

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

**“DINÁMICA POBLACIONAL DE LA MICROBIOTA DEL  
QUESO DE PORO DE BALANCÁN DURANTE SU  
PROCESO DE FABRICACIÓN ARTESANAL”**

---

Por:

**María de los Ángeles de la Rosa Alcaraz**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

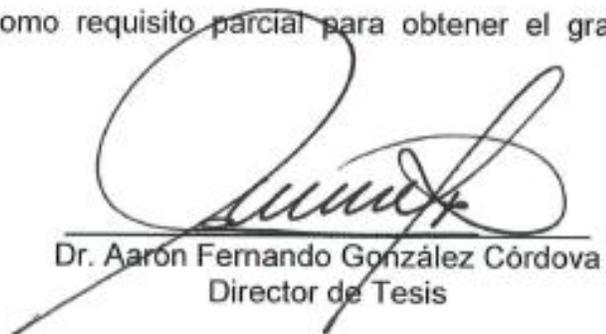
**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Hermosillo, Sonora

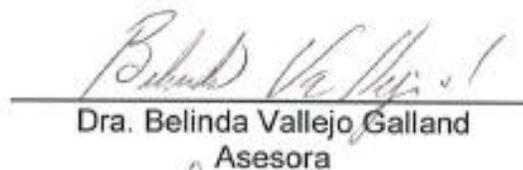
Diciembre de 2013

## APROBACIÓN

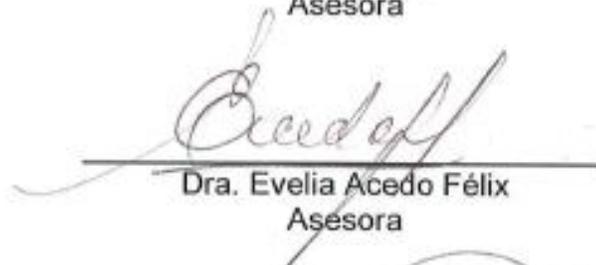
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de María de los Ángeles de la Rosa Alcaraz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



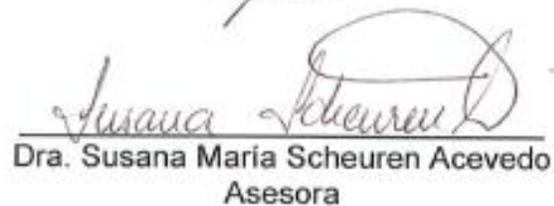
Dr. Aaron Fernando González Córdova  
Director de Tesis



Dra. Belinda Vallejo Galland  
Asesora



Dra. Evelia Acedo Félix  
Asesora



Dra. Susana María Scheuren Acevedo  
Asesora



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**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento económico para la realización de la Maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD) por brindarme el apoyo para realizar mis estudios de Maestría y por ser como un segundo hogar durante esta etapa.

A Dios por brindarme fortaleza, paciencia y sabiduría en los momentos más importantes de mi vida, por tantas bendiciones y sin lugar a duda por su gran amor.

Mención especial merece el Dr. Aarón Fernando González Córdova por la dirección de este trabajo, por su apoyo incondicional, su tiempo y la confianza depositada en mí para llevar a cabo este proyecto. Mi más sincero agradecimiento.

A la Dra. Belinda Vallejo Galland por sus opiniones y el apoyo brindado para la culminación de esta investigación, por siempre mostrarnos que trabajando se obtienen grandes cosas. Muchas gracias.

Al Dr. Adrián Hernández Mendoza, por sus consejos y disposición durante la realización de este trabajo, no sin mencionar las palabras de aliento durante esta etapa de formación.

A la Dra. Evelia Acedo Félix por su amable disposición y por compartir su experiencia en el campo de la microbiología molecular que fue imprescindible durante la realización de esta investigación. Gracias por formar parte de esta Tesis de Maestría.

A la Dra. Susana María Scheuren Acevedo quien en cada momento me oriento y asesoró con paciencia y singular amabilidad. Gracias por su calidad humana y por sus constantes ánimos hacia la culminación de este proyecto.

Al Dr. Luca Cocolin, de la Università degli Studi di Torino, Italia por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, donde viví una gran experiencia profesional y personal. En esta etapa mi más grato reconocimiento a la Dra. Valentina Alessandria por su apoyo y disposición durante mi estancia en Torino.

A la Dra. Gloria Yepiz Plascencia por su apoyo como Coordinadora de programas académicos, su disposición, amabilidad y tiempo brindado.

A la Dra. María de Jesús Torres Yanez, M. en C. Carmen Estrada Montoya, y M. en C. Ricardo Reyes Díaz, por su apoyo técnico y todos sus consejos siempre encaminados a la realización de trabajo de calidad, pero sobre todo gracias por su amistad.

A la Asociación de Productores de Queso de Poro de Balancán, Tabasco. Les expreso mi gratitud por abrirme sus puertas para emprender este proyecto. Muy especialmente al Ing. Emilio Castro Ehuan por su confianza y apoyo logístico siempre incondicional, sin ustedes no hubiera sido posible este trabajo.

A mis Maestros quienes me formaron durante esta etapa y que sin duda sembraron semilla para mi futuro en el área de investigación.

A mi amiga Brenda Rivera Soto quien estuvo siempre dispuesta a apoyarme y aconsejarme, gracias por darme la oportunidad de conocer a tu maravillosa familia, que en Sonora la sentí como mía.

A Ángel Martín Ortiz Estrada quien me brindó su apoyo incondicional durante este proyecto, compañero fiel y comprometido en esta etapa, te quiero mucho.

A mis más entrañables amigos quienes fueron una parte esencial en esta etapa Rigoberto Hernández, Martín Moreno, Elizabeth Reyes, Monserrat Félix, José Alfredo Quintana, gracias por su apoyo moral, académico y sobre todo por tantos consejos y compartir momentos bellos conmigo.

Finalmente pero no menos importante al personal de CIAD: Gerardo Reyna, Verónica Araiza, Laura García, Argelia Marín, Norma García, Héctor Galindo, Héctor Cota, Diana Pacheco, Olivia Parra, Alma Rosa Rivera, Leticia Benítez, Denia Ruíz, Gabi Padilla, Rocio Mejía, Carlos Izabal, mil gracias por su apoyo y amistad, por mostrar siempre la actitud de servicio y amables en cada momento.

## DEDICATORIA

A *Dios* porque no hay mayor expresión de amor que el que tú nos brindas. Gracias por darme fuerza, paciencia y sabiduría en los momentos más difíciles, gracias por tantas bendiciones y provisiones en esta etapa.

A mi madre *María de los Ángeles Alcaraz Reyes* por el gran amor que me profesas todos los días y las enseñanzas que has compartido conmigo hasta este momento de mi vida. Gracias por ser mi inspiración, mujer incansable. Te amo.

A mis *hermanas y hermanos*, gracias por siempre confiar en mí, por su apoyo moral y el gran cariño que me tienen. Además su alegría que a pesar de la distancia me la transmitían y me motivaban a seguir preparándome.

A mis *sobrinas* lindas. Gracias por ser el motor que me impulsa a seguir, para que el día de mañana yo pueda predicar con el ejemplo para ustedes. Las amo.

A *Ángel Ortiz Estrada* por ser mi brazo derecho en cada ocasión durante este tiempo que llevamos juntos, por hacerme amenos los momentos difíciles y más aún por compartir tiempo valioso conmigo.

A mis compañeros de laboratorio quien en distinta medida formaron parte de esta etapa y compartieron conmigo su amistad: Jesús Martín, Lulú Santiago, Trinidad López Armenta, Priscilia Heredia, Jesús Sosa, Samantha Loaiza, Isidro Méndez, Eleazar Tóala, Alejandro Santos, Fausto Cantú.

## CONTENIDO

Página

<b>LISTA DE FIGURAS</b> -----	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> -----	<b>xii</b>
<b>RESUMEN</b> -----	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b> -----	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> -----	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> -----	<b>3</b>
<b>2.1 Quesos Artesanales</b> -----	<b>3</b>
<b>2.2 Panorama General de la Quesería Artesanal en México</b> -----	<b>4</b>
<b>2.3 Queso de Poro de Balancán</b> -----	<b>5</b>
<b>2.3.1 Características</b> -----	<b>5</b>
<b>2.3.2 Proceso de elaboración</b> -----	<b>6</b>
<b>2.4 Composición Microbiológica de la Leche para la Elaboración de Quesos</b> -----	<b>9</b>
<b>2.4.1 Bacterias Ácido Lácticas Inicadoras (SLAB)</b> -----	<b>10</b>
<b>2.4.2 Microbiota Secundaria (NSLAB)</b> -----	<b>11</b>
2.4.2.1 OTROS MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LAS NSLAB.	13
2.4.2.2 BACTERIAS DETERIORATIVAS.-----	15
2.4.2.3 BACTERIAS PATÓGENAS. -----	17
<b>2.5 Efecto del Tratamiento Térmico a la Leche Destinada Para la Elaboración de Quesos</b> -----	<b>18</b>
<b>2.6 Importancia del Estudio de las Comunidades Microbianas en el Queso</b>	<b>20</b>
<b>2.7 Estudio de la Dinámica Poblacional de la Microbiota del Queso</b> --	<b>21</b>
<b>2.7.1 Técnicas dependientes de cultivo e independientes de cultivo</b>	<b>21</b>
<b>2.8 Limitaciones de las Técnicas</b> -----	<b>24</b>

<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>26</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Objetivos Específicos</b>	<b>27</b>
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>28</b>
<b>5.1 Muestreo</b>	<b>28</b>
<b>5.2 Análisis Físicoquímico</b>	<b>28</b>
<b>5.3 Análisis Microbiológico</b>	<b>29</b>
<b>5.3.1 Microorganismos Indicadores</b>	<b>29</b>
<b>5.3.2 Microorganismos Patógenos</b>	<b>29</b>
<b>5.3.3 Bacterias Ácido Lácticas</b>	<b>30</b>
<b>5.4 Extracción del DNA de las Matrices</b>	<b>30</b>
<b>5.5 Condiciones y Amplificación por PCR</b>	<b>31</b>
<b>5.6 Condiciones y Análisis por DGGE</b>	<b>32</b>
<b>5.7 Identificación de las Bandas de DGGE por Secuenciación</b>	<b>32</b>
<b>5.8 Análisis Estadístico</b>	<b>33</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>34</b>
<b>6.1 Análisis Físicoquímicos</b>	<b>34</b>
<b>6.1.1 Humedad</b>	<b>34</b>
<b>6.1.2 Proteína</b>	<b>36</b>
<b>6.1.3 Grasa</b>	<b>38</b>
<b>6.1.4 Acidez titulable</b>	<b>40</b>
<b>6.2 Análisis Microbiológico</b>	<b>43</b>
<b>6.2.1 Microorganismos Indicadores</b>	<b>43</b>
<b>6.2.1.1 MESÓFILOS AEROBIOS</b>	<b>43</b>
<b>6.2.1.2 COLIFORMES TOTALES</b>	<b>45</b>
<b>6.2.1.3 HONGOS Y LEVADURAS</b>	<b>47</b>
<b>6.2.2 Microorganismos Patógenos</b>	<b>50</b>
<b>6.2.2.1 E. COLI</b>	<b>50</b>

6.2.2.2. <i>S. AUREUS</i> -----	53
6.2.2.3 ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA-----	56
6.2.2.4 <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> -----	59
6.2.2.5 SALMONELLA-----	61
<b>6.2.3 Bacterias ácido lácticas (BAL)-----</b>	<b>64</b>
6.2.3.1 <i>LACTOCOCCUS</i> -----	64
6.2.3.2 <i>LACTOBACILLUS.</i> -----	66
6.2.3.4 <i>STREPTOCOCCUS.</i> -----	68
<b>6.3 Especies Bacterianas Involucradas en la Manufactura del QPB</b>	
<b>Detectadas Mediante Cultivo Independiente -----</b>	<b>70</b>
<b>7. CONCLUSIONES -----</b>	<b>83</b>
<b>8. RECOMENDACIONES -----</b>	<b>84</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA-----</b>	<b>85</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Queso de Poro de Balancán -----	6
Figura 2. Proceso de elaboración del queso de Poro de Balancán. -----	8
Figura 3. Diagrama de flujo de las técnicas dependientes e independientes de cultivo para el estudio de la microbiota del queso -----	23
Figura 4. Análisis DGGE de las muestras obtenidas en la manufactura del QPB de la quesería A. -----	72
Figura 5. Análisis DGGE de las muestras obtenidas en la manufactura del QPB de la quesería B. -----	73
Figura 6. Análisis DGGE de las muestras obtenidas en la manufactura del QPB de la quesería C. -----	74
Figura 7. Análisis DGGE de las muestras obtenidas en la manufactura del QPB de la quesería D. -----	75
Figura 8. Análisis DGGE de las muestras obtenidas en la manufactura de QPB de la quesería E -----	76
Figura 9. Análisis DGGE de las muestras obtenidas en la manufactura del QPB de la quesería F -----	80

## LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Composición promedio y desviación estándar del % de humedad de las muestras representativas del proceso de elaboración del queso de Poro de Balancán. -----	
-----	35
Tabla 2. Composición promedio y desviación estándar del % de proteína de las muestras representativas del proceso de elaboración del queso de Poro de Balancán. -----	
-----	37
Tabla 3. Composición promedio y desviación estándar del % de grasa de las muestras obtenidas durante el proceso de elaboración del queso de Poro de Balancán. -----	
-----	39
Tabla 4. Composición promedio y desviación estándar del contenido de ácido láctico de las muestras obtenidas durante el proceso de elaboración del queso de Poro de Balancán.-----	
-----	41
Tabla 5. Cuenta viable de microorganismos mesófilos aerobios asociada a la manufactura del queso de Poro de Balancán -----	
-----	44
Tabla 6. Cuenta viable de bacterias coliformes totales durante la manufactura del queso de Poro de Balancán-----	
-----	46
Tabla 7. Cuenta viable de levaduras asociada a la manufactura del queso de Poro de Balancán-----	
-----	48
Tabla 8. Cuenta viable de E. coli asociada a la manufactura del queso de Poro de Balancán. -----	
-----	51

## LISTA DE TABLAS (continuación)

	Página
Tabla 9. Cuenta viable de <i>S. aureus</i> asociada a la manufactura del queso de Poro de Balancán. -----	54
Tabla 10. Enterotoxina estafilocócica asociada a la manufactura de queso de Poro de Balancán a los 7 días de almacenamiento. -----	58
Tabla 11. <i>Listeria monocytogenes</i> asociada a la manufactura de queso de Poro de Balancán a los 7 días de almacenamiento. -----	60
Tabla 12. <i>Salmonella</i> asociada a la manufactura de queso de Poro de Balancán. -----	62
Tabla 13. Cuenta viable de <i>Lactococcus</i> asociada a la manufactura del queso de Poro de Balancán. -----	65
Tabla 14. Cuenta viable de <i>Lactobacillus</i> durante la manufactura del queso de Poro de Balancán. -----	67
Tabla 15. Cuenta viable de <i>Streptococcus</i> asociada a la manufactura del queso de Poro de Balancán. -----	69
Tabla 16. Identidad de las bandas detectadas obtenidas del análisis de DGGE a través de análisis directo de las muestras del proceso del QPB. -----	71

## RESUMEN

La microbiota asociada a los quesos artesanales juega un papel fundamental en el desarrollo de las características sensoriales típicas y en su inocuidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar la dinámica poblacional de la microbiota durante el proceso de manufactura artesanal del queso de Poro de Balancán (QPB) del estado de Tabasco. Muestras de leche cruda (LC), suero para cuajar (SPC), cuajada (C), suero de cuajada (SC) y queso (Q), de dos lotes de producción del QPB fueron recolectadas y estudiadas. A las muestras, se les determinó su composición fisicoquímica (humedad, proteína, grasa y acidez titulable), así como las cuentas de microorganismos indicadores (mesófilos aerobios, coliformes totales, hongos y levaduras), bacterias patógenas (*Salmonella*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y la presencia de su enterotoxina) y bacterias ácido lácticas (BAL) (*Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*). Para el estudio de la dinámica poblacional de la microbiota, se realizaron análisis mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) utilizando iniciadores universales dirigidos a la región V3 del gen 16S DNAr. Los resultados mostraron que la composición proximal del queso se encuentra dentro de lo establecido por la NOM-243-SSA1-2010. A pesar de la presencia de patógenos en LC, se observó una sucesión de las poblaciones en Q probablemente asociada a la acción de BAL (las cuales se encontraron en altas concentraciones). El análisis DGGE mostró que *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* fueron los microorganismos más predominantes durante la manufactura del QPB. No obstante, otras especies de BAL encontradas pudieran ser importantes en las características finales de este queso. Los resultados de este estudio permitieron identificar las poblaciones microbianas que conforman el ecosistema QPB y como los cambios en las poblaciones microbianas son esenciales para el desarrollo de las características finales de este queso.

**Palabras clave:** Dinámica poblacional, microbiota, queso de Poro de Balancán, PCR-DGGE.

## ABSTRACT

The microbiota associated to artisanal cheese plays a vital role in the development of their final characteristics and safety. The aim of this study was to evaluate the population dynamics of the microbiota in the Poro de Balancán cheese (PBC) in the State of Tabasco during the artisanal manufacturing process. Raw milk samples (RM) , natural whey starter (NWS), curd (C) , curd's whey (WC) and cheese (Ch) of two batches were collected. The physico-chemical composition (moisture, protein, fat and titratable acidity) of the samples was determined. Counts of indicator microorganisms (aerobic mesophilic bacteria, total coliforms, fungi and yeasts) pathogenic bacteria (*Salmonella*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* and the presence of its enterotoxin ) and lactic acid bacteria (LAB) such as *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus* were evaluated in specific medium. To study the population dynamics of the microbiota, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analyses were performed using universal primers to amplify V3 region of the 16S rDNA gene. The results indicated that the cheese's proximal composition is within the allowed parameters established by the Mexican current legislation (NOM-243-SSA1-2010). In spite of pathogens presence in RM, a succession of population in Ch was observed, probably associated to the action of BAL (which were found in high concentrations). DGGE analysis showed that *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* were the most prevalent microorganisms during the manufacturing of the PBC . However, other BAL species also found in this study, may be important in the final characteristics of this cheese. The results of this study allowed the identification of the microbial populations that make up the QP ecosystem and how changes

in these populations are essential for the development of the final characteristics of this cheese.

**Keywords: microbiota population dynamics, PCR-DGGE, Poro de Balancán Cheese.**

## 1. INTRODUCCIÓN

El queso de Poro de Balancán (QPB) es uno de los tres quesos (Queso Cotija Región de Origen y Queso Bola de Ocosingo) que recientemente han sido protegidos con una marca colectiva e indicación geográfica que regula su manufactura artesanal en México (Cervantes-Escoto *et al.*, 2008). Existen registros históricos de su elaboración que datan desde hace más de 50 años en el municipio de Balancán, Tabasco, México (Zona de los ríos) considerándose como uno de los más antiguos en este país y que a la fecha su proceso artesanal sigue conservándose.

Los problemas asociados a la inocuidad de este alimento se han presentado debido a su elaboración con leche cruda, lo que desobedece a lo indicado en la normativa mexicana para la elaboración de este alimento (SSA, 2010). Sin embargo en este queso nunca se han realizado estudios microbiológicos a través del proceso de manufactura así como la tipificación de su microbiota nativa, por lo tanto este estudio puede servir para dos propósitos; evaluar las condiciones higiénicas del proceso así como identificar los microorganismos que le dan la tipicidad a este alimento. Además se podrían considerar aquellos microorganismos de interés biotecnológico, conociendo la gran diversidad de microorganismos reportada en la literatura y que han sido encontrados en quesos artesanales (Coppola *et al.*, 2008, Alegría *et al.*, 2009, Randazzo *et al.*, 2009, Licitra, 2010).

En últimas fechas para describir los ecosistemas microbianos complejos, tales como el queso, es necesario combinar los métodos de cultivo independiente y microbiología tradicional y así sobreponer las limitaciones presentadas por las técnicas dependientes de cultivo. La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE), basado en la separación de

secuencias específicas amplificadas de las regiones del gen 16S rRNA, es una de las técnicas que ha sido aplicada ampliamente en el estudio de la microbiota de un gran número de productos lácteos (Randazzo *et al.*, 2002, Ercolini *et al.*, 2004, Dolci *et al.*, 2010).

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue conocer como está conformada la flora endógena del sistema QPB así como su dinámica durante el proceso de fabricación y en producto terminado mediante la técnica de DGGE, una vez conociendo esto se podrán abordar aspectos importantes de seguridad microbiológica asociada a la microbiota presente en esta matriz para que se puedan obtener finalmente quesos de calidad y que cumplan con los parámetros sanitarios que las Normas Oficiales Mexicanas indican, a pesar de su elaboración con leche cruda.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Quesos Artesanales

Los quesos artesanales son un segmento de productos que usualmente son hechos a mano y producidos a pequeña escala con atención particular del maestro quesero. En años recientes, ha sido reconocido que este tipo de quesos constituyen un nicho económico importante, en el cual los productores disfrutan de ventaja competitiva (ACS, 2011).

Estos productos tienen una fuerte vinculación al territorio de origen y por lo tanto son testimonio de la historia, de la cultura y del estilo de vida de las comunidades que los produce. Son caracterizados por la intensidad y diferencia en su sabor, con mucha variabilidad incluso dentro de la misma variedad de queso. Lo anterior es debido a una “biodiversidad de factores” tales como: el medio ambiente; el macro y micro-clima; la alimentación de los animales; el uso de leche cruda y su microflora natural; el uso de coagulantes naturales así como las herramientas tradicionales usadas durante su manufactura (Bonetta *et al.*, 2008, Licitra, 2010, Morales *et al.*, 2011).

Los factores previamente mencionados han marcado la pauta para diversas investigaciones que sin duda comparten un aspecto en común, el estudio del comportamiento de las comunidades microbianas a través de los procesos de elaboración y maduración de diversos quesos como un parámetro importante en sus características únicas (Alegría *et al.*, 2009, Casalta *et al.*, 2009, Dolci *et al.*, 2010). No obstante la calidad sanitaria de dichos productos no se ha dejado de lado, es así que este tema ha causado controversia debido

al uso de leche cruda como materia prima para su elaboración y nuestro país no ha sido la excepción, por lo tanto bastaría revisar si la leche es el principal factor de riesgo para este tipo de quesos.

Con base en lo anterior algunos estudios indican que el término “hecho con leche cruda” o “hecho con leche pasteurizada” podría ser insuficiente para evaluar el riesgo de estos alimentos. De hecho algunos productos elaborados a partir de leche cruda, especialmente aquellos que en su proceso incluyen una rápida y alta acidificación o cocinado de la cuajada, presentan una buena protección frente a los microorganismos patógenos, mientras algunos productos lácteos pasteurizados pueden presentar factores de riesgo como es un alto contenido de agua o múltiples etapas en el manejo favoreciendo la contaminación post-pasteurización. Por lo tanto se deberían de considerar otros aspectos al momento de evaluar la calidad de los quesos bajo algún proceso artesanal (De Buyser *et al.*, 2001).

## 2.2 Panorama General de la Quesería Artesanal en México

En México, el queso se ha elaborado desde tiempos de la Colonia cuando los conquistadores españoles trajeron a la Nueva España los primeros rebaños de cabras y ovejas, y posteriormente ejemplares de ganado criollo. En poco tiempo se desarrollaron zonas de fuerte actividad ganadera, que posteriormente fueron vinculadas a la actividad del queso (Cervantes-Escoto *et al.*, 2008).

Actualmente la industria de quesos en nuestro país está constituida principalmente por micro y pequeñas empresas destacándose como una de las agroindustrias de mayor importancia socioeconómica. No obstante en México solo existe un registro de la producción de quesos elaborados con leche pasteurizada, y a pesar de que la quesería artesanal elabora alrededor del 70% de los quesos que se consumen en el país, sus volúmenes no están registrados (Villegas de Gante y Escoto, 2011).

En nuestro país, existen alrededor de 40 tipos de quesos de los cuales solo ocho son procesados de manera industrial y el resto se elabora de manera artesanal. Estos últimos se caracterizan por conservar los métodos operativos y la utilización de escasa tecnología en su producción, el resultado del producto es en base a la habilidad y la destreza del personal operativo que normalmente carece de base científica (Villegas de Gante y Escoto, 2011).

No obstante, a pesar de que existe una gran diversidad de quesos artesanales, para la mayoría de la población es desconocida su existencia, su raíz cultural y la zona geográfica donde se elaboran. Como ejemplo se pueden mencionar algunos quesos como: el de Poro, el Bola de Ocosingo, el Cotija, el Crema Tropical, el Sierra, el Adobera, el de Cincho, el Asadero, el de Guaje, el de Hoja, el de Morral, el de rueda y el de Aro, que sin lugar a duda el saber-hacer ha permitido que cada uno adquiriera sus propias particularidades, sin embargo a la fecha solo los tres quesos mexicanos han logrado una distinción de marca colectiva de referencia geográfica, tal es el caso del queso de Poro de Balancán, queso Bola de Ocosingo y queso Cotija Región de Origen. (<http://www.jornada.unam.mx/2010/02/13/quesos.html>).

## 2.3 Queso de Poro de Balancán

### 2.3.1 Características

El QPB es generalmente fresco o ligeramente maduro; de pasta blanda, demineralizada y friable, esto debido a la disposición en capas de la cuajada durante el moldeado; cuando el queso es fresco al cortarse se pueden observar laminas apiladas (donde se pueden observar pequeños poros) producidas durante el prensado. Es elaborado con leche cruda de vaca principalmente de las cruzas de ganado pardo suizo-cebú. Se presenta en el mercado en piezas

pequeñas, prismático-rectangulares planas, con un peso que oscila entre 150 g y 1 kg. Las piezas vienen parafinadas (con parafina transparente) y envueltas en papel celofán amarillo, bajo el cual luce su etiqueta como se muestra en la **Figura 1** (Cervantes-Escoto *et al.*, 2008).



Figura 1. Queso de Poro de Balancán

### **2.3.2 Proceso de elaboración**

El proceso de elaboración consiste en la adición de suero ácido como coagulante a la leche para posteriormente cortar el gel en bloques, se permite un reposo de 2-4 horas. El moldeado se efectúa disponiendo la cuajada en moldes de madera, prismático rectangulares. Ahí la cuajada se autoprensa sometiéndose posteriormente a reposo de la cuajada por 24 h. Tras el reposo, la cuajada se dispone en moldes de formación donde se coloca una prensa rústica de madera durante los dos días siguientes, en este tiempo se efectúa un proceso de salado. Al término del prensado el queso se somete a un tiempo de maduración parcial en un armario de madera cerrado durante cuatro días, en este lapso se efectúa un salado final del queso frotando cada pieza con sal fina, en sucesivas aplicaciones, durante tres días. Después de cada frotado, las unidades se reintroducen en el armario de maduración.

Finalmente se lleva a cabo un proceso de parafinado sumergiendo las piezas de queso, previamente lavadas y oreadas, en un baño de parafina blanca fundida cuyo objetivo es formar una barrera contra la deshidratación del producto y la invasión de mohos. Las piezas de queso, ya parafinadas, se envuelven en papel celofán amarillo debajo del cual se coloca una etiqueta de identificación comercial, se pone a la venta a los pocos días de producido; sin embargo, por problemas de distribución puede ocurrir que su venta se retarde varias semanas; durante ese tiempo la pasta del queso continúa un proceso de maduración, hasta llegar al consumidor (Cervantes-Escoto *et al.*, 2008). El diagrama del proceso de elaboración del QPB se describe detalladamente en la **Figura 2**.

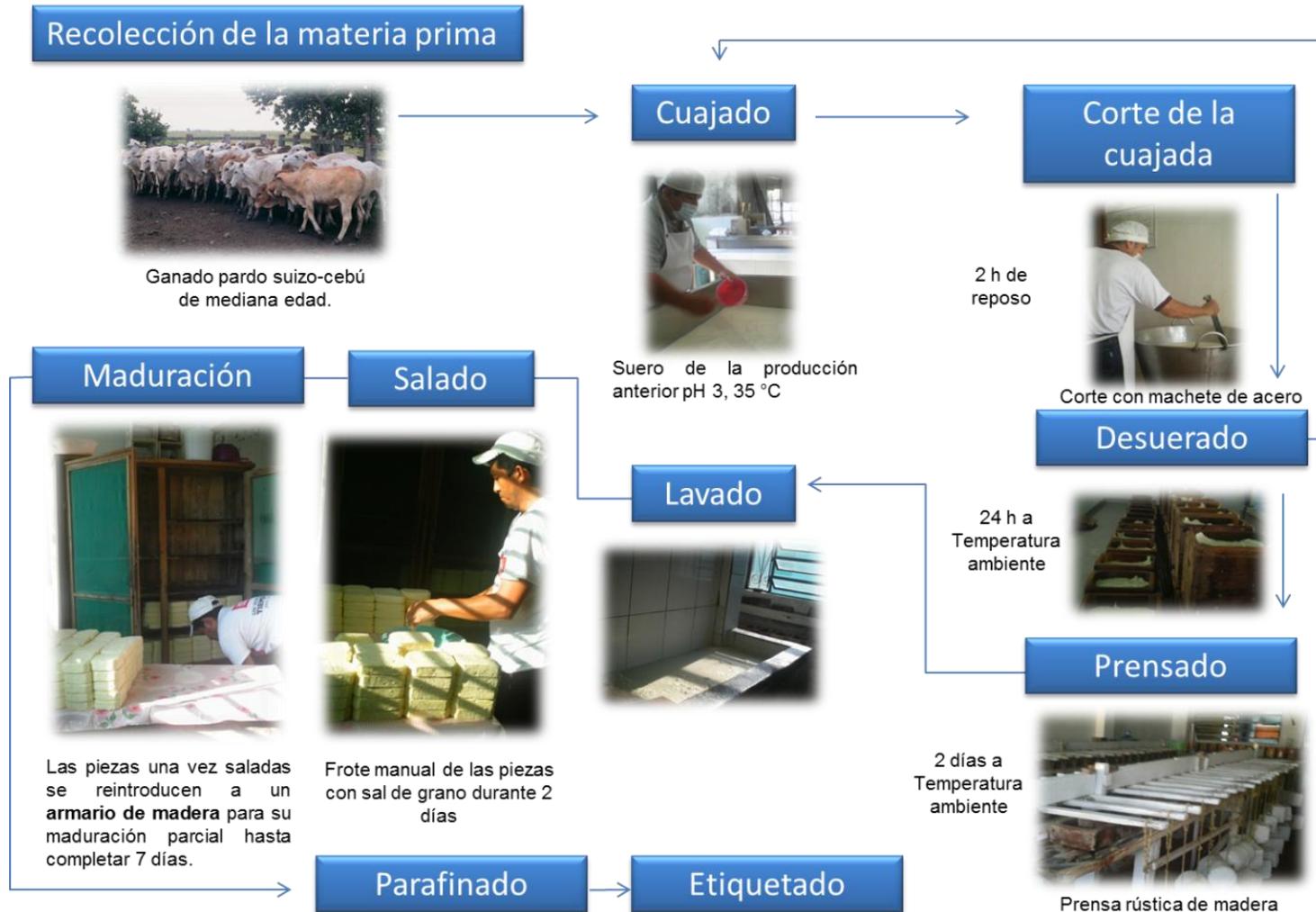


Figura 2. Proceso de elaboración del queso de Poro de Balancán.

## 2.4 Composición Microbiológica de la Leche para la Elaboración de Quesos

La diversidad microbiana de la leche cruda está conformada por levaduras, hongos y bacterias que representan un elemento central en el proceso de elaboración del queso. Es así que se han identificado más de 150 especies microbianas con diferentes balances cualitativos y cuantitativos en términos de especies y cepas que varían entre los diferentes tipos de leche (Retureau *et al.*, 2010).

Ésta microbiota es necesaria para mantener la calidad y la diversidad sensorial de los quesos artesanales (Delbès-Paus *et al.*, 2012). Algunas investigaciones han concluido que la microbiota nativa de la leche cruda es un componente esencial para lograr las características más completas, agradables y apetecibles en las distintas variedades de quesos (Mucchetti y Neviani, 2006, Coppola *et al.*, 2008, Alegría *et al.*, 2009). Por tal motivo muchos productores usan o agregan leche cruda considerándola esencial para alcanzar las características organolépticas deseadas en este tipo de alimento debido principalmente a la proteólisis y lipólisis de la microbiota nativa (Little *et al.*, 2008). Además durante el procesamiento y maduración de los quesos, estas poblaciones microbianas interactúan entre sí y sufren cambios en su composición debido a la competencia de nutrientes o espacio en la matriz alimentaria y solo aquellas poblaciones con mejores capacidades metabólicas permanecerán y brindarán las características que distinguirán a cada queso (Callon *et al.*, 2005, Duthoit *et al.*, 2005).

Así mismo diversos estudios han señalado que la microbiota natural de la leche cruda puede contribuir a la biopreservación de algunos alimentos ya que son capaces de inhibir bacterias patógenas como es el

caso de *L. monocytogenes* (Imran *et al.*, 2010, Callon *et al.*, 2011), por lo tanto puede impactar directamente en la calidad final de los productos lácteos (Retureau *et al.*, 2010). Sin embargo para conocer más a detalle cómo están constituidos los grupos de microorganismos que predominan en los quesos algunos autores han dividido a la microbiota en dos grupos para fines prácticos; bacterias ácido lácticas iniciadoras (SLAB) y bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB) por sus siglas en inglés, estos grupos representaran a la flora dominante del ecosistema del queso (Beresford *et al.*, 2001).

#### **2.4.1 Bacterias Ácido Lácticas Iniciadoras (SLAB)**

Las SLAB son un grupo muy heterogéneo cuyo rasgo fisiológico más característicos es su tolerancia al ácido como consecuencia obligada de su metabolismo, estas bacterias son responsables de la producción de ácido durante la fabricación del queso y, por lo tanto, deben ser capaces de producir ácido suficiente para reducir el pH de la leche rápidamente, un parámetro útil es un pH <5,3 en la leche en 6 horas a 30-37 °C dependiendo de la variedad del queso (Beresford y Williams, 2004).

Las SLAB pueden ser o bien mezclas de cepas definidas o, como en el caso de muchos quesos fabricados por los métodos tradicionales, compuestos de mezclas indefinidas de cepas que están ya sea añadidos al comienzo de la fabricación o están naturalmente presentes en la leche con que se fabrica el queso. La mayoría de las bacterias lácticas sólo pueden obtener energía a partir de azúcares y otros compuestos relacionados. Debido a su limitada capacidad biosintética son muy exigentes nutricionalmente y requieren factores de crecimiento complejos como aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Ammor *et al.*, 2005).

Las principales especies de SLAB incluyen *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc sp.*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Lb. helveticus* pero no todos ellos se utilizan en todas las variedades de queso. Los dos primeros organismos se utilizan en la mayoría de las variedades de queso, mientras que los últimos son utilizados en los quesos Emmental, Parmigiano Reggiano y Mozzarella/pizza, que se calientan a una alta temperatura durante la fabricación. En muchos quesos artesanales, especialmente los producidos en países Mediterráneos, otras LAB que también se encuentran incluyen, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Ec. faecalis*, *Ec faecium*, *Lb. salivarius*, y especies de *Staphylococcus* (Beresford y Williams, 2004).

Otros microorganismos igualmente utilizados en la fabricación de quesos son por ejemplo, *Propionibacterium freudenreichii*, *Brevibacterium liinens*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium roqueforti* y *camemberti* (Beresford y Williams, 2004). Todas estas bacterias tienen características particulares que en conjunto darán como resultado cambios estructurales (reología) y sensoriales (sabor, textura, aroma, etc) como producto de su metabolismo aumentando el valor añadido de la materia prima además permitiendo preservar el valor nutritivo y salubridad de la materia prima, proporcionando un producto agradable al consumidor y generando un ambiente poco favorable para el desarrollo de patógenos y otros microorganismos alterantes (Van Hoorde *et al.*, 2010).

#### **2.4.2 Microbiota Secundaria (NSLAB)**

Las NSLAB pertenecen a la microbiota dominante durante el almacenamiento de los quesos. Estas bacterias toleran el medio ambiente hostil y junto con las bacterias iniciadoras promueven una serie compleja

de reacciones bioquímicas que son vitales para el adecuado desarrollo de sabor y textura durante la maduración. Se encuentran en bajas concentraciones inicialmente, sin embargo pueden aumentar sus concentraciones de cerca de cuatro a cinco órdenes de magnitud en pocos meses (Settanni y Moschetti, 2010)

A pesar de que su presencia en muchas ocasiones es deseable, algunos productores consideran que es complejo controlar este tipo de microorganismos debido a que varían entre quesería, pero también entre quesos producidos en la misma quesería, entre los diferentes días y entre los quesos de la misma cuba y por lo tanto pueden repercutir en las características finales. De igual manera en los quesos elaborados de manera industrial que en su mayoría sigue un patrón sumamente reproducible, la presencia de las NSLAB constituye el único factor importante que aún no ha sido controlado. De esta manera se sugiere que como resultado de la pasteurización las NSLAB proliferan en la leche superando a la microbiota endógena, la cual en algunos casos muere y esto propicia el predominio y/o crecimiento de las NSLAB (Settanni y Moschetti, 2010).

Muchos autores consideran que esta microbiota juega un papel importante en las características organolépticas de los quesos y de esta manera se puede considerar que este tipo de microorganismos son una contaminación deseable. Este grupo de NSLAB generalmente se compone de *Lactobacillus* mesófilos facultativos y estrictos, como son *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. curvatus*, *L. brevis* y *L. plantarum*, aunque también incluye otros *Lactobacillus* homofermentativos, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*. Hasta la fecha en todos los quesos que se han estudiado se ha encontrado al menos un grupo de estos microorganismos, sobre todo los que pertenecen al grupo de los

*Lactobacillus* mesófilos (Crow *et al.*, 2001, Somers *et al.*, 2001, Randazzo *et al.*, 2008).

A hora bien, la existencia de las NSLAB en el queso es conocida desde hace algún tiempo, sin embargo su impacto en la calidad final es producto de investigación reciente, por lo que su presencia y efecto ha generado un creciente interés por parte de la industria quesera, no solo por su influencia en las características organolépticas que proporcionan a los quesos sino también se están considerando otras características durante el proceso de selección, en particular, sus propiedades saludables (Banks y Williams, 2004, Settanni y Moschetti, 2010).

2.4.2.1 Otros microorganismos asociados a las NSLAB. Además de las NSLAB, es importante señalar que existen otros microorganismos asociados a los cultivos secundarios, entre ellos se puede destacar a las bacterias ácido propiónicas (BAP), levaduras y hongos filamentosos; los cuales de inicio no están presentes en la leche pero llegan a ella procedentes del entorno de procesamiento y juegan un papel importante durante la maduración (Callon *et al.*, 2006).

Las BAP aparecen en muchas variedades de quesos al final de la maduración. Son las principales responsables de los típicos ojos de los quesos suizos, que aparecen como consecuencia de la acumulación de gas durante la fermentación de los azúcares y lactato a propionato, acetato, agua y dióxido de carbono. Se dividen en dos grupos, BAP cutáneas y BAP clásicas. Las BAP clásicas son las más importantes en la microbiología de los quesos, con las siguientes especies: *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii*, *P. acidipropionici* y *P. cyclohexanicum* y *P. coccoides* (Vorobjeva, 1999).

Las levaduras se encuentran y se utilizan como cultivos secundarios en muchos quesos gracias a su gran capacidad proteolítica y lipolítica por lo cual se posicionan como microbiota deseable en los procesos de maduración de los quesos, así mismo promueven el crecimiento de otros microorganismos (Borelli *et al.*, 2006). En algunos casos se les considera microbiota detarorativa debido a que promueven algunos defectos como; excesiva producción de gas, sabores afrutados, incremento en la acidez, cambios en la textura y sabores amargos y rancios. No obstante la significancia de la presencia de las levaduras dependerá de la variedad de queso, ya que en algunos casos pueden contribuir de una manera positiva a los procesos de fermentación y maduración del queso inhibiendo microorganismos indeseables (Welthagen y Viljoen, 1998).

Las levaduras están con frecuencia en la superficie de una amplia variedad de quesos. Aunque su capacidad de crecimiento es menos favorable que el de las bacterias su población alcanza  $10^6$  a  $10^8$  UFC  $\text{cm}^2$  en la superficie del queso durante los primeros 5 días y se mantienen en este nivel a lo largo de la maduración. En general, su número en el interior del queso es 100 o 1000 veces menor (Chamba y Irlinger, 2004). Las levaduras que con frecuencia se aíslan de la superficie de los quesos son, entre otras, las especies son *Debaryomyces. hansenii*, *Yarrowia lipolytica* y *Trichosporon. beigeli* (Beresford *et al.*, 2001).

En lo que respecta a algunos hongos estos contribuyen de manera directa a la apariencia de la superficie de los quesos, o en el caso de algunos como el de pasta azul para la apariencia del cuerpo o en el interior. El color, longitud y densidad del micelio son criterios muy importantes en la selección del cultivo. Generalmente, las cepas que muestran color azul y amarillo son usadas en el queso Gorgonzola mientras las cepas verde oscuras en los quesos Danablue, Bleu des Causes, Roquefort y Stilton y en el caso de Camembert y Brie su

presencia se destaca en la superficie y tiene un color blanquesino, de esta manera su diversidad natural radica en la apariencia de *Penicillium* (*P. roqueforti* y *P. camemberti*) respectivamente (Beresford *et al.*, 2001).

Las especies de *P. roqueforti* y *P. camemberti* son capaces de utilizar el ácido láctico como fuente de carbono. Por lo tanto, su crecimiento provoca un incremento en el pH y una consecuente proteólisis que ocasiona la suavidad del queso. Su actividad lipolítica varía ampliamente de acuerdo a la cepa, algunos de los compuestos producidos mediante sus procesos metabólicos son metil cetonas y sus correspondientes alcoholes secundarios, que son producidos por  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y contribuyen al sabor de los quesos madurados con hongos. Por otro lado muchos esteroides, aldehídos, aminas volátiles contribuyen al aroma de estos quesos (Chamba y Irlinger, 2004).

No obstante, al igual que las levaduras algunas especies de hongos son considerados microorganismos indeseables. Los hongos tienen la capacidad de producir micotoxinas (metabolitos secundarios tóxicos), las cuales representan un riesgo para la salud, aunque se ha indicado que el riesgo no es significativo debido a que las toxinas que están presentes en los quesos madurados con hongos se encuentran en niveles muy bajos (Torkar y Vengušt, 2008).

2.4.2.2 Bacterias deteriorativas. El queso debido a su naturaleza es rico en nutrientes, y por lo tanto susceptible a contaminación por microorganismos alterantes que pueden afectar su calidad sensorial (Pintado *et al.*, 2010). Así la producción de sabores a malta, rancidez, amargo, fruta y pútrido se ha asociado a microorganismos psicrótrofos presentes en los quesos. Algunas especies incluidas en este grupo de bacterias pertenecen a los géneros *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Aeromonas* y *Alcaligenes*. También se ha asociado a algunas especies como

*Pseudomonas*, *Rahnella* y bacterias coliformes que producen proteólisis parcial de la caseína, decoloraciones, pigmentación, arrugas, exfoliación y sabores desagradables en quesos (Cantoni y Bersani, 2010, Baruzzi *et al.*, 2012).

Es importante destacar que la contribución actual de las bacterias Gram-negativas con respecto del desarrollo de características organolépticas en el queso aun no es clara. Por lo anterior una gran mayoría de bacterias Gram-negativas en el queso aún son consideradas como microbiota deteriorativa ya que estas pueden ser responsables de los defectos de textura y sabor en quesos. Sin embargo, se ha encontrado que algunas especies influyen en el desarrollo de ciertas propiedades organolépticas; por ejemplo se encontró una cepa de *Proteus vulgaris* que produce cantidades significativas de compuestos volátiles en quesos modelo y algunas cepas de *Hafnia alvei* pueden ser usadas como agentes de almacenamiento debido a que inhiben a microorganismos como *E. coli* durante el almacenamiento controlado de algunos quesos (Delbès-Paus *et al.*, 2012, Delbès-Paus *et al.*, 2013).

Por otra parte en un estudio realizado por (Larpin-Laborde *et al.*, 2011) en queso Livarot indicaron que del total de las cepas aisladas en este trabajo el 32% correspondía a una gran diversidad de bacterias Gram-negativas. Los géneros que mayormente estuvieron incluidos fueron, *Alcaligenes*, *Hafnia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, y *Psychrobacter*. Independientemente de la procedencia de la leche (cruda o pasteurizada), los niveles en la biodiversidad no fueron diferentes en las queserías estudiadas, todas con procedimientos de limpieza eficientes además de contar con buenas prácticas de fabricación, por lo que se sugiere que su presencia debe examinarse objetivamente con respecto a la evaluación de su papel positivo y negativo ya que al parecer algunas de las bacterias Gram-negativas identificadas ahora han sido consideradas como

potencialmente útiles en algunos procesos tecnológicos para la elaboración de quesos (Mounier *et al.*, 2005, Larpin-Laborde *et al.*, 2011).

2.4.2.3 Bacterias patógenas. Las infecciones asociadas al consumo de quesos y productos lácteos representan alrededor del 5% de las enfermedades provocadas por alimentos en países industrializados, los microorganismos patógenos se han relacionado a dicha contaminación algunos factores que favorecen la contaminación son: las malas prácticas de manufactura durante la elaboración de dicho alimento, un ordeño insalubre o bien por contaminación debido a los operarios (De Buyser *et al.*, 2001)

En los quesos frescos, las infecciones suelen estar asociadas a enterobacterias patógenas como *Salmonella* o *E. coli* (Vernozy-Rozand *et al.*, 2005), mientras que en los quesos semicurados o curados los principales patógenos son *S. aureus* y *L. monocytogenes*, aunque su incidencia es baja, son responsables de las infecciones más severas que pueden transmitir los productos lácteos. Además de los patógenos antes mencionados también se ha involucrado a otros microorganismos como *Bacillus sp.*, *Brucella sp.*, *Shigella sp* y *Clostridium botulinum* (De Buyser *et al.*, 2001).

Debido a la incidencia en los casos de infecciones provocados por productos lácteos contaminados con bacterias patógenos, algunos gobiernos como Estados Unidos de Norteamérica y México han prohibido la producción y consumo de queso proveniente de leche sin un previo tratamiento térmico, sin embargo esto lleva consigo la pérdida de microbiota que puede proteger de una manera natural la salubridad de los quesos (Villegas de Gante y Escoto, 2011).

## 2.5 Efecto del Tratamiento Térmico a la Leche Destinada Para la Elaboración de Quesos

El principal objetivo de la pasteurización de la leche para la manufactura de quesos es la eliminación de microorganismos patógenos que pudieran estar presentes en la leche con la cual se elaboran. Sin embargo este tratamiento térmico no solo promueve la reducción de las poblaciones microbianas patógenas o alterantes sino también aquellas que desempeñan un papel importante en la elaboración del queso. Se ha comprobado que los tratamientos térmicos como es el caso de la pasteurización induce la eliminación de una proporción importante de la microbiota que puede desarrollarse durante el proceso de maduración, además se inactivan muchas enzimas nativas de la leche cruda como el complejo plasmina/plasminógeno, lipasa o fosfatasa alcalina además de producir una ligera desnaturalización de las proteínas séricas y ligeras modificaciones en la coagulación y acidificación producida por bacterias ácido lácticas (Grappin y Beuvier, 1997).

Por lo anterior en diversos estudios se han centrado en estudiar las diferencias en la microbiota presente bajo diferentes procesos de elaboración, artesanal e industrial y han indicado que difieren considerablemente en la cantidad y variedad de su microbiota, afectada principalmente por el proceso de pasteurización, por otra parte los quesos elaborados con leche cruda presentan una riqueza y variedad en su microbiota, la cual no es encontrada en los quesos de leche pasteurizada (Bonetta *et al.*, 2008).

Otro estudio dirigido por Giraffa en el 2003 indicó que algunos microorganismo pertenecientes al género *Enterococcus* presentan resistencia a altas temperaturas de calentamiento y por lo tanto son

abundantes no solo en los quesos de leche cruda sino que pueden establecerse en aquellos de leche pasteurizada, sin embargo destaca que se encontró una mayor diversidad en las poblaciones de esta especie *Enterococcus* en los quesos elaborados con leche cruda.

En cierta medida es importante resaltar que el proceso de pasteurización no garantiza la inocuidad del alimento debido a que existen otros factores que deben controlarse y que repercutirán ampliamente en el alimento. La microbiota de cualquier tipo de queso se ve influenciada por la fuente y el tratamiento de la leche con la cual se elaboró el queso, el proceso de fabricación, las prácticas de higiene aplicadas durante el ordeño, el tipo de fabricación de queso, y el proceso de maduración son aspectos que deben considerarse (Beresford *et al.*, 2001, Martín-Platero *et al.*, 2009, Arteau *et al.*, 2010).

Para finalizar es importante destacar que en nuestro país se han establecido normativas que conllevan a la aplicación de un tratamiento térmico como la pasteurización o de lo contrario tener implementado un sistema HACCP para su proceso, pero cabe mencionar que en general, estos sistemas de inocuidad aún no están desarrollados adecuadamente en la industria pequeña y mediana con respecto a la quesería en América Latina, por lo cual se debería de considerar de inicio la implementación de Buenas Prácticas de Higiene (BPH) y las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), que son sin duda condicionantes para la producción, manufactura y distribución de alimentos inocuos y saludables. Lo que esto significa en la práctica es que estos requisitos básicos se deben cumplir antes, y distinguirse, aunque no separarse, del desarrollo del sistema HACCP (SSA, 2010)

Por lo tanto, en todo caso para los quesos elaborados a partir de leche no pasteurizada, es necesario extremar medidas referentes al

control de la materia prima como principal punto de control crítico. La leche debe ser de alta calidad microbiológica, carente de microorganismos patógenos y ser mantenida en condiciones adecuada de conservación

## 2.6 Importancia del Estudio de las Comunidades Microbianas en el Queso

El estudio de la ecología microbiana asociada a los productos lácteos fermentados es fundamental para comprender sus atributos característicos. Los cambios que se presentan en las comunidades microbianas durante las diversas fases de elaboración de productos lácteos son particularmente importantes para el logro de una descripción satisfactoria de la microflora presente, especialmente en productos típicos obtenidos por procesos tradicionales. Por lo tanto, los microorganismos, a nivel especie y cepa, deben ser objeto de estudio al menos durante las etapas del procesos de manufactura más importantes, donde se presentan ciertas actividades microbianas importantes que conllevan al logro de la calidad esperada del producto final (Ruíz y Rodarte, 2003, Coppola *et al.*, 2008).

El conocimiento de la ecología microbiana del queso, así como de otros productos lácteos fermentados pueden beneficiarse enormemente de las herramientas moleculares teniendo en cuenta que estas técnicas apoyan la identificación de especies microbianas y las cepas presentes durante los procesos de producción, discriminan y cuantifican microorganismos viables y activos ya que además permiten observar la expresión de genes funcionales y las actividades metabólicas que se esperan durante las etapas de fabricación de queso (Ndoye *et al.*, 2011)

## 2.7 Estudio de la Dinámica Poblacional de la Microbiota del Queso

La dinámica de crecimiento, la supervivencia y la actividad bioquímica de los microorganismos en los alimentos fermentados son el resultado de reacciones de estrés en respuesta al cambio de las condiciones físicas y químicas en los microambientes de los alimentos, la capacidad para colonizar la matriz del alimento y de crecer en un espacio heterogéneo, así como las interacciones ecológicas *in situ* célula a célula que a menudo tienen lugar en una fase sólida (Justé *et al.*, 2008, Randazzo *et al.*, 2009).

En la última década, debido al uso de los métodos moleculares, el conocimiento sobre la diversidad microbiana de los ecosistemas microbianos ha aumentado dramáticamente. Aunque el uso de estas técnicas se encuentra todavía en desarrollo, su aplicación ha demostrado ser una herramienta de gran alcance para determinar la composición de las comunidades microbianas y monitorear los cambios en comunidades. En la actualidad una amplia variedad de enfoques moleculares son disponibles para estudiar las comunidades de queso. Estas técnicas pueden ser divididas en: I) técnicas dependientes de cultivo, seguido por la identificación fenotípica y molecular (II) independientes del cultivo métodos moleculares (Randazzo *et al.*, 2002).

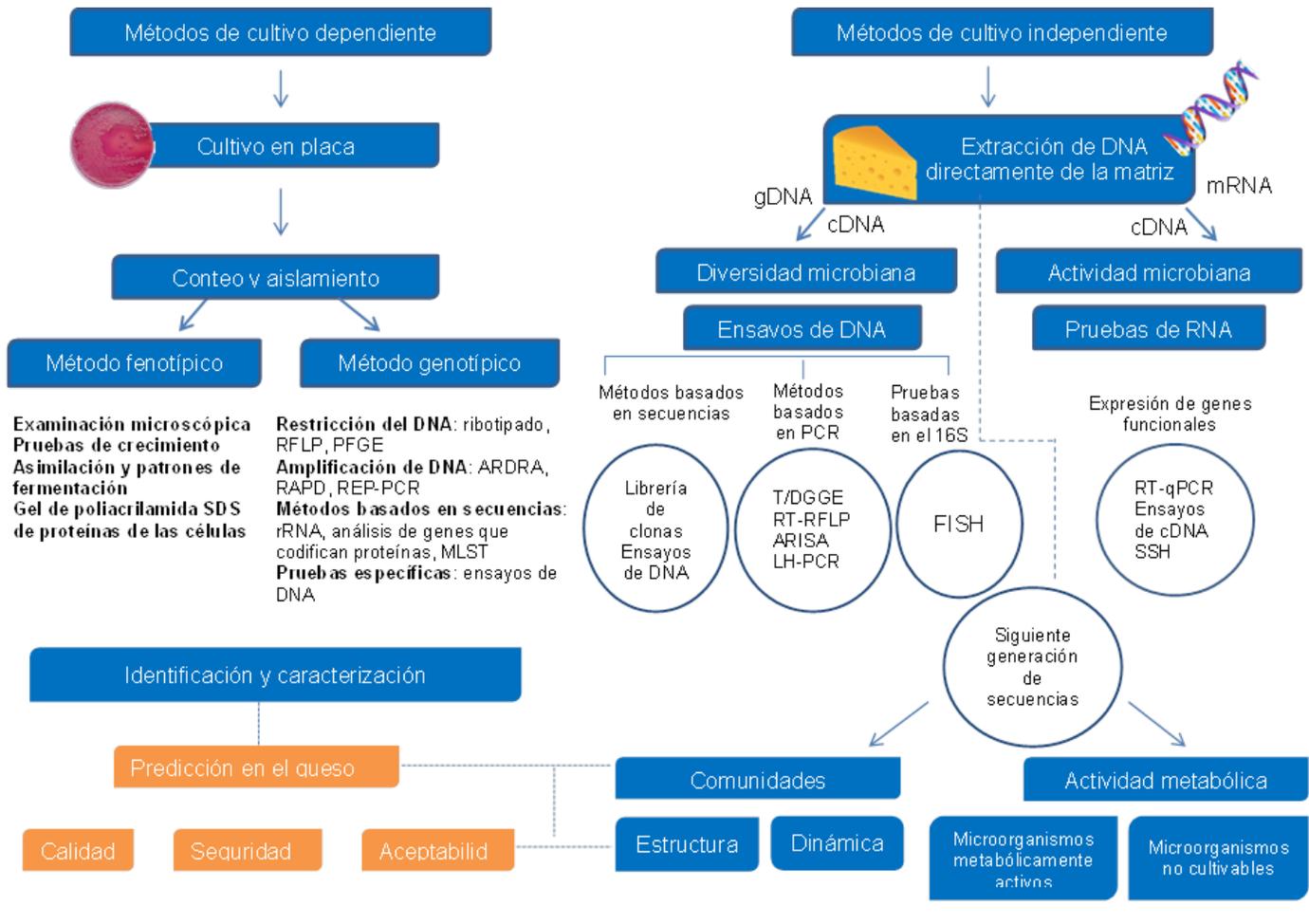
### 2.7.1 Técnicas dependientes de cultivo e independientes de cultivo

La forma tradicional de determinar la naturaleza de la microbiota presente en los productos lácteos se basa en técnicas de cultivo dependiente (Coppola *et al.*, 2008). Sin embargo estos métodos presentan varias desventajas para determinar sobre todo bacterias que pueden ser

cultivadas solo si sus necesidades metabólicas y fisiológicas pueden ser reproducidas *in vitro*, de esta manera solamente identifican y controlan parcialmente la microbiota presente en la matriz (Nadkarni *et al.*, 2009).

Por otro lado el desarrollo de métodos moleculares para el estudio de las comunidades microbianas en productos lácteos ha transformado la ecología microbiana del queso. Su aplicación en esta matriz ayuda a dar una información valiosa y concreta sobre las poblaciones microbianas, la evolución y la naturaleza de los grupos durante la maduración del queso (Bonaïti *et al.*, 2006). La dinámica y la estructura de toda la comunidad microbiana de queso son un paso hacia la promoción de una mejor comprensión de cómo las características del queso varían con respecto al crecimiento microbiano y el metabolismo. Por estas razones, la manera de evaluar la composición microbiana de los alimentos ha tenido que cambiar radicalmente (Jany y Barbier, 2008).

Nuevos enfoques moleculares, especialmente aquellos basados en el uso de rRNA y DNA, han brindado la oportunidad para analizar comunidades complejas en base a la diversidad de secuencias (**Figura 3**): la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) (Muyzer *et al.*, 1993, Randazzo *et al.*, 2002) y las técnicas relacionadas, electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) (Cocolin *et al.*, 2000), electroforesis en gel con gradiente de temperatura temporal (TTGE) (Ogier *et al.*, 2002), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP) (Osborn *et al.*, 2000) y polimorfismo conformacional de una sola hebra (SSCP), han sido aplicadas en ecología microbiana para resolver diferencias hasta de un solo nucleótido en secuencias de regiones previamente amplificadas del gen 16S rRNA mediante PCR. Estas técnicas representan métodos rápidos, exactos, fiables y eficaces para la detección e identificación de los microorganismos presentes en los productos lácteos así como en diversas matrices (Jany y Barbier, 2008).



**Figura 3.** Diagrama de flujo de las técnicas dependientes e independientes de cultivo para el estudio de la microbiota del queso

## 2.8 Limitaciones de las Técnicas

Es importante reconocer que a pesar de la novedad de estos métodos se debe tomar en cuenta, sin embargo, que estos métodos tienen limitaciones. Uno de los factores importantes a la hora de hacer este tipo de análisis sucede al momento de realizar la extracción de ácidos nucleicos de las muestras, esto debido a que existen factores que puede inhibir la amplificación por PCR, esta interferencia puede suceder principalmente debido a: interferencia con la lisis celular, necesaria para la extracción del DNA, la captura o degradación de ácidos nucleicos y la inhibición de la actividad polimerasa para la amplificación de la secuencia objetivo. Estos efectos pueden tener implicaciones importantes en la investigación clínica y salud pública, especialmente si la investigación involucra análisis de alimentos y medioambiente (Wilson, 1997).

La reacción de PCR puede introducir errores, ya que pueden ocurrir amplificaciones preferenciales (debido a la reasociación del DNA que se usa como templado y que evita la unión de los cebadores y que puede ser reducida añadiendo acetamida, glicerol o dimetilsulfóxido a la reacción de PCR) o a la formación de moléculas quiméricas (moléculas de rDNA híbridas que se forman cuando una molécula de DNA parcialmente elongada sirve como cebador en el siguiente ciclo de PCR), aunque éstas pueden ser detectadas, por ejemplo con el programa CHECK\_CHIMERA del RDP (The Ribosomal Database Project) por sus siglas en inglés (Ruíz y Rodarte, 2003). La formación de moléculas heteroduplex (asociación de cadenas sencillas de moléculas diferentes de DNA) durante la amplificación dificulta la interpretación de patrones de DGGE o TGGE. Ésta puede ser reducida utilizando en la reacción de PCR mayor fuerza iónica, concentraciones de cebadores mayores, menores temperaturas de asociación y disminuyendo el número de ciclos de amplificación (Muyzer y Smalla, 1998).

Sólo pueden separarse por DGGE o TGGE fragmentos pequeños, de hasta 500 pares de bases y esto limita las inferencias filogenéticas. Aunque existen reportes sobre la posibilidad de separar secuencias que difieren en una sola base, también se ha reportado la dificultad de separar fragmentos que difieren en 2 ó 3 bases (Vallaey *et al.*, 1997). Otra limitación de estas técnicas es el número máximo de bandas de DNA que puedan separarse, aunque se ha reportado la detección de poblaciones que constituyen el 1% de la comunidad por PCR-DGGE (Muyzer *et al.*, 1993). Es posible que ocurra la co-migración de fragmentos de DNA, que provocaría la subestimación de la diversidad microbiana y la dificultad para extraer secuencias para su identificación o la sobreestimación de la diversidad debido a la microheterogeneidad en las secuencias de algunos genes, que puede ser detectada por el DGGE o TGGE (Muyzer y Smalla, 1998).

No obstante, a pesar de que se conocen las limitaciones de la técnica DGGE más de 2000 trabajos se han reportado utilizando esta técnica, a fin de conocer la ecología microbiana de diversos sistemas alimentarios. DGGE sigue siendo la herramienta poderosa de la microbiología molecular para conocer la dinámica poblacional de diversos nichos sin la necesidad de aislar sus componentes individuales

### **3. HIPÓTESIS**

La dinámica poblacional de la microbiota asociada a su proceso de fabricación artesanal del queso de Poro de Balancán permite obtener un alimento con características sanitarias que cumplan con los lineamientos establecidos por la normativa vigente en México (NOM-243-SSA1-2010).

## **4. OBJETIVO GENERAL**

Identificar los cambios de las poblaciones microbianas durante el proceso de fabricación del queso de Poro de Balancán artesanal y como estos se ven afectados por las características fisicoquímicas de la leche y su composición microbiológica per se.

### **4.1 Objetivos Específicos**

- Determinar la composición fisicoquímica y microbiológica de la leche cruda (LC), suero para cuajar (SPC), cuajada (C), suero de cuajada (SC) y queso (Q) del proceso de manufactura del queso Poro de Balancán artesanal.
- Evaluar la microbiota nativa y su dinámica poblacional en las fracciones de leche cruda (LC), suero para cuajar (SPC), cuajada (C), suero de cuajada (SC) y queso (Q) mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo del queso Poro de Balancán artesanal.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Muestreo

Se realizaron dos muestreos en el mes de Septiembre del 2012 y Mayo del 2013 en 6 queserías (identificadas como A, B, C, D, E y F por cuestiones de confidencialidad) del municipio de Balancán Tabasco, México. Se recolectaron muestras de leche cruda (LC), suero para cuajar (SPC), cuajada (C), suero de cuajada (SC) durante el proceso de manufactura y muestras de queso (Q) a los 7 días de almacenamiento, todo por duplicado. Las muestras recolectadas fueron colocadas en bolsas estériles, y posteriormente transportadas al laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos, en Hermosillo, Sonora, México, a una temperatura de 4 °C para sus posteriores análisis, excepto las muestras correspondientes a los análisis moleculares, estas se almacenaron inmediatamente a -20 ° C para posteriormente ser analizadas.

### 5.2 Análisis Físicoquímico

VARIABLES DE GRASA (MÉTODO DE BABCOCK), HUMEDAD, PROTEÍNA CRUDA (MÉTODO DE KJELDAHL) Y ACIDEZ TITULABLE SE DETERMINARON POR TRIPPLICADO UTILIZANDO LA METODOLOGÍA DE LA (A.O.A.C., 2002).

## 5.3 Análisis Microbiológico

### 5.3.1 Microorganismos Indicadores

Los conteos microbianos de microorganismos indicadores (mesófilos aerobios, *E. coli*, coliformes, hongos y levaduras) se realizaron utilizando películas deshidratadas rida®count (R-biopharm, Alemania) para ello se hicieron diluciones patrón que contenían 10 mL de la muestra en 90 mL de NaCl al 8%, para muestras líquidas, y 10 g de la muestra en 90 mL de NaCl al 8% para muestras sólidas. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas 1:10 partiendo de la dilución patrón. A las placas se les inoculó 1mL de las diluciones seriadas. Los resultados se expresaron siguiendo los lineamientos de la Norma Mexicana (SSA, 2010) , Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

### 5.3.2 Microorganismos Patógenos

Los microorganismos patógenos *S.aureus* y *Salmonella* spp., se determinaron mediante sistema de películas deshidratadas rida®count (R-biopharm, Alemania) siguiendo las recomendaciones del proveedor y como se describió anteriormente. *Listeria monocytogenes* y la toxina estafilocócica se determinaron de acuerdo a lo indicado en la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 (SSA, 2010).

### 5.3.3 Bacterias Ácido Lácticas

*Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, fueron determinados siguiendo la metodología propuesta por (Dagdemiir y Ozdemir, 2008). Para realizar los conteos de *Lactobacillus* se utilizó la técnica de vaciado en placa en agar (Man, Rogosa y Sharpe) MRS (BD DIFCO™, USA) las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis a  $35\pm 2$  °C por 48 h. Para el caso de *Lactococcus* y *Streptococcus* se contabilizaron utilizando la técnica de difusión en placa sobre agar M17 (BD DIFCO™, USA) enriquecido al 5% con una solución de lactosa al 10%, las placas fueron incubadas a 30 y  $42\pm 2$  °C por 48 h, respectivamente.

### 5.4 Extracción del DNA de las Matrices

Para la extracción de DNA se homogenizaron 10 g de las muestras de cuajada en bolsas stomacher de las muestras de cuajada y queso, con 40 mL de solución Ringer (Fluka, USA) en un aparato Seward Stomacher® 80 (Biomaster, USA). Del sobrenadante se tomó 1 mL, se centrifugo a 13,200 rpm por 10 min para sedimentar las células. En el caso de las muestras de leche y suero, 1 mL fue directamente centrifugado y el sedimento fue usado para la extracción de ácidos nucleicos. Después de la centrifugación el sedimento fue resuspendido con 120 µL de buffer de proteinasa (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 7.5, 0.5% dodecilsulfato de sodio [w/vol]), 25 µL de proteinasa K (25 mg/mL, Sigma-Aldrich, USA) y 50 µL de lisozima (50 mg/mL, Sigma-Aldrich, USA). Posteriormente se sometió a un tratamiento térmico por 1 h a 50 °C. La solución fue transferida a tubos con rosca de 1.5 mL, conteniendo 0.3 g de perlas de vidrio con un diámetro de 0.5 mm. Después fueron adicionados 150 µL de breaking buffer (2% Triton X-100 [vol/vol], 1% duodecilsulfato de sodio [w/vol], 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8 y 1 mM EDTA pH 8) además de 300 µL de fenol-cloroformo-alcohol-isoamilico 25:24:1 (pH 6.7, Sigma-Aldrich, USA), los

tubos fueron sometidos a tres ciclos de 30 segundos en un aparato bead beater (Mini-Beadbeater; BioSpec 607, VA, USA), los tratamientos fueron a una velocidad de 4.5 m/s. Posteriormente se agregaron 300  $\mu$ L de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) a los tubos y se centrifugaron a 12 000 xg por 10 minutos. La fase acuosa se colectó y los ácidos nucleicos fueron precipitados por la adición de 750  $\mu$ L de etanol absoluto 99% congelado centrifugándose a 12 000 xg por 10 minutos a 4 °C, se hizo enseguida un lavado breve con etanol al 70% y el sedimento de DNA se disolvió en 50  $\mu$ L de agua estéril (Alessandria *et al.*, 2010).

### 5.5 Condiciones y Amplificación por PCR

El DNA total de las muestras de leche cruda (LC), suero para cuajar (SPC), cuajada (C), suero de cuajada (SC) y queso fue usado como templado para amplificar la región V3 del gen 16S rRNA de bacterias por PCR utilizando los iniciadores universales F357 (5'-TACGGGAGGCAGCAG-3') y R518 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). Se adicionó una grapa rica en CG al iniciador F357 (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCGGGGGCACGGGGG-3'), para obtener F357-CG (Muyzer *et al.*, 1993).

Las amplificaciones por PCR se realizaron en volúmenes de 50  $\mu$ L que contenían Buffer PCR 1X, 2.5 mM de  $MgCl_2$ , 0.25 mM de cada dNTP, 0.2  $\mu$ M de cada iniciador, 1 U de Taq polimerasa y 50 ng del DNA.

Para la amplificación del fragmento de interés de procariotas el templado de DNA fue desnaturalizado a 94 °C, durante 5 min, y se realizó una PCR touchdown de acuerdo a lo indicado por (Muyzer *et al.*, 1993). El alineamiento inicial se realizó a una temperatura de 66 °C y este fue decreciendo 1 °C cada ciclo hasta llegar a una temperatura de 56 °C. La extensión para cada ciclo fue llevada a 72 °C por 3 min y una extensión final a 72 °C por 10 min en un

termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Alemania). Los productos de PCR (alícuotas de 20 µL) se verificaron rutinariamente en geles de agarosa al 1.5% (Ercolini *et al.*, 2008).

## 5.6 Condiciones y Análisis por DGGE

Los productos de PCR fueron analizados mediante DGGE usando el equipo Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, CA, USA). Los amplicones de la región V3 fueron analizados en un gel de poliacrilamida al 8 % en buffer TAE 1X. El experimento consistió en una electroforesis paralela a 60 °C mediante el uso de geles con un contenido de un 30 a 60% de urea-formamida como gradiente desnaturizante (100% correspondió a 7 M de urea y 40% (w vol<sup>-1</sup>) formamida). Los geles fueron corridos por 10 min a 50V, seguido por 4 h a 200V. Estos fueron teñidos con bromuro de etidio por 3 min, posteriormente se enjuagaron durante 15 min con agua deionizada y fueron observados usando un fotodocumentador Gel Doc (Bio-Rad, CA, USA).

## 5.7 Identificación de las Bandas de DGGE por Secuenciación

Las bandas seleccionadas de DGGE fueron cortadas del gel, transferidas a tubos de 1.5 mL adicionándoles 50 µL de agua estéril y se incubaron durante la noche a 4 °C. De cada DNA eluído se tomaron 2 µL y se reamplificaron utilizando las condiciones descritas anteriormente y verificados mediante DGGE. Los productos que migraron como bandas individuales junto con su control fueron amplificados con los iniciadores 357F-GC-M13R-FORWARD (5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') y 518R-AT-M13F-REVERSE (5'-GTA AAA CGA

CGG CCA GTA AAT AAA ATA AAA ATG TAA AAA AAT TAC CGC GGC TGC TGG-3') (O'Sullivan *et al.*, 2008). Posteriormente se purificaron con un Kit comercial QIAquick PCR Purification (QIAGEN) para su consecutiva secuenciación en un centro de secuenciación comercial (University of Arizona Genetics Core [UAGC], AZ, USA).

## 5.8 Análisis Estadístico

Para los análisis microbiológicos se utilizó un diseño completamente al azar donde el factor variable fue la quesería y la variable respuesta fue el microorganismo, para ello se utilizó el paquete estadístico NCSS versión 2007, y de encontrarse diferencias ( $p < 0.05$ ) entre muestras se realizó una prueba de comparación de medias de Fisher.

Para conocer la identidad de las secuencias obtenidas se hizo un alineamiento local utilizaron dos herramientas bioinformáticas BLAST y ClustalW.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Análisis Físicoquímicos

En lo que respecta a la composición físicoquímica del QPB, se evaluaron los parámetros de humedad, grasa, proteína y acidez titulable durante su proceso de elaboración. En esta investigación se buscó conocer de manera general cual es la composición del QPB, más que encontrar diferencias entre las queserías. Para esto se evaluaron muestras de leche cruda (LC), suero para cuajar (SPC), cuajada (C), suero de cuajada (SC) y queso (Q).

Cada componente químico juega un papel importante en la calidad del producto final; de hecho en los quesos artesanales elaborados a partir de leche cruda la calidad en términos físicoquímicos es crucial para que se alcancen características más agradables y apetecibles para el consumidor (Beuvier y Buchin, 2004).

#### 6.1.1 Humedad

En la **Tabla 1** se presentan los promedios obtenidos del porcentaje de humedad. Respecto al porcentaje de humedad de LC se encontró en los parámetros adecuados de acuerdo con lo indicado por la NMX-F-700-

**Tabla 1.** Composición promedio y desviación estándar del % de humedad de las muestras representativas del proceso de elaboración del queso de Poro de Balacán.

Quesería	Contenido de humedad (%)				
	LC	SPC	C	SC	Q
<b>A</b>	89.35 ± 0.35	94.45 ± 0.04	76.72 ± 0.50	94.05 ± 0.24	35.20 ± 0.24
<b>B</b>	87.02 ± 0.00	94.47 ± 0.01	80.45 ± 1.16	94.08 ± 0.04	24.39 ± 0.72
<b>C</b>	89.10 ± 0.15	94.52 ± 0.01	79.37 ± 0.22	94.54 ± 0.16	25.79 ± 0.17
<b>D</b>	89.66 ± 0.50	95.26 ± 0.02	78.36 ± 0.08	93.90 ± 0.02	29.98 ± 0.03
<b>E</b>	88.91 ± 0.11	93.96 ± 0.02	78.67 ± 0.64	93.88 ± 0.12	25.97 ± 0.58
<b>F</b>	91.67 ± 0.29	94.89 ± 0.00	77.46 ± 0.56	94.90 ± 0.54	31.42 ± 0.47

Los resultados representan el promedio ± EE de dos lotes muestreados.  
 LC (leche cruda), SPC (suero para cuajar), C (cuajada), SC (suero de cuajada) y Q (queso con 7 días de almacenamiento).

COFOCALEC-2004 (COFOCALEC, 2004) para todos los productores, los valores oscilaron entre 87.02 y 91.67 %

En lo que respecta al porcentaje de humedad en C, se presentaron valores porcentuales entre 76.72 y 80.45, los cuales se encuentran por encima de lo reportado en otros estudios (64.63%) donde también utilizan coagulación ácida en la elaboración del queso (Alegría *et al.*, 2009).

La coagulación ácida conlleva a una desmineralización de la micela y la destrucción de la estructura (gel muy frágil) (Lucey, 2011), es así que en el proceso del QPB se obtienen geles débiles y con alta humedad, tras el drenado de suero de la cuajada se pierde una importante cantidad de agua lo que se verá reflejado en el porcentaje de humedad del queso.

De acuerdo con la literatura, en el queso obtenido por coagulación ácida se pierden hasta tres terceras partes de humedad que contiene la cuajada como se observó en este estudio (Dejmek y Walstra, 2004). La NOM-243-SSA1-2010 indica que el queso no debe contener arriba de 45% de humedad, por lo que el QPB se encuentra dentro de lo establecido (SSA, 2010).

### **6.1.2 Proteína**

El contenido de proteína en las muestras durante el proceso de elaboración del QPB se muestra en la **Tabla 2**. Para LC se obtuvieron promedios porcentuales entre 2.97 y 3.5, por lo que se coloca la mayoría de los productores dentro de la categoría clase A ( $\geq 31$  clase A) de acuerdo con la NMX-F-700-COFOCALEC-2004 (COFOCALEC, 2004) posicionándose como de buena calidad.

En cuanto al contenido de proteína en C, los promedios se encontraron entre 3.68 y 6.77 por debajo a lo reportado (12.07%). en el queso Casín, un queso similar al QPB (Alegría *et al.*, 2009). Sin embargo, en Q los valores se

**Tabla 2.** Composición promedio y desviación estándar del % de proteína de las muestras representativas del proceso de elaboración del queso de Poro de Balancán.

<b>Contenido de proteína (%)</b>					
<b>Quesería</b>	<b>LC</b>	<b>SPC</b>	<b>C</b>	<b>SC</b>	<b>Q</b>
<b>A</b>	3.42 ± 0.04	0.96 ± 0.00	3.68 ± 0.17	0.93 ± 0.00	24.76 ± 0.66
<b>B</b>	3.33 ± 0.01	0.86 ± 0.00	6.55 ± 0.10	0.98 ± 0.02	26.79 ± 0.56
<b>C</b>	3.53 ± 0.23	0.90 ± .01	6.77 ± 0.08	0.92 ± 0.03	28.47 ± 0.25
<b>D</b>	2.97 ± 0.04	0.94 ± 0.06	4.93 ± 0.09	0.93 ± 0.06	25.82 ± 0.52
<b>E</b>	3.50 ± 0.06	1.04 ± 0.21	4.36 ± 0.08	0.83 ± 0.00	26.87 ± 0.57
<b>F</b>	3.10 ± 0.02	0.85 ± 0.00	7.24 ± 0.63	0.88 ± 0.04	24.21 ± 0.48

Los resultados representan el promedio ± EE de dos lotes muestreados  
 LC (leche cruda), SPC (suero para cuajar), C (cuajada), SC (suero de cuajada) y Q (queso con 7 días de almacenamiento).

encontraron dentro de lo indicado por la NOM-243-SSA1-2010 (SSA, 2010) que establece un 22% mínimo de proteína.

Además los valores encontrados para proteína en este estudio se encuentran dentro del rango de lo reportado para otros quesos de alto consumo en México como el Oaxaca (26.5 a 31.6 %) (De Oca-Flores *et al.*, 2009), Cotija Región de Origen (30.5 %) (Flores-Magallón *et al.*, 2011) y Chihuahua (24.1 a 27.6 %) (Tunick *et al.*, 2008).

### 6.1.3 Grasa

El contenido de grasa de la LC se ha establecido en un 3% de acuerdo con la NMX-F-700-COFOCALEC-2012 (COFOCALEC, 2004). La **Tabla 3** muestra los resultados del contenido de grasa de las muestras colectadas con los diferentes productores. En conjunto con la proteína, la grasa desempeña un papel muy importante debido a que estos componentes son utilizados por la microbiota de la leche cruda. De esta forma, la microbiota por su capacidad proteolítica y lipolítica desencadenará la producción de nuevas moléculas que en el queso se traducirá en las características sensoriales distintivas de cada variedad de queso (Beuvier y Buchin, 2004)

En cuanto al porcentaje de grasa en el queso la NOM-243-SSA1-2010 (SSA, 2010) indica un mínimo de 25 %, por lo que todos los productores cumplen con lo indicado. En comparación con queso Cotija Región de Origen, los valores encontrados fueron similares (34%) así como el queso Chihuahua (30.1 a 34.6)(Tunick *et al.*, 2008, Flores-Magallón *et al.*, 2011).

**Tabla 3.** Composición promedio y desviación estándar del % de grasa de las muestras obtenidas durante el proceso de elaboración del queso de Poro de Balancán.

<b>Contenido de grasa (%)</b>					
<b>Quesería</b>	<b>LC</b>	<b>SPC</b>	<b>C</b>	<b>SC</b>	<b>Q</b>
<b>A</b>	2.88 ± 0.15	0.15 ± 0.00	4.13 ± 0.25	0.10 ± 0.00	36.50 ± 0.00
<b>B</b>	3.85 ± 0.27	0.15 ± 0.00	6.88 ± 0.25	0.10 ± 0.00	43.08 ± 0.29
<b>C</b>	2.32 ± 0.04	0.05 ± 0.00	8.46 ± 0.05	0.05 ± 0.00	41.67 ± 0.41
<b>D</b>	2.98 ± 0.01	0.10 ± 0.00	7.42 ± 0.20	0.10 ± 0.00	38.83 ± 0.41
<b>E</b>	2.78 ± 0.05	0.10 ± 0.00	6.63 ± 0.25	0.15 ± 0.00	36.75 ± 1.50
<b>F</b>	2.88 ± 0.03	0.10 ± 0.00	7.02 ± 0.03	0.13 ± 0.00	37.79 ± 0.77

Los resultados representan el promedio ± EE de dos lotes muestreados.  
 LC (leche cruda), SPC (suero para cuajar), C (cuajada), SC (suero de cuajada) y Q (queso con 7 días de almacenamiento).

#### 6.1.4 Acidez titulable

En general, la determinación de la acidez de la leche es una medida indirecta de su calidad sanitaria. Este análisis es aplicado de forma habitual a la leche cruda, como así también a la leche tratada térmicamente. El primer caso, reviste particular importancia económica, puesto que la tendencia a nivel mundial es fijar el precio de la compra de leche a los productores por su calidad, valorando no sólo el volumen o masa de leche, sino también la calidad fisicoquímica y sanitaria de la misma (Alais, 1985). En lo que respecta a la acidez de la leche cruda, de acuerdo con NMX-F-700-COFOCALEC-2004 (COFOCALEC, 2004), un valor normal de acidez se encuentra entre 1.3 y 1.6 g/L, expresado como ácido láctico.

Los valores obtenidos en este análisis se observan en la **Tabla 4**, sólo tres de los productores (A, E y F) se encuentran dentro de los parámetros establecidos NMX-F-700-COFOCALEC-2004 (COFOCALEC, 2004) para LC; sin embargo, el tiempo prolongado de entrega de la leche por parte de los productores en las queserías, aunado a las temperaturas de la región (33-35 °C) podrían estar influyendo en este parámetro.

En lo que corresponde al SPC, de acuerdo con los productores un suero adecuado para utilizar como agente coagulante es aquel que tiene entre 50 y 70 °D (1° Dornic = 0,1 gr por litro ó 0,01% de ácido láctico), que corresponde a los valores expresados de ácido láctico (5.3 a 7.6) de todos los productores, lo cual indica que hay una estandarización en SPC, misma que es muy importante para las características sensoriales del producto final.

**Tabla 4.** Composición promedio y desviación estándar del contenido de ácido láctico de las muestras obtenidas durante el proceso de elaboración del queso de Poro de Balancán.

<b>Contenido de ácido láctico (%)</b>					
<b>Queserías</b>	<b>LC (g/L)</b>	<b>SPC (g/L)</b>	<b>C (g/Kg)</b>	<b>SC (g/L)</b>	<b>Q (g/Kg)</b>
<b>A</b>	1.59 ± 0.02	7.61 ± 0.64	0.70 ± 0.02	1.49 ± 0.43	0.67 ± 0.01
<b>B</b>	1.83 ± 0.09	5.37 ± 0.15	0.71 ± 0.03	2.61 ± 0.14	0.71 ± 0.01
<b>C</b>	1.72 ± 0.04	7.42 ± 0.13	0.69 ± 0.02	3.44 ± 0.07	0.56 ± 0.01
<b>D</b>	1.77 ± 0.04	6.65 ± 0.16	0.70 ± 0.03	2.63 ± 0.80	0.86 ± 0.01
<b>E</b>	1.58 ± 0.04	6.51 ± 0.11	0.74 ± 0.03	5.40 ± 0.11	0.84 ± 0.01
<b>F</b>	1.60 ± 0.05	5.37 ± 0.27	1.92 ± 0.07	3.51 ± 0.06	0.72 ± 0.01

Los resultados representan el promedio ± EE de dos lotes muestreados.

LC (leche cruda), SPC (suero para cuajar), C (cuajada), SC (suero de cuajada) y Q (queso con 7 días de almacenamiento).

En cuanto al contenido de acidez del queso, los valores se encontraron entre 0.5 y 0.8 g/Kg de ácido láctico, en comparación con otros quesos que comparten esta característica particular (baja acidez), como es el queso Crema de Chiapas con valores de acidez (0.26 a 0.64). La baja acidez puede ser atribuida a la adición de suero ácido (pH 4) como agente coagulante a la leche al momento de cuajar, esta materia prima contienen bacterias ácido lácticas que se caracterizan por la producción de una alta cantidad de ácido láctico al inicio del proceso de elaboración del queso (como *Lactobacillus* y *Streptococcus*, lo cual se discute más adelante), lo cual se puede observar en este estudio, dichas bacterias durante el almacenamiento del queso influirán positivamente en su calidad final (Parente y Cogan, 2004).

## 6.2 Análisis Microbiológico

### 6.2.1 Microorganismos Indicadores

6.2.1.1 Mesófilos aerobios. En lo que respecta a los conteos de microorganismos mesófilos aerobios, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a las queserías bajo estudio. Los resultados se muestran en la **Tabla 5**.

Los valores para LC se encontraron fuera de especificación para todos los productores, tomando como referencia lo establecido por la NMX-F-700-COFOCALEC-2004 (COFOCALEC, 2004), quien categoriza las diferentes clases de leche cruda de la siguiente manera: clase 1=  $5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ , clase 2=  $5.47 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ , clase 3=  $5.77 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ , clase 4=  $6.07 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ .

Considerando lo anterior se puede observar que no se cumple con las especificaciones establecidas por la NMX-F-700-COFOCALEC-2004 (COFOCALEC, 2004) en ninguno de los productores bajo estudio; sin embargo, cabe mencionar que esta misma Norma indica que para productores no tecnificados los valores corresponden a  $7 \text{ log}_{10} \text{ UFC/mL}$ , cuyo valor refleja la situación real del sector productivo y poniendo en consideración esto, sólo las queserías D y E no cumplieron con las especificaciones. Los conteos altos de microorganismos mesófilos pudieran reflejar la deficiencia en la higiene durante la recolección y distribución de la leche como unos de los factores más importantes y que impactará en la calidad final del queso (Torres-Llanez *et al.*, 2006).

**Tabla 5.** Cuenta viable de microorganismos mesófilos aerobios asociada a la manufactura del queso de Poro de Balancán

Quesería	Cuenta viable (Log <sub>10</sub> UFC/g o mL)				
	L	SPC	C	SC	Q
<b>A</b>	7.28 ± 0.085 <sup>a</sup>	4.39 ± 0.27 <sup>c</sup>	5.50 ± 0.33 <sup>d</sup>	4.1 ± 0.38 <sup>b</sup>	4.40 ± 0.07 <sup>a</sup>
<b>B</b>	7.20 ± 0.115 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.48 <sup>a</sup>	3.89 ± 0.14 <sup>a</sup>	3.37 ± 0.87 <sup>c</sup>	3.10 ± 0.2 <sup>b</sup>
<b>C</b>	7.83 ± 0.095 <sup>a</sup>	3.66 ± 0.75 <sup>a</sup>	6.1 ± 0.03 <sup>b</sup>	3.60 ± 0.19 <sup>c</sup>	4.15 ± 0.57 <sup>a</sup>
<b>D</b>	8.20 ± 0.165 <sup>b</sup>	3.87 ± 0.45 <sup>a</sup>	6.65 ± 0.05 <sup>b</sup>	5.99 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.58 ± 0.11 <sup>b</sup>
<b>E</b>	8.88 ± 0.435 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.62 <sup>b</sup>	5.36 ± 0.56 <sup>c</sup>	3.26 ± 2.49 <sup>c</sup>	3.37 ± 0.22 <sup>b</sup>
<b>F</b>	7.08 ± 0.235 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.34 <sup>a</sup>	4.38 ± 0.27 <sup>c</sup>	4.60 ± 1.1 <sup>b</sup>	3.31 ± 0.26 <sup>b</sup>

Cada promedio representa la media de los dos lotes muestreados.

Promedios ± EE. Medias con diferente literal en la misma columna son significativamente diferentes (P<0.05).

\*LC (leche cruda), SPC (suero para cuajar), C (cuajada), SC (suero de cuajada) y Q (queso con 7 días de almacenamiento).

En cuanto a los conteos microbianos, en C se encontraron valores similares a los reportados ( $5.9 \log_{10}$  UFC/g y  $6.42 \log_{10}$  UFC/g) en queso artesanal Cotija Región de Origen y queso artesanal Casín Denominación de Origen Protegida (DOP) respectivamente (Alegría *et al.*, 2009, Flores-Magallón *et al.*, 2011). Sin embargo, cabe mencionar que aunque las condiciones de producción difieren en cada matriz, estos valores proporcionan información de referencia para este trabajo debido a algunas particularidades entre estos quesos.

Por otro lado, en los conteos realizados en Q se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre queserías, los valores oscilaron entre 2.58 y  $4.4 \log_{10}$  UFC/g. Los valores encontrados indican que se presentó un decremento significativo en este parámetro, tomando en cuenta los valores obtenidos de la materia prima al inicio del proceso de elaboración. En otros quesos mexicanos, se han reportado valores de  $5.3 \log_{10}$  UFC/g a los 30 días de almacenamiento (Flores-Magallón *et al.*, 2011), así como 7.31 y  $8.89 \log_{10}$  UFC/g a los 5 días de elaboración (Renyé *et al.*, 2008).

2.1.2 Coliformes totales. En lo que respecta a los conteos de bacterias coliformes totales, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los productores así como entre las matrices evaluadas, como lo muestra la **Tabla 6**. Cabe señalar que a pesar de que la NOM-243-SSA1-2010 (SSA, 2010) no especifica una cuenta para leche cruda, así como suero y cuajada, sin embargo los valores encontrados en este estudio para LC fueron similares (7.16) a lo reportado en otro estudio (Temelli *et al.*, 2006).

Para el SPC (denominado en la literatura como cultivo iniciador natural (Neviani y Carini, 1994, Coppola *et al.*, 1997, Santarelli *et al.*, 2008) se ha señalado que las *Enterobacterias* como coliformes forman parte de la microbiota presente en los cultivos iniciadores naturales; sin embargo, no se encontraron reportes de los conteos para este microorganismo.

**Tabla 6.** Cuenta viable de bacterias coliformes totales durante la manufactura del queso de Poro de Balancán

Quesería	Cuenta viable (Log <sub>10</sub> UFC/g o mL)				
	LC	SPC	C	SC	Q
<b>A</b>	6.35 ± 0.19 <sup>b</sup>	4.06 ± 0.12 <sup>c</sup>	3.8 ± 0.30 <sup>b</sup>	ND <sup>*a</sup>	3.5 ± 0.2 <sup>c</sup>
<b>B</b>	5.19 ± 0.20 <sup>a</sup>	2.75 ± 0.17 <sup>b</sup>	3.4 ± 0.23 <sup>b</sup>	3.05 ± 0.15 <sup>c</sup>	2.52 ± 0.07 <sup>b</sup>
<b>C</b>	7.48 ± 0.38 <sup>c</sup>	4.50 ± 0.44 <sup>c</sup>	5.41 ± 0.41 <sup>c</sup>	3.03 ± 0.30 <sup>c</sup>	3.93 ± 0.08 <sup>d</sup>
<b>D</b>	7.48 ± 0.38 <sup>c</sup>	5.93 ± 0.07 <sup>d</sup>	6.53 ± 0.04 <sup>d</sup>	6.53 ± 0.04 <sup>d</sup>	2.54 ± 0.11 <sup>b</sup>
<b>E</b>	8.19 ± 0.16 <sup>c</sup>	ND <sup>*a</sup>	2.6 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.26 ± 0.12 <sup>b</sup>	ND <sup>*a</sup>
<b>F</b>	5.50 ± 0.19 <sup>a</sup>	2.62 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.4 ± 0.08 <sup>a</sup>	3.51 ± 0.16 <sup>c</sup>	3.42 ± 0.14 <sup>c</sup>

Cada promedio representa la media de los dos lotes muestreados.

Promedios ± EE. Medias con diferente literal en la misma columna son significativamente diferentes (P<0.05)

\*ND: No detectado; límite de detección= dilución patrón.

LC (leche cruda), SPC (suero para cuajar), C (cuajada), SC (suero de cuajada) y Q (queso con 7 días de almacenamiento).

Se ha logrado establecer que algunas bacterias Gram-negativas confieren características organolépticas distintivas a los quesos, dichas bacterias trabajan durante el reposo de la cuajada de manera antagonista con otras bacterias, confiriendo cierta protección (Coppola *et al.*, 1988, Carraro *et al.*, 2011, Bottari *et al.*, 2013).

En lo que concierne a los conteos de bacterias coliformes en el Q, solo tres de las queserías (B, D y E) se encontraron dentro de los valores establecidos por la NOM-243-SSA1-2010 (SSA, 2010) ( $<100$  UFC/g o  $\text{mL} \approx 2 \log_{10}$  UFC/mL). Sin embargo, los valores de este estudio se encuentran por debajo de lo reportado por Alegría *et al.*, (2009) para queso con 7 días de elaboración ( $6.13 \log_{10}$  UFC/g).

6.2.1.3 Hongos y levaduras. Cabe señalar que en este estudio no se detectó la presencia de hongos durante el proceso de elaboración del QPB aunque si de levaduras, los datos obtenidos se presentan en la **Tabla 7**. Los productores bajo estudio fueron diferentes ( $p < 0.05$ ) en sus muestras de C, SC y Q, aunque en LC 5 de las queserías exhibieron valores iguales.

Los conteos se presentaron en el rango de 5 a  $6.02 \log_{10}$  UFC/mL en lo que respecta a LC y aunque la normativa vigente (SSA, 2010) no indica un valor para este microorganismo, los valores están por encima a lo reportado por Torres-Llanez *et al.*, 2006 ( $2.5 \log_{10}$  UFC/mL), Alegría *et al.*, 2009, (no detectado=límite de detección  $2 \log_{10}$ ) y ( $2 \log_{10}$  UFC/mL) (Borelli *et al.*, 2006).

Por lo anterior se puede inferir que los conteos elevados de levaduras en este estudio pueden ser debidos a que estos microorganismos llegan como microbiota adventicia del ambiente de las queserías por ejemplo del aire, piso, paredes, delantales así como en las manos de los productores (Welthagen y Viljoen, 1998). No obstante otro factor que puede influir en el caso de la leche

**Tabla 7.** Cuenta viable de levaduras asociada a la manufactura del queso de Poro de Balancán

Cuenta viable (Log <sub>10</sub> UFC/g o mL)					
Quesería	LC	SPC	C	SC	Q
A	5.79 ± 0.04 <sup>a</sup>	5.8 ± 0.09 <sup>a</sup>	5.21 ± 0.03 <sup>a</sup>	5.59 ± 0.04 <sup>c</sup>	5.45 ± 0.06 <sup>b</sup>
B	5.59 ± 0.04 <sup>a</sup>	5.67 ± 0.23 <sup>a</sup>	5.96 ± 0.26 <sup>c</sup>	3.45 ± 0.34 <sup>a</sup>	4.99 ± 0.09 <sup>b</sup>
C	5.75 ± 0.04 <sup>a</sup>	5.89 ± 0.11 <sup>a</sup>	6.16 ± 0.10 <sup>c</sup>	5.12 ± 0 <sup>b</sup>	6.26 ± 0.12 <sup>d</sup>
D	5.37 ± 0.43 <sup>a</sup>	5.94 ± 0.13 <sup>a</sup>	6.28 ± 0.13 <sup>c</sup>	5.38 ± 0.52 <sup>c</sup>	5.62 ± 0.02 <sup>c</sup>
E	6.02 ± 0.08 <sup>b</sup>	5.94 ± 0.13 <sup>a</sup>	4.37 ± 0.16 <sup>b</sup>	4.14 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.37 <sup>a</sup>
F	5.00 ± 0.40 <sup>a</sup>	5.67 ± 0.27 <sup>a</sup>	5.88 ± 0.15 <sup>c</sup>	5.15 ± 0.47 <sup>b</sup>	4.92 ± 0.04 <sup>b</sup>

Cada promedio representa la media de los dos lotes muestreados.

Promedios ± EE. Medias con diferente literal en la misma columna son significativamente diferentes (P<0.05).

\*LC (leche cruda), SPC (suero para cuajar), C (cuajada), SC (suero de cuajada) y Q (queso con 7 días de almacenamiento).

para la elaboración del QPB son los tiempos prolongados de entrega de la leche en las queserías ya que una vez ordeñada permanece hasta 3 horas en ausencia de cadena de frío lo que propicia el crecimiento de algunos microorganismos.

Respecto al SPC, no se encontraron diferencias ( $p < 0.05$ ) entre productores presentando valores de  $5 \log_{10}$  UFC/mL, aunque en otros estudios se han reportado valores inferiores de  $3.8 \log_{10}$  UFC/mL (Borelli *et al.*, 2006), lo encontrado en este estudio es muy importante ya que la estandarización del SPC como un cultivo iniciador podría ser parte crucial en la microbiota que se le otorga a la leche al momento de la cuajada. Es importante resaltar que en muchas ocasiones de este cultivo iniciador dependerán muchas de las características sensoriales del queso así como su tipicidad, y más aún como un parámetro importante para la búsqueda de la DOP de este alimento (Mauriello *et al.*, 2003, Ercolini *et al.*, 2008, Santarelli *et al.*, 2008).

En relación a los conteos de levaduras en C, los valores encontrados en este estudio corresponden con los reportados por Flores-Magallón *et al.*, (2011) ( $5.0 \log_{10}$  UFC/g) y cercanos ( $4.8 \log_{10}$  UFC/g) a lo reportado por Dolci *et al.*, (2010).

Los resultados obtenidos en los conteos de levaduras en Q se encontraron diferencias ( $p < 0.05$ ) entre productores, los conteos se presentaron en un intervalo de 3.8 a  $6.5 \log_{10}$  UFC/g por lo que sobrepasan el límite máximo permitido por la NOM-243-SSA1-2010 (SSA, 2010) ( $500 \text{ UFC/g} \approx 2.7 \log_{10} \text{ UFC/g}$ ). Al respecto se ha descrito que en algunos tipos de quesos no es raro encontrar conteos elevados de levaduras, sobre todo considerándose al papel positivo que desempeñan durante el proceso de fermentación y maduración del queso (Fleet, 1990),

Se ha documentado que durante el proceso de maduración, las levaduras participan junto con otros microorganismos y contribuyen a los cambios de textura y biosíntesis de compuestos aromáticos (Welthagen y Viljoen, 1999). Debido a características propias de las levaduras, como su alta actividad proteolítica y lipolítica desempeñan un papel importante en la formación de precursores del aroma tales como aminoácidos, ácidos grasos y ésteres. Además pueden inhibir microorganismos no deseados y sintetizan factores de crecimiento como las vitaminas B, ácido pantoténico, niacina, riboflavina y biotina (Jakobsen y Narvhus, 1996) (Ferreira y Viljoen, 2003). Por todo esto el estudio de su papel específico en el QPB podría ser objeto de investigaciones subsecuentes.

## 6.2.2 Microorganismos Patógenos

6.2.2.1 *E. coli*. La incidencia de *E. coli* a través del proceso de manufactura del QPB se presenta en la **Tabla 8**. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre productores para este parámetro, así mismo se observó una disminución presumiblemente significativa al final del proceso.

Los valores obtenidos para LC presentaron conteos elevados para todos los productores, los cuales oscilando entre 2.28 y 5.83  $\log_{10}$  UFC/mL. Cabe señalar que la NOM-243-SSA1-2010 (SSA, 2010) no establece parámetros para este microorganismo en leche cruda. Sin embargo no debe de omitirse su incidencia en leche y productos lácteos y las implicaciones que tiene en la salud debido a que su presencia en productos lácteos ha ocasionado infecciones por brotes asociados a este microorganismo (De Buyser *et al.*, 2001).

Algunos de los factores asociados a la contaminación por este microorganismo son; heces de ganado infectado, por contacto de la leche con

**Tabla 8.** Cuenta viable de *E. coli* asociada a la manufactura del queso de Poro de Balancán.

Quesería	Cuenta viable (Log <sub>10</sub> UFC/g o mL)				
	L	SPC	C	SC	Q
<b>A</b>	6.16 ± 0.03 <sup>d</sup>	3.83 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.01 <sup>c</sup>	ND*	ND*
<b>B</b>	3.03 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.83 ± 0.35 <sup>b</sup>	3.06 ± 0.12 <sup>b</sup>	ND*	ND*
<b>C</b>	5.83 ± 0.25 <sup>d</sup>	ND* <sup>c</sup>	2.56 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.96 ± 0.16 <sup>a</sup>	ND*
<b>D</b>	5.22 ± 0.04 <sup>c</sup>	ND* <sup>c</sup>	3.54 ± 0.24 <sup>c</sup>	ND*	ND*
<b>E</b>	4.93 ± 0.24 <sup>b</sup>	ND* <sup>c</sup>	2.35 ± 0.13 <sup>a</sup>	ND*	ND*
<b>F</b>	2.84 ± 0.06 <sup>a</sup>	ND* <sup>c</sup>	2.13 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.33 ± 0.10 <sup>b</sup>	ND*

Cada promedio representa la media de los dos lotes muestreados.

Promedios ± EE. Medias con diferente literal en la misma columna son significativamente diferentes (P<0.05)

\*ND: No detectado; límite de detección= dilución patrón.

LC (leche cruda), SPC (suero para cuajar), C (cuajada), SC (suero de cuajada) y Q (queso con 7 días de almacenamiento).

superficies contaminadas en la granja así como la falta de buenas prácticas por parte de los productores lo cual coadyuva a la susceptibilidad de contaminaciones (Van Kessel *et al.*, 2004, Bianchi *et al.*, 2013).

En cuanto a los conteos de *E. coli* en SPC se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las queserías estudiadas. Para las queserías C, D, E, y F no se detectó la presencia de *E. coli* con la metodología utilizada en este estudio, lo cual está en concordancia con lo ya reportado en previos estudios (Carraro *et al.*, 2011). Por otro lado los conteos obtenidos de muestras de C presentaron valores de 2.23 a 3.5  $\log_{10}$  UFC/g), los cuales están por debajo de lo obtenido por Alegría *et al.*, (2009) y en concordancia con lo descrito por Dolci *et al.*, (2010).

En investigaciones previamente reportadas se ha indicado que el incremento en los conteos de *E. coli* en la cuajada durante el proceso de elaboración del queso, es en parte, debido a la retención física de microorganismos en el coágulo y su multiplicación durante la coagulación. Este incremento en las cuentas microbianas es acompañado de una disminución en el pH debido a la actividad de las BAL, afectando probablemente a microorganismos como *E. coli* (Torres-Llenez *et al.*, 2006).

A pesar de que *E. coli* es uno de los microorganismos de mayor incidencia en quesos no madurados y elaborados a partir de leche cruda en nuestro país (Torres-Vitela *et al.*, 2012), en este estudio no fue detectada para ninguno de los quesos de los productores estudiados, lo cual puede deberse a la generación de sustancias antimicrobianas producidas por algunas BAL, como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas, las cuales actúan inhibiendo a este patógeno (Stiles, 1996, Zacharof y Lovitt, 2012).

6.2.2.2. *S. aureus*. En cuanto a la incidencia *S. aureus*, cabe mencionar que en todos los muestreos durante el proceso de producción del QPB se encontró presente, así mismo se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para todos las queserías como se puede observar en la **Tabla 9**.

*S aureus* es uno de los microorganismos más comunes, causante de enfermedades transmitidas por alimentos en el mundo (Hennekinne *et al.*, 2012). El envenenamiento por alimentos con *Staphylococcus* ha sido atribuido al consumo de leche y productos lácteos contaminados con la toxina producida por esta microorganismo, especialmente quesos elaborados con leche cruda y una higiene pobre, resultando en un ambiente propicio para el incremento en el número de células de *S. aureus* y posterior producción de toxina estafilocócica, desencadenando los cuadros de intoxicación estafilocócica (Can y Çelik, 2012).

En los conteos de *S. aureus* para LC se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre queserías, los valores oscilaron en un rango de 3.52 a 5.65  $\log_{10}$  UFC/mL, lo cual está por encima de lo establecido por la NOM-243-SSA1-2010 (SSA, 2010) cuyo valor es de  $\leq 10$  UFC/mL  $\approx 1 \log_{10}$  UFC/mL aun para leche pasteurizada. Los valores encontrados en este estudio se relacionan con lo indicado por Temelli *et al.*, 2006 (5.82  $\log_{10}$  UFC/mL en LC). Este patógeno es frecuentemente encontrado en los tanques de leche debido a que está contenido en la leche proveniente de vacas con mastitis clínica o subclínica, los niveles pueden estar por encima de 8  $\log_{10}$  UFC/mL<sup>-1</sup> lo cual pudiera ser el factor principal en el caso del QPB (Oliver *et al.*, 2005, Callon *et al.*, 2008).

En lo que corresponde a los conteos en SPC de este microorganismo se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre queserías. Los valores encontrados en el presente estudio oscilaron desde 2.27 hasta 6.12  $\log_{10}$  UFC/mL. En la literatura se indica, que algunas especies de *Staphylococcus* son normalmente encontradas en los cultivos iniciadores utilizados para la

**Tabla 9.** Cuenta viable de *S. aureus* asociada a la manufactura del queso de Poro de Balancán.

<b>Cuenta viable (Log<sub>10</sub> UFC/g o mL)</b>					
<b>Quesería</b>	<b>LC</b>	<b>SPC</b>	<b>C</b>	<b>SC</b>	<b>Q</b>
<b>A</b>	5.11 ± 0.28 <sup>b</sup>	5.05 ± 0.32 <sup>c</sup>	3.28 ± 0.27 <sup>a</sup>	3.62 ± 0.04 <sup>a</sup>	5.46 ± 0.45 <sup>e</sup>
<b>B</b>	4.5 ± 0.23 <sup>b</sup>	4.27 ± 0.33 <sup>c</sup>	3.19 ± 0.21 <sup>a</sup>	2.73 ± 0.03 <sup>b</sup>	2.46 ± 0.08 <sup>a</sup>
<b>C</b>	5.65 ± 0.25 <sup>c</sup>	3.27 ± 0.14 <sup>b</sup>	4.6 ± 0.28 <sup>b</sup>	2.46 ± 0.06 <sup>b</sup>	3.65 ± 0.19 <sup>c</sup>
<b>D</b>	5.34 ± 0.23 <sup>c</sup>	6.12 ± 0.17 <sup>e</sup>	5.76 ± 0.13 <sup>c</sup>	3.71 ± 0.21 <sup>a</sup>	2.78 ± 0.06 <sup>b</sup>
<b>E</b>	5.54 ± 0.22 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.20 <sup>d</sup>	4.66 ± 0.05 <sup>b</sup>	3.69 ± 0.22 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.25 <sup>c</sup>
<b>F</b>	3.52 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.27 ± 0.12 <sup>a</sup>	4.38 ± 0.26 <sup>b</sup>	2.62 ± 0.25 <sup>b</sup>	4.44 ± 0.15 <sup>d</sup>

Cada promedio representa la media de los dos lotes muestreados.

Promedios ± EE. Medias con diferente literal en la misma columna son significativamente diferentes (P<0.05).

LC (leche cruda), SPC (suero para cuajar), C (cuajada), SC (suero de cuajada) y Q (queso con 7 días de almacenamiento).

elaboración de quesos artesanales, principalmente en aquellos producidos en ciudades mediterráneas, sin embargo, es importante mencionar que este microorganismo tiene la capacidad de producir enterotoxinas las cuales pueden causar enfermedades e infecciones nosocomiales, por lo tanto es importante descartar su presencia en los alimentos (Irlinger, 2008).

En cuanto a los conteos correspondientes a C se hallaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre queserías, los conteos se presentaron entre 3.19 y 5.76  $\log_{10}$  UFC/mL correspondiendo a lo encontrado por Alegría et al., 2009 (5.27  $\log_{10}$  UFC/mL) sin embargo cabe señalar que el valor corresponde a la cuenta total de *Staphylococcus* ya que la especie *S. aureus* no se detectó. Uno de los factores que posiblemente influya en los conteos elevados de *S. aureus* es la manipulación de la cuajada por parte del quesero al ser transferida a moldes ya que se ha indicado que este microorganismo se encuentra distribuido en piel y mucosas del ser humano.

En lo que respecta a las cuentas en Q se encontraron diferencias ( $p < 0.05$ ) entre queserías, los valores en este parámetro oscilaron entre 2.46 y 5.46  $\log_{10}$  UFC/g. Cabe señalar que ninguno de los productores cumple con las especificaciones que indica la NOM-243-SSA1-2010 (SSA, 2010) ( $\leq 100$  UFC/mL  $\approx 2 \log_{10}$  UFC/mL) sin embargo coinciden con los valores reportados por Dolci et al., (2010).

En algunas investigaciones se ha indicado que existen mecanismos de inhibición por parte de la vaca frente a este patógeno, una de las hipótesis más aceptadas es la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) producido por BAL como *Lactobacillus*. En las vacas estos microorganismos son uno de los principales componentes del ecosistema vaginal de las vacas, y la inhibición de *S. aureus* se ha demostrado *in vitro*. Se cree también, que la acción inhibidora de  $H_2O_2$  podría resultar de la acción de peroxidasas en conjunto con compuestos halogenados (cloruro y bromuro) que generen especies reactivas

de oxígeno y son altamente tóxicos para ciertos patógenos (Charlier *et al.*, 2009).

En lo que respecta a los conteos de *S. aureus* encontrados en Q se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre queserías. Los valores reflejan conteos elevados para este microorganismo de 2.46 a 5.46  $\log_{10}$  UFC/mL. Lo que concuerda con que *S. aureus* es uno de los microorganismos que habitualmente es encontrado en ambientes lácteos, incluido el queso.

En un estudio realizado por (Jakobsen *et al.*, 2011) se encontró la presencia de *S. aureus* en un 80.8% de las muestras de queso Fresco elaborado con leche cruda, no obstante este porcentaje de incidencia disminuyó a través del almacenamiento durante 30 días a 24.6%, lo cual indica que hubo una disminución de más del 80% debido al almacenamiento. En el caso del QPB sería pertinente hacer estudios sobre la incidencia de este patógeno a través de tiempos de almacenamiento más prolongados debido a que ocasionalmente este queso sufre una maduración involuntaria de por lo menos 30 días ya que es un producto regional y en ocasiones se presentan problemas en su distribución.

6.2.2.3 Enterotoxina estafilocócica. Al respecto de los resultados encontrados sobre la incidencia de enterotoxina estafilocócica, se encuentran en la **Tabla 10**. Cabe resaltar, que solo en una de las queserías (B) se detectó la presencia de esta enterotoxina durante esta investigación. En lo que compete a las queserías A, C, D, E y F no se encontró presencia de enterotoxina estafilocócica. Lo anterior podría deberse a la distribución de la variación genética de las cepas de *S. aureus* que existen entre la diversidad de las queserías.

Las enterotoxinas estafilocócicas (SEs) por sus siglas en inglés, son una variedad de proteínas extracelulares que produce *S. aureus*, incluyendo las causantes de intoxicaciones alimentarias. Estas moléculas son sintetizadas por

el microorganismo durante su crecimiento en alimentos y se han identificado cinco como las más comunes en la intoxicación de alimentos (SEA-SED). Las SEA y SED se producen durante la fase logarítmica del microorganismo, más aun, a la fecha se han identificado 23 enterotoxinas diferentes producidas por *S. aureus* siendo la glándula mamaria de los bovinos el principal reservorio de cepas de *S. aureus* enterotoxigenicas (Can y Çelik, 2012, Podkowik *et al.*, 2013)

**Tabla 10.** Enterotoxina estafilocócica asociada a la manufactura de queso de Poro de Balancán a los 7 días de almacenamiento.

Muestreo	Quesería					
	A	B	C	C	E	F
M1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
M2	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

Los resultados corresponden a 2 lotes muestreados

6.2.2.4 *Listeria monocytogenes*. En lo que corresponde a la presencia de *Listeria monocytogenes* en el QPB tras 7 días de elaboración, no se encontró su presencia en ninguna de las queserías estudiadas, **Tabla 11**. Cabe destacar que se los resultados obtenidos en este trabajo son favorables ya que este microorganismo tiene cero tolerancia NOM-243-SSA1-2010 (SSA, 2010) debido a las implicaciones que tiene en la salud humana.

La mayoría de los brotes relacionados con *Listeria monocytogenes* se han producido en poblaciones hispanas, acostumbradas a comer quesos artesanales (Torres-Vitela *et al.*, 2012). Los alimentos listos para el consumo, cárnicos, lácteos, mariscos, frutas y vegetales se han considerado como la principal fuente de infección (Kramarenko *et al.*, 2013).

*Listeria monocytogenes* tienen la capacidad de adherirse y colonizar superficies inertes que están en contacto con los alimentos así mismo adquiere resistencia adaptativa a factores adversos como: estrés osmótico, un amplio rango de temperaturas, acidez, desinfectantes, esto en tiempos cortos de 3 a 5 días por lo cual se han buscado diversas alternativas para su inhibición (Mariani *et al.*, 2011).

Para contrarrestar esta problemática algunos autores han reportado que existen algunas BAL que a través de diversos mecanismos impiden el establecimiento y crecimiento de *Listeria* en superficies. Dichos mecanismos involucran la producción de agentes antimicrobianos como el ácido láctico, bacteriocinas y competencia por nutrientes. (Licitra *et al.*, 2007, Lortal *et al.*, 2009, Didienne *et al.*, 2012).

**Tabla 11.** *Listeria monocytogenes* asociada a la manufactura de queso de Poro de Balancán a los 7 días de almacenamiento.

Quesería						
Muestreo	A	B	C	D	E	F
M1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
M2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Los resultados de presencia/ausencia corresponden a 25 g o mL de la muestra analizada.

En quesos mexicanos se ha mostrado la evidencia de la inhibición de este patógeno por BAL, especialmente cepas de *Enterococcus faecium*. aislados de queso Panela, Fresco y Chihuahua Menonita (Alvarado *et al.*, 2005, Renye *et al.*, 2009). Por lo cual se podría inferir que probablemente a algunas BAL están ejerciendo alguno de los mecanismos mencionados en el QPB.

6.2.2.5 Salmonella. En lo que corresponde a *Salmonella*, en el presente estudio se evaluó su presencia durante el proceso de elaboración del QPB. Se observó una alta incidencia de este patógeno desde la materia prima, no obstante un aspecto importante es la usencia de *Salmonella* en Q como se puede observar en la **Tabla 12**.

En lo que correspondió a LC se observó la presencia de *Salmonella* en las queserías A, B, y E. De acuerdo con la literatura se ha descrito que en leche y productos lácteos pasteurizados este patógeno se presenta con una alta incidencia, lo cual está en concordancia con lo encontrado en esta investigación (De Buyser *et al.*, 2001).

Al mismo tiempo la presencia de *Salmonella* en el SPC fue frecuente en todas las queserías a pesar de la alta acidez y pH (pH= 4) presentada. Algunos autores han descrito que *Salmonella* resiste a pH normalmente letales de 3.0 o 2.5 y se ha indicado que este patógeno cuenta con mecanismos de resistencia y tolerancia a ácidos, estos mecanismos están mediados por señales incluyendo la temperatura, el pH y osmolaridad, de esta manera, en respuesta al estrés se expresan genes que le permiten sobrevivir. Aunque el carácter específico de la resistencia dependerá de cada cepa (Shen y Fang, 2012, Spector y Kenyon, 2012, Lianou y Koutsoumanis, 2013).Lo anterior responde a la persistencia de este microorganismo en el SPC del QPB.

**Tabla 12.** *Salmonella* asociada a la manufactura de queso de Poro de Balancán.

Quesería y muestreo		LC	SPC	C	SC	Q
A	M1	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
	M2	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
B	M1	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
	M2	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
C	M1	Ausente	Presente	Presente	Presente	Ausente
	M2	Ausente	Presente	Presente	Presente	Ausente
D	M1	Ausente	Presente	Presente	Presente	Ausente
	M2	Ausente	Presente	Presente	Presente	Ausente
E	M1	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
	M2	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
F	M1	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
	M2	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente

Los resultados corresponden a 2 lotes muestreados

LC (leche cruda), SPC (suero para cuajar), C (cuajada), SC (suero de cuajada) y Q (queso con 7 días de almacenamiento)

Los resultados de presencia/ausencia corresponden a 25 g o mL de la muestra analizada.

En lo que corresponde a C y SC *Salmonella* se presentó en la mayoría de los productores, lo cual puede ser atribuido a que algunas células pueden quedar atrapadas en el gel de caseína (Dimitrellou *et al.*, 2009). Al mismo tiempo en SC siguen permaneciendo y logran resistir los cambios de pH ya que el SC obtenido del proceso del QPB permanece 24h sin refrigeración con el fin de que se acidifique y pueda ser utilizado para cuajar en la producción del día siguiente y *Salmonella* sigue persistiendo.

En lo que corresponde a la presencia de *Salmonella* en Q, no se encontró presencia en ninguno de los productores, por lo cual podrían existir algunos mecanismos de inhibición de este patógeno como la presencia de biofilms de BAL. Estudios científicos han evidenciado el uso de biofilms para el biocontrol de patógenos. Dichos biofilms son matrices viscosas compuestas de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que forman de manera natural los microorganismos debido a su capacidad de adhesión y multiplicación (Simões *et al.*, 2010). Este material se forma algunas veces en las superficies de madera donde el queso pasa algún proceso de maduración o almacenamiento, y es aquí donde ocurre la interacción de BAL y patógenos. Como ejemplo, se han encontrado algunas BAL como *S. thermophilus*, *L. lactis*, y *L. delbrueckii* subsp.*lactis* en tinajas de madera utilizadas en la elaboración de queso Ragusano DOP (Licitra *et al.*, 2007) y se ha observado la ausencia total de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*O157:H7, lo cual ha sido atribuido a dicha interacción de poblaciones microbianas (Lortal *et al.*, 2009)

En el proceso del QPB pudiera estar influyendo de manera positiva el uso de utensilios de madera, como moldes para el drenado de la cuajada, moldes de formación del queso, los estantes de madera donde se almacena el queso, y se podría estar formando un ambiente propicio para este tipo de interacciones. Sin embargo bastaría hacer el análisis en futuras investigaciones para confirmar o descartar esta conclusión.

### 6.2.3 Bacterias ácido lácticas (BAL)

6.2.3.1 *Lactococcus*. En lo que respecta al género *Lactococcus* se encontró su presencia durante todo el proceso de elaboración del QPB, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre productores como se observa en la **Tabla 13**. Los valores encontrados en LC fueron de 5.79 y 8.15  $\log_{10}$  UFC/mL, lo cual está en concordancia con otros estudios (Alegría *et al.*, 2009, Fuka *et al.*, 2010). *Lactococcus* se ha caracterizado como flora dominante en la leche y un constituyente durante todo el proceso de elaboración de algunos quesos como se observó en el estudio de Dolci *et al.* (2010).

En el SPC este grupo de bacterias es poco frecuente, sin embargo en este estudio los valores encontrados fueron de 3.85 a 6.27  $\log_{10}$  UFC/mL. En cuanto a los conteos en C se encontraron entre 5.53 y 9.93  $\log_{10}$  UFC/g, lo cual concuerda con lo reportado por Alegría *et al.*, (2009) y Dolci *et al.*, (2010). Con respecto a los valores en Q se presentaron en un rango de 5.16 a 6.89  $\log_{10}$  UFC/g, lo cual se encuentra por debajo a lo reportado en queso Fresco a los 10 días de almacenamiento 7.42  $\log_{10}$  UFC/g (Torres-Llanez *et al.*, 2006).

El género *Lactococcus* es uno de los más estudiados debido a su presencia inherente en los lácteos. Su principal función en la fermentación de lácteos es la acidificación, contribuye a la textura por la producción de exopolisacaridos y al sabor por la producción de compuestos aromáticos (alcoholes, cetonas y aldehídos). Además, son usados como biopreservantes de alimentos por la producción de bacteriocinas y su uso como probiótico también ha sido considerado (Casalta y Montel, 2008, Casalta *et al.*, 2009). Por lo anterior, se puede hipotetizar que esta población de BAL ejerce un efecto protector ya que a pesar de la incidencia de patógenos en su materia prima, el producto final se presentó apto para consumo humano y este género de BAL se encuentra en todo el proceso de elaboración del QPB.

**Tabla 13.** Cuenta viable de *Lactococcus* asociada a la manufactura del queso de Poro de Balancán.

<b>Cuenta viable (Log<sub>10</sub> UFC/g o mL)</b>					
<b>Quesería</b>	<b>LC</b>	<b>SPC</b>	<b>C</b>	<b>SC</b>	<b>Q</b>
<b>A</b>	6.71 ± 0.02 <sup>c</sup>	6.27 ± 0.35 <sup>c</sup>	6.27 ± 0.42 <sup>c</sup>	6.89 ± 0.36 <sup>a</sup>	6.89 ± 0.26 <sup>b</sup>
<b>B</b>	8.15 ± 0.29 <sup>b</sup>	3.85 ± 0.30 <sup>b</sup>	6.84 ± 0.36 <sup>b</sup>	5.26 ± 0.17 <sup>b</sup>	5.16 ± 0.27 <sup>a</sup>
<b>C</b>	7.40 ± 0.48 <sup>b</sup>	5.27 ± 0.33 <sup>a</sup>	6.17 ± 0.30 <sup>c</sup>	5.19 ± 0.23 <sup>b</sup>	5.97 ± 0.31 <sup>c</sup>
<b>D</b>	5.79 ± 0.36 <sup>a</sup>	5.91 ± 0.26 <sup>a</sup>	5.53 ± 0.38 <sup>a</sup>	4.69 ± 0.34 <sup>b</sup>	5.28 ± 0.35 <sup>a</sup>
<b>E</b>	7.89 ± 0.26 <sup>b</sup>	5.11 ± 0.26 <sup>a</sup>	6.78 ± 0.22 <sup>b</sup>	7.14 ± 0.12 <sup>a</sup>	5.19 ± 0.15 <sup>a</sup>
<b>F</b>	7.41 ± 0.56 <sup>b</sup>	5.82 ± 0.20 <sup>a</sup>	6.93 ± 0.19 <sup>b</sup>	6.91 ± 0.21 <sup>a</sup>	5.46 ± 0.46 <sup>a</sup>

Cada promedio representa la media de los dos lotes muestreados.

Promedios ± EE. Medias con diferente literal en la misma columna son significativamente diferentes (P<0.05).

LC (leche cruda), SPC (suero para cuajar), C (cuajada), SC (suero de cuajada) y Q (queso con 7 días de almacenamiento).

6.2.3.2 *Lactobacillus*. Respecto al género *Lactobacillus* se encontraron conteos significativamente altos durante todo el proceso de elaboración del QPB como se puede observar en la **Tabla 14**. En lo que respecta a los conteos de L, C y SPC se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los productores, con una alta ocurrencia de 5.72 a 8.38  $\log_{10}$  UFC/g o mL de este microorganismo, lo cual concuerda con los valores reportados de 8 log UFC/g o mL para leche y cuajada por Kafili et al. (2009).

Se ha reportado en otros estudios que el género *Lactobacillus* es uno de los predominantes en los sueros iniciadores naturales. Las principales especies de *Lactobacillus* involucrados son: *Lactobacillus helveticus* y *delbrueckii subsp. lactis*. A su vez, las BAL que se desarrollan en la cuajada y en el almacenamiento del queso surgen solamente de la leche cruda y el suero natural iniciador y tienen un papel importante en la fermentación y la hidrólisis de la lactosa y proteínas de la cuajada (Ercolini et al., 2008, Santarelli et al., 2008, Settanni y Moschetti, 2010, Pogačić et al., 2013). Por lo tanto, la concentración de BAL tales como *Lactobacillus* en SC, el cual servirá como cultivo iniciador para la elaboración de lotes de queso subsecuentes, es importante ya que son cruciales en las características finales del queso.

Por último en Q se observó una disminución de al menos 2 log UFC/g en comparación con la materia prima, dicho comportamiento se observa en otros estudios ya que en queso se han asociado algunos factores que influyen como pH bajo, altas concentraciones de sal, presencia de ácidos orgánicos, etc., mismas que en leche no se presentan (Kafili et al., 2009, Flores-Magallón et al., 2011).

**Tabla 14.** Cuenta viable de *Lactobacillus* durante la manufactura del queso de Poro de Balancán.

<b>Cuenta viable (Log<sub>10</sub> UFC/g o mL)</b>					
<b>Quesería</b>	<b>LC</b>	<b>SPC</b>	<b>C</b>	<b>SC</b>	<b>Q</b>
<b>A</b>	8.38 ± 0.45 <sup>a</sup>	6.97 ± 0.17 <sup>b</sup>	8.28 ± 0.43 <sup>b</sup>	7.79 ± 0.25 <sup>c</sup>	4.97 ± 0.17 <sup>a</sup>
<b>B</b>	7.21 ± 0.41 <sup>c</sup>	6.12 ± 0.44 <sup>b</sup>	7.82 ± 0.39 <sup>b</sup>	6.22 ± 0.34 <sup>b</sup>	5.26 ± 0.37 <sup>a</sup>
<b>C</b>	7.08 ± 0.23 <sup>b</sup>	5.72 ± 0.37 <sup>c</sup>	6.89 ± 0.32 <sup>c</sup>	5.98 ± 0.21 <sup>b</sup>	5.87 ± 0.22 <sup>c</sup>
<b>D</b>	7.79 ± 0.31 <sup>c</sup>	6.69 ± 0.30 <sup>b</sup>	6.38 ± 0.46 <sup>a</sup>	3.79 ± 0.37 <sup>a</sup>	6.36 ± 0.16 <sup>b</sup>
<b>E</b>	8.04 ± 0.34 <sup>c</sup>	4.99 ± 0.25 <sup>a</sup>	7.25 ± 0.35 <sup>c</sup>	5.39 ± 0.48 <sup>b</sup>	5.12 ± 0.34 <sup>a</sup>
<b>F</b>	7.39 ± 0.46 <sup>c</sup>	7.33 ± 0.21 <sup>b</sup>	7.67 ± 0.47 <sup>c</sup>	8.17 ± 0.28 <sup>c</sup>	5.62 ± 0.48 <sup>c</sup>

Cada promedio representa la media de los dos lotes muestreados.

Promedios ± EE. Medias con diferente literal en la misma columna son significativamente diferentes (P<0.05).

LC (leche cruda), SPC (suero para cuajar), C (cuajada), SC (suero de cuajada) y Q (queso con 7 días de almacenamiento).

6.2.3.4 *Streptococcus*. Las bacterias del género *Streptococcus* se encontraron en alta concentración en LC con valores de 6.13 a 9.4 log<sub>10</sub> UFC/mL y estuvieron presentes durante todo el proceso de elaboración del QPB, manteniéndose en general entre 4 y 8.4 log<sub>10</sub> UFC/g o mL como se puede apreciar en la **Tabla 15**. En otros quesos como Grana Padano y Caciocavallo Pugliese *Streptococcus* forma parte de microbiota autóctona de la leche y suero iniciador en conjunto con otras bacterias como *Lactobacillus*, estos juegan un papel importante ya que proveen una efectiva acidificación en muchos quesos y se ha indicado que dicha microbiota tiene una fuerte vinculación con el origen geográfico donde se elaboren dichos quesos (Mauriello *et al.*, 2003, Ercolini *et al.*, 2008).

Por otro lado el género *Streptococcus* se encuentra distribuido en el ser humano y animales e incluye especies catalogadas como (GRAS) “generalmente reconocido como seguro” que se encuentran en la leche, los productos lácteos y vegetales. *Streptococcus thermophilus* es la única especie de *Streptococcus* de interés industrial, ya que desempeña un papel importante en la producción de varios tipos de quesos y leches fermentadas (Zotta *et al.*, 2008)

Así mismo, algunas especies de *Streptococcus* se les ha atribuido propiedades de textura al ser utilizados en la manufactura de alimentos fermentados como yogurt, quesos, cremas y postres a base de leche. Dichos efectos en la textura son debidos a moléculas liberadas por este género de BAL denominadas exopolisacaridos (EPS), las cuales, enriquecen los atributos sensoriales del alimento además de impartir efectos funcionales y beneficios a la salud (Duboc y Mollet, 2001, Welman y Maddox, 2003, Yang *et al.*, 2014). Por lo anterior se puede inferir que este tipo de microorganismos puede ejercer un efecto positivo en la matriz estudiada en esta investigación, debido a la alta concentración de este microorganismo durante todo el proceso del QPB.

**Tabla 15.** Cuenta viable de *Streptococcus* asociada a la manufactura del queso de Poro de Balancán.

<b>Cuenta viable (Log<sub>10</sub> UFC/g o mL)</b>					
<b>Quesería</b>	<b>LC</b>	<b>SPC</b>	<b>C</b>	<b>SC</b>	<b>Q</b>
<b>A</b>	7.94 ± 0.31 <sup>b</sup>	5.91 ± 0.32 <sup>c</sup>	8.0 ± 0.40 <sup>a</sup>	3.89 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.47 ± 0.31 <sup>b</sup>
<b>B</b>	6.13 ± 0.28 <sup>a</sup>	4.55 ± 0.18 <sup>a</sup>	6.0 ± 0.12 <sup>b</sup>	5.02 ± 0.11 <sup>b</sup>	4.49 ± 0.34 <sup>a</sup>
<b>C</b>	7.93 ± 0.15 <sup>b</sup>	4.15 ± 0.29 <sup>a</sup>	6.08 ± 0.33 <sup>b</sup>	5.16 ± 0.17 <sup>b</sup>	6.06 ± 0.16 <sup>b</sup>
<b>D</b>	9.07 ± 0.43 <sup>d</sup>	4.26 ± 0.28 <sup>a</sup>	5.71 ± 0.29 <sup>b</sup>	4.48 ± 0.45 <sup>c</sup>	5.47 ± 0.31 <sup>b</sup>
<b>E</b>	9.43 ± 0.47 <sup>d</sup>	5.35 ± 0.02 <sup>b</sup>	6.75 ± 0.32 <sup>b</sup>	5.80 ± 0.30 <sup>b</sup>	5.20 ± 0.25 <sup>c</sup>
<b>F</b>	7.94 ± 0.38 <sup>b</sup>	4.37 ± 0.20 <sup>a</sup>	6.68 ± 0.33 <sup>b</sup>	4.78 ± 0.41 <sup>c</sup>	5.44 ± 0.05 <sup>b</sup>

Cada promedio representa la media de los dos lotes muestreados.

Promedios ± EE. Medias con diferente literal en la misma columna son significativamente diferentes (P<0.05).

LC (leche cruda), SPC (suero para cuajar), C (cuajada), SC (suero de cuajada) y Q (queso con 7 días de almacenamiento).

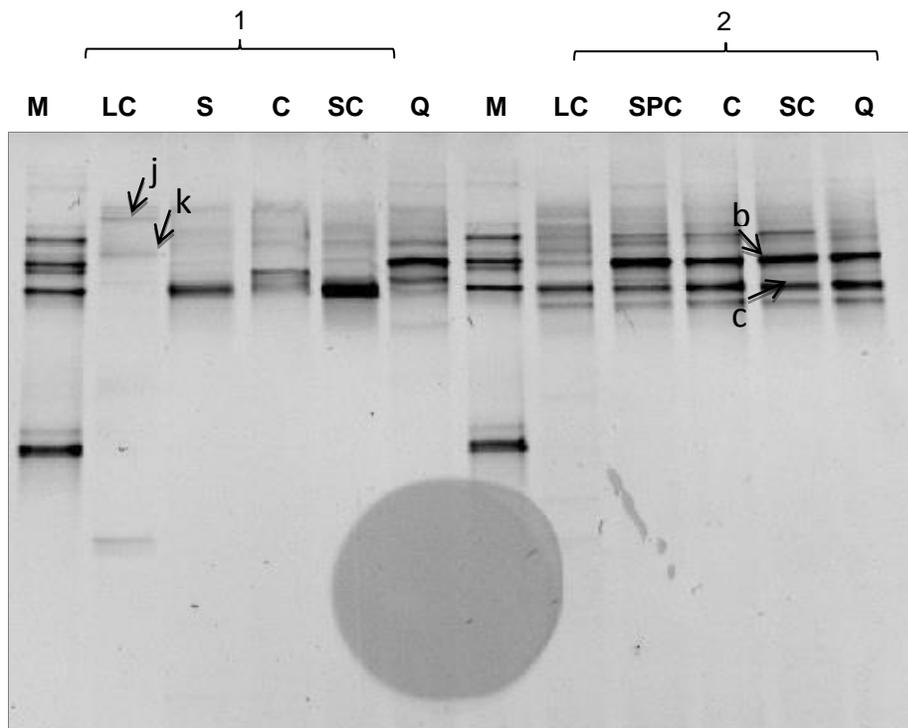
### 6.3 Especies Bacterianas Involucradas en la Manufactura del QPB Detectadas Mediante Cultivo Independiente

El análisis directo del DNA bacteriano a partir de las matrices destacó la persistencia de BAL termófilas como se puede observar en el **Cuadro 16**. *Streptococcus thermophilus* (Banda c en **Fig. 4**, Banda 2 en **Fig. 5**, Banda b en **Fig. 6**, Banda 11 en **Fig. 7**, Banda e en **Fig. 8**) se presentó en las 6 queserías y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, en 4 de las 6 estudiadas. Estos resultados indican que estos dos microorganismos son la microbiota autóctona inherentes al QPB. En otros trabajos similares se ha informado que las poblaciones de *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus* son las poblaciones autóctonas de la leche cruda y el suero iniciador natural utilizado en la manufactura de algunos quesos como el Grana Padano, Caciocavallo Plugiese y el Mozzarella di bufala debido a que producen una alta concentración de ácido láctico y son cruciales en la maduración de la cuajada (Coppola *et al.*, 1988, Ercolini *et al.*, 2001, Randazzo *et al.*, 2002). Conjuntamente con otras BAL, *Lactobacillus delbrueckii* participa en la formación de sabor, aroma y textura (Nikolaou *et al.*, 2011). Por dichas cualidades el uso de este microorganismo como cultivo iniciador en la industria de la fermentación es una práctica común, por ejemplo en la producción de yogurt debido a que mejorar la textura, evita la sinéresis e incrementa la viscosidad (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002).

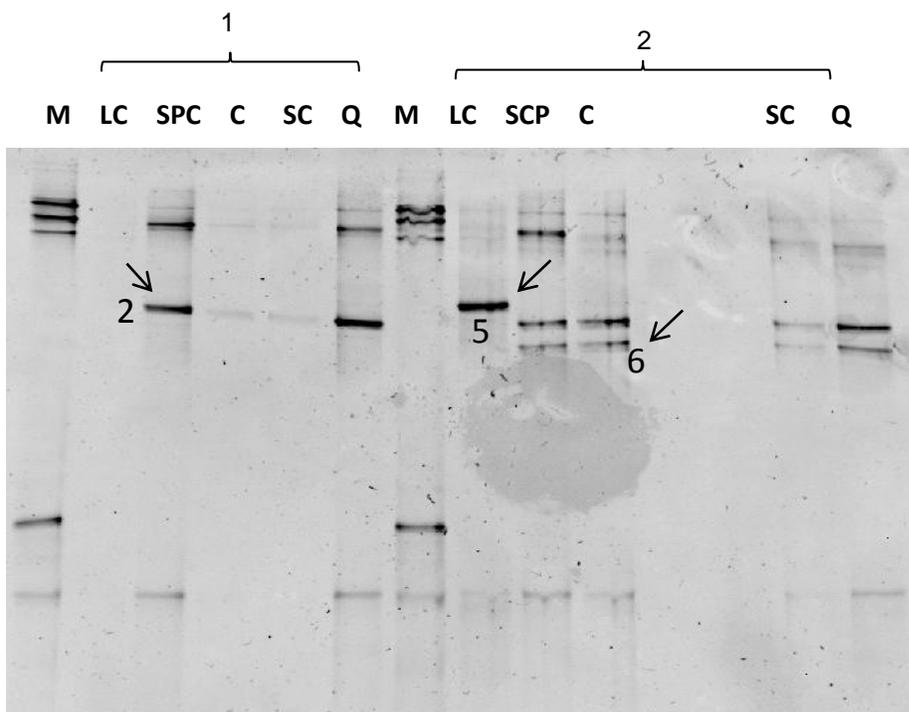
Por otro lado la producción de exopolisacáridos (EPS) es una de las capacidades que se ha atribuido al género *Lactobacillus* y más específicamente a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Estos EPS son productos microbianos de gran interés biotecnológico en las industrias alimentaria, farmacéutica, médica, etc., ya que actúan como agentes viscosantes, emulsificantes, gelificantes y estabilizantes (Welman y Maddox, 2003).

**Tabla 16.** Identidad de las bandas detectadas obtenidas del análisis de DGGE a través de análisis directo de las muestras del proceso del QPB.

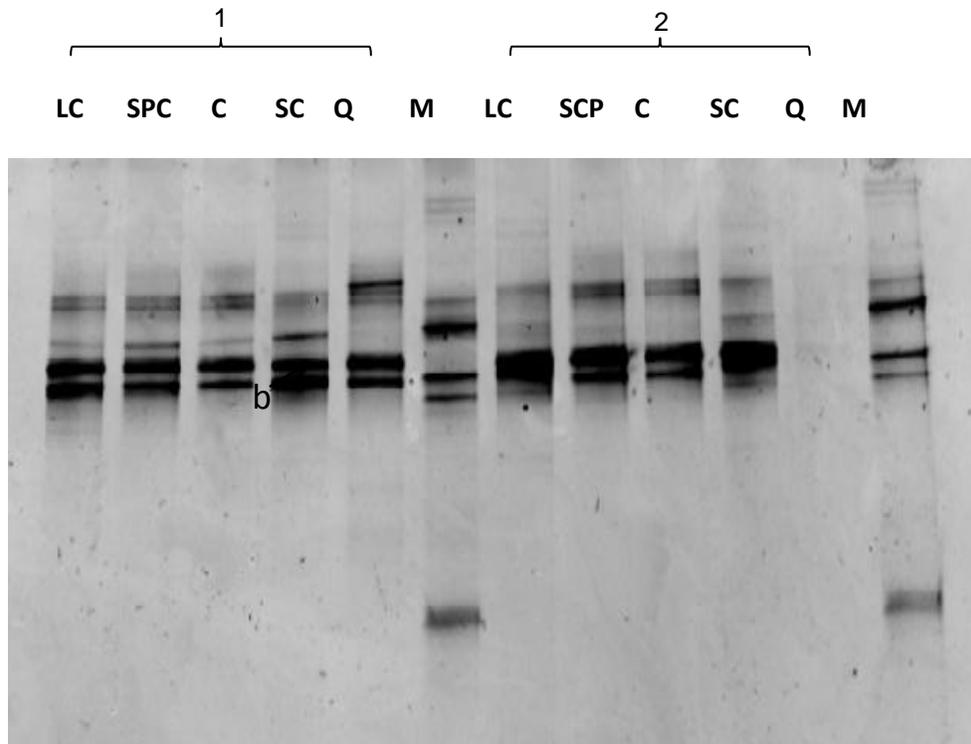
Quesería	Banda	Microorganismo	% de identidad	No. de acceso en Gen Bank
<b>A</b>	<b>b</b>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	92%	DQ001070
	<b>c</b>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	98%	DQ001071
	<b>j</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	92%	JN315155
	<b>i</b>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	95%	EU091443
	<b>k</b>	<i>Elizabethkingia</i> sp (no cultivable)	99%	KF505955
<b>B</b>	<b>5</b>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	90%	JN969331
	<b>6</b>	<i>Streptococcus salivarius</i>	95%	AM157451
	<b>2</b>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	95%	DQ001071
<b>C</b>	<b>b</b>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	96%	DQ001071
<b>D</b>	<b>16</b>	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	100%	AB748994
	<b>17</b>	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	94%	AY126157
	<b>15</b>	<i>Klebsiella</i> sp (no cultivable)	98%	GQ471864
	<b>13</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	KC963013
	<b>12</b>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	99%	JQ694171
	<b>11</b>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	97%	DQ001071
	<b>5</b>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	94%	DQ001070
	<b>4</b>	<i>Enterococcus faecium</i>	95%	AB243003
	<b>3</b>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	95%	AB856983
	<b>1</b>	<i>Lactococcus garvieae</i>	99%	KF012887
<b>E</b>	<b>d</b>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	94%	DQ001070
	<b>e</b>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	93%	DQ00107
<b>F</b>	<b>j</b>	<i>Rahnella aquatilis</i>	99%	KF465848
	<b>d</b>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	95%	DQ001071



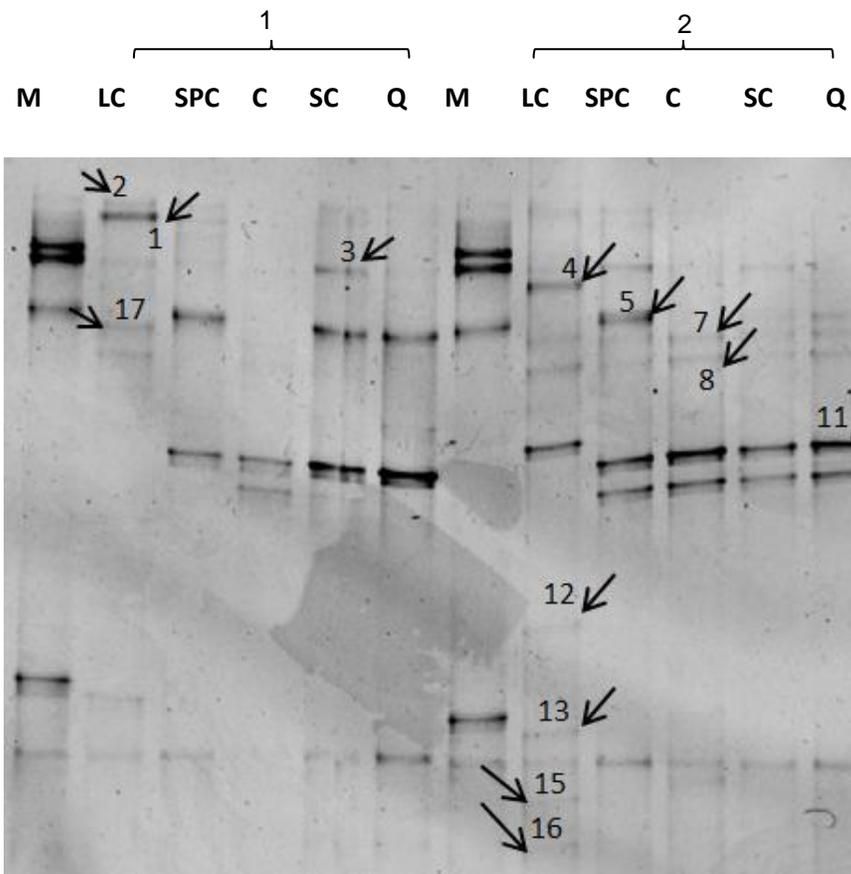
**Figura 4.** Análisis DGGE de las muestras obtenidas en la manufactura del QPB de la quesería A. M es el Marcador molecular (mezcla de *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. Johnsonii*). Leche cruda (LC); Suero para cuajar (SPC); Cuajada (C); Suero de cuajada (SC); Queso (Q). 1 y 2 representan el número de muestreo.



**Figura 5.** Análisis DGGE de las muestras obtenidas en la manufactura del QPB de la quesería B. M es el marcador molecular (mezcla de *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. Johnsonii*). Leche cruda (LC); Suero para cuajar (SPC); Cuajada (C); Suero de cuajada (SC); Queso (Q). 1 y 2 representan el número de muestreo.



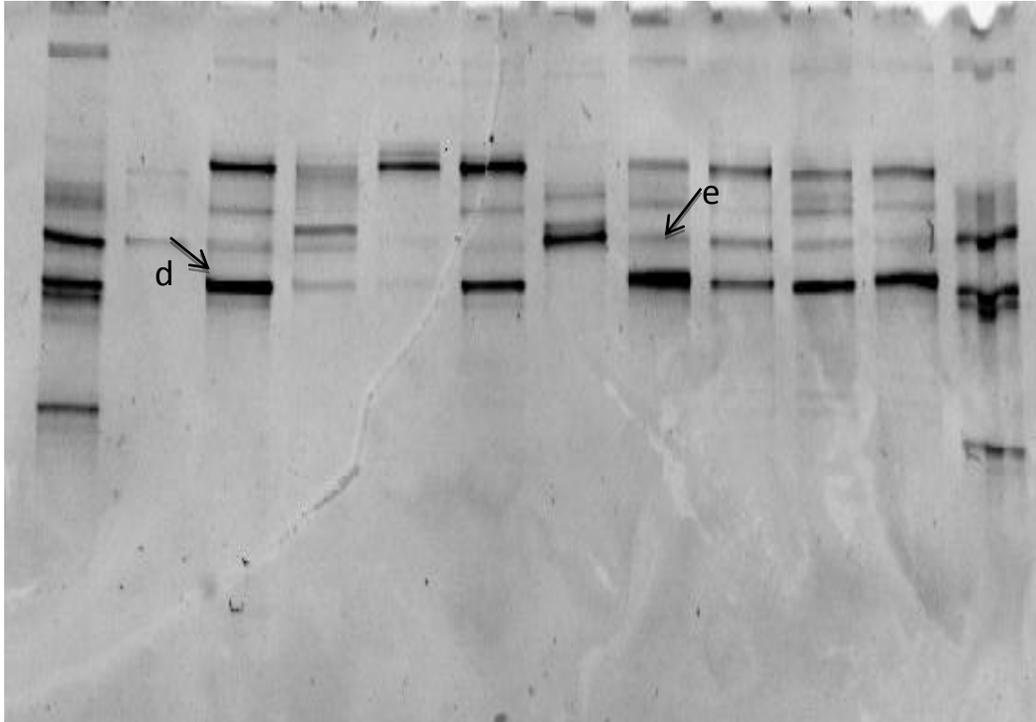
**Figura 6.** Análisis DGGE de las muestras obtenidas en la manufactura del QPB de la quesería C. M es el marcador Molecular (mezcla de *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. Johnsonii*). Leche cruda (LC); Suero para cuajar (SPC); Cuajada (C); Suero de cuajada (SC); Queso (Q). 1 y 2 representan el número de muestreo.



**Figura 7.** Análisis DGGE de las muestras obtenidas en la manufactura del QPB de la quesería D. M es el Marcador molecular (mezcla de *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. Johnsonii*). Leche cruda (LC); Suero para cuajar (SPC); Cuajada (C); Suero de cuajada (SC); Queso (Q). 1 y 2 representan el número de muestreo.

1
2

M LC SPC C SC Q
LC SCP C SC Q M



**Figura 8.** Análisis DGGE de las muestras obtenidas en la manufactura de QPB de la quesería E. M es el Marcador molecular (mezcla de *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. Johnsonii*). Leche cruda (LC); Suero para cuajar (SPC); Cuajada (C); Suero de cuajada (SC); Queso (Q). 1 y 2 representan el número de muestreo.

Adicionalmente existe evidencia significativa de que *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* exhibe propiedades probióticas (Mater *et al.*, 2005, Guglielmotti *et al.*, 2007, García-Albiach *et al.*, 2008). Sin embargo a pesar del conocimiento respecto a la aplicación de estas cepas como cultivos iniciadores en la industria láctea a nivel mundial es imprescindible su identificación molecular debido a la variabilidad genética que presentan las diferentes subespecies de *Lactobacillus delbrueckii* (*bulgaricus*, *delbrueckii* y *lactis*).

Por otro lado, *Lactobacillus fermentum* se encontró en la quesería D (Banda **3 en Fig. 7**), este microorganismo es común encontrarlo en leche y lácteos fermentados tradicionales, *fermentum* es una de las especies del género *Lactobacillus* predominantes en el intestino humano y tracto vaginal. En fechas recientes, se ha destacado por su potencial probiótico debido a que reduce la circulación de lípidos cuando se administra como probióticos encapsulados (Sanders, 2008). Así mismo, se reportó la capacidad de *Lactobacillus fermentum* aislado de leches fermentadas y probado en un modelo murino, observándose su capacidad para reducir el colesterol sanguíneo y los niveles de triglicéridos. Además, mostro tener capacidad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus* (Pan *et al.*, 2011)

En lo que respecta al género *Lactococcus* para la quesería D se encontraron *Lactococcus garviae* (Banda 1 en **Fig. 7**) y para la quesería A *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Banda i en **Fig. 4**). Esta última cepa es una población habitual durante la manufactura y almacenamiento de algunos quesos artesanales (Dolci *et al.*, 2010). Así mismo se le ha asociado como uno de los responsables en la formación de compuestos aromáticos en quesos, específicamente a las cepas correspondientes de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* o *lactis* (García-Cayuela *et al.*, 2012). Por otro lado, han sido estudiadas estas cepas por su habilidad de formar compuestos antimicrobianos como bacteriocinas, las cuales tienen la capacidad de controlar el crecimiento de microorganismos patógenos (incluido *L. monocytogenes*) (Dal Bello *et al.*,

2012). Uno de los microorganismos identificados en el presente estudio en LC de la quesería D, y que se consideró de interés fue *Lactococcus garviae*, este microorganismo es bien reconocido como un patógeno de peces (Eyngor *et al.*, 2004), así mismo se ha aislado de búfalos de agua con mastitis subclínica (Teixeira *et al.*, 1996) y de muchas muestras clínicas de humanos (Fefer *et al.*, 1998). Recientemente, *Lactococcus garviae*, se ha reportado como un componente común de la microbiota autóctona de los productos lácteos fabricados a partir de leche cruda (Fortina *et al.*, 2007). Los *Lactococcus garviae* aislados de diferentes fuentes han demostrado no estar relacionadas genéticamente (Foschino *et al.*, 2008), lo que sugiere que esta especie se adapta, desarrolla y persiste en ambientes diversos. Al estudiarse varias cepas lácteas y hacer la comparación con sus homólogas patógenas, los resultados mostraron que las primeras no suelen expresar genes causantes o asociados a virulencia (Fortina *et al.*, 2007). Por lo tanto, se puede deducir que la presencia de cepas de *Lactococcus garviae* en quesos artesanales no plantean un problema de salud grave.

Entre los microorganismos patógenos se identificó *S. aureus* en la quesería A (Banda j en **Fig. 4**), este microorganismo fue encontrado como uno de los más predominantes durante todas las etapas de elaboración del QPB hasta el producto final en todas las queserías en el análisis dependiente de cultivo.

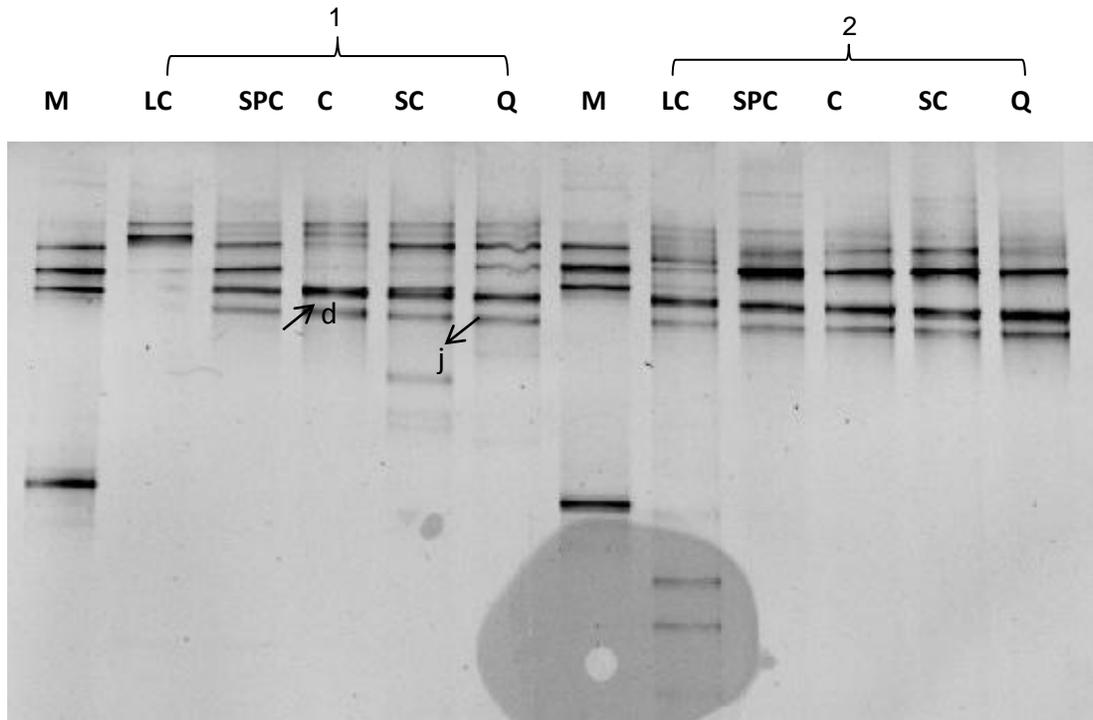
La mastitis es uno de los principales problemas causados por *S. aureus* que afecta al ganado bovino, la leche es la principal vía de contaminación de productos lácteos cuando esta ha sido obtenida de vacas mestizas. Lo anterior concuerda con la alta incidencia de mastitis que atañe al ganado destinado para la producción de leche utilizada en la elaboración del QPB. A la fecha, en busca de alternativas para el control de *S. aureus* se han realizado estudios que involucran la interacción de BAL y *S. aureus*, observándose resultados positivos especialmente cuando este microorganismo está en relación con BAL de

género *Lactobacillus*. De hecho, en vacas sanas se ha descrito que su microbiota vaginal está compuesta por *Lb. fermentum*, *Lb. gasseri* y *Lb. rhamnosus* lo cual sugiere que existe una interacción entre estas bacterias y una posible inhibición de *S. aureus* por las BAL (Charlier *et al.*, 2009).

Uno de los géneros filogenéticamente relacionado con *Staphylococcus* es el *Macrococcus*, este género de bacterias incluye siete especies entre las cuales se encuentra *caseolyticus*, mismo que se encontró en LC de la quesería D (Banda 17 en **Fig. 7**). Al respecto de *Macrococcus caseolyticus* se ha reportado que a diferencia de las especies de *Staphylococcus*, no causa enfermedades en humanos o animales, son típicamente aislados de piel de animales, órganos de la especie bovina, alimentos como leche y carne así como fabricas procesadoras de alimentos. Las características fisiológicas de este organismo son, sin embargo, en gran medida desconocidas, y sólo un pequeño número de investigaciones se han publicado sobre *Macrococcus* (Baba *et al.*, 2009).

Por otra parte se encontraron algunas enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella sp* y *Salmonella* en la quesería D (Bandas 13, 15 y 12 en **Fig. 7**). La alta incidencia de enterobacterias se considera indicativo de mala calidad higiénica en los procesos de ordeño y elaboración del queso (Delbès-Paus *et al.*, 2012), por lo que se debe de considerar el reforzamiento en la prácticas de higiene en la elaboración del QPB. Sin embargo vale la pena destacar que en ninguna de las queserías estudiadas se presentó ninguno de estos patógenos en el queso a los 7 días de proceso.

*Rahnella aquatilis* fue detectada en la quesería F (Banda j en **Fig. 9**). Este microorganismo es un coliforme psicotrófico, cuyo hábitat es el agua aunque también ha sido aislado de muestras clínicas (Funke y Rosner, 1995), alimentos, incluyendo leche y crema pasteurizada (Lindberg *et al.*, 1998) y queso cottage (Davey y Eyles, 1992).



**Figura 9.** Análisis DGGE de las muestras obtenidas en la manufactura del QPB de la quesería F. M es el Marcador molecular (mezcla de *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. Johnsonii*). Leche cruda (LC); Suero para cuajar (SPC); Cuajada (C); Suero de cuajada (SC); Queso (Q). 1 y 2 representan el número de muestreo.

Es probable que esta bacteria sea un contaminante frecuente de los alimentos, pero resulta difícil diferenciarla de otros organismos coliformes. Por otro lado, se ha reportado la presencia de *Rahnella aquatilis* en leches con chocolate refrigeradas. Los autores indican que este microorganismo puede considerarse un microorganismo indeseable en este producto debido a que produce guayacol (Jensen *et al.*, 2001).

Otros estudios indican que *Rahnella aquatilis* puede vivir en sustratos lácteos como suero de leche observándose niveles óptimos de crecimiento en sueros ricos en citrato y lactosa, produciendo una diversidad polisacáridos entre ellos el lactan (Pintado *et al.*, 1999). La capacidad de *Rahnella aquatilis* de crecer en suero de leche, concuerda con lo encontrado en esta investigación ya que esta bacteria solo fue detectada en suero de la cuajada del QPB, siendo probablemente su medio óptimo de crecimiento. Por todo lo anterior, la posibilidad de explorar la producción de polisacáridos funcionales en sustratos como el suero de leche *Rahnella aquatilis* podría ser una alternativa *para* dar un valor agregado a este desecho de la industria quesera.

Finalmente, es importante mencionar que se encontró la presencia de *Elizabethkingia* sp. (Banda K en **Fig. 4**) solo en la LC de la quesería A. Sin embargo, esta desapareció tras la adición de SPC; ya que no fue detectada en las demás muestras del proceso de elaboración del QPB. Con esto, podemos inferir que *Elizabethkingia* no resiste ambientes con estrés ácido, ya que históricamente su hábitad es el suelo, agua dulce y ambientes marinos (Bernardet *et al.*, 2006). No obstante, a la fecha no existe ningún reporte sobre la presencia de esta bacteria en ecosistemas lácteos, solo existen tres estudios en los que se ha logrado aislar e identificar *Chryseobacterium bovis* sp. nov., *Chryseobacterium haifense* sp. nov. y *Chryseobacterium oranimense* sp. nov. en leche cruda (Hantsis-Zacharov y Halpern, 2007, Hantsis-Zacharov *et al.*, 2008a, Hantsis-Zacharov *et al.*, 2008b). Estas especies están filogenéticamente relacionadas con *Elizabethkingia* (Kim *et al.*, 2005). Por lo tanto, este es el

primer reporte de la presencia de *Elizabethkingia* en LC y ambientes lácteos. Su rol en la LC destinada a la elaboración de QPB es desconocido.

## 7. CONCLUSIONES

1.- La alta acidez y baja humedad características del QPB pueden estar asociados a la disminución del crecimiento o a la supervivencia de algunos microorganismos patógenos encontrados en este queso.

2.- El presente estudio sienta las bases para la correcta caracterización de la microbiota típica del QPB. Los gradientes utilizados para el análisis DGGE fueron cruciales para una correcta separación electroforéticas del ADN de los diferentes microorganismos asociadas al QPB.

3.- El análisis DGGE mostró que las BAL, tales como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* fueron las poblaciones predominantes encontradas durante el proceso de elaboración artesanal del QPB. Dichas especies, son ampliamente utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración de distintas variedades de quesos debido a que imparten características sensoriales deseables.

4. Con el presente estudio se da a conocer la microbiota típica y la composición fisicoquímica del QPB, lo cual coadyuva a la generación de información valiosa para mantener la marca colectiva de este queso como un alimento originario de Balancán, Tabasco. Con esta información los productores estarían posibilitados para la búsqueda de una protección más amplia como podría ser la Denominación de Origen.

## 8. RECOMENDACIONES

Siendo la calidad sanitaria un factor importante en la inocuidad de los alimentos, no debe omitirse que en el presente estudio se encontraron valores por encima de los establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 en los conteos microbianos de los microorganismos indicadores de calidad y patógenos en el QPB. Lo anterior puede deberse a que la materia prima con la cual se elabora el QPB presentó valores elevados en los microorganismos mencionados anteriormente, los cuales persistieron y prevalecieron durante las diferentes etapas del proceso de manufactura e impactaron de manera significativa en la calidad sanitaria final del QPB.

La implementación de medidas preventivas en la salud del ganado lechero, las buenas prácticas de ordeño, higiene y de manufactura durante el procesado del QPB, representan una estrategia para los productores, a fin de prevenir la incidencia de microorganismos indeseables tales como Coliformes totales, *S. aureus* y su enterotoxina, los cuales representan un riesgo potencial para la salud de los consumidores.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C. 2002. Official Methods of Analysis of the Association of official chemists.

ACS. 2011. <http://www.cheesesociety.org/domain-two-cheese-making-processes/>.

Accesado: 13 de junio de 2013.

Alais, C. 1985. Ciencia de la leche: principios de técnica lechera. Editorial Reverté.

Alegría, Á., P. Álvarez-Martín, N. Sacristán, E. Fernández, S. Delgado y B. Mayo. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology* 136(1):44-51.

Alessandria, V., P. Dolci, K. Rantsiou, D. Pattono, A. Dalmasso, 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.

Alvarado, C., B. Garcia-Almendarez, S. Martin y C. Regalado. 2005. Anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan Mexican-style cheese. *Current microbiology* 51(2):110-115.

Ammor, S., C. Rachman, S. Chaillou, H. Prévost, X. Dousset, M. Zagorec, E. Dufour y I. Chevallier. 2005. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology* 22(5):373-382.

Arteau, M., S. Labrie y D. Roy. 2010. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese. *International Dairy Journal* 20(8):545-554.

Baba, T., K. Kuwahara-Arai, I. Uchiyama, F. Takeuchi, T. Ito y K. Hiramatsu. 2009. Complete genome sequence of *Micrococcus caseolyticus* strain JCSC5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. *Journal of bacteriology* 191(10):3429.

Banks, J. M. y A. G. Williams. 2004. The role of the nonstarter lactic acid bacteria in Cheddar cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology* 57(2-3):145-152.

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. Page 287 in *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. vol. 1. P. F. Fox, McSweeney, P. L., Cogan, T. M y Guinee, T., ed. Elsevier Academic Press.

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.

Bernardet, J.-F., C. Hugo y B. Bruun. 2006. The Genera *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia*. Pages 638-676 in *The Prokaryotes*. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer y E. Stackebrandt, ed. Springer New York.

Beuquier, E. y S. Buchin. 2004. Raw milk cheeses. *Cheese: chemistry, physics and microbiology* 1:319-345.

Bianchi, D. M., A. Barbaro, S. Gallina, N. Vitale, L. Chiavacci, M. Caramelli y L. Decastelli. 2013. Monitoring of foodborne pathogenic bacteria in vending machine raw milk in Piedmont, Italy. *Food Control* 32(2):435-439.

Bonaiti, C., S. Parayre y F. Irlinger. 2006. Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. *International Journal of Food Microbiology* 107(2):171-179.

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.

Borelli, B., E. Ferreira, I. Lacerda, G. Franco y C. Rosa. 2006. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22(11):1115-1119.

Bottari, B., C. Agrimonti, M. Gatti, E. Neviani y N. Marmiroli. 2013. Development of a multiplex real time PCR to detect thermophilic lactic acid bacteria in natural whey starters. *International Journal of Food Microbiology* 160(3):290-297.

Callon, C., J. Berdagué, E. Dufour y M. Montel. 2005. The effect of raw milk microbial flora on the sensory characteristics of Salers-type cheeses. *Journal of Dairy Science* 88(11):3840-3850.

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.

Callon, C., F. B. Gilbert, R. De Cremoux y M.-C. Montel. 2008. Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of *S. aureus* contamination from milk to cheese in goat cheese farms. *Food Control* 19(2):143-150.

Callon, C., M. Saubusse, R. Didiene, S. Buchin y M.-C. Montel. 2011. Simplification of a complex microbial antilisterial consortium to evaluate the contribution of its flora in uncooked pressed cheese. *International Journal of Food Microbiology* 145(2–3):379-389.

Can, H. Y. y T. H. Çelik. 2012. Detection of enterotoxigenic and antimicrobial resistant *S. aureus* in Turkish cheeses. *Food Control* 24(1–2):100-103.

Cantoni, C. y C. Bersani. 2010. Mozzarella blu: cause ed ipotesi.

Carraro, L., M. Maifreni, I. Bartolomeoli, M. E. Martino, E. Novelli, F. Frigo, M. Marino y B. Cardazzo. 2011. Comparison of culture-dependent and -independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing. *Research in Microbiology* 162(3):231-239.

Casalta, E. y M.-C. Montel. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126(3):271-273.

Casalta, E., J.-M. Sorba, M. Aigle y J.-C. Ogier. 2009. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *International Journal of Food Microbiology* 133(3):243-251.

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.

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.

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: 04.04.13.

Coppola, R., M. Nanni, M. Iorizzo, A. Sorrentino, E. Sorrentino y L. Grazia. 1997. Survey of lactic acid bacteria isolated during the advanced stages of the ripening of Parmigiano Reggiano cheese. *Journal of dairy research* 64(02):305-310.

Coppola, S., G. Blaiotta y D. Ercolini. 2008. Dairy Products Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods. Pages 31-90. L. Cocolin y D. Ercolini, ed. Springer New York.

Coppola, S., E. Parente, S. Dumontet y A. La Peccerella. 1988. The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. *Le Lait* 68(3):295-309.

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. *Cheese: chemistry, physics and microbiology* 1:191-206.

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.

Dagdemir, E. y S. Ozdemir. 2008. Technological characterization of the natural lactic acid bacteria of artisanal Turkish White Pickled cheese. *International Journal of Dairy Technology* 61(2):133-140.

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.

Davey, J. y M. Eyles. 1992. Discolouration of cottage cheese caused by *Rahnella aquatilis* in the presence of glucono  $\delta$ -lactone. *Australian journal of dairy technology* 47(1):62-63.

De Buyser, M.-L., 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):1-17.

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.

Dejmek, P. y P. Walstra. 2004. The Syneresis of Rennet-coagulated Curd. Pages 71-103 in *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol. Volume 1. P. L. H. M. T. M. C. Patrick F. Fox y P. G. Timothy, ed. Academic Press.

Delbès-Paus, C., S. Mischczycha, S. Ganet, S. Helinck, P. Veisseire, S. Pochet, D. Thévenot y M. C. Montel. 2013. Behavior of *Escherichia coli* O26:H11 in the presence of *Hafnia alvei* in a model cheese ecosystem. *International Journal of Food Microbiology* 160(3):212-218.

Delbès-Paus, C., S. Pochet, S. Helinck, P. Veisseire, C. Bord, A. Lebecque, M. Coton, N. Desmasures, E. Coton, F. Irlinger y M.-C. Montel. 2012. Impact of Gram-negative bacteria in interaction with a complex microbial consortium on biogenic amine content and sensory characteristics of an uncooked pressed cheese. *Food Microbiology* 30(1):74-82.

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.

Dimitrellou, D., Y. Kourkoutas, A. A. Koutinas y M. Kanellaki. 2009. Thermally-dried immobilized kefir on casein as starter culture in dried whey cheese production. *Food Microbiology* 26(8):809-820.

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.

Duboc, P. y B. Mollet. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal* 11(9):759-768.

Duthoit, F., C. Callon, L. Tessier y M. C. Montel. 2005. Relationships between sensorial characteristics and microbial dynamics in "Registered Designation of Origin" Salers cheese. *International Journal of Food Microbiology* 103(3):259-270.

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., 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., G. Moschetti, G. Blaiotta y S. Coppola. 2001. The Potential of a Polyphasic PCR-DGGE Approach in Evaluating Microbial Diversity of Natural Whey Cultures for Water-Buffered Mozzarella Cheese Production: Bias of Culture-Dependent and Culture-Independent Analyses. *Systematic and Applied Microbiology* 24(4):610-617.

Eyngor, M., A. Zlotkin, C. Ghittino, M. Prearo, D.-G. Douet, S. Chilmonczyk y A. Eldar. 2004. Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries. *Applied and environmental microbiology* 70(9):5132-5137.

Fefer, J. J., K. R. Ratzan, S. E. Sharp y E. Saiz. 1998. *Lactococcus garvieae* endocarditis: report of a case and review of the literature. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 32(2):127-130.

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.

Fleet, G. 1990. Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Microbiology* 68(3):199-211.

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.

Fortina, M. G., G. Ricci, R. Foschino, C. Picozzi, P. Dolci, G. Zeppa, L. Cocolin y P. L. Manachini. 2007. Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains from dairy environments. *Journal of Applied Microbiology* 103(2):445-453.

Foschino, R., D. Nucera, G. Volponi, C. Picozzi, M. Ortoffi y M. T. Bottero. 2008. Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing. *Journal of Applied Microbiology* 105(3):652-662.

Fuka, M. M., M. Engel, A. Skelin, S. Redžepović y M. Schloter. 2010. Bacterial communities associated with the production of artisanal Istrian cheese. *International Journal of Food Microbiology* 142(1-2):19-24.

Funke, G. y H. Rosner. 1995. *Rahnella aquatilis* bacteremia in an HIV-infected intravenous drug abuser. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 22(3):293-296.

García-Albiach, R., M. José, P. de Felipe, S. Angulo, M.-I. Morosini, D. Bravo, F. Baquero y R. del Campo. 2008. Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota. *The American journal of clinical nutrition* 87(1):91-96.

García-Cayuela, T., L. P. Gómez de Cadiñanos, C. Peláez y T. Requena. 2012. Expression in *Lactococcus lactis* of functional genes related to amino acid catabolism and cheese aroma formation is influenced by branched chain amino acids. *International Journal of Food Microbiology* 159(3):207-213.

Grappin, R. y E. Beuvier. 1997. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal* 7(12):751-761.

Guglielmotti, D., M. B. Marcó, C. Vinderola, C. de los Reyes Gavilán, J. Reinheimer y A. Quiberoni. 2007. Spontaneous *Lactobacillus delbrueckii* phage-resistant mutants with acquired bile tolerance. *International Journal of Food Microbiology* 119(3):236-242.

Hantsis-Zacharov, E. y M. Halpern. 2007. *Chryseobacterium haifense* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from raw milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(10):2344-2348.

Hantsis-Zacharov, E., Y. Senderovich y M. Halpern. 2008a. *Chryseobacterium bovis* sp. nov., isolated from raw cow's milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58(4):1024-1028.

Hantsis-Zacharov, E., T. Shakéd, Y. Senderovich y M. Halpern. 2008b. *Chryseobacterium oranimense* sp. nov., a psychrotolerant, proteolytic and lipolytic

bacterium isolated from raw cow's milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58(11):2635-2639.

Hennekinne, J.-A., M.-L. De Buyser y S. Dragacci. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews* 36(4):815-836.

Imran, M., N. Desmasures y J.-P. Vernoux. 2010. From undefined red smear cheese consortia to minimal model communities both exhibiting similar anti-listerial activity on a cheese-like matrix. *Food Microbiology* 27(8):1095-1103.

Irlinger, F. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* 126(3):302-310.

Jakobsen, M. y J. Narvhus. 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal* 6(8-9):755-768.

Jakobsen, R. A., R. Heggebø, E. B. Sunde y M. Skjervheim. 2011. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. *Food Microbiology* 28(3):492-496.

Jany, J.-L. y G. Barbier. 2008. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology* 25(7):839-848.

Jensen, N., P. Varelis y F. B. Whitfield. 2001. Formation of guaiacol in chocolate milk by the psychrotrophic bacterium *Rahnella aquatilis*. *Letters in Applied Microbiology* 33(5):339-343.

Justé, A., B. P. H. J. Thomma y B. Lievens. 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology* 25(6):745-761.

Kafili, T., S. Razavi, Z. Djomeh, M. Naghavi, P. Álvarez-Martín y B. Mayo. 2009. Microbial characterization of Iranian traditional Lighvan cheese over manufacturing and ripening via culturing and PCR-DGGE analysis: identification and typing of dominant lactobacilli. *European Food Research and Technology* 229(1):83-92.

Kim, K. K., M. K. Kim, J. H. Lim, H. Y. Park y S.-T. Lee. 2005. Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb. nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(3):1287-1293.

Kramarenko, T., M. Roasto, K. Meremäe, M. Kuningas, P. Pölsama y T. Elias. 2013. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control* 30(1):24-29.

Larpin-Laborde, S., M. Imran, Bona, C. ti, N. Bora, R. Gelsomino, S. Goerges, F. Irlinger, oise, M. Goodfellow, A. C. Ward, M. Vancanneyt, J. Swings, S. Scherer, Gu, M. guen y N. Desmasures. 2011. Surface microbial consortia from Livarot, a French smear-ripened cheese. *Canadian Journal of Microbiology* 57(8):651-660.

Lianou, A. y K. P. Koutsoumanis. 2013. Evaluation of the strain variability of *Salmonella enterica* acid and heat resistance. *Food Microbiology* 34(2):259-267.

Licitra, G. 2010. World wide traditional cheeses: Banned for business? *Dairy Science & Technology* 90(4):357-374.

Licitra, G., J. Ogier, S. Parayre, C. Pediliggieri, T. Carnemolla, H. Falentin, M. Madec, S. Carpino y S. Lortal. 2007. Variability of bacterial biofilms of the “tina” wood vats used in the Ragusano cheese-making process. *Applied and environmental microbiology* 73(21):6980-6987.

Lindberg, A. M., Å. Ljungh, S. Ahrné, S. Löfdahl y G. Molin. 1998. Enterobacteriaceae found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. *International Journal of Food Microbiology* 39(1–2):11-17.

Little, C. L., J. R. Rhoades, S. K. Sagoo, J. Harris, M. Greenwood, V. Mithani, K. Grant y J. McLauchlin. 2008. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiology* 25(2):304-312.

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.

Lucey, J. A. 2011. Cheese | Rennet-Induced Coagulation of Milk. Pages 579-584 in *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. J. W. Fuquay, ed. Academic Press, San Diego.

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.

Martín-Platero, A. M., M. Maqueda, E. Valdivia, J. Purswani y M. Martínez-Bueno. 2009. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiology* 26(3):294-304.

Mater, D. D., L. Bretigny, O. Firmesse, M.-J. Flores, A. Mogenet, J.-L. Bresson y G. Corthier. 2005. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS microbiology letters* 250(2):185-187.

Mauriello, G., L. Moio, A. Genovese y D. Ercolini. 2003. Relationships Between Flavoring Capabilities, Bacterial Composition, and Geographical Origin of Natural Whey Cultures Used for Traditional Water-Buffalo Mozzarella Cheese Manufacture. *Journal of Dairy Science* 86(2):486-497.

Morales, F., J. Morales, C. Hernández y H. Hernández-Sánchez. 2011. Isolation and Partial Characterization of Halotolerant Lactic Acid Bacteria from Two Mexican Cheeses. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164(6):889-905.

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.

Mucchetti, G. y E. Neviani. 2006. *Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e sicurezza. Tecniche nuove.*

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.

Muyzer, G. y K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73(1):127-141.

Nadkarni, M. A., F. E. Martin, N. Hunter y N. A. Jacques. 2009. Methods for optimizing DNA extraction before quantifying oral bacterial numbers by real-time PCR. *FEMS microbiology letters* 296(1):45-51.

Ndoye, B., E. Rasolofo, G. LaPointe y D. Roy. 2011. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Science & Technology* 91(5):495-524.

Neviani, E. y S. Carini. 1994. Microbiology of Parmesan cheese. *MAN Microbiologie, aliments, nutrition* 12(1):1-8.

Nikolaou, A., G. Saxami, Y. Kourkoutas y A. Galanis. 2011. A new methodology for rapid detection of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on multiplex PCR. *Journal of Microbiological Methods* 84(2):362-364.

O'Sullivan, L. A., G. Webster, J. C. Fry, R. J. Parkes y A. J. Weightman. 2008. Modified linker-PCR primers facilitate complete sequencing of DGGE DNA fragments. *Journal of Microbiological Methods* 75(3):579-581.

Ogier, J.-C., O. Son, A. Gruss, P. Tailliez y A. Delacroix-Buchet. 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology* 68(8):3691-3701.

Oliver, S., B. Jayarao y R. Almeida. 2005. Foodborne pathogens, mastitis, milk quality, and dairy food safety. Pages 3-27 in *Proc. NMC Annual Meeting Proceedings*.

Osborn, A. M., E. R. Moore y K. N. Timmis. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology* 2(1):39-50.

Pan, D. D., X. Q. Zeng y Y. T. Yan. 2011. Characterisation of *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(3):512-518.

Parente, E. y T. Cogan. 2004. Starter cultures: general aspects. *Cheese: chemistry, physics and microbiology* 1:123-147.

Pintado, C. M. B. S., M. A. S. S. Ferreira y I. Sousa. 2010. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control* 21(3):240-246.

Pintado, M. E., A. I. E. Pintado y F. X. Malcata. 1999. Production of Polysaccharide by *Rahnella aquatilis* with Whey Feedstock. *Journal of Food Science* 64(2):348-352.

Podkowik, M., J. Y. Park, K. S. Seo, J. Bystron y J. Bania. 2013. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* 163(1):34-40.

Pogačić, T., A. Mancini, M. Santarelli, B. Bottari, C. Lazzi, E. Neviani y M. Gatti. 2013. Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of a long ripened hard cheese produced from raw milk and undefined natural starter. *Food Microbiology* 36(2):207-215.

Randazzo, C. L., C. Caggia y E. Neviani. 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods* 78(1):1-9.

Randazzo, C. L., I. Pitino, S. De Luca, G. O. Scifò y C. Caggia. 2008. Effect of wild strains used as starter cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siciliano cheese. *International Journal of Food Microbiology* 122(3):269-278.

Randazzo, C. L., S. Torriani, A. D. Akkermans, W. M. de Vos y E. E. Vaughan. 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and environmental microbiology* 68(4):1882-1892.

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, B. Vallejo-Cordoba, D. L. Van Hekken y A. F. Gonzalez-Cordova. 2008. CHARACTERIZATION OF THE MICROFLORA ISOLATED FROM QUESO FRESCO MADE FROM RAW AND PASTEURIZED MILK. *Journal of Food Safety* 28(1):59-75.

Retureau, É., C. Callon, R. Didiene y M.-C. Montel. 2010. Is microbial diversity an asset for inhibiting *Listeria monocytogenes* in raw milk cheeses? *Dairy Science & Technology* 90(4):375-398.

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):163-171.

Ruíz, G. D. y C. W. Rodarte. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* (002).

Sanders, M. E. 2008. Use of Probiotics and Yogurts in Maintenance of Health. *Journal of Clinical Gastroenterology* 42:S71-S74 10.1097/MCG.1090b1013e3181621e3181687.

Santarelli, M., M. Gatti, C. Lazzi, V. Bernini, G. A. Zapparoli y E. Neviani. 2008. Whey Starter for Grana Padano Cheese: Effect of Technological Parameters on Viability and Composition of the Microbial Community. *Journal of Dairy Science* 91(3):883-891.

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.

Shen, S. y F. C. Fang. 2012. Integrated stress responses in *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology* 152(3):75-81.

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.

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.

Spector, M. P. y W. J. Kenyon. 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International* 45(2):455-481.

SSA. 2010.

Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70(2-4):331-345.

Teixeira, L. M., V. L. C. Merquior, M. d. C. E. Vianni, M. d. G. S. Carvalho, S. EL FRACALANZZA, A. G. Steigerwalt, D. J. Brenner y R. R. Facklam. 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *International journal of systematic bacteriology* 46(3):664-668.

Temelli, S., Ş. Anar, C. Sen y P. Akyuva. 2006. Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. *Food Control* 17(11):856-861.

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. J., B. Vallejo-Cordoba, M. E. Díaz-Cinco, M. A. Mazorra-Manzano y A. F. González-Córdova. 2006. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control* 17(9):683-690.

Torres-Vitela, M., M. Mendoza-Bernardo, J. Castro-Rosas, C. Gomez-Aldapa, L. 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, 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.

Vallaey, T., E. Topp, G. Muyzer, V. Macheret, G. Laguerre, A. Rigaud y G. Soulas. 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology* 24(3):279-285.

Van Hoorde, K., M. Heyndrickx, P. Vandamme y G. Huys. 2010. Influence of pasteurization, brining conditions and production environment on the microbiota of artisan Gouda-type cheeses. *Food Microbiology* 27(3):425-433.

Van Kessel, J. S., J. S. Karns, L. Gorski, B. J. McCluskey y M. L. Perdue. 2004. Prevalence of Salmonellae, Listeria monocytogenes, and Fecal Coliforms in Bulk Tank Milk on US Dairies. *Journal of Dairy Science* 87(9):2822-2830.

Vernozy-Rozand, C., C. Mazuy-Cruchaudet, C. Bavai, M. P. Montet, V. Bonin, A. Dernburg y Y. Richard. 2005. Growth and survival of Escherichia coli O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 105(1):83-88.

Villegas de Gante, A. y F. C. Escoto. 2011. La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales*.

Vorobjeva, L. I. 1999. Economic and medical applications. Propionibacteria, Netherlands. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Welman, A. D. y I. S. Maddox. 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends in Biotechnology 21(6):269-274.

Welthagen, J. J. y B. C. Viljoen. 1998. Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. International Journal of Food Microbiology 41(3):185-194.

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.

Wilson, I. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and environmental microbiology 63(10):3741-3751.

Yang, T., K. Wu, F. Wang, X. Liang, Q. Liu, G. Li y Q. Li. 2014. Effect of exopolysaccharides from lactic acid bacteria on the texture and microstructure of buffalo yoghurt. International Dairy Journal 34(2):252-256.

Zacharof, M. P. y R. W. Lovitt. 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. APCBEE Procedia 2(0):50-56.

Zotta, T., A. Ricciardi, F. Ciocia, R. Rossano y E. Parente. 2008. Diversity of stress responses in dairy thermophilic streptococci. International Journal of Food Microbiology 124(1):34-42.