de los principales microorganismos implicados durante la maduración de la superficie.

Los quesos madurados con bacterias en la superficie, también conocidos como quesos madurados untados (QMU) tales como el Münster, Beaufort, Brick, Comté, Epoisse, Esrom, Gruyère, Havarti, Itálico, Limburger, Livarot, Mont d'Or, Port du Salut, Reblochon, Taleggio, Tetilla, Serra da Estrela, Tilsit y Trappist, a pesar de ser ampliamente producidos en Suiza, Austria, Bélgica, Alemania, Italia, Portugal, Dinamarca y Francia, son mucho menos conocidos que los

quesos madurados con hongos en la superficie (Brennan *et al.*, 2004; Fontana *et al.*, 2010).

La composición de la microbiota de la superficie de los QUM es muy compleja. Algunos estudios realizados a distintos QUM han identificado una aparente interacción entre algunas levaduras y bacterias. En general, se sabe que las levaduras que habitan en la superficie de estos quesos, durante los primeros días de maduración convierten el lactato producido por las BAL a CO₂ y H₂O, formando metabolitos de naturaleza alcalina (Bonaïti *et al.*, 2004; Riahi *et al.*, 2007), lo cual induce un aumento del pH de la superficie. Además, producen una serie de compuestos que aparentemente promueven el desarrollo de comunidades microbianas de bacterias Gram positivas, catalasa positivas, resistentes a ambientes con altas concentraciones de sal, compuestas principalmente por cocos coagulasa negativo y bacterias corineformes, que pertenecen a los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Brevibacterium* y *Arthrobacter* (Corsetti *et al.*, 2001; Mounier *et al.*, 2005; Fontana *et al.*, 2010).

El conocimiento de la composición de la microbiota que se desarrolla en los quesos de superficie madurada es el principal prerequisite para el desarrollo de CIs que puedan utilizarse para la elaboración y control de microbiota durante la maduración de este tipo de quesos. Por esta razón, durante los últimos años, la composición de la microbiota asociada a algunos quesos de superficie madurada, ha sido estudiada mediante la combinación de técnicas genotípicas y fenotípicas de microbiología tradicional y molecular (Place *et al.*, 2003; Bockelmann *et al.*, 2005; Fontana *et al.*, 2010; Larpin-Laborde *et al.*, 2011). Sin embargo, la composición particular y el papel de la microbiota involucrada en los quesos tradicionales de superficie madurada es a la fecha poco conocida y pocos estudios sobre estos detalles están disponibles (Fontana *et al.*, 2010).

Por otro lado, es importante mencionar que las levaduras pueden estar presentes en otros tipos de quesos diferentes a los de superficie maduradas. De hecho, en muchos casos la presencia de estos microorganismos es indeseable, debido a que producen sabores y olores desagradables (Viljoen, 2001). Sin embargo, en otros casos su presencia es deseable, debido a que imparten características de olor y sabor en algunos quesos (Viljoen, 2001; Golić *et al.*, 2013). Incluso, algunas especies de los géneros *Kluyveromyces*, *Debaryomyces* y *Saccharomyces* son usadas como cultivos adjuntos para acelerar el proceso de maduración (Romano *et al.*, 2006).

2.2.5 Bacterias Deteriorativas

La LC y los productos lácteos como el queso, debido a su alto valor nutricional es un medio óptimo para el crecimiento de una diversidad de microorganismos, algunos de ellos como las BAL son importantes para el desarrollo del sabor, olor, textura y en general de las características deseables en estos productos (Beresford y Williams, 2004; Bourdichon *et al.*, 2012).

Como parte de la microbiota de los quesos pueden estar implicadas bacterias que pueden afectar su calidad final. Debido a esto, una cantidad considerable de estudios se han realizado con el fin de identificar aquellos microorganismos que pueden estar relacionados con defectos en los quesos. Lo anterior, ha permitido conocer que bacterias del género *Clostridium* son las principales responsables de la rancidez e hinchamiento de los quesos (Cocolin *et al.*, 2004). Mientras que bacterias de los géneros *Pseudomona*, *Acinetobacter*, *Rahnella*, *Serratia* y *Klebsiella* se les ha asociado con la formación de coloración amarilla y café en los quesos, además presentan alta actividad proteolítica y lipolítica ocasionando sabores desagradables, arrugas y una subsecuente exfoliación de la superficie del queso (Massa *et al.*, 1992; Leriche *et al.*, 2004; Ercolini *et al.*, 2009; Arslan *et al.*, 2011; Baruzzi *et al.*, 2012).

A pesar de la alta incidencia de bacterias deteriorativas en los productos lácteos, es bien conocido que en la LC existen proteínas del sistema lactoperoxidasa, lactoferrina y lisozima, las cuales tienen propiedades antimicrobianas contra bacterias deteriorativas y patógenos (Özer, 1999). Sin embargo, algunos de estos microorganismos han logrado crear mecanismos de defensa que evaden la acción antimicrobiana de estas proteínas. Por lo anterior, la industria láctea y en general la industria alimentaria, ha optado por el uso de “cultivos protectores”, los cuales están constituidos por BAL grado GRAS (Generally Recognized as Safe, por sus siglas en inglés) que confieren factores de seguridad adicionales tales como la producción de compuestos antimicrobianos que resultan en la estabilidad microbiológica de alimentos, reduciendo así el riesgo del crecimiento y la supervivencia de microorganismos deteriorativos y patógenos en los mismos (Holzapfel *et al.*, 1995).

El crecimiento *per se* de las BAL en los alimentos determina la inhibición de microorganismos no deseados. Sin embargo, su capacidad para producir bacteriocinas es de importancia básica en las estrategias de conservación biológica de los alimentos (biopreservación) (Holzapfel *et al.*, 1995). En este sentido, diversas investigaciones se han realizado a fin de caracterizar la producción y eficiencia antimicrobiana de bacteriocinas producidas por BAL (Rodríguez *et al.*, 2000; Hata *et al.*, 2010; Dal Bello *et al.*, 2012), las cuales han demostrado ser una promesa para la biopreservación de alimentos.

2.2.6 Bacterias Patógenas

La tradición del consumo de LC y sus productos fue objeto de un cambio importante en el siglo XIX, debido a que los países industrializados empezaron a implementar la pasteurización de la leche a gran escala, con el fin de eliminar patógenos principalmente *Mycobacterium bovis* (de la Rúa-Domenech, 2006). Lo anterior motivó la producción de quesos de leche pasteurizada a fin de

reducir el riesgo sanitario que representaban los quesos de leche cruda (QLC). Sin embargo, recientemente existe un renovado interés en la producción de quesos artesanales de LC debido a la demanda de los consumidores por incrementar las características de sabor y textura agradables en los quesos, características distintivas de los quesos artesanales (Licitra, 2010).

Debido al incremento de los brotes de enfermedades transmitidas por el consumo de QLC en los últimos años, la inocuidad de estos quesos ha sido cuestionada (De Buyser *et al.*, 2001). En consecuencia, países miembros de la unión europea y USA han implementado políticas que regulan la producción, venta y distribución de QLC (Licitra, 2010; Brooks *et al.*, 2012). A pesar de esto, existe una enorme preocupación debido a que dichas normativas establecen que los QLC deben ser sometidos a una maduración de por lo menos 60 días a fin de disminuir los riesgos de enfermedades transmitidas por su consumo.

Sin embargo, diversos estudios han demostrado que ciertos patógenos resisten condiciones hostiles durante los 60 días de maduración a los que deben someterse los QLC para poder ser comercializados (D'Amico *et al.*, 2008; Schvartzman *et al.*, 2011). Por lo anterior, se está analizando la posibilidad de tomar otras medidas con el fin de garantizar la inocuidad de estos quesos (Neuman, 2011).

Staphylococcus aureus, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 son las bacterias patógenas encontradas con mayor frecuencia en queso y productos lácteos. Generalmente, la incidencia de estos patógenos en los productos lácteos está relacionado a un ordeño insalubre, contaminación post-proceso y en general a malas prácticas de manufactura durante la elaboración de estos productos, sin embargo se ha descrito que una multiplicidad de factores están involucrados (De Buyser *et al.*, 2001).

En Francia y otros países industrializados se ha reportado que los brotes infecciosos producidos por el consumo de productos lácteos representan del 1 al 5 % de las infecciones alimentarias (De Buyser *et al.*, 2001). En México, existe poca información disponible sobre los brotes de enfermedades producidos por alimentos (Chávez-de la Peña *et al.*, 2001). En el caso de los productos lácteos no existen datos o reportes detallados que evidencien que estos alimentos son responsables de brotes alimentarios.

Sin embargo, algunos estudios han logrado identificar una alta incidencia de patógenos en quesos frescos elaborados con leche cruda, siendo estos productos un foco de infección potencial para los consumidores (Rubio-Lozano *et al.*, 2006; Moreno-Enriquez *et al.*, 2007; Torres-Vitela *et al.*, 2012). Por lo anterior, las autoridades de salud deben implementar medidas pertinentes con el fin de garantizar la seguridad e inocuidad este tipo de quesos.

2.3 Ecología Microbiana de los Ecosistemas Alimentarios Complejos: Alimentos Fermentados

Los alimentos fermentados son ecosistemas alimentarios complejos, en los cuales subsiste una diversidad de poblaciones microbianas. La microbiota inherente a este tipo de alimentos no es estática, es así que, la dinámica de crecimiento, supervivencia y actividad bioquímica de los microorganismos en los alimentos fermentados son el resultado de las reacciones de estrés en respuesta a cambios físicos o químicos dentro del microambiente del alimento (Giraffa y Carminati, 2008).

La habilidad para colonizar la matriz del alimento, crecer dentro de una heterogeneidad espacial y comunicarse mediante interacciones célula-célula

(quórum sensing), son los principales factores que definirán supervivencia de las distintas poblaciones microbianas en estos alimentos. En este sentido, las estimaciones de la diversidad microbiana en los alimentos fermentados son a menudo difíciles, debido a la incapacidad de cultivar la mayoría de las bacterias viables o para evaluar células estresadas (Giraffa y Carminati, 2008).

En las últimas dos décadas, debido al uso de nuevas técnicas moleculares el conocimiento acerca de la diversidad de los ecosistemas microbianos se ha incrementado espectacularmente. Ahora, estas herramientas están disponibles para conocer la dinámica poblacional involucrada en los procesos microbiológicos que intervienen en la elaboración de distintos alimentos (Giraffa y Carminati, 2008; Cocolin *et al.*, 2013).

2.3.1 Diversidad y Dinámica de las Poblaciones Microbianas en Productos Lácteos Fermentados

Los alimentos lácteos fermentados como el queso son ecosistemas complejos que se caracterizan por la presencia, interacción y sucesión de bacterias, hongos y levaduras. El conjunto de las interacciones y dinámica de las poblaciones microbianas juegan un rol central en la manufactura y formación de características de sabor, olor, textura y vida útil de los quesos (Irlinger y Mounier, 2009).

La microbiota en los productos lácteos fermentados es dinámica, debido a que los cambios en sus poblaciones están influenciados por los continuos cambios ambientales que se producen durante la elaboración de estos productos. Por lo tanto, los microorganismos, a nivel cepa o especie, deben ser analizados al menos durante las fases tecnológicas más eficaces (por ejemplo durante la

fermentación de la cuajada que posteriormente se convertirá en queso), es decir, cuando es importante tener ciertas actividades microbianas con el objetivo de alcanzar la calidad esperada del producto final (Coppola *et al.*, 2008).

Los cambios en las comunidades microbianas durante las diversas fases de la producción de los productos lácteos son particularmente importantes para alcanzar una descripción satisfactoria de la microbiota que se produce, especialmente en productos artesanales, obtenidos por procedimientos tradicionales. Lo anterior puede ayudar a la comprensión de la base de rasgos sensoriales específicos y/o de sus variaciones estacionales. En el caso de los quesos con DOP (Denominación de Origen Protegida) para comprender su complejidad, es importante realizar una asociación entre la diversidad y la zona de producción que puede mejorar la relación entre la microbiota, el medio ambiente y la calidad sensorial de estos productos tradicionales. Por lo tanto, un estudio satisfactorio de la microbiología de la fermentación de los productos lácteos también debe examinar todas las fases tecnológicas importantes de su producción (Coppola *et al.*, 2008).

2.3.2 Técnicas Independientes de Cultivo: Un Enfoque a la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante y sus Aplicaciones.

Los últimos 20 años han sido un periodo clave para la microbiología molecular, ya que es a finales de la década de los años 90 cuando se introdujeron las técnicas independientes de cultivo (TIC), que permitieron sobreponerse a las limitaciones que representan los métodos de microbiología convencional. Las TIC permitieron a los investigadores realizar los primeros estudios de ecología microbiana en ecosistemas naturales, conocer la diversidad y los cambios en

las poblaciones microbianas a través del tiempo (Giraffa y Carminati, 2008; Cocolin *et al.*, 2013).

En comparación con los métodos dependientes de cultivo en medios sintéticos, las TIC tienen por objeto proporcionar una imagen de las poblaciones microbianas sin la necesidad de aislar sus componentes individuales. Esto es posible debido a que estas técnicas se basan en el aislamiento y análisis del material genético (ADN o ARN) de las comunidades microbianas con un enfoque comunitario, permitiendo detectar en su totalidad las poblaciones presentes en ecosistemas naturales, incluso aquellas poblaciones que no son cultivables (Giraffa y Carminati, 2008).

En el campo de la microbiología molecular, el primer reporte sobre el estudio de la diversidad microbiana en un alimento utilizando TIC fue el trabajo reportado por Ampe *et al.* (1999). Los resultados de este estudio demostraron que el uso en conjunto de las técnicas dependientes e independientes de cultivo permite conocer la diversidad microbiana de los ecosistemas alimentarios complejos, como lo son los alimentos fermentados. Posteriormente, un sin número de trabajos utilizando TIC se han realizado con el objetivo de conocer la diversidad de microorganismos inherentes a diferentes ecosistemas alimentarios (Cocolin *et al.*, 2000; Cocolin *et al.*, 2001; Ercolini *et al.*, 2003; Fontana *et al.*, 2005; Mounier *et al.*, 2005; Callon *et al.*, 2006; Van Hoorde *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2013).

Un paso crucial para el estudio de la diversidad microbiana de diferentes matrices alimentarias es la correcta selección del gen diana del ADN que será amplificado, para esto se utilizan iniciadores dirigidos a regiones altamente conservadas del ADN microbiano (por ejemplo 16S ARNr en procariotes y 26S ARNr para eucariotas), es así que fragmentos de un solo tamaño específico pero con diferente secuencia nucleotídica son obtenidos. Estos fragmentos

posteriormente son analizados mediante TIC a fin de conocer el perfil microbiano del alimento.

Actualmente, DGGE es la técnica más utilizada en microbiología molecular para el estudio de ecología microbiana de diferentes ecosistemas alimentarios. DGGE permite la separación electroforética de amplicones de ADN microbiano de un tamaño similar pero diferente en su secuencia nucleotídica mediante la aplicación de un gradiente químico (urea-formamida) en un gel de poliacrilamida. A medida que las moléculas de ADN se encuentran con el gradiente desnaturizante apropiado, se produce la desnaturización parcial de la doble cadena. Este cambio en la conformación de la estructura del ADN provoca una tasa de migración reducida de la molécula. Cuando se utiliza este método para conocer el perfil microbiano, después de la amplificación, la mezcla de ADN de diferentes especies microbianas puede ser diferenciado y caracterizado. Las bandas o unidades taxonómicas operacionales (UTOs) visibles en geles DGGE representan los componentes de la microbiota, las cuales, pueden reamplificadas y secuenciadas, a fin de conocer las especies microbianas presentes en el alimento. El uso de esta técnica además de proveer un perfil microbiano del ecosistema alimentario, también posibilita observar la dinámica de las poblaciones microbianas a lo largo del tiempo (Ercolini, 2004).

DGGE ha sido ampliamente utilizada por los microbiólogos en alimentos lácteos con el objetivo de conocer la diversidad microbiana y dinámica poblacional en alimentos lácteos fermentados (ver Tabla 2). El perfil microbiano obtenido por DGGE ha permitido conocer qué microorganismos están implicados en impartir las características típicas a cada alimento lácteo, evaluar que poblaciones microbianas están implicadas en los procesos de descomposición de los alimentos, entre otras múltiples aplicaciones (Ercolini *et al.*, 2008; Randazzo *et al.*, 2010; Franciosi *et al.*, 2011; Cocolin *et al.*, 2013).

Tabla 2. Estudios de ecología microbiana realizados en diferentes productos lácteos mediante la técnica DGGE

Alimento	País	Microorganismos identificados ^a	Gen objetivo	Referencia
Leche cruda y cuajada fresca	Italia	ST, EF, LL, MC, Ch	16S ARNr	Giannino <i>et al.</i> (2009)
Queso Castelmagno		LP, SA, LLL, LLC, LK	16S ARNr	Dolci <i>et al.</i> (2008)
queso Parmigiano Reggiano		LF, LC, LPC, LH, LDL	16S ARNr	Gala <i>et al.</i> (2008)
Queso Robiola di Roccaverano		LL, Ge, KL	16S ARNr y 26 S ARNr	(Bonetta <i>et al.</i> , 2008)
Leche refrigerada	Francia	LL, SW, StE, KP, KR, Li, Ar	16S ARNr	Lafarge <i>et al.</i> (2004)
Queso Feta	Grecia	ST, LDB, KL, PM, PF	16S ARNr y 26 S ARNr	Rantsiou <i>et al.</i> (2008)
Yogurt comercial	China	ST, LD, LCr, LR	16S ARNr	Ma <i>et al.</i> (2009)
Queso Cabrales	España	LG, LLL, LR, PR, GC	16S ARNr y 26 S ARNr	Flórez y Mayo (2006)
Queso Casín		ST, LL, SP, LP, GC, KL	16S ARNr y 26 S ARNr	Alegria <i>et al.</i> (2009)
Granos de Kefir	Taiwan	LK, LKe, LL	16S ARNr	Chen <i>et al.</i> (2008)

^a *Streptococcus thermophilus* (ST); *Enterococcus faecium* (EF); *Lactococcus lactis* (LL); *Macrocooccus caseolyticus* (MC); *Chryseobacterium* spp. (Ch); *Lactobacillus plantarum* (LP); *Streptococcus agalactiae* (SA); *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LLL); *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (LLC); *Lactobacillus kefirifaciens* (LK); *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LDB); *Kluyveromyces lactis* (KL); *Pichia membranifaciens* (PM); *Pichia fermentans* (PF); *Lactobacillus fermentum* (LF); *Lactobacillus casei* (LC); *Lactobacillus paracasei* (LPC); *Lactobacillus helveticus* (LH); *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (LDL); *Geotrichum* spp (Ge); *Lactobacillus delbrueckii* (LD); *Lactobacillus crispatus* (LCr); *Lactobacillus rhamnosus* (LR); *Staphylococcus warneri* (SW); *Staphylococcus epidermidis* (StE); *Klebsiella pneumoniae* (KP); *Kocuria rosea* (KR); *Listeria* spp. (Li); *Arthrobacter* sp. (Ar); *Lactococcus garvieae* (LG); *Lactobacillus raffinolactis* (LR); *Penicillium roqueforti* (PR); *Geotrichum candidum* (GC); *Streptococcus parauberis* (SP); *Lactobacillus kefir* (LKe); *Lactobacillus buchneri* (LB); *Corynebacterium variabile* (CV)

A pesar de los avances en el entendimiento de la diversidad y los procesos dinámicos de las poblaciones microbianas que ocurren en los alimentos caracterizados por DGGE, esta técnica tiene una serie de inconvenientes, quizás la más recurrente es que no siempre una UTO en el perfil microbiano representa una sola especie microbiana. Este problema surge debido a que algunas secuencias de ADN de diferentes microorganismos pueden tener sitios de fusión igual o similar, y por lo tanto anclarse en regiones en el gel DGGE donde no existe una diferencia visual (Sekiguchi *et al.*, 2001; Kisand y Wikner, 2003). En la actualidad, nuevas técnicas están disponibles para el estudio de la ecología microbiana y han sido utilizadas recientemente en estudios de la diversidad microbiana en diferentes ecosistemas alimentarios. Las técnicas de secuenciación de nueva generación (TSNG) tienen ventajas sobre DGGE, ya que mientras DGGE sólo permite identificar los perfiles microbianos de bandas intensas y separadas, y como consecuencia sólo puede ser identificada una fracción parcial de la microbiota de los alimentos (Cocolin *et al.*, 2013).

Las TSNG logran identificar una cantidad masiva de secuencias a partir de una única prueba de secuenciación y el análisis de las mismas ofrece la posibilidad de obtener una gran cantidad de información en un tiempo relativamente corto. Cuando se aplica a estudios de ecología microbiana, las TSNG posibilitan determinar el número de lecturas de diferentes UTOs que se producen de un templado y, por lo tanto, tener una estimación del porcentaje de ocurrencia de diferentes UTOs en un ecosistema específico (Cocolin *et al.*, 2013). Este enfoque molecular ha sido utilizada en el campo de la microbiología de los alimentos aplicado al estudio de la ecología de diferentes alimentos (Masoud *et al.*, 2011; Ercolini *et al.*, 2012; Nam *et al.*, 2012). Sin embargo, las TSNG ofrecen la posibilidad aún más interesante de estudiar la presencia y abundancia de genes microbianos en un determinado ecosistema y de establecer que factores inciden en su expresión (Cocolin *et al.*, 2013).

Estudios de metagenómica y metatranscriptómica representan el futuro para el estudio de la ecología microbiana de los alimentos. En poco tiempo, seguramente esta información estará disponible y conoceremos detalladamente las transformaciones microbianas en alimentos, lo que permitirá a los científicos comprender plenamente el papel e impacto de los microorganismos en alimentos específicos (Cocolin *et al.*, 2013). Sin embargo, mientras toda esa información es generada, DGGE seguirá siendo la herramienta más poderosa para el estudio de la diversidad y dinámica las poblaciones microbianas asociadas a ecosistemas alimentarios.

III. HIPÓTESIS

Los cambios en las poblaciones microbianas presentes en el queso Chihuahua en las diferentes etapas de su manufactura y almacenamiento durante al menos 30 días, propicia condiciones idóneas para la generación de un producto de calidad e inocuidad de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar la diversidad y dinámica de poblaciones microbianas durante la manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua (QC).

Objetivos Específicos

- Realizar conteos microbianos de los principales microorganismos indicadores de calidad y bacterias ácido lácticas así como identificar la presencia de patógenos y toxina estafilocócica en muestras obtenidas durante manufactura y almacenamiento del QC.
- Identificar si existen diferencias en los conteos microbianos por efecto del nivel tecnológico de las queserías, debido a los tiempos de almacenamiento evaluados e intraquesería entre los muestreos realizados.
- Caracterizar la dinámica de las poblaciones microbianas durante la manufactura y almacenamiento del QC mediante la técnica DGGE.
- Caracterizar la diversidad microbiana mediante la identificación de las especies que conforman las poblaciones microbianas presentes durante la manufactura y almacenamiento del QC.

V. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA), específicamente en el Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos (LQBPL) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C (CIAD), Unidad Hermosillo, Sonora, eligiéndose las técnicas cuidadosamente y tomando en cuenta los materiales y equipos de los que se dispone en dicho Centro.

5.1 Estrategia de Muestreo

Muestras del proceso de manufactura de queso Chihuahua (QC) (leche cruda: LC, leche pasteurizada: LP, suero: S, cuajada: C y queso con 0 días de almacenamiento: Q0) fueron obtenidas en dos muestreos realizados durante los meses de Noviembre-Diciembre de 2012, de 5 queserías (3 artesanales y 2 semitecnificadas) ubicadas en Cd. Delicias y Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua. Por confidencialidad las queserías fueron codificadas como A, B, C, D, E y F (las queserías C y D corresponden al mismo productor con diferentes procesos de manufactura [quesería C: método artesanal y quesería D: método semitecnificado], por lo tanto se utilizó la misma LC para la manufactura de ambos lotes de QC, por lo que los resultados de los análisis microbiológicos para LC es el mismo en ambas queserías). Las muestras colectadas en las distintas queserías fueron confinadas e identificadas cuidadosamente en bolsas estériles Whirl-Pak™ (Nasco®, USA), y posteriormente transportadas en hieleras bajo condiciones

de refrigeración (aproximadamente de 0-4 °C) a las instalaciones del LQBPL de CIAD, Hermosillo, Sonora.

5.1.1 Condiciones de Almacenamiento

Las muestras obtenidas del proceso de manufactura de QC fueron inmediatamente analizadas microbiológicamente. Así mismo, las muestras de queso que correspondieron a los tiempos de almacenamiento 15 (Q15) y 30 (Q30) días, fueron cuidadosamente identificados y colocados bajo condiciones controladas de temperatura a 4 °C, una vez transcurrido el tiempo de almacenamiento antes mencionado fueron analizados.

En el caso de las muestras destinadas para el análisis molecular, estas muestras fueron inmediatamente almacenadas a una temperatura de - 20 °C para su posterior análisis, excepto las muestras de Q15 y Q30, las cuales fueron almacenadas a la misma temperatura una vez que transcurrieron los tiempos de almacenamiento experimentales.

5.2 Caracterización de la Diversidad Microbiana y Dinámica de Poblaciones por Técnica Microbiológicas Convencionales

Se realizaron conteos microbianos con el fin de conocer la concentración de microorganismos indicadores de calidad, BAL, presencia de patógenos y detección de toxina estafilocócica a muestras obtenidas durante el proceso de manufactura (LC y Q0) y almacenamiento del QC (Q15 y Q30). La preparación de las muestras, diluciones y expresión de resultados se realizaron siguiendo las recomendaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, como a continuación se describe.

10 g de las muestras de queso, tanto de la superficie externa como del interior o 10 mL de las muestras de LC fueron colocados bajo condiciones asépticas en bolsas estériles Whirl-Pak™ (Nasco®, USA) que contenían 90 mL de una solución de agua peptonada salina estéril (0.1 % de peptona bacteriológica y 8.5 % de NaCl) y posteriormente homogenizadas. Después, se procedió a realizar 6 diluciones decimales en tubos que contenían agua peptonada salina estéril, las cuales fueron utilizadas para todos los análisis microbiológicos. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado en medios selectivos para cada microorganismo bajo estudio.

5.2.1 Microorganismos Indicadores de Calidad

Para la realización de los conteos de los microorganismos indicadores de calidad se sembraron las diluciones de las muestras en los siguientes medios de cultivo: Agar Cuenta en Placa/Plate Count Agar (PCA) (BD Difco™, USA) para microorganismos mesófilos aerobios, las placas fueron incubadas a 35 ± 2 °C durante 48 ± 2 h; Agar Papa Dextrosa/Potatoe Dextrose Agar (PDA) (BD Difco™, USA) acidificado a un pH de 3.5 ± 0.1 con ácido tartárico estéril al 10 % (aproximadamente 1.4 mL de ácido tartárico por 100 mL de medio), las placas fueron incubadas a 25 ± 1 °C durante 3-5 días.

Para los análisis del recuento de bacterias coliformes totales (BCT) y bacterias coliformes fecales (BCF) se utilizó la técnica de diluciones en tubo múltiple (número más probable también conocida como NMP). 1 mL de cada una las diluciones de las muestras fueron inoculadas en 3 tubos estériles que contenían 10 mL de Caldo Lauril Sulfato/Lauryl Sulfate Broth (LSB) (BD Difco™, USA), los tubos fueron incubados a 35 ± 0.5 °C durante 48 h. Transcurrido este tiempo, se procedió a inspeccionar los tubos, aquellos en los que se observó formación de biomasa y gas se inoculó una azada de

estos tubos en tubos estériles que contenían 10 mL de Caldo Bilis Verde Brillante 2 %/Brilliant Green Bile 2 % Broth (BGBB) (BD Difco™, USA) para el recuento de BCT, así como también en tubos con 10 mL caldo EC/EC broth (ECB) (BD Difco™, USA) para el recuento de BCF, posteriormente los tubos con BGBB y ECB fueron incubados durante 48 h a 35 ± 0.5 °C y a 44.5 ± 0.2 °C respectivamente (SSA, 2010). Todos los tubos utilizados para el recuento de BCT y BCF contenían campana de fermentación Durham.

5.2.2 Microorganismos Patógenos

La determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes* solo se realizó en las muestras de queso, para esto 25 g de cada queso, tanto de la superficie externa como del interior fue colocado bajo condiciones asépticas en bolsas estériles que contenían 225 mL de Caldo de Enriquecimiento para Listeria/Listeria Enrichment Broth (LEB) (Oxoid, USA) posteriormente las bolsas fueron homogenizadas e incubadas a 30 °C durante 48 h. Después de transcurrido 48 h se procedió a resembrar el medio de enriquecimiento en Agar Cloruro de Litio Feniletanol Moxolactam/Lithium chloride Phenylethanol Moxalactam Agar (LPM) (Oxoid, USA) y Agar Base Oxford/Oxford Agar (OXA) (Oxoid, USA) e incubados a 30 °C y 35 °C respectivamente durante 48 h, de no observarse crecimiento en las placas, la muestra se reporta como ausente de *Listeria monocytogenes*, de observarse crecimiento se debe comprobar la presencia presuntiva de *Listeria monocytogenes* siguiendo los métodos de prueba establecidos en el numeral B.13 de la NOM-243-SSA1-210.

Respecto a los conteos de *Staphylococcus* se tomó 0.1 mL de las diluciones decimales de las muestras del proceso de manufactura y almacenamiento del QC y se dispersaron con bastones desechables en placas con Agar Baird-Parker/Baird-Parker Agar (BPA) (BD Difco™, USA) enriquecido con 5

% de Telurito EY/EY Tellurite (BD Difco™, USA), las placas fueron incubadas a 35 °C durante 45-48 h (SSA, 2010).

Para la detección de toxina estafilocócica en las muestras de QC, se realizó un inmunoensayo por el método de ELISA utilizando el kit TECRA™ SET ID VIA (3M™, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor en concordancia con lo establecido en el numeral B.15 de la NOM-243-SSA1-2010.

5.2.3 Bacterias Ácido Lácticas

Para los conteos de BAL de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* se utilizaron las metodologías reportadas por Marino *et al.* (2003) y Dagdemir y Ozdemir (2008). Para el recuento de *Lactobacillus*, 1 mL de cada dilución de las muestras del proceso de manufactura y almacenamiento de QC fueron sembradas en placas con Agar de Man Rogosa y Sharpe/de Man Rogosa and Sharpe Agar (MRSA), las placas fueron colocadas en jarras de anaerobiosis GasPak 150 Jar que contenía un cada una sobre de GasPak Plus (BBL™, USA) (a fin de garantizar un ambiente anaerobio con 10 % de CO₂) e incubadas a 35 °C por 48 h. Para el conteo de *Lactococcus* y *Streptococcus*, 1 y 0.1 mL respectivamente de las diluciones seriadas fueron inoculadas y dispersadas con bastones desechables en Agar Medio 17/Medium 17 Agar (M17A) enriquecido al 5 % con una solución de lactosa (BD Difco™, USA) al 10 %, las placas fueron incubadas por 48 h a 30 °C para los conteos *Lactococcus* y a 44 °C de los conteos de *Streptococcus*.

5.3. Caracterización de la Diversidad y Dinámica de las Poblaciones Microbianas por Técnicas de Microbiología Molecular

5.3.1 Extracción de ADN

La extracción del ADN total, directamente de las muestras se realizó siguiendo la metodologías reportada por Alessandria *et al.* (2010) con algunas modificaciones que se describen a continuación. Se homogenizaron 10 g de las muestras de C, Q0, Q15 y Q30, en bolsas Stomacher® (Seward, USA) con 40 mL de solución Ringer (Fluka, USA) en un Stomacher® 80 Biomaster (Seward, USA) durante 1 min. Las partículas grandes se dejaron sedimentar durante 5 min y 1 mL del sobrenadante fue colocado en tubos estériles de 1.5 mL, los cuales fueron centrifugados a 12000 $\times g$ por 10 min en una microcentrífuga 5417R (Eppendorf, Alemania) para sedimentar las células.

Para las muestras de LC, LP y S, 1 mL de estas muestras fue directamente centrifugado usando las mismas condiciones descritas anteriormente y el sedimento de células fue usado para la extracción del ADN. Después de la centrifugación, el sedimento de células fue resuspendido con una mezcla de 120 μL de solución tampón de proteínasa (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM [pH 7.5], dodecil sulfato de sodio al 0.5 % [p/v]), 25 μL de proteínasa K (25 mg/mL, Sigma, USA) y 50 μL de lisozima (50 mg/mL, Sigma-Aldrich, USA). Posteriormente, los tubos fueron incubados en un Thermomixer® R (Eppendorf, Alemania) a 50 °C por 1 h a 300 rpm. Después, la solución fue transferida a tubos con rosca estériles que contenían perlas de vidrio con un diámetro de 0.5 mm e inmediatamente se agregó 300 μL de solución tampón de lisis (Triton X-100 al 4 % [vol/vol], dodecil sulfato de sodio al 2 % [p/v], NaCl 200 mM, Tris base 20 mM [pH 8]) y 300 μL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, Sigma, USA). Posteriormente, los tubos fueron

sometidos a 3 ciclos de 30 s en un Mini-Beadbeater-16 (Bio Spec Products Inc, USA). 300 μ L de solución tampón TE (Tris base 10 mM, EDTA 1 mM) fueron agregados a los tubos y sometidos a centrifugación a 12000 $\times g$ por 10 min. La fase acuosa fue recolectada y transferida a tubos estériles de 1.5 mL. Los ácidos nucleicos fueron precipitados por la adición de 600 μ L de etanol frío grado biología molecular (99 %, Sigma, USA) y sedimentados por centrifugación a 12000 $\times g$ por 10 min a 4 °C. El etanol fue retirado por decantación y se realizó un lavado brevemente por 2 min de los ácidos nucleicos con 250 μ L de etanol frío al 70 % (Sigma, USA), centrifugando los tubos a 12000 $\times g$ por 10 min a 4 °C. Nuevamente, se retiró el etanol por decantación, se esperó durante 30 min a que el exceso de etanol se volatilizara y se rehidrató el ADN con 50 μ L de agua libre de nucleasas (Ambion®, USA). Enseguida, los tubos fueron colocados en un Thermomixer® R a 37 °C durante 2 h a 300 rpm. Por último, se verificó la concentración y pureza del ADN obtenido, a una longitud de onda de 260 nm usando un NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer (Thermo scientific, USA).

5.3.2 Amplificación por PCR

La región variable V3 del gen 16S ARNr de las bacterias presentes en el DNA obtenido fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), usando los iniciadores 357f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 518r (5'-ATTACCGCG GCTGCTGG-3') que corresponden a las posiciones 341 a 534 en el 16S ARNr de *E. coli*. Una secuencia de GC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCA CGGGGGG-3') fue unida al extremo 5' del iniciador 357f para obtener el cebador 357f-GC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCA CGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'), el cual fue utilizado para amplificar fragmentos de aproximadamente 233 pares de base (Muyzer *et al.*,

1993). Las amplificaciones se realizaron mediante PCR-touchdown en un termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Alemania) siguiendo las metodologías reportadas por Muyzer *et al.* (1993) y Ercolini *et al.* (2008) con algunas modificaciones especificadas a continuación. Cada reacción PCR (volumen final, 25 µL) contenía 50 ng de ADN extraído de las muestras del proceso de elaboración y almacenamiento de QC, 0.2 µM de cada cebador, 0.25 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato, MgCl₂ 2.5 mM, solución tampón PCR 1X y 1 U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil). Las amplificaciones PCR se realizaron usando las siguientes condiciones: 1 ciclo inicial de desnaturalización del templado de ADN a 95 °C por 5 min, seguido de 10 ciclos a 95 °C por 1 min, 66 °C por 1 min (decreciendo 1 °C cada ciclo hasta alcanzar 56 °C) y 72 °C por 3 min; seguidos de 20 ciclos a 95 °C por 1 min, 56 °C por 1 min y 72 °C por 3 min. Por último, se realizó un ciclo final a 72 °C durante 10 min. Finalmente, los productos PCR fueron visualizados. Para esto, una mezcla de 5 mL de los productos PCR obtenidos y 3 mL de 1X DNA Electrophoresis Sample Loading Dye (Bio-Rad, USA) fueron inyectados en geles al 1.5 % de agarosa y sometidos a un voltaje de 130 V por 30 min, transcurrido este tiempo los geles fueron visualizados en un fotodocumentador Gel Doc™ XR+System (Bio-Rad, CA, USA).

5.3.3 Análisis DGGE

Con el fin de conocer la composición de las poblaciones microbianas y su dinámica de poblaciones se realizaron análisis DGGE de los productos PCR de bacterias en un Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, CA, USA) siguiendo las metodologías reportadas por Cocolin *et al.* (2001) y Ercolini *et al.* (2008) con algunas modificaciones especificadas a continuación. Los amplicones obtenidos por PCR fueron analizados en geles de poliacrilamida (8 % [p/v] acrilamida-bis acrilamida [37.5:1]) con un

gradiente desnaturalizante 30-60 % de urea-formamida (donde el 100 % de desnaturalizante correspondió a 7 M de urea y formamida desionizada al 40 % [p/v]) en solución tampón TAE 1X (Tris base 2 M, ácido acético glacial 1 M, EDTA 50 M [pH 8]). Los geles fueron sometidos a 50 V por 10 min a 60 °C para alinear las muestras y posteriormente corridos a 200 V por 4 h a 60 °C. Después, los geles fueron teñidos por 10 min en bromuro de etidio (1 µg/mL) (Bio-Rad, CA, USA) y enjuagados en dH₂O por 5 min. Posteriormente, los geles fueron visualizados bajo luz UV en un fotodocumentador Gel Doc™ XR+System (Bio-Rad, CA, USA). Hecho esto, se identificaron las bandas más predominantes, las cuales fueron cortadas con puntas estériles, eluidas en 50 µL dH₂O e incubadas a 4 °C durante 12 h aproximadamente. Por último, se tomaron 2 µL de las bandas rehidratadas y se reamplificaron con los cebadores 357f-GC y 518r usando las condiciones descritas anteriormente.

5.3.4 Secuenciación de las Bandas Obtenidas por DGGE

Los productos PCR de las bandas reamplificadas fueron nuevamente sometidas a un análisis DGGE utilizando las condiciones anteriormente descritas en el apartado 5.4.3. Los amplicones que dieron una sola banda de co-migración con la banda original, fueron nuevamente cortadas y reamplificadas con los iniciadores 357f y 518r bajo las condiciones de amplificación descritas anteriormente en el apartado 5.4.2. Posteriormente, los amplicones obtenidos fueron purificados con el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, USA) y enviados para su secuenciación con el cebador reverso a un centro de secuenciación comercial (University of Arizona Genetics Core [UAGC], AZ, USA).

5.4 Análisis Estadístico

Para determinar el efecto del almacenamiento y las diferencias significativas entre muestreos se realizó un diseño en bloques completamente al azar mediante un análisis de varianza (GLM-ANOVA) a un 95 % de confianza. Se consideraron los resultados de los conteos microbianos como variables respuesta y como factores variables los tiempos de almacenamiento de las muestras y el nivel tecnológico de las queserías. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey-Kramer. El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico NCSS 2007.

Para conocer la identidad de las bandas obtenidas del análisis DGGE se realizaron alineamientos locales BLAST contra secuencias contenidas en la base de datos del GenBank. En las secuencias donde no fue posible obtener la identidad por un alineamiento local, se realizaron alineamientos múltiples con el programa informático ClustalW2.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Conteos Microbianos

El análisis estadístico de los datos evidenció diferencias significativas entre las queserías respecto a los conteos microbianos a lo largo de la manufactura y almacenamiento del QC debido al nivel tecnológico de las queserías. En general se observaron conteos más bajos en queserías donde la leche utilizada fue pasteurizada y se añadió cultivo iniciador (queserías semitecnificadas), también se observaron diferencias en los conteos intraquesería, es decir, hubo diferencias en los lotes analizados por efecto del día de muestreo en la misma quesería, esto a pesar de que ambos muestreos se realizaron en la misma época del año. Lo anterior, pone de manifiesto la falta de estandarización en los procesos de manufactura de las queserías bajo estudio, independientemente de su nivel tecnológico. Respecto a los conteos microbianos de los quesos almacenados durante 0, 15 y 30 días, se observó que el tiempo de almacenamiento tuvo un efecto significativo. En general, los conteos de los microorganismos analizados fueron incrementándose a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento (ver Tablas 3-5).

6.1.1 Microorganismos Indicadores de Calidad

Los resultados de los conteos de microorganismos indicadores de calidad en las muestras recolectadas durante la manufactura y almacenamiento de QC,

se muestran en la Tabla 3. En los lotes de LC de las 6 queserías analizadas se encontraron conteos de microorganismos mesófilos aerobios (MMA) en el rango de 4.83 a 8.13 \log_{10} UFC/g, que en todos los casos están fuera del rango permitido por la Norma Mexicana NMX-F-700-COFOCALEC-2004 (COFOCALEC, 2004) que establece un máximo de 6 \log_{10} UFC/mL de MMA en LC con calidad sanitaria aceptable. El contenido de MMA en LC es el parámetro más importante que determina la calidad sanitaria durante su obtención (ordeño, recolección y transporte principalmente).

A pesar de que todos los productores bajo estudio realizan el ordeño del ganado lechero con maquinaria especializada, limpian rutinariamente los establos, desinfectan la ubre del ganado antes del ordeño y existe un monitoreo constante de la salud del ganado, en todos los casos las muestras de LC están fuera de los rangos permitidos por la normativa Mexicana. Lo cual, probablemente se debe a la presencia de biopelículas de microorganismos en los aparatos de ordeño, tanques de almacenamiento y líneas de alimentación debido a una inadecuada desinfección o una posible adaptación de los biopelículas microbianos a los desinfectantes usados para la limpieza de los equipos usados para la obtención de la LC (Flint *et al.*, 1997; Latorre *et al.*, 2010; Simões *et al.*, 2010).

Los conteos de MMA en los quesos analizados oscilaron en los rangos de 6.20 a 8.93 para Q0, 4.96 a 8.44 para Q15 y 6.35 a 8.82 \log_{10} UFC/g para Q30; observándose una disminución en los conteos a medida que transcurrieron los tiempos de almacenamiento en los quesos analizados. Sin embargo, aun con esta tendencia, los elevados conteos encontrados son indicio de malas prácticas durante la obtención de la LC y del proceso de manufactura en general. Aunque la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 no se establece un rango máximo permitido de MMA en quesos, los

Tabla 3. Conteos^b de microorganismos indicadores de calidad en muestras colectadas durante la manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua.

Queserías ^c	Muestras ^a	Microorganismo Mesófilos aerobios	Hongos y levaduras	Coliformes totales	Coliformes fecales
Muestreo 1					
A	LC	7.12±0.03	2.21±0.05	4.04	4.04
	Q0	6.41±0.02	2.34±0.02	4.04	4.04
	Q15	6.62±0.03	2.40±0.03	3.04	1.97
	Q30	7.12±0.01	2.68±0.02	3.04	3.04
B	LC	6.21±0.02	2.17±0.02	4.38	3.38
	Q0	7.49±0.01	3.33±0.03	6.04	4.04
	Q15	6.17±0.04	4.08±0.01	5.04	3.04
	Q30	7.32±0.01	5.75±0.02	5.04	4.18
C	LC	-----	-----	-----	-----
	Q0	7.96±0.00	4.87±0.01	6.04	5.04
	Q15	7.72±0.00	6.08±0.05	6.04	6.04
	Q30	8.39±0.00	6.46±0.00	6.04	6.04
D	LC	7.69±0.00	2.49±0.03	4.04	3.04
	Q0	6.69±0.09	5.13±0.02	5.04	4.38
	Q15	4.96±0.00	5.58±0.02	4.66	4.18
	Q30	6.35±0.01	5.67±0.03	4.04	4.04
E	LC	4.83±0.01	3.64±0.03	6.04	5.66
	Q0	8.93±0.00	6.69±0.01	5.66	2.38
	Q15	8.22±0.01	8.04±0.01	5.66	4.66
	Q30	7.70±0.14	7.80±0.02	5.04	3.66
F	LC	5.91±0.01	4.89±0.07	6.04	5.04
	Q0	7.31±0.01	4.77±0.01	6.04	5.18
	Q15	7.65±0.03	5.26±0.03	6.04	6.04
	Q30	7.89±0.03	7.75±0.04	3.99	2.30
Muestreo 2					
A	LC	8.13±0.01	2.25±0.03	4.66	4.66
	Q0	8.06±0.00	2.22±0.03	4.04	4.04
	Q15	7.06±0.00	2.30±0.03	3.04	3.04
	Q30	7.22±0.01	2.17±0.04	4.18	4.18
B	LC	7.50±0.01	2.39±0.05	6.04	3.04
	Q0	7.36±0.03	2.46±0.02	4.04	0.84
	Q15	7.03±0.03	4.30±0.02	4.04	3.67
	Q30	7.33±0.01	5.15±0.03	4.38	4.38
C	LC	-----	-----	-----	-----
	Q0	8.11±0.01	5.39±0.00	5.66	4.66
	Q15	8.44±0.00	6.24±0.04	4.04	3.32
	Q30	7.30±0.00	5.77±0.01	3.38	3.38
D	LC	6.10±0.04	3.27±0.03	2.38	1.63
	Q0	6.20±0.03	4.89±0.02	3.04	3.04
	Q15	6.55±0.00	5.57±0.02	2.87	2.87
	Q30	6.84±0.01	5.61±0.02	2.87	2.87
E	LC	7.63±0.00	4.24±0.05	5.66	1.63
	Q0	8.41±0.01	6.95±0.01	6.04	6.04
	Q15	8.22±0.01	8.05±0.03	6.04	6.04
	Q30	8.39±0.01	7.95±0.03	6.04	2.32
F	LC	7.25±0.01	5.20±0.02	6.04	3.87
	Q0	8.01±0.05	4.67±0.03	5.04	4.66
	Q15	8.00±0.01	6.08±0.01	6.04	6.04
	Q30	8.82±0.00	7.93±0.01	6.04	4.66

Para la manufactura de queso de las queserías C y D se utilizó la misma leche cruda (solo varió el proceso de manufactura) por esto solo se muestran los resultados de leche cruda para la quesería D, sin embargo es el mismo resultado para ambas queserías

^a Leche cruda (LC); queso con 0 días de almacenamiento (Q0); queso con 15 días de almacenamiento (Q15); queso con 30 días de almacenamiento (Q30)

^b Promedio log UFC/mL± desviación estándar (DE) para leche cruda; promedio log UFC/g±desviación estándar (DE) para muestras de queso (excepto para bacterias coliformes totales y fecales donde los resultados se expresan como log NMP/mL para leche cruda y log NMP/g para las muestras de queso)

^c A, B, C (productores a escala semitecnificada); D, E, F (productores artesanales)

resultados de este estudio son similares a los reportados por Tunick *et al.* (2008); quienes reportaron valores de MMA en el rango de 6.08 a 9.61 \log_{10} UFC/g en quesos de LC y LP elaborados en queserías Menonitas ubicadas en Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, incluso los valores reportados por estos autores están por encima de los reportados en el presente trabajo. Sin embargo, en otro estudio realizado por los mismos autores (Tunick *et al.*, 2007) se reportaron valores de MMA en el rango de 6.08 a 7.95 \log_{10} UFC/g en quesos Menonitas elaborados con LC y LP en la misma época del año donde se recolectaron las muestras analizadas en el presente estudio. Lo anterior, pone de manifiesto la similitud de los resultados de los estudios antes mencionados con los valores encontrados en este estudio.

Los altos valores de MMA encontrados en las muestras de QC analizados, reflejan como la mala calidad de la LC y posibles contaminaciones post-proceso, debido a ambientes de procesamiento con líneas de ventilación inadecuadas o bien a contaminaciones por el personal que labora en las queserías (esto a pesar de que los trabajadores de las queserías bajo estudio en su mayoría utiliza mandiles, cofias y material de trabajo limpio) podrían ser los principales factores que impactan en la calidad sanitaria final del QC.

Respecto a los conteos de hongos y levaduras (HL) en LC se encontraron en el rango de 2.17 a 5.20 \log_{10} UFC. De estos, los valores más elevados (3.64 a 5.20 \log_{10} UFC) fueron encontrados en las queserías E y F, lo anterior pone de manifiesto las malas prácticas sanitarias durante la obtención de la leche en estas queserías. Aunque la normativa en México no establece valores permisibles para HL en LC (COFOCALEC, 2004; SSA, 2010), su presencia en altas concentraciones es indeseable debido a que pueden liberar enzimas que propician la degradación de lactosa, proteína y lípidos, además algunos hongos pueden producir micotoxinas, las cuales logran resistir los procesos

de pasteurización y aun en concentraciones muy bajas pueden llegar a ocasionar riesgos a la salud de los consumidores (Torkar y Vengušt, 2008).

En un estudio realizado por Torres-Llanez *et al.* (2006) en el cual se evaluó la calidad sanitaria de LC destinada para la elaboración de queso Fresco regional del estado de Sonora, se encontraron conteos microbianos cercanos a $5.5 \log_{10}$ UFC/mL de HL, estos valores a pesar de ser altos son similares a los encontrados en el presente estudio para las queserías artesanales. La similitud de los resultados del presente estudio con los reportados por Torres-Llanez *et al.* (2006) permiten tener una visión general de la calidad sanitaria de la LC utilizada en la elaboración de quesos artesanales en la región Noroeste de México.

Los conteos microbianos de HL en los quesos oscilaron entre 2.34 a 6.95 para Q0, 2.30 a 8.04 para Q15 y 2.17 a 7.93 \log_{10} UFC/g, en todos los casos en ambos muestreos (excepto por la quesería A) los conteos microbianos están fuera de los 2.69 \log_{10} UFC/g permitidos por la normativa mexicana (SSA, 2010). En base a los resultados de los conteos de HL encontrados en la LC y queso, se observa que existe una relación directa de la carga excesiva de HL encontrada en los quesos con los conteos elevados encontrados en la LC, principalmente en las queserías artesanales. En el caso de las queserías semitecnificadas (excepto la quesería A) los conteos elevados de HL es un indicativo de falta de control sanitario y graves problemas de contaminación de la leche postpasteurización. Por lo anterior, se deben implementar medidas para supervisar las temperaturas de los pasteurizadores y conocer si realmente alcanzan las temperaturas necesarias para la eliminación de microorganismos.

Generalmente, las levaduras son consideradas parte de la microbiota adventicia contaminante de los quesos, su prevalencia y supervivencia en

ambientes lácteos se debe principalmente a su capacidad de fermentar lactosa, resistir ambientes con baja actividad de agua y concentraciones elevadas de sal (Fleet, 1990). Las levaduras en los quesos pueden ocasionar problemas como por ejemplo cambios en la coloración, sabor, textura y deformación de los quesos por una excesiva producción de gas (Westall y Filtenborg, 1998)

Sin embargo, la presencia de levaduras en algunos quesos es benéfico por ejemplo en el queso Cheddar (un queso muy similar al Chihuahua) se ha logrado identificar una diversidad de levaduras que influyen en las características finales de este queso (Welthagen y Viljoen, 1999), incluso algunos estudios se han realizado a fin de evaluar el efecto de ciertas levaduras agregadas como cultivos adjuntos en la elaboración del queso Cheddar, las cuales mostraron tener la capacidad de acelerar el proceso de maduración y la formación de compuestos de aroma (Ferreira y Viljoen, 2003; De Wit *et al.*, 2005). Además, algunos estudios han reportado que las levaduras interactúan con las bacterias (principalmente BAL) promoviendo su crecimiento y desarrollo debido a la producción de vitaminas y otros compuestos (Welthagen y Viljoen, 1999; Viljoen, 2001).

Por lo anterior, es prudente mencionar que se deberían realizar estudios de caracterización de las levaduras encontradas en el QC, sobre todo en las queserías artesanales, ya que fue en este tipo de queserías donde se encontraron conteos elevados de HL, con el fin de identificarlas y evaluar el rol que desempeñan en las características finales del QC.

En lo que corresponde a la estimación de la densidad poblacional de bacterias coliformes totales (BCT) y bacterias coliformes fecales (BCF) en LC se encontraron valores en el rango de 2.38 a 6.04 \log_{10} NMP/mL para BCT y 1.63 a 6.04 \log_{10} NMP/mL para BCF. La Norma Oficial Mexicana NOM-243-

SSA1-2010 no establece rangos permisibles para estos microorganismos en LC. Sin embargo, su presencia es indicio de contaminación fecal, en el caso de la LC, se convierte en un parámetro que ayuda a evaluar el grado de limpieza de las manos de los operarios, la correcta limpieza y desinfección de los pezones de los animales y en general ayuda a evaluar la calidad de las prácticas sanitarias durante la obtención de la leche (Calderón *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos en el presente estudio son muy elevados respecto a los valores reportados por Torres-Llanez *et al.* (2006) para BCT (aproximadamente $2.2 \log_{10}$ NMP/mL) y BCF ($1 \log_{10}$ NMP/mL) encontrados en LC usada para la elaboración de queso Fresco. En general, los resultados de los valores encontrados de BCT y BCF en LC son indicio de malas prácticas sanitarias durante la recolección de la leche usada para la manufactura de QC.

Por otro lado, en los quesos analizados se encontraron valores de BCT en el rango de 3.04 a 6.04 para Q0, 2.89 a 6.04 \log_{10} NMP/g para Q15 y Q30. Respecto a BCF los rangos para Q0 fueron de 0.84 a 6.04, para Q15 1.97 a 6.04 y para Q30 oscilaron en el rango de 2.87 a 6.04 \log_{10} NMP/g. En general, para BCT y BCF los valores más elevados se encontraron en quesos artesanales. Sin embargo, los valores de los rangos encontrados para BCT y BCF indicaron una amplia heterogeneidad en los resultados, no pudiendo observar un comportamiento de decremento o incremento respecto a los tiempos de almacenamiento evaluados, lo anterior concuerda con lo reportado por Diaz-Cinco *et al.* (1992) presentando un comportamiento similar durante el monitoreo de QC durante 12 días a 5 °C. Finalmente estos autores concluyen que este comportamiento se debe a las condiciones fisicoquímicas (acidez, pH y humedad principalmente) del QC que permiten el desarrollo de BCT y BCF en este queso.

Sin embargo, la presencia de BCT y BCF en concentraciones elevadas en los quesos es perjudicial debido a que son capaces de metabolizar lactosa y producir elevadas concentraciones de gas que pueden producir defectos en los quesos. Además una alta incidencia de BCF generalmente está asociada con la posible presencia de bacterias enteropatógenas tales como *E. coli* que representan un riesgo a la salud de los consumidores. Por lo tanto, se debe poner particular atención a estos resultados y buscar estrategias que ayuden a mejorar las prácticas de manufactura de las queserías analizadas.

6.1.2 Microorganismos Patógenos

Los conteos de *Staphylococcus*, detección de toxina estafilocócica y presencia de *Listeria monocytogenes* se muestran en la tabla 4. Los resultados de los conteos de *Staphylococcus* mostraron que todas las muestras analizadas, en general, tuvieron conteos microbianos muy elevados a lo largo de la manufactura y almacenamiento del QC. En LC se encontraron conteos en el rango de 4.63 a 6.44 \log_{10} UFC/mL y en queso oscilaron desde 3.99 a 6.35 para Q0, 2.57 a 5.80 para Q15 y 3.57 a 5.37 \log_{10} UFC/g para Q30. El comportamiento de los conteos de *Staphylococcus* fue heterogéneo ya que en algunos casos decrecieron las cuentas microbianas por efecto del tiempo de almacenamiento de los quesos, sin embargo algunos quesos bajo las mismas condiciones de almacenamiento presentaron un comportamiento opuesto.

El género *Staphylococcus* está compuesto por más de 70 especies y subespecies (Euzéby, 2013). Los *Staphylococcus* son bacterias Gram positivas y no móviles que son colonizadores comensales de las membranas mucocutáneas de animales de sangre caliente y de los seres humanos (Kloos y Bannerman, 1994; Lowy, 1998). Generalmente los *Staphylococcus*

Tabla 4. Conteos^b de *Staphylococcus* y detección de toxina estafilocócica en muestras colectadas durante la manufactura y almacenamiento de queso Chihuahua

Quesería ^c	Muestras ^a	Microorganismo <i>Staphylococcus</i>	Toxina estafilocócica
Muestreo 1			
A	LC	6.21±0.00	NA ^d
	QO	4.11±0.03	-
	Q15	3.36±0.06	+
	Q30	3.89±0.03	+
B	LC	5.64±0.01	NA
	QO	6.35±0.01	+
	Q15	4.76±0.02	-
C	Q30	5.97±0.02	-
	LC	-----	-----
	QO	4.35±0.08	-
D	Q15	4.12±0.06	-
	Q30	5.38±0.00	-
	LC	6.26±0.02	NA
	QO	4.66±0.05	-
E	Q15	4.11±0.04	+
	Q30	5.09±0.01	+
	LC	4.63±0.02	NA
	QO	5.39±0.00	-
F	Q15	5.80±0.00	-
	Q30	5.59±0.03	+
	LC	6.44±0.04	NA
	QO	3.99±0.06	+
Muestreo 2	Q15	5.40±0.01	+
	Q30	5.59±0.03	-
	LC	6.02±0.00	NA
	QO	4.69±0.03	+
A	Q15	2.57±0.03	-
	Q30	3.97±0.02	-
	LC	6.03±0.03	NA
	QO	4.60±0.01	-
B	Q15	3.43±0.03	+
	Q30	4.68±0.01	-
	LC	-----	-----
	QO	5.61±0.02	+
C	Q15	4.77±0.06	-
	Q30	4.11±0.01	-
	LC	5.47±0.01	NA
	QO	4.96±0.02	-
D	Q15	4.94±0.03	-
	Q30	4.90±0.01	+
	LC	4.76±0.06	NA
	QO	4.49±0.07	+
E	Q15	5.21±0.02	-
	Q30	5.77±0.06	+
	LC	5.66±0.07	NA
	QO	5.52±0.02	+
F	Q15	5.40±0.01	-
	Q30	5.67±0.04	-

Para la manufactura de queso de las queserías C y D se utilizó la misma leche cruda (solo varió el proceso de manufactura) por esto solo se muestran los resultados de leche cruda para la quesería D, sin embargo es el mismo resultado para ambas queserías

^a Leche cruda (LC); queso con 0 días de almacenamiento (QO); queso con 15 días de almacenamiento (Q15); queso con 30 días de almacenamiento (Q30)

^b Promedio Log UFC/mL±DE para leche cruda; promedio Log UFC/g±DE para muestras de queso

^c A, B, C (productores a escala semitecnificada); D, E, F (productores artesanales)

^d Muestras no analizadas

están presentes en leche y productos lácteos. Bacterias de este género tales como *Staphylococcus aureus* son considerados patógenos que pueden ocasionar riesgos a la salud, debido a su capacidad de producir enterotoxinas termoresistentes que pueden provocar graves intoxicaciones por su ingesta (Viçosa *et al.*, 2010; Podkowik *et al.*, 2013). Por lo anterior, la presencia no en concentraciones elevadas de *Staphylococcus* no es deseable en productos lácteos.

De acuerdo con su capacidad para coagular plasma de conejo, las bacterias del género *Staphylococcus* se dividen tradicionalmente en dos grupos: coagulasa positivos (SCP) y coagulasa negativos (SCN). Es bien conocido que ciertas especies de SCP son causantes de la mastitis (El-Jakee *et al.*, 2013; Podkowik *et al.*, 2013), es así que concentraciones elevadas de bacterias del género *Staphylococcus* en LC son indicio de problemas de relacionados con mastitis en el ganado destinado para la producción de leche.

Por lo anterior, los conteos microbianos elevados de *Staphylococcus* encontradas en LC en este estudio podrían estar relacionadas con problemas de salud del ganado de ordeño, mastitis y malas prácticas de ordeño durante la obtención de la leche o bien con inadecuada desinfección de los equipos de ordeño. Lo anterior, podría atribuirse a la evidencia mostrada en recientes estudios, los cuales han demostrado que cepas de *Staphylococcus* son capaces de adherirse a superficies de los equipos de ordeño y tanques de almacenamiento, y formar biopelículas siendo un foco de contaminación de la leche (Jorgensen *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2012), lo cual, podría explicar los conteos elevados de este grupo microbiano en la LC usada en la manufactura de QC.

Respecto a los conteos elevados de *Staphylococcus* encontrados en los quesos analizados en el presente trabajo, diversos estudios han logrado proveer información acerca de la supervivencia de *Staphylococcus* (principalmente *S. aureus*) en los alimentos fermentados como el queso, donde la microbiota dominante en estos alimentos son las BAL, esto implica que ciertas cepas de *Staphylococcus* son capaces de adaptarse, crecer y resistir ambientes hostiles bajo condiciones adversas, incluso producir agentes antimicrobianos en respuesta condiciones adversas (Netz *et al.*, 2002; Saeed *et al.*, 2004; Weinrick *et al.*, 2004; Charlier *et al.*, 2009; Cebrián *et al.*, 2010). Sin embargo, la mayor problemática, cuando se presentan conteos elevados de *Staphylococcus* es la posible producción de enterotoxina estafilocócica, la cual es causa recurrente de intoxicación por ingesta de productos lácteos contaminados con *S. aureus* (Clarisse *et al.*, 2013).

En la década pasada se iniciaron estudios sobre la comprensión de los mecanismos de defensa y la expresión de genes de *S. aureus* en respuesta al estrés ácido, osmótico y la regulación del pH intracelular (Weinrick *et al.*, 2004). La prevalencia y supervivencia de bacterias del genero *Staphylococcus* en altas concentraciones en los quesos analizados en este estudio podría deberse a la resistencia y adaptación al ambiente ecológico QC. Sin embargo, los resultados de los conteos encontrados en *Staphylococcus* durante la elaboración y almacenamiento de QC es sinónimo de malas prácticas de manufactura, una inadecuada pasteurización (en las queserías semitecnificadas) y ambientes de procesamiento inadecuados.

Por otro lado, los resultados de los análisis de detección de toxina estafilocócica en los quesos colectados en queserías semitecnificadas mostraron que el 50 % de las muestras de Q0, 33.3 % de Q15 y 16.6 % de Q30 resultaron positivos a la determinación de esta toxina, en cambio para

las muestras de queserías artesanales los resultados evidenciaron que 50 % de las muestras de Q0, 33.3 % de Q15 y 66.6 % de Q30 mostraron presencia de toxina estafilocócica. Los resultados de este estudio proporcionan evidencia de una alta prevalencia de toxina estafilocócica en los quesos analizados, incluso en quesos de LP elaborados con procesos semitecnificados se pudo detectar la presencia de toxina estafilocócica. A pesar de que la detección de toxina en las muestras disminuyó en las muestras con 15 y 30 días de almacenamiento, aun así existe una alta prevalencia de esta toxina en los quesos bajo estudio. Estos resultados indican que los quesos analizados representan un riesgo potencial para la salud de los consumidores.

Algunos estudios se han realizado a fin de conocer la relación entre la presencia de toxina estafilocócica y la carga microbiana de *Staphylococcus* utilizando como modelo diferentes quesos, en todos los estudios se ha concluido que a concentraciones superiores de 10^5 UFC de *Staphylococcus*, es probable detectar la presencia de toxina estafilocócica (Tatini *et al.*, 1973; Gómez-Lucía *et al.*, 1992). Lo anterior, sustenta el hecho de que las altas concentraciones de *Staphylococcus* encontradas en las muestras de QC impactan de manera significativa en la formación y presencia de toxina estafilocócica en QC.

Respecto a la determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes* en los quesos, se encontró ausencia total de este microorganismo en todas las muestras analizadas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Díaz-Cinco *et al.* (1992) y Tunick *et al.* (2008), ambos autores reportaron ausencia total de *L. monocytogenes* en muestras de QC elaborados con LC y LP. La ausencia o presencia de este patógeno en las muestras de QC permite evaluar el grado de riesgo que este alimento puede representar por su consumo. De hecho, *L. monocytogenes* es una de las bacterias

patógenas por la cual existe preocupación a nivel mundial debido a constantes brotes alimentarios asociados a quesos contaminados con esta bacteria (De Buyser *et al.*, 2001; Todd, 2011) . En este sentido, el producto QC de las queserías estudiadas no representaría un riesgo de intoxicación por *L. monocytogenes*.

6.1.3 Bacterias Ácido Lácticas

Los resultados de los conteos de BAL inherentes a las muestras de QC durante su manufactura y almacenamiento se muestran en la tabla 5. Los análisis microbiológicos mostraron que las BAL fue el grupo microbiano que presentó los conteos más elevados en todas las muestras bajo estudio. Al igual que en los demás grupos microbianos, en los conteos de BAL se encontraron diferencias significativas entre productores artesanales y semitecnificados, observándose conteos más elevados en LC y queso de los productores artesanales.

Por otro lado, se encontró un comportamiento heterogéneo en los conteos de BAL por efecto del muestreo analizado, incluso las queserías semitecnificadas, que utilizan CI a fin de mantener un control sobre la microbiota y por lo tanto homogenizar las características finales del QC presentan este comportamiento, lo cual refleja la falta de estandarización en sus procesos de manufactura. Respecto a los conteos y el posible efecto de los tiempos de almacenamiento se encontraron diferencias significativas, mas no se observa un aumento ascendente de las concentraciones de BAL, lo cual obedece a la heterogeneidad de la dinámica poblacional de estas bacterias a lo largo del almacenamiento del QC.

Tabla 5. Conteos^b de BAL en muestras colectadas durante la manufactura y almacenamiento de queso Chihuahua.

Quesería	Muestras	Microorganismo		
		<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
Muestreo 1				
A	LC	7.29±0.02	8.34±0.03	8.57±0.08
	QO	5.87±0.01	7.87±0.00	7.73±0.00
	Q15	7.77±0.03	8.99±0.00	8.97±0.03
	Q30	6.11±0.00	8.14±0.05	6.95±0.01
B	LC	6.10±0.00	7.94±0.02	7.46±0.00
	QO	5.32±0.04	8.23±0.01	8.10±0.02
	Q15	7.16±0.05	7.42±0.02	8.11±0.02
	Q30	7.76±0.02	8.49±0.00	7.49±0.01
C	LC	-----	-----	-----
	QO	6.14±0.00	7.07±0.05	7.15±0.02
	Q15	6.02±0.04	6.87±0.04	6.47±0.06
	Q30	5.73±0.03	6.17±0.05	7.00±0.06
D	LC	5.81±0.03	8.57±0.00	8.71±0.02
	QO	6.66±0.00	8.64±0.02	6.41±0.02
	Q15	6.41±0.03	7.45±0.03	6.43±0.04
	Q30	6.40±0.01	8.41±0.00	7.44±0.04
E	LC	7.24±0.00	8.31±0.00	7.72±0.03
	QO	7.92±0.03	8.22±0.01	7.78±0.02
	Q15	8.03±0.00	9.46±0.03	8.95±0.01
	Q30	8.59±0.02	8.77±0.04	7.51±0.04
F	LC	7.62±0.00	8.33±0.01	7.21±0.05
	QO	8.27±0.01	8.11±0.00	7.11±0.00
	Q15	7.04±0.01	10.13±0.00	8.41±0.00
	Q30	7.27±0.01	8.26±0.02	7.64±0.03
Muestreo 2				
A	LC	5.98±0.03	8.21±0.03	7.40±0.03
	QO	8.09±0.02	8.21±0.00	8.23±0.01
	Q15	6.97±0.02	7.46±0.05	7.13±0.04
	Q30	6.16±0.02	7.71±0.02	6.69±0.04
B	LC	5.91±0.01	9.76±0.00	8.33±0.00
	QO	5.28±0.01	8.59±0.01	8.55±0.01
	Q15	7.61±0.00	7.94±0.04	7.83±0.01
	Q30	7.25±0.02	7.88±0.00	6.68±0.03
C	LC	-----	-----	-----
	QO	7.31±0.01	6.74±0.02	5.80±0.03
	Q15	5.61±0.03	6.32±0.01	6.43±0.02
	Q30	5.99±0.05	5.32±0.01	6.36±0.01
D	LC	7.40±0.01	7.39±0.04	7.74±0.01
	QO	5.63±0.04	6.20±0.03	5.96±0.01
	Q15	6.41±0.01	7.23±0.05	6.69±0.04
	Q30	5.70±0.03	7.20±0.03	6.35±0.02
E	LC	5.93±0.09	8.22±0.04	6.80±0.03
	QO	8.24±0.02	9.08±0.03	8.87±0.02
	Q15	8.07±0.02	8.35±0.05	7.97±0.03
	Q30	8.24±0.01	8.70±0.02	7.07±0.01
F	LC	5.77±0.01	8.49±0.06	6.83±0.07
	QO	8.87±0.02	8.03±0.00	7.95±0.01
	Q15	6.67±0.06	7.76±0.05	7.18±0.01
	Q30	8.78±0.03	8.07±0.04	6.98±0.02

Para la manufactura de queso de las queserías C y D se utilizó la misma leche cruda (solo varió el proceso de manufactura) por esto solo se muestran los resultados de leche cruda para la quesería D, sin embargo es el mismo resultado para ambas queserías

^a Leche cruda (LC); queso con 0 días de almacenamiento (QO); queso con 15 días de almacenamiento (Q15); queso con 30 días de almacenamiento (Q30)

^b Promedio Log UFC/mL±DE para leche cruda; promedio Log UFC/g±DE para muestras de queso

^c A, B, C (productores a escala semitecnificada); D, E, F (productores artesanales)

Los conteos de BAL encontrados en LC oscilaron en el rango de 5.77 a 7.62 \log_{10} UFC/g para para *Lactobacillus*, de 7.39 a 9.76 \log_{10} UFC/g para *Lactococcus* y de 6.80 a 8.71 \log_{10} UFC/g para *Streptococcus*. Los conteos de BAL que se realizan rutinariamente a la LC para evaluar su carga inicial, no son indicio de inocuidad de la misma. Sin embargo, en el caso de los quesos artesanales elaborados con LC, es de vital importancia conocer la carga microbiana de BAL en este alimento debido a que existe una relación directa entre la presencia de estas bacterias y las características deseadas de olor, sabor textura principalmente en este tipo quesos.

En este contexto los conteos de BAL en LC encontrados en este estudio están cerca de 2 a 3 \log_{10} UFC/g superiores a los valores encontrados para LC de vaca, oveja y cabra reportados por Delavenne *et al.* (2012), cerca de 2 \log_{10} UFC/g por encima de la LC confinada en tanques de almacenamiento utilizada para la elaboración de Queso Caciocavallo Palermitano (Settanni *et al.*, 2012) y muy similares a lo encontrado por Randazzo *et al.* (2006) en LC usada en la manufactura de queso Pecorino Siciliano. Sin embargo, factores tales como las condiciones de ordeño, el estado fisiológico de los animales de ordeño, ambientes de procesamiento así como la microbiota asociada a los tanques de almacenamiento son los factores más importantes que definirán la carga microbiana de la LC usada para la manufactura de quesos y en general de los productos lácteos (Beresford y Williams, 2004; Settanni *et al.*, 2012).

Por otro lado, los resultados de conteos microbianos obtenidos para *Lactobacillus* presentes en los quesos, se presentaron en el rango de 5.28 a 8.87 \log_{10} UFC/g para Q0, 5.61 a 8.03 \log_{10} UFC/g para Q15 y 5.70 a 8.70 \log_{10} UFC/g para Q30. Respecto a los conteos de *Lactococcus* los rangos oscilaron de entre 6.20 a 9.08 \log_{10} UFC/g para Q0, 6.32 a 10.13 \log_{10} UFC/g para Q15 y 5.32 a 8.77 para Q30. Por último, los conteos para *Streptococcus*

se encontraron en el rango de 5.80 a 8.87 para Q0, 6.43 a 8.47 log₁₀ UFC/g para Q15 y 6.35 a 7.64 para Q30.

Los resultados de este estudio son muy similares a los encontrados por Bricker *et al.* (2005), que reportaron conteos de *Lactobacillus* en QC elaborado con LP en el rango de 3.94 a 7.24 log₁₀ UFC/g y de 6.27 a 9.08 log₁₀ UFC/g en QC elaborado con LC y para *Lactococcus* en el rango de 7.15 a 7.45 log₁₀ UFC/g en QC elaborado con LP y de 6.41 a 8.70 log₁₀ UFC/g en QC elaborado con LC. Además, estos mismos autores concluyen, al igual que lo encontrado en este estudio, que las diferencias significativas en los conteos de BAL fueron por efecto del nivel tecnológico de las queserías; encontrando conteos más elevados en queserías artesanales. Lo anterior, obedece en gran medida a la falta de pasteurización de la leche y a la elevada carga microbiana asociada a la LC utilizada en las diferentes queserías estudiadas.

Por último, es importante mencionar que este es el primer estudio en México donde se reporta la evolución de los conteos microbianos de BAL a lo largo de la manufactura y almacenamiento del QC, y aunque se observa un comportamiento heterogéneo en los valores encontrados para los tiempos de almacenamientos analizados, en general los conteos microbianos de BAL no fueron menores a los encontrados en los Q0. Lo cual pone de manifiesto que las BAL son la microbiota predominante durante los tiempos de almacenamientos evaluados. Por lo anterior, sería conveniente realizar estudios para evaluar el impacto de los cambios en los conteos microbianos de BAL en los tiempos de almacenamiento bajo estudio, respecto a su papel en las características de sabor, olor y textura típicas del QC

6.2 Perfiles Microbianos DGGE

Los resultados de los perfiles microbianos obtenidos por DGGE de las muestras colectadas en diferentes queserías durante la manufactura y almacenamiento del QC se muestran en las Figuras 4-9. Las identidades de las bandas seleccionadas de los geles DGGE se muestra en la Tabla 6. Los perfiles microbianos obtenidos por DGGE de las bacterias inherentes a las muestras estudiadas revelaron la presencia de una gran diversidad de bacterias a lo largo de la manufactura y almacenamiento del QC. En las 6 queserías analizadas fue posible detectar BAL de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella* y *Carnobacterium* y *Enterococcus* como las más importantes en este queso, y de las cuales un consorcio microbiano conformado por *Streptococcus thermophilus* (UTO 12 en Figura 4), *Lactococcus lactis* subps. *lactis* (UTO 18 en Figura 4) y *Leuconostoc mesenteorides* subsp. *mesenteorides* (UTO 41 en figura 8) fueron las especies presentes en cada una de las etapas de la manufactura y almacenamiento del QC (excepto por *Lactococcus lactis* subps. *lactis* que no fue detectado en las queserías C y D, Figuras 5 y 6).

La dinámica poblacional observada en los perfiles microbianos mostró que el consorcio microbiano predominante a lo largo del proceso no estuvo presente de inicio en la LC, ya que solo fue detectado desde la C y permaneció en los quesos durante los tiempos de almacenamiento analizados. Lo anterior indica que parte del consorcio microbiano o quizás la totalidad del mismo, forma parte de los CIs utilizado por las queserías semitecnificadas, las cuales tras la pasteurización de la LC añaden CI o bien su presencia en el QC puede deberse a la formación de biopelículas bacterianas de este consorcio en los equipos y utensilios utilizados en la manufactura de este queso (Somers *et al.*, 2001; Kubota *et al.*, 2008; Settanni *et al.*, 2012).

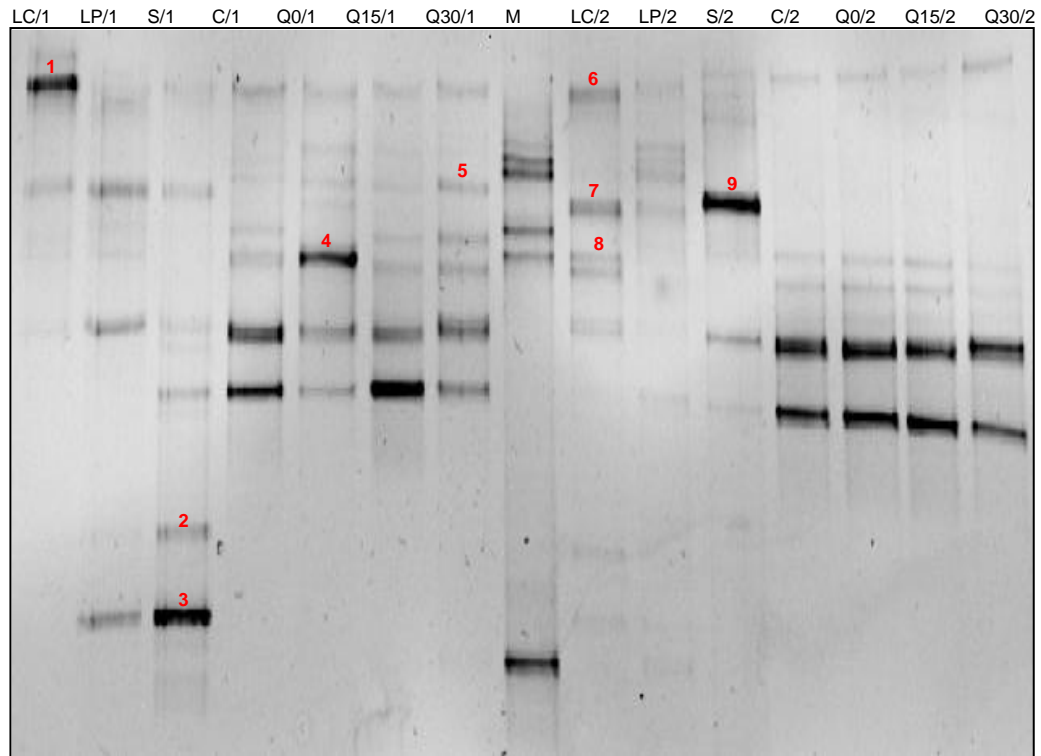


Figura 3. Perfil DGGE de bacterias presentes en muestras del proceso de manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua de la quesería A. LC-Q30 son las muestras analizadas. 1 y 2 representan los muestreos realizados. M: marcador molecular (mezcla de ADNA de *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. fermentum* y *Lb. acidophilus*).

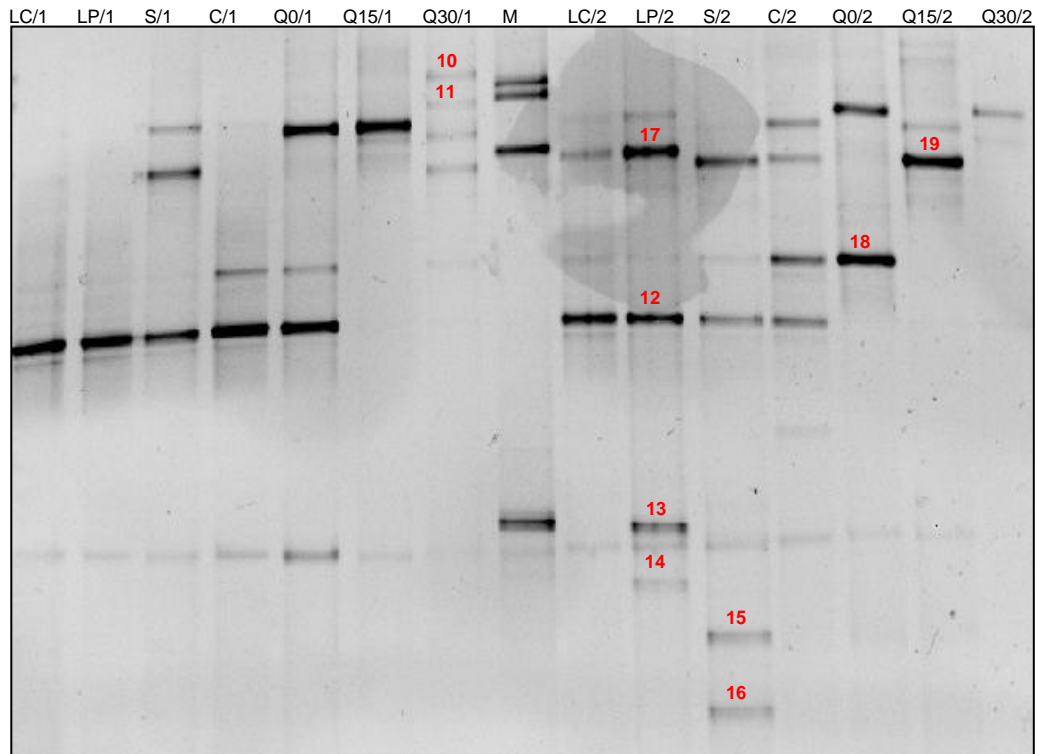


Figura 4. Perfil DGGE de bacterias presentes en muestras del proceso de manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua de la quesería B. LC-Q30 son las muestras analizadas. 1 y 2 representan los muestreos realizados. M: marcador molecular (mezcla de ADN de *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. fermentum* y *Lb. acidophilus*)

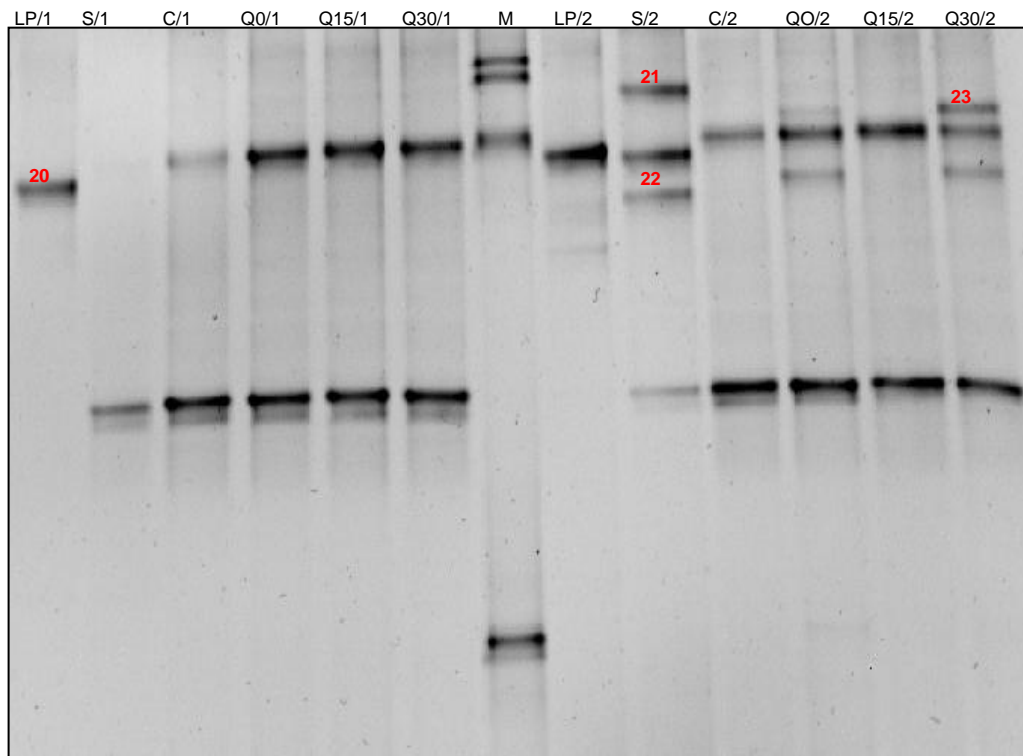


Figura 5. Perfil DGGE de bacterias presentes en muestras del proceso de manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua de la quesería C. LP-Q30 son las muestras analizadas. 1 y 2 representan los muestreos realizados. M: marcador molecular (mezcla de ADN de *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. fermentum* y *Lb. acidophilus*)

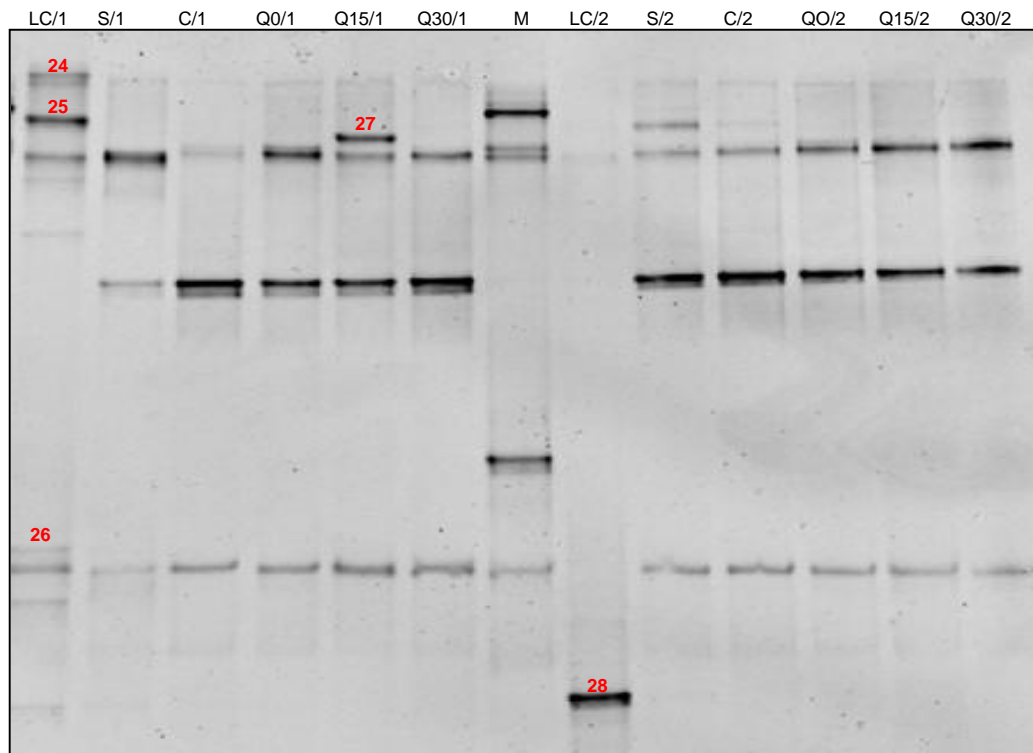


Figura 6. Perfil DGGE de bacterias presentes en muestras del proceso de manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua de la quesería D. LC-Q30 son las muestras analizadas. 1 y 2 representan los muestreos realizados. M: marcador molecular (mezcla de ADN de *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. fermentum* y *Lb. acidophilus*)

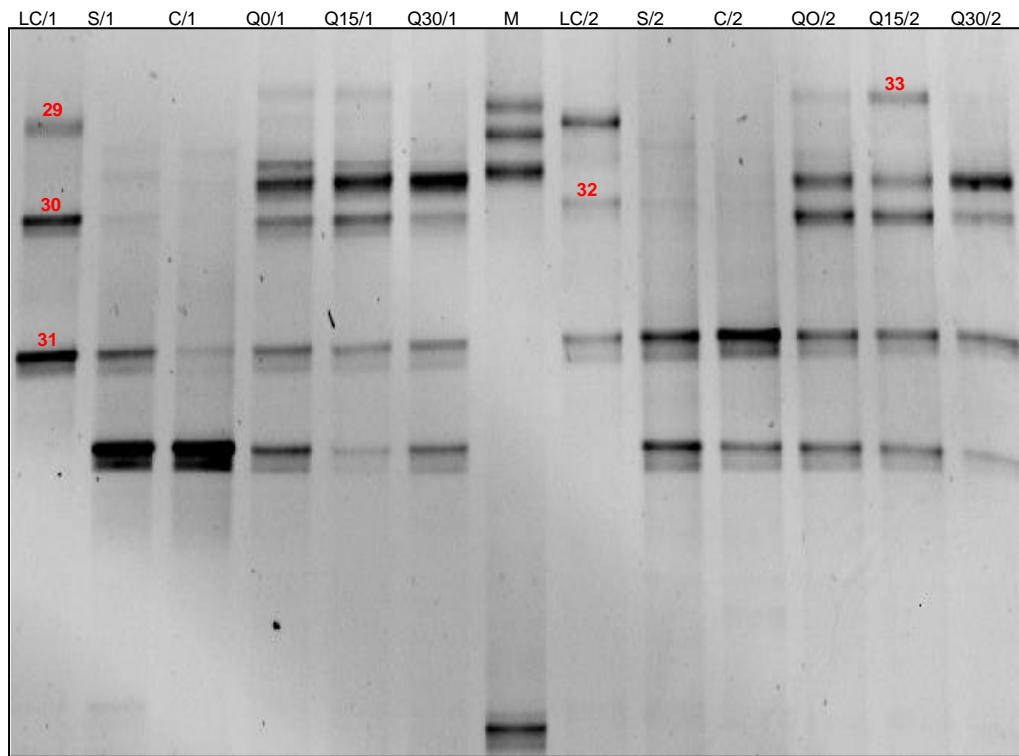


Figura 7. Perfil DGGE de bacterias presentes en muestras del proceso de manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua de la quesería E. LC-Q30 son las muestras analizadas. 1 y 2 representan los muestreos realizados. M: marcador molecular (mezcla de ADN de *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. fermentum* y *Lb. acidophilus*)

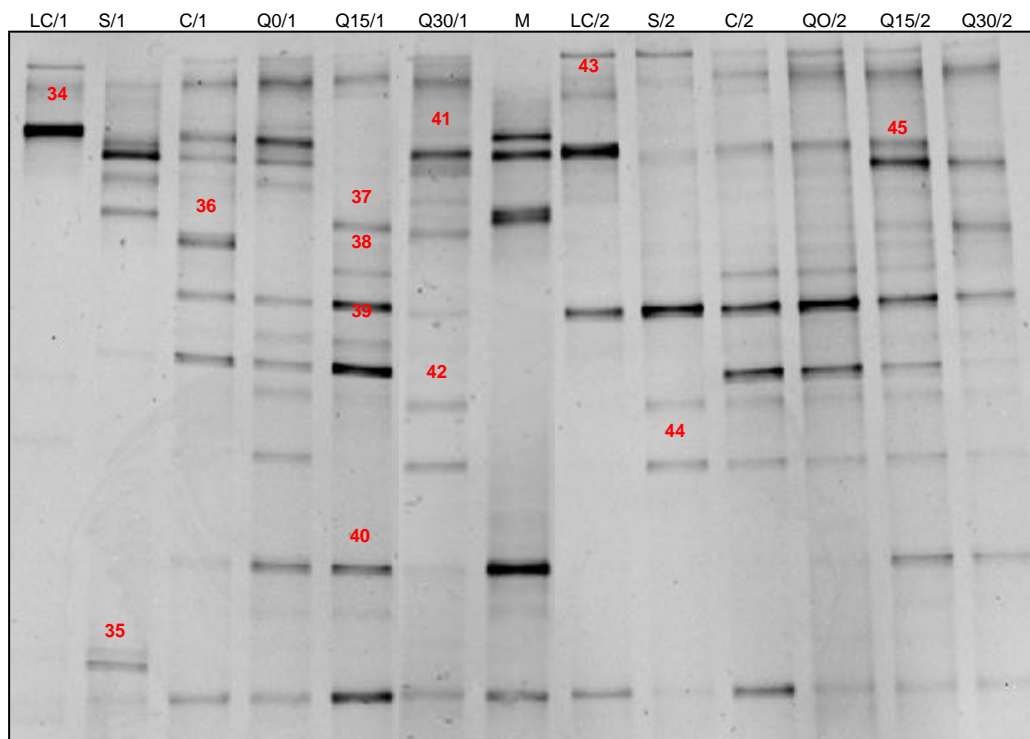


Figura 8. Perfil DGGE de bacterias presentes en muestras del proceso de manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua de la quesería F. LC-Q30 son las muestras analizadas. 1 y 2 representan los muestreos realizados. M: marcador molecular (mezcla de ADN de *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. fermentum* y *Lb. acidophilus*)

Tabla 6. Identidad de las bandas de los geles DGGE de las muestras obtenidas durante la manufactura y almacenamiento del queso Chihuahua.

UTOs	secuencia relativa más cercana	% de identidad	numero de acceso Gen Bank
8	<i>Carnobacterium divergens</i>	93	FJ656707
26	<i>Pantoea vagans</i>	96	JX077090
29, 10, 11	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	99	KC951926
30, 32	<i>Streptococcus parauberis</i>	97	KF193975
15	<i>Pantoea ananatis</i>	94	JX683900
20, 19	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	96	AY126157
12	<i>Streptococcus thermophilus</i>	96	DQ001071
31	<i>Rothia</i> sp.	95	KF815533
25	<i>Pseudomona putida</i>	99	HQ613736
42	<i>Pantoea</i> sp.	97	FJ445213
34	<i>Lactococcus piscium</i>	97	JN226415
5, 45	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99	GU458344
21	<i>Enterococcus faecium</i>	99	FJ619708
28	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	AB371713
6, 43, 1, 24	<i>Lactococcus garvieae</i>	97	KF012887
4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99	AY660890
35	<i>Gluconobacter</i> sp.	98	FN421116
3	<i>Serratia liquefaciens</i>	98	GU213126
9, 38	<i>Pseudomona</i> spp.	99	KF442783
17, 41	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	96	HM218808
7	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	97	KF263652
37	<i>Lactobacillus curvatus</i>	98	DQ336384
46	<i>Pseudomona fluorescens</i>	99	JN257092
14	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	96	JX128255
40	<i>Lactobacillus casei</i>	94	HQ697612
36	<i>Lactobacillus helveticus</i>	97	KF149860
16	<i>Pantoea</i> sp.	99	FR775104
2	<i>Serratia</i> sp.	98	FM161514
22	<i>Enterococcus faecalis</i>	97	GU417285
13	<i>Lactobacillus casei</i>	99	HQ697612
18	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	97	EU091443
44	<i>Buttiauxella</i> sp.	97	FM161527
27, 23	<i>Weissella paramesenteroides</i>	97	AB841318

Los resultados del presente estudio indican que las bacterias que conforman el consorcio dominante en el QC no forman parte de la composición

microbiana de la LC usada para la manufactura de QC. Sin embargo, la dinámica poblacional permitió observar que el consorcio microbiano logra desplazar a las bacterias presentes en la LC (en su mayoría patógenas y deteriorativas, ver identidades de las bandas 24, 25, 26, 29, 30, 31 y 34 en la Tabla 6) y predominar a lo largo del proceso de manufactura y almacenamiento.

La presencia de este consorcio predominante en el QC encontrado en este estudio, concuerda con lo reportado por Renye *et al.* (2011), estos autores lograron aislar e identificar BAL tales como: *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* como los microorganismos más predominantes en la mayoría de los aislados de bacterias presentes en QC elaborado con LC y LP.

Streptococcus thermophilus y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* son ampliamente utilizados como CIs por la industria láctea para la elaboración de productos lácteos fermentados. En la manufactura de quesos son muy utilizados debido a su capacidad de fermentar rápidamente lactosa y por producir en un tiempo relativamente corto, ácido suficiente para acidificar la leche y producir las características deseables en los geles de caseína utilizados para la elaboración de quesos así como participar activamente en la definición de la textura, formación de compuestos de aroma y sabor. Estos microorganismos han sido ampliamente encontrados como parte de la biota dominante en investigaciones realizadas con el fin de caracterizar la microbiota presente en algunas variedades de quesos como el Mozzarella di Bufala Campana DOP (Ercolini *et al.*, 2004), Robiola di Roccaverano (Bonetta *et al.*, 2008), Casín DOP (Alegria *et al.*, 2009), Ragusano DOP (Lortal *et al.*, 2009), Castelmagno DOP (Dolci *et al.*, 2010), Pecorino Crotonese (Randazzo *et al.*, 2010) y tipo Caciocavallo (Settanni *et al.*, 2012).

Recientes estudios han evidenciado que *Streptococcus thermophilus* es capaz de producir exopolisacáridos que ayudan a mejorar la textura e impactan significativamente en la mejoría del rendimiento en la producción de quesos, incluso se ha demostrado que *Streptococcus thermophilus* produce compuestos de aroma y sabor que resultan ser agradables al paladar en quesos modelos (Jiménez-Guzmán *et al.*, 2009; Di Cagno *et al.*, 2014)

Por otro lado, *Lactococcus lactis*/subsp. *lactis* además de ser utilizado como CIs en la manufactura de queso, ha demostrado tener la capacidad de producir péptidos bioactivos y exopolisacáridos que cumplen con distintas actividades biológicas (Pan y Mei, 2010; Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2010), por lo que su uso en tecnología de alimentos para la producción de alimentos funcionales resulta ser prometedor y un fructífero campo de estudios futuros.

Por otra parte, *Leuconostoc mesenteoides*/subsp. *mesenteroides* al igual que *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ha sido ampliamente identificado como parte de la microbiota asociada a quesos como el Roncal e Idiazabal (Arizcun *et al.*, 1997), de algunas variedades de quesos artesanales Franceses (Cibik *et al.*, 2000) así como también en los quesos Bukuljac (Nikolic *et al.*, 2008), Manchego DOP (Nieto-Arribas *et al.*, 2010) y Caciotta (Aquilanti *et al.*, 2011). *Leuconostoc* spp., crece lentamente en leche, pero durante de maduración produce compuestos como acetaldehído, diacetilo y acetoína a partir de lactato y citrato, que contribuyen a las propiedades organolépticas y sensoriales de los quesos (McSweeney y Sousa, 2000)

Estudios de caracterización de las propiedades funcionales de especies de *Leuconostoc*, han demostrado que bacterias de este género puede ser explotadas en tecnología de alimentos debido a su capacidad por producir exopolisacáridos también conocidos como glicopolisacáridos (principalmente

dextranos de sacarosa), los cuales actualmente son utilizados por la industria alimentaria como espesantes o biotexturizantes de nueva generación (Vedamuthu, 1994). Recientemente, se ha encontrado estos glicopolisacáridos producidos por ciertas cepas de *Leuconostoc*, también pueden actuar como moléculas señal e interactuar con el huésped y por lo tanto tener capacidad inmunoestimulante (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002; Ruas-Madiedo y de los Reyes-Gavilán, 2005). Incluso, debido a su capacidad por acelerar el proceso de maduración y producir compuestos de aroma y sabor se han realizado estudios de caracterización de algunas cepas de *Leuconostoc* y explorado su efecto como cultivos adjuntos en la elaboración de queso tipo Cheddar (Martley y Crow, 1993), Brine (Skeie *et al.*, 2008), Manchego (Poveda *et al.*, 2003), Ras (El-Shafei, 1994) y Tetilla (Menéndez *et al.*, 2004)

Por todo lo anteriormente mencionado, podemos inferir que 1: el consorcio microbiano encontrado a lo largo de la manufactura y almacenamiento de QC es la microbiota autóctona del QC y 2) debido al impacto en las características deseables en distintas variedades de quesos donde se ha encontrado que las bacterias pertenecientes al consorcio dominante inherente a la manufactura y almacenamiento de QC, podemos establecer que la presencia de estos microorganismos podrían estar íntimamente relacionadas con impartir las características sensoriales, organolépticas y de textura que distinguen al QC. Estos hallazgos deben ser ampliamente estudiados con el fin de establecer el rol específico de estos microorganismos sobre las características típicas de este queso y estar en condiciones de explotarlo tecnológicamente para la producción de un cultivo iniciador para la elaboración estandarizada de QC.

VII. CONCLUSIONES

En base a los hallazgos encontrados y objetivos planteados en el presente estudio podemos concluir que:

1. Se caracterizó e identificó una diversidad de bacterias de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* y *Enterococcus* como las principales poblaciones que componen la microbiota del QC.
2. La dinámica de poblaciones evidenció que un consorcio microbiano conformado por *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* fue la microbiota dominante en la manufactura y almacenamiento del QC.
3. Los gradientes utilizados para los análisis mediante DGGE fueron cruciales para obtener perfiles microbianos adecuados de las muestras analizadas.
4. Desde el punto de vista de la inocuidad, los conteos encontrados en las muestras analizadas fueron superiores a los recomendados por la NOM-243-SSA1-2010, lo cual refleja que el producto QC de las queserías bajo estudio tienen problemas de higiene. A pesar de esto, se observó una disminución en los conteos de microorganismos indicadores de calidad y en la presencia de enterotoxina estafilocócica durante el periodo de almacenamiento del QC, probablemente debido al efecto protector de las BAL, que fueron identificadas como la microbiota dominante.

5. Las diferencias en los conteos microbianos reflejó la falta de buenas prácticas de manufactura (BPM) y estandarización entre e intraquerasías influenciado por el nivel tecnológico de las mismas y a los tiempos de almacenamiento del QC, lo cual podría traducirse en posibles problemas de contaminación post-proceso.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Es recomendable implementar BPM en las queserías a fin de disminuir los posibles problemas de contaminación post-proceso, lo cual muy probablemente esté afectando la calidad sanitaria del QC.
2. Es necesario promover y concientizar a los productores de las queserías intervenidas sobre la implementación de un programa integral que capacite a los integrantes de la cadena productora de QC dirigido a resaltar y necesidad de las BPM y su impacto en la calidad final del producto QC.
3. Con el fin de disminuir los conteos elevados de *Staphylococcus* en la leche cruda y la alta incidencia de su enterotoxina en las muestras de QC, es necesario que los productores implementen mejoras en las prácticas de ordeño, inspeccionen rutinariamente la salud del ganado lechero así como realicen pruebas rápidas que identifiquen la calidad sanitaria de la leche previa a la elaboración del QC.
4. Es importante ampliar la investigación sobre la posible presencia de biopelículas microbianas en los equipos de ordeño, tanques de almacenamiento, líneas de alimentación y en general en todos los equipos y materiales usados en la manufactura de QC. Así mismo, evaluar su efecto sobre la calidad sanitaria final del QC.
5. Una estrategia que pueden adoptar los productores para evitar la formación, adaptación y resistencia de microorganismos que pueden formar biopelículas a lo largo de la manufactura de QC, es la rotación

rutinaria de los desinfectantes utilizados en la sanitización de los equipos y materiales usados en la elaboración de QC.

6. Debido a que durante la manufactura y a 30 días de almacenamiento de QC, los cambios en las poblaciones microbianas no permitieron encontrar conteos microbianos dentro de los permitidos por la NOM-SSA1-2010 y garantizar la calidad sanitaria de los productos QC analizados, se sugiere realizar estudios posteriores donde se involucren tiempos de almacenamiento más prolongados, debido a que se observó una disminución en los conteos de microorganismos indicadores de calidad y enterotoxina estafilocócica a medida que transcurría el tiempo de almacenamiento. Lo anterior, posibilitaría a los productores de QC estar dentro de los lineamientos que establecen la normativa mexicana y posicionar al producto QC como seguro dentro del territorio nacional así como explorar la posibilidad de satisfacer nichos de mercado internacionales, que exigen productos con altos estándares de calidad.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Alegria, A., P. Alvarez-Martin, N. Sacristan, E. Fernandez, S. Delgado y B. Mayo. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casin, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology* 136(1):44-51.
- Alessandria, V., P. Dolci, K. Rantsiou, D. Pattono, A. Dalmaso, T. Civera y L. Cocolin. 2010. Microbiota of the Planalto de Bolona: an artisanal cheese produced in uncommon environmental conditions in the Cape Verde Islands. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(12):2211-2221.
- Ampe, F., N. Ben Omar, C. Moizan, C. Wachter y J. P. Guyot. 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and environmental microbiology* 65(12):5464-5473.
- Aquilanti, L., V. Babini, S. Santarelli, A. Osimani, A. Petruzzelli y F. Clementi. 2011. Bacterial dynamics in a raw cow's milk Caciotta cheese manufactured with aqueous extract of *Cynara cardunculus* dried flowers. *Letters in Applied Microbiology* 52(6):651-659.
- Arizcun, C., Y. Barcina y P. Torre. 1997. Identification of lactic acid bacteria isolated from Roncal and Idiazabal cheeses. *Le Lait* 77(6):729-736.
- Arslan, S., A. Eyi y F. Özdemir. 2011. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. *Journal of Dairy Science* 94(12):5851-5856.

- Baruzzi, F., R. Lagonigro, L. Quintieri, M. Morea y L. Caputo. 2012. Occurrence of non-lactic acid bacteria populations involved in protein hydrolysis of cold-stored high moisture Mozzarella cheese. *Food Microbiology* 30(1):37-44.
- Beresford, T. y A. Williams. 2004. The Microbiology of Cheese Ripening. en *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol. 1: General Aspects. Pag: 287-317. 3ra ed. Elsevier Academic Press, Oxford.
- Beresford, T. P., N. A. Fitzsimons, N. L. Brennan y T. M. Cogan. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11(4):259-274.
- Bockelmann, W., K. P. Willems, H. Neve y K. H. Heller. 2005. Cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* 15(6-9):719-732.
- Bonaïti, C., M. N. Leclercq-Perlat, E. Latrille y G. Corrieu. 2004. Deacidification by *Debaryomyces hansenii* of Smear Soft Cheeses Ripened Under Control Conditions: Relative Humidity and Temperature Influences. *Journal of Dairy Science* 87(11):3976-3988.
- Bonetta, S., S. Bonetta, E. Carraro, K. Rantsiou y L. Cocolin. 2008. Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE. *Food Microbiology* 25(6):786-792.
- Bourdichon, F., S. Casaregola, C. Farrokh, J. C. Frisvad, M. L. Gerds, W. P. Hammes, J. Harnett, G. Huys, S. Laulund, A. Ouwehand, I. B. Powell, J. B. Prajapati, Y. Seto, E. Ter Schure, A. Van Boven, V. Vankerckhoven, A. Zgodá, S. Tuijelaars y E. B. Hansen. 2012. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* 154(3):87-97.
- Brennan, N. M., T. M. Cogan, M. Loessner y S. Scherer. 2004. Bacterial surface-ripened cheeses. en *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 2: Major Cheese Groups. Pag:199-225. 3ra ed. Elsevier Academic Press Oxford.
- Bricker, A. L., D. Van Hekken, V. M. Guerrero y A. A. Gardea. 2005. Microflora isolated from Mexican Mennonite-style cheeses. *Food Protection Trends* 25(8):637-640.

- Brooks, J. C., B. Martinez, J. Stratton, A. Bianchini, R. Krokstrom y R. Hutkins. 2012. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiology* 31(2):154-158.
- Burns, P., F. Cuffia, M. Milesi, G. Vinderola, C. Meinardi, N. Sabbag y E. Hynes. 2012. Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. *Food Microbiology* 30(1):45-50.
- Calderón, A., F. García y G. Martínez. 2006. Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. *Revista MVZ Córdoba* 11(1):1-16.
- Callon, C., C. Delbès, F. Duthoit y M. C. Montel. 2006. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* 29(2):172-180.
- Cantor, M. D., T. van den Tempel, T. K. Hansen y Y. Ardö. 2004. Blue cheese. en *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 2: Major Cheese Groups. Pag:175-198. 3ra ed. Elsevier Academic Press, Oxford.
- Carminati, D., G. Giraffa, A. Quiberoni, A. Binetti, V. Suárez y J. Reinheimer. 2010. Advances and Trends in Starter Cultures for Dairy Fermentations. en *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. Pag: 177-192. Wiley-Blackwell. Vol.
- Casey, M. G., J. P. Häni, J. Gruskovnjak, W. Schaeren y D. Wechsler. 2006. Characterization of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyère PDO cheese. *Le Lait* 86(6):407-414.
- Cebrián, G., N. Sagarzazu, R. Pagán, S. Condón y P. Mañas. 2010. Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* 140(1):26-33.
- Cervantes-Escoto, F., A. Villegas de Gante, J. A. Cesín-Vargas y A. Espinoza-Ortega. 2008. Los Quesos Mexicanos Genuinos. Patrimonio cultural que debe rescatarse. 1ra ed. Mundi prensa México, México.
- Cibik, R., E. Lepage y P. Tailliez. 2000. Molecular Diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* Isolated from Traditional French

- Cheeses as Revealed by RAPD Fingerprinting, 16S rDNA Sequencing and 16S rDNA Fragment Amplification. *Systematic and Applied Microbiology* 23(2):267-278.
- Ciuciu Simion, A. M., C. Vizireanu, P. Alexe, I. Franco y J. Carballo. 2014. Effect of the use of selected starter cultures on some quality, safety and sensorial properties of Dacia sausage, a traditional Romanian dry-sausage variety. *Food Control* 35(1):123-131.
- Clarisse, T., S. Michèle, T. Olivier, E. Valérie, L. M. Vincent, H. Jacques-Antoine, G. Michel y V. Florence. 2013. Detection and quantification of staphylococcal enterotoxin A in foods with specific and sensitive polyclonal antibodies. *Food Control* 32(1):255-261.
- Cocolin, L., V. Alessandria, P. Dolci, R. Gorra y K. Rantsiou. 2013. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 167(1):29-43.
- Cocolin, L., L. F. Bisson y D. A. Mills. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 189(1):81-87.
- Cocolin, L., N. Innocente, M. Biasutti y G. Comi. 2004. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology* 90(1):83-91.
- Cocolin, L., M. Manzano, C. Cantoni y G. Comi. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied Environmental Microbiology* 67(11):5113-5121.
- COFOCALEC. 2004. NMX-F-700-COFOCALEC-2004. Sistema producto leche – Alimento – Lácteo – Leche cruda de vaca – Especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba. Disponible en: <http://cofocalec.org.mx/interna.php?tipo=1&id=190>. Accesado el: 10.11.13.

- COFOCALEC. 2010. NMX-F-738-COFOCALEC-2011. Sistema Producto Leche – Alimento – Lácteo – Queso Chihuahua – Denominación, especificaciones y métodos de prueba. Disponible en: <http://www.cofocalec.org.mx/interna.php?tipo=1&id=190>. Consultado: 22.01.13.
- Coppola, S., G. Blaiotta y D. Ercolini. 2008. Dairy Products. en *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Pag: 31-90. Vol. 1ra ed. L. Coccolin y D. Ercolini,(eds). Springer New York.
- Corsetti, A., J. Rossi y M. Gobbetti. 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 69(1–2):1-10.
- Cousin, F., D. G. Mater, B. Foligné y G. Jan. 2011. Dairy propionibacteria as human probiotics: A review of recent evidence. *Dairy Science and Technology* 91(1):1-26.
- Crow, V., B. Curry y M. Hayes. 2001. The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal* 11(4–7):275-283.
- Chamba, J. F. y F. Irlinger. 2004. Secondary and Adjunct Cultures. en *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan y T. P. Guinee,(eds). Elsevier Academic Press. Oxford.
- Charlier, C., M. Cretenet, S. Even y Y. Le Loir. 2009. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology* 131(1):30-39.
- Chávez-de la Peña, M. E., A. L. Higuera-Iglesias, M. A. Huertas-Jiménez, R. Báez-Martínez, J. Morales-de León, F. Arteaga-Cabello, S. Rangel-Frausto y S. Ponce de León-Rosales. 2001. Brote por *Salmonella enteritidis* en trabajadores de un hospital. *Salud Pública de México* 43:211-216.
- Chebeňová-Turcovská, V., K. Ženišová, T. Kuchta, D. Pangallo y B. Brežná. 2011. Culture-independent detection of microorganisms in traditional Slovakian bryndza cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150(1):73-78.

- Chen, H., S. Wang y M. Chen. 2008. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology* 25:492-501.
- D'Amico, D. J., M. J. Druart y C. W. Donnelly. 2008. 60-Day Aging Requirement Does Not Ensure Safety of Surface-Mold-Ripened Soft Cheeses Manufactured from Raw or Pasteurized Milk When *Listeria monocytogenes* is Introduced as a Postprocessing Contaminant. *Journal of Food Protection* 71(8):1563-1571.
- Dal Bello, B., L. Cocolin, G. Zeppa, D. Field, P. D. Cotter y C. Hill. 2012. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology* 153(1–2):58-65.
- De Buyser, M., B. Dufour, M. Maire y V. Lafarge. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology* 67(1–2):1-17.
- de Candia, S., M. De Angelis, E. Dunlea, F. Minervini, P. L. H. McSweeney, M. Faccia y M. Gobbetti. 2007. Molecular identification and typing of natural whey starter cultures and microbiological and compositional properties of related traditional Mozzarella cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 119(3):182-191.
- de la Rúa-Domenech, R. 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 86(2):77-109.
- De Oca-Flores, E. M., O. A. Castelán-Ortega, J. G. Estrada-Flores y A. Espinoza-Ortega. 2009. Oaxaca cheese: Manufacture process and physicochemical characteristics. *International Journal of Dairy Technology* 62(4):535-540.
- De Wit, M., G. Osthoff, B. Viljoen y A. Hugo. 2005. A comparative study of lipolysis and proteolysis in Cheddar cheese and yeast-inoculated Cheddar cheeses during ripening. *Enzyme and Microbial Technology* 37(6):606-616.
- Delavenne, E., J. Mounier, F. Déniel, G. Barbier y G. Le Blay. 2012. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and

- goat over one-year period. *International Journal of Food Microbiology* 155(3):185-190.
- Delgado, S., C. T. C. C. Rachid, E. Fernández, T. Rychlik, Á. Alegría, R. S. Peixoto y B. Mayo. 2013. Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively-cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing. *Food Microbiology* 36(1):103-111.
- Di Cagno, R., R. Coda, M. De Angelis y M. Gobbetti. 2013. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology* 33(1):1-10.
- Di Cagno, R., I. De Pasquale, M. De Angelis, S. Buchin, M. Calasso, P. F. Fox y M. Gobbetti. 2011. Manufacture of Italian Caciotta-type cheeses with adjuncts and attenuated adjuncts of selected non-starter lactobacilli. *International Dairy Journal* 21(4):254-260.
- Di Cagno, R., I. De Pasquale, M. De Angelis, S. Buchin, C. G. Rizzello y M. Gobbetti. 2014. Use of microparticulated whey protein concentrate, exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus*, and adjunct cultures for making low-fat Italian Caciotta-type cheese. *Journal of Dairy Science* 97(1):72-84.
- Diaz-Cinco, M. E., O. Fraijo, P. Grajeda, J. Lozano-Taylor y E. G. De Mejía. 1992. Microbial and Chemical Analysis of Chihuahua Cheese and Relationship to Histamine and Tyramine. *Journal of Food Science* 57(2):355-356.
- Didienne, R., C. Defargues, C. Callon, T. Meylheuc, S. Hulin y M.-C. Montel. 2012. Characteristics of microbial biofilm on wooden vats ('gerles') in PDO Salers cheese. *International Journal of Food Microbiology* 156(2):91-101.
- Dolci, P., V. Alessandria, K. Rantsiou, M. Bertolino y L. Cocolin. 2010. Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology* 143(1-2):71-75.
- Dolci, P., V. Alessandria, K. Rantsiou, L. Rolle, G. Zeppa y L. Cocolin. 2008. Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on

- lactic acid bacteria ecology. *International Journal of Food Microbiology* 122(3):302-311.
- Edite Bezerra da Rocha, M., F. d. C. O. Freire, F. Erlan Feitosa Maia, M. Izabel Florindo Guedes y D. Rondina. 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* 36(1):159-165.
- El-Jakee, J. K., N. E. Aref, A. Gomaa, M. D. El-Hariri, H. M. Galal, S. A. Omar y A. Samir. 2013. Emerging of coagulase negative staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: An environmental hazard. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 1(2):74-78.
- El-Shafei, H. 1994. Accelerated ripening of Ras cheese using cell free extract, freeze- and heat-shocked *Leuconostoc* spp. cultures. *Food/Nahrung* 38(6):599-605.
- Eliskases-Lechner, F., W. Ginzinger, H. Rohm y E. Tschager. 1999. Raw milk flora affects composition and quality of Bergkäse. 1. Microbiology and fermentation compounds. *Le Lait* 79(4):385-396.
- Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56(3):297-314.
- Ercolini, D., F. De Filippis, A. La Stora y M. Iacono. 2012. A “remake” of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese by high throughput sequencing. *Applied and environmental microbiology*.
- Ercolini, D., G. Frisso, G. Mauriello, F. Salvatore y S. Coppola. 2008. Microbial diversity in Natural Whey Cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology* 124(2):164-170.
- Ercolini, D., P. J. Hill y C. E. R. Dodd. 2003. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Applied and environmental microbiology* 69(6):3540-3548.
- Ercolini, D., G. Mauriello, G. Blaiotta, G. Moschetti y S. Coppola. 2004. PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology* 96(2):263-270.

- Ercolini, D., F. Russo, I. Ferrocino y F. Villani. 2009. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology* 26(2):228-231.
- Euzéby, J. P. 2013. LPSN (list of prokaryotic names with standing in nomenclature). Disponible en: <http://www.bacterio.net>. Accesado el: 21.11.13
- Falentin, H., N. Henaff, P. Le Bivic, S.-M. Deutsch, S. Parayre, R. Richoux, D. Sohier, A. Thierry, S. Lortal y F. Postollec. 2012. Reverse transcription quantitative PCR revealed persistency of thermophilic lactic acid bacteria metabolic activity until the end of the ripening of Emmental cheese. *Food Microbiology* 29(1):132-140.
- Ferreira, A. D. y B. C. Viljoen. 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology* 86(1–2):131-140.
- Filtborg, O., J. C. Frisvad y U. Thrane. 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 33(1):85-102.
- Fleet, G. H. 1990. Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* 68(3):199-211.
- Flint, S. H., P. J. Bremer y J. D. Brooks. 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling* 11(1):81-97.
- Flores-Magallón, R., A. A. Oliva-Hernández y J. A. Narváez-Zapata. 2011. Characterization of microbial traits involved with the elaboration of the Cotija cheese. *Food Science and Biotechnology* 20(4):997-1003.
- Flórez, A. B. y B. Mayo. 2006. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology* 110(2):165-171.
- Fontana, C., F. Cappa, A. Rebecchi y P. S. Cocconcelli. 2010. Surface microbiota analysis of Taleggio, Gorgonzola, Casera, Scimudin and Formaggio di Fossa Italian cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 138(3):205-211.

- Fontana, C., P. Sandro Cocconcelli y G. Vignolo. 2005. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *International Journal of Food Microbiology* 103(2):131-142.
- Fox, P., P. McSweeney y C. Lynch. 1998. Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* 53(2):83-89.
- Franciosi, E., G. De Sabbata, F. Gardini, A. Cavazza y E. Poznanski. 2011. Changes in psychrotrophic microbial populations during milk creaming to produce Grana Trentino cheese. *Food Microbiology* 28(1):43-51.
- Franciosi, E., L. Settanni, S. Carlin, A. Cavazza y E. Poznanski. 2008. A Factory-Scale Application of Secondary Adjunct Cultures Selected from Lactic Acid Bacteria During Puzzone di Moena Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science* 91(8):2981-2991.
- Fröhlich-Wyder, M. T. y H. P. Bachmann. 2004. Cheeses with propionic acid fermentation. en *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. .Vol. 2: Major Cheese Groups. Pag: 141-156 3ra ed. Elsevier Academic Press Oxford.
- Gala, E., S. Landi, L. Solieri, M. Nocetti, A. Pulvirenti y P. Giudici. 2008. Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. *International Journal of Food Microbiology* 125(3):347-351.
- Gautier, M. 1999. Propionibacterium. en *Encyclopedia of Food Microbiology*. Pag: 1850-1857.Vol. Elsevier Academic Press, Oxford.
- Giannino, M. L., M. Marzotto, F. Dellaglio y M. Feligini. 2009. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* 130(3):188-195.
- Giraffa, G. y D. Carminati. 2008. Molecular Techniques in Food Fermentation: Principles and Applications. en *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented foods*. Pag: 1-30.Vol. 1ra ed. Springer. New York.

- Golić, N., N. Čadež, A. Terzić-Vidojević, H. Šuranská, J. Beganović, J. Lozo, B. Kos, J. Šušković, P. Raspor y L. Topisirović. 2013. Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *International Journal of Food Microbiology* 166(2):294-300.
- Gómez-Lucía, E., J. Goyache, J. A. Orden, A. Domenech, F. Javier Hernandez, J. A. Ruiz-Santa Quiteria, B. Lopez, J. L. Blanco y G. Suárez. 1992. Growth of *Staphylococcus aureus* and Synthesis of Enterotoxin During Ripening of Experimental Manchego-Type Cheese. *Journal of Dairy Science* 75(1):19-26.
- Guillier, L., V. Stahl, B. Hezard, E. Notz y R. Briandet. 2008. Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *International Journal of Food Microbiology* 128(1):51-57.
- Gutiérrez-Méndez, N., J. C. Rodríguez-Figueroa, A. F. González-Córdova, G. V. Nevárez-Moorillón, B. Rivera-Chavira y B. Vallejo-Cordoba. 2010. Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems. *Canadian Journal of Microbiology* 56(5):432-439.
- Gutiérrez-Méndez, N., B. Vallejo-Cordoba, A. F. González-Córdova, G. V. Nevárez-Moorillón y B. Rivera-Chavira. 2008. Evaluation of Aroma Generation of *Lactococcus lactis* with an Electronic Nose and Sensory Analysis. *Journal of Dairy Science* 91(1):49-57.
- Harris, N. B., J. Payeur, D. Bravo, R. Osorio, T. Stuber, D. Farrell, D. Paulson, S. Treviso, A. Mikolon y A. Rodriguez-Lainz. 2007. Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. *Applied and environmental microbiology* 73(3):1025-1028.
- Hata, T., R. Tanaka y S. Ohmomo. 2010. Isolation and characterization of plantaricin ASM1: A new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. *International Journal of Food Microbiology* 137(1):94-99.
- Hayaloglu, A. A. y S. Kirbag. 2007. Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese. *International Journal of Food Microbiology* 115(3):376-380.

- Hernández-Morales, C., A. Hernández-Montes, E. Aguirre-Mandujano y A. V. De Gante. 2010. Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterisation of Mexican Añejo cheese. *International Journal of Dairy Technology* 63(4):552-560.
- Hojo, K., R. Watanabe, T. Mori y N. Taketomo. 2007. Quantitative Measurement of Tetrahydromenaquinone-9 in Cheese Fermented by Propionibacteria. *Journal of Dairy Science* 90(9):4078-4083.
- Holzapfel, W. H., R. Geisen y U. Schillinger. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24(3):343-362.
- Hutkins, R. W. 2007. Cap. 2: Microorganisms and Metabolism. en *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Pag. 15-66. Vol. R. W. Hutkins, (eds). Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Irlinger, F. y J. Mounier. 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology* 20(2):142-148.
- Jackson, K. A., M. Biggerstaff, M. Tobin-D'Angelo, D. Sweat, R. Klos, J. Nosari, O. Garrison, E. Boothe, L. Saathoff-Huber, L. Hainstock y R. P. Fagan. 2011. Multistate Outbreak of *Listeria monocytogenes* Associated with Mexican-Style Cheese Made from Pasteurized Milk among Pregnant, Hispanic Women. *Journal of Food Protection* 74(6):949-953.
- Jiménez-Guzmán, J., A. Flores-Nájera, A. E. Cruz-Guerrero y M. García-Garibay. 2009. Use of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of Mexican Panela cheese. *LWT - Food Science and Technology* 42(9):1508-1512.
- Jorgensen, H. J., T. Mork, H. R. Hogasen y L. M. Rorvik. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *Journal of Applied Microbiology* 99(1):158-166.

- Kisand, V. y J. Wikner. 2003. Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *Journal of Microbiological Methods* 54(2):183-191.
- Kloos, W. E. y T. L. Bannerman. 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* 7(1):117-140.
- Kongo, J. M. 2013. Chap. 1: Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments. en *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. Vol. J. M. Kongo,(eds). Intech, Croacia.
- Kubota, H., S. Senda, N. Nomura, H. Tokuda y H. Uchiyama. 2008. Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106(4):381-386.
- Kure, C. F., I. Skaar y J. Brendehaug. 2004. Mould contamination in production of semi-hard cheese. *International Journal of Food Microbiology* 93(1):41-49.
- Lafarge, V., J.-C. Ogier, V. Girard, V. Maladen, J.-Y. Leveau, A. Gruss y A. Delacroix-Buchet. 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and environmental microbiology* 70(9):5644-5650.
- Laleye, L., R. Simard, B. Lee, R. Holley y R. Giroux. 1987. Involvement of heterofermentative lactobacilli in development of open texture in cheeses. *Journal of Food Protection* 50.
- Larpin-Laborde, S., M. Imran, C. Bonaïti, N. Bora, R. Gelsomino, S. Goerges, F. Irlinger, M. Goodfellow, A. C. Ward, M. Vancanneyt, J. Swings, S. Scherer, M. Guéguen y N. Desmasures. 2011. Surface microbial consortia from Livarot, a French smear-ripened cheese. *Canadian Journal of Microbiology* 57(8):651-660.
- Latorre, A. A., J. S. Van Kessel, J. S. Karns, M. J. Zurakowski, A. K. Pradhan, K. J. Boor, B. M. Jayarao, B. A. Houser, C. S. Daugherty y Y. H. Schukken. 2010. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science* 93(6):2792-2802.

- Lee, S. H. I., C. H. Camargo, J. L. Gonçalves, A. G. Cruz, B. T. Sartori, M. B. Machado y C. A. F. Oliveira. 2012. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk and the milking environment from small-scale dairy farms of São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science* 95(12):7377-7383.
- Leriche, F., A. Bordessoules, K. Fayolle, R. Karoui, K. Laval, L. Leblanc y E. Dufour. 2004. Alteration of raw-milk cheese by *Pseudomonas* spp.: monitoring the sources of contamination using fluorescence spectroscopy and metabolic profiling. *Journal of Microbiological Methods* 59(1):33-41.
- Leroy, F. y L. De Vuyst. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15(2):67-78.
- Licitra, G. 2010. World wide traditional cheeses: Banned for business? *Dairy Science and Technology* 90(4):357-374.
- Lindsay, D., V. S. Brözel, J. F. Mostert y A. Von Holy. 2002. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *Journal of Applied Microbiology* 92(2):352-361.
- Lortal, S., A. Di Blasi, M.-N. Madec, C. Pediliggieri, L. Tuminello, G. Tanguy, J. Fauquant, Y. Lecuona, P. Campo, S. Carpino y G. Licitra. 2009. Tina wooden vat biofilm: A safe and highly efficient lactic acid bacteria delivering system in PDO Ragusano cheese making. *International Journal of Food Microbiology* 132(1):1-8.
- Lowy, F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine* 339(8):520-532.
- Lynch, K. M., P. L. H. McSweeney, E. K. Arendt, T. Uniacke-Lowe, S. Galle y A. Coffey. 2014. Isolation and characterisation of exopolysaccharide-producing *Weissella* and *Lactobacillus* and their application as adjunct cultures in Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 34(1):125-134.

- Ma, J., J. Kong y M. Ji. 2009. Detection of the lactic acid bacteria in commercial yoghurts by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology* 15 (4):534-539.
- MacDonald, P. D., R. E. Whitwam, J. D. Boggs, J. N. MacCormack, K. L. Anderson, J. W. Reardon, J. R. Saah, L. M. Graves, S. B. Hunter y J. Sobel. 2005. Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. *Clinical Infectious Diseases* 40(5):677-682.
- Mariani, C., R. Briandet, J. F. Chamba, E. Notz, A. Carnet-Pantiez, R. N. Eyoug y N. Oulahal. 2007. Biofilm Ecology of Wooden Shelves Used in Ripening the French Raw Milk Smear Cheese Reblochon de Savoie. *Journal of Dairy Science* 90(4):1653-1661.
- Mariani, C., N. Oulahal, J. F. Chamba, F. Dubois-Brissonnet, E. Notz y R. Briandet. 2011. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening. *Food Control* 22(8):1357-1362.
- Martley, F. G. y V. L. Crow. 1993. Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *International Dairy Journal* 3(4-6):461-483.
- Masoud, W., M. Takamiya, F. K. Vogensen, S. Lillevang, W. A. Al-Soud, S. J. Sørensen y M. Jakobsen. 2011. Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. *International Dairy Journal* 21(3):142-148.
- Massa, S., F. Gardini, M. Sinigaglia y M. E. Guerzoni. 1992. *Klebsiella pneumoniae* as a Spoilage Organism in Mozzarella Cheese. *Journal of Dairy Science* 75(6):1411-1414.
- McSweeney, P. L. H. y M. J. Sousa. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* 80(3):293-324.

- Meile, L., G. Le Blay y A. Thierry. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: Propionibacterium and Bifidobacterium. *International Journal of Food Microbiology* 126(3):316-320.
- Menéndez, S., R. Godínez, M. Hermida, J. A. Centeno y J. L. Rodríguez-Otero. 2004. Characteristics of "Tetilla" pasteurized milk cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. *Food Microbiology* 21(1):97-104.
- Merry, R., J. y D. Davies, R. 1999. Propionibacteria and their role in the biological control of aerobic spoilage in silage. *Lait* 79(1):149-164.
- Moreno-Enriquez, R. I., A. Garcia-Galaz, E. Acedo-Felix, H. Gonzalez-Rios, J. E. Call, J. B. Luchansky y M. E. Diaz-Cinco. 2007. Prevalence, Types, and Geographical Distribution of *Listeria monocytogenes* from a Survey of Retail Queso Fresco and Associated Cheese Processing Plants and Dairy Farms in Sonora, Mexico. *Journal of Food Protection* 70(11):2596-2601.
- Mounier, J., R. Gelsomino, S. Goerges, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, S. Scherer, J. Swings, G. F. Fitzgerald y T. M. Cogan. 2005. Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Applied and environmental microbiology* 71(11):6489-6500.
- Muyzer, G., E. C. De Waal y A. G. Uitterlinden. 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(3):695-700.
- Nam, Y.-D., S.-Y. Lee y S.-I. Lim. 2012. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing. *International Journal of Food Microbiology* 155(1–2):36-42.
- Netz, D. J. A., R. Pohl, A. G. Beck-Sickinger, T. Selmer, A. J. Pierik, M. d. C. d. F. Bastos y H.-G. Sahl. 2002. Biochemical Characterisation and Genetic Analysis of Aureocin A53, a New, Atypical Bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Molecular Biology* 319(3):745-756.

- Neuman, W. 2011. Raw Milk Cheesemakers Fret Over Possible New Rules. Disponible en: http://www.nytimes.com/2011/02/05/business/05cheese.html?_r=1. Consultado el: 1.12.13
- Nieto-Arribas, P., S. Seseña, J. M. Poveda, L. Palop y L. Cabezas. 2010. Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. *Food Microbiology* 27(1):85-93.
- Nikolic, M., A. Terzic-Vidojevic, B. Jovicic, J. Begovic, N. Golic y L. Topisirovic. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 122(1-2):162-170.
- Özer, B. H. 1999. Natural antimicrobial systems. Lactoperoxidase and Lactoferrin. en *Encyclopedia of Food Microbiology*. Vol. R. K. Robinson, (eds). Elsevier, Oxford.
- Pagedar, A., J. Singh y V. K. Batish. 2012. Adaptation to benzalkonium chloride and ciprofloxacin affects biofilm formation potential, efflux pump and haemolysin activity of *Escherichia coli* of dairy origin. *Journal of Dairy Research* 79(04):383-389.
- Pan, D. y X. Mei. 2010. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. *Carbohydrate Polymers* 80(3):908-914.
- Panelli, S., J. N. Buffoni, C. Bonacina y M. Feligini. 2012. Identification of moulds from the Taleggio cheese environment by the use of DNA barcodes. *Food Control* 28(2):385-391.
- Parente, E. y T. M. Cogan. 2004. Starter cultures: General aspects. en *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. Volume 1. P. L. H. M. T. M. C. Patrick F. Fox y P. G. Timothy, (eds). Academic Press.
- Paul, M., A. Nuñez, D. L. Van Hekken y J. A. Renye. 2012. Sensory and protein profiles of Mexican Chihuahua cheese. *Journal of Food Science and Technology*:1-7.

- Pedersen, T. B., D. Ristagno, P. L. H. McSweeney, F. K. Vogensen y Y. Ardö. 2013. Potential impact on cheese flavour of heterofermentative bacteria from starter cultures. *International Dairy Journal* 33(2):112-119.
- Place, R. B., D. Hiestand, H. R. Gallmann y M. Teuber. 2003. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., A Starter Culture Component for Surface Ripened Semi-Hard Cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* 26(1):30-37.
- Podkowik, M., J. Y. Park, K. S. Seo, J. Bystroń y J. Bania. 2013. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* 163(1):34-40.
- Pomeon, T. 2007. El Queso Cotija, México. Un producto con marca colectiva queso "Cotija Región de origen", en proceso de adquisición de una Denominación de Origen. FAO/IICA. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Poveda, J. M., M. J. Sousa, L. Cabezas y P. L. H. McSweeney. 2003. Preliminary observations on proteolysis in Manchego cheese made with a defined-strain starter culture and adjunct starter (*Lactobacillus plantarum*) or a commercial starter. *International Dairy Journal* 13(2-3):169-178.
- Powell, I. B., M. C. Broome y G. K. Y. Limsowtin. 2011. Cheese Starter Cultures: General Aspects. en *Encyclopedia of Dairy Sciences Vol. Second ed.* W. F. Editor-in-Chief: John,(eds). Academic Press, San Diego.
- Randazzo, C. L., I. Pitino, A. Ribbera y C. Caggia. 2010. Pecorino Crotonese cheese: Study of bacterial population and flavour compounds. *Food Microbiology* 27(3):363-374.
- Randazzo, C. L., E. E. Vaughan y C. Caggia. 2006. Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: Microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *International Journal of Food Microbiology* 109(1-2):1-8.
- Rantsiou, K., R. Urso, P. Dolci, G. Comi y L. Cocolin. 2008. Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *International Journal of Food Microbiology* 126(1-2):36-42.

- Renye, J. A., G. A. Somkuti, M. Paul y D. L. Van Hekken. 2009. Characterization of antilisterial bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolates from Hispanic-style cheeses. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36(2):261-268.
- Renye, J. A., G. A. Somkuti, D. L. Van Hekken y V. M. Guerrero-Prieto. 2011. Short communication: Characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. *Journal of Dairy Science* 94(7):3311-3315.
- Riahi, M. H., I. C. Trelea, D. Picque, M. N. Leclercq-Perlat, A. Hélias y G. Corrieu. 2007. A Model Describing *Debaryomyces hansenii* Growth and Substrate Consumption During a Smear Soft Cheese Deacidification and Ripening. *Journal of Dairy Science* 90(5):2525-2537.
- Rodríguez-Figueroa, J. C., R. Reyes-Díaz, A. F. González-Córdova, R. Troncoso-Rojas, I. Vargas-Arispuro y B. Vallejo-Cordoba. 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science* 93(11):5032-5038.
- Rodríguez-Nogales, J. M. y F. Vázquez. 2007. Application of electrophoretic and chemometric analysis to predict the bovine, ovine and caprine milk percentages in Panela cheese, an unripened cheese. *Food Control* 18(5):580-586.
- Rodríguez, E., B. González, P. Gaya, M. Nuñez y M. Medina. 2000. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal* 10(1–2):7-15.
- Romano, P., A. Capece y L. Jespersen. 2006. Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts. en *Yeasts in Food and Beverages*. Vol. A. Querol y G. Fleet,(eds). Springer Berlin Heidelberg.
- Rossetti, L., M. E. Fornasari, M. Gatti, C. Lazzi, E. Neviani y G. Giraffa. 2008. Grana Padano cheese whey starters: Microbial composition and strain distribution. *International Journal of Food Microbiology* 127(1–2):168-171.

- Ruas-Madiedo, P. y C. G. de los Reyes-Gavilán. 2005. Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science* 88(3):843-856.
- Ruas-Madiedo, P., J. Hugenholtz y P. Zoon. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 12(2-3):163-171.
- Rubio-Lozano, M. S., C. D. Alcazar-Montañez, R. Alonso-Morales y J. F. Núñez Espinoza. 2006. Detección de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en vía pública en la Ciudad de México. *Veterinaria México* 37(4):417-419.
- Saeed, S., S. Ahmad y S. A. Rasool. 2004. Antimicrobial spectrum, production and mode of action of staphylococcin 188 produced by *Staphylococcus aureus* 188. *Pak. J. Pharm. Sci* 17:1-8.
- Saithong, P., W. Panthavee, M. Boonyaratanakornkit y C. Sikkhamondhol. 2010. Use of a starter culture of lactic acid bacteria in plaa-som, a Thai fermented fish. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110(5):553-557.
- Sauer, K., A. H. Rickard y D. G. Davies. 2007. Biofilms and biocomplexity. *MICROBE-AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY* 2(7):347.
- Schvartzman, M. S., A. Maffre, F. Tenenhaus-Aziza, M. Sanaa, F. Butler y K. Jordan. 2011. Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurised or raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 145, Supplement 1(0):S31-S38.
- Sekiguchi, H., N. Tomioka, T. Nakahara y H. Uchiyama. 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology Letters* 23(15):1205-1208.
- Settanni, L., A. Di Grigoli, G. Tornambé, V. Bellina, N. Francesca, G. Moschetti y A. Bonanno. 2012. Persistence of wild *Streptococcus thermophilus* strains on wooden vat and during the manufacture of a traditional Caciocavallo type cheese. *International Journal of Food Microbiology* 155(1-2):73-81.

- Settanni, L., E. Franciosi, A. Cavazza, P. S. Cocconcetti y E. Poznanski. 2011. Extension of Tosèla cheese shelf-life using non-starter lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 28(5):883-890.
- Settanni, L. y G. Moschetti. 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology* 27(6):691-697.
- Sharma, M. y S. K. Anand. 2002a. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control* 13(6–7):469-477.
- Sharma, M. y S. K. Anand. 2002b. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology* 19(6):627-636.
- SIAP. 2013. Boletín de la leche enero-marzo de 2013. <http://www.siap.gob.mx/opt/estadistica/Derivada/BoletinLeche/LecheMar2013.pdf>. Accesado: 17.08.13
- Simões, M., L. C. Simões, I. Machado, M. O. Pereira y M. J. Vieira. 2006. Control of Flow-Generated Biofilms with Surfactants: Evidence of Resistance and Recovery. *Food and Bioproducts Processing* 84(4):338-345.
- Simões, M., L. C. Simões y M. J. Vieira. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology* 43(4):573-583.
- Skeie, S., A. Kieronczyk, S. Eidet, M. Reitan, K. Olsen y H. Østlie. 2008. Interaction between starter bacteria and adjunct *Lactobacillus plantarum* INF15D on the degradation of citrate, asparagine and aspartate in a washed-curd cheese. *International Dairy Journal* 18(2):169-177.
- Somers, E. B., M. E. Johnson y A. C. L. Wong. 2001. Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *Journal of Dairy Science* 84(9):1926-1936.
- Spinnler, H. E. y J. C. Gripon. 2004. Surface mould-ripened cheeses. en *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. Volume 2. P. L. H. M. T. M. C. Patrick F. Fox y P. G. Timothy,(eds). Academic Press.

- SSA. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5160755&fecha=27/09/2010.
Accesado el: 22.09.12
- Surono, S. y A. Hosono. 2011. Fermented Milks | Starter Cultures. en Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition).Vol. W. F. Editor-in-Chief: John,(eds). Academic Press, San Diego.
- Tatini, S. R., W. D. Wesala, J. J. Jezeski y H. A. Morris. 1973. Production of Staphylococcal Enterotoxin A in Blue, Brick, Mozzarella, and Swiss Cheeses. Journal of Dairy Science 56(4):429-435.
- Teh, K. H., S. Flint, J. Palmer, P. Andrewes, P. Bremer y D. Lindsay. 2014. Biofilm – An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? International Dairy Journal 34(1):32-40.
- Teixeira, P., Z. Lopes, J. Azeredo, R. Oliveira y M. J. Vieira. 2005. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. Food Microbiology 22(2–3):247-251.
- Thierry, A., S.-M. Deutsch, H. Falentin, M. Dalmasso, F. J. Cousin y G. Jan. 2011. New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. International Journal of Food Microbiology 149(1):19-27.
- Thierry, A., M.-B. Maillard, P. Bonnarne y E. Roussel. 2005. The Addition of *Propionibacterium freudenreichii* to Raclette Cheese Induces Biochemical Changes and Enhances Flavor Development. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(10):4157-4165.
- Thomas, T. y V. Crow. 1983. Mechanism of D (-)-lactic acid formation in Cheddar cheese. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology 18.
- Todd, E. C. D. 2011. The international risk governance council framework and its application to *Listeria monocytogenes* in soft cheese made from unpasteurised milk. Food Control 22(9):1513-1524.

- Torkar, K. G. y A. Vengušt. 2008. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control* 19(6):570-577.
- Torres-Llenez, M., B. Vallejo-Cordoba, M. Díaz-Cinco, M. Mazorra-Manzano y A. González-Córdova. 2006. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control* 17(9):683-690.
- Torres-Vitela, M. R., M. Mendoza-Bernardo, J. Castro-Rosas, C. A. Gomez-Aldapa, L. E. Garay-Martinez, V. Navarro-Hidalgo y A. Villarruel-López. 2012. Incidence of Salmonella, Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157: H7, and Staphylococcal Enterotoxin in Two Types of Mexican Fresh Cheeses. *Journal of Food Protection* 75(1):79-84.
- Tunick, M. H., D. L. Van Hekken, J. Call, F. J. Molina-Corral y A. A. Gardea. 2007. Queso Chihuahua: effects of seasonality of cheesemilk on rheology. *International Journal of Dairy Technology* 60(1):13-21.
- Tunick, M. H., D. L. Van Hekken, F. J. Molina-Corral, P. M. Tomasula, J. Call, J. Luchansky y A. A. Gardea. 2008. Queso Chihuahua: manufacturing procedures, composition, protein profiles, and microbiology. *International Journal of Dairy Technology* 61(1):62-69.
- Van Hekken, D. L., M. A. Drake, F. J. M. Corral, V. M. Guerrero-Prieto y A. A. Gardea. 2006. Mexican Chihuahua Cheese: Sensory Profiles of Young Cheese. *Journal of Dairy Science* 89(10):3729-3738.
- Van Hekken, D. L., M. H. Tunick, P. M. Tomasula, F. J. M. Corral y A. A. Gardea. 2007. Mexican Queso Chihuahua: rheology of fresh cheese. *International Journal of Dairy Technology* 60(1):5-12.
- Van Hoorde, K., I. Van Leuven, P. Dirinck, M. Heyndrickx, K. Coudijzer, P. Vandamme y G. Huys. 2010. Selection, application and monitoring of Lactobacillus paracasei strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 144(2):226-235.

- Van Hoorde, K., T. Verstraete, P. Vandamme y G. Huys. 2008. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food Microbiol* 25(7):929-935.
- Vedamuthu, E. R. 1994. The Dairy *Leuconostoc*: Use in Dairy Products. *Journal of Dairy Science* 77(9):2725-2737.
- Viçosa, G. N., P. M. Moraes, A. K. Yamazi y L. A. Nero. 2010. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. *Food Microbiology* 27(4):447-452.
- Viljoen, B. C. 2001. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology* 69(1–2):37-44.
- Villanueva-Carvajal, A., M. Esteban-Chávez, A. Espinoza-Ortega, C. M. Arriaga-Jordán y A. Dominguez-Lopez. 2012. Oaxaca cheese: flavour, texture and their interaction in a Mexican traditional pasta filata type cheese. *CyTA - Journal of Food* 10(1):63-70.
- Villegas de Gante, A. y F. Cervantes-Escoto. 2011. La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales* 19(38):146-164.
- Villegas de Gante, A. y F. C. Escoto. 2011. La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales* (38):146-164.
- Weinrick, B., P. M. Dunman, F. McAleese, E. Murphy, S. J. Projan, Y. Fang y R. P. Novick. 2004. Effect of mild acid on gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 186(24):8407-8423.
- Welthagen, J. J. y B. C. Viljoen. 1999. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Food Microbiology* 16(1):63-73.

Westall, S. y O. Filtenborg. 1998. Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. *Food Microbiology* 15(2):243-249.

Yescas, C. 2012. Fromagge, Cheese, Fromagge, Cheese, Queso. Disponible en: <http://lactography.com/espanol/fichero/fromage-cheese-queso-2/>. Consultado el: 14.02.2013

Zobell, C. E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of bacteriology* 46(1):39.