

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DIVERSIDAD Y DINÁMICA DEL MICROBIOMA DE BACTERIAS  
LÁCTICAS DEL QUESO CHIHUAHUA**

**Por**

**M.C. CRISTINA SÁNCHEZ GAMBOA**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGÍA**

**Abril, 2016**

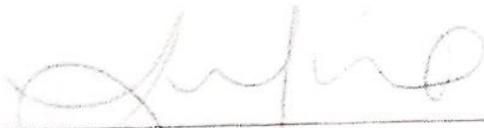
**DIVERSIDAD Y DINÁMICA DEL MICROBIOMA  
DE BACTERIAS LÁCTICAS  
DEL QUESO CHIHUAHUA**

**Comité de tesis**



---

**Dr. José Santos García Alvarado**  
Presidente



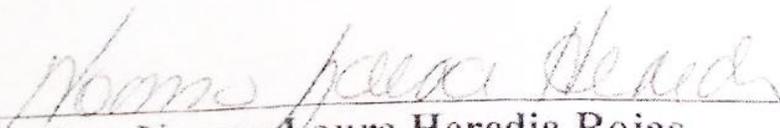
---

**Dra. Luisa Yolanda Solís Soto**  
Secretaria



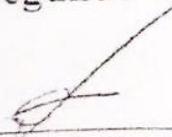
---

**Dra. Gpe. Virginia Nevárez Moorillón**  
Primer vocal



---

**Dra. Norma Laura Heredia Rojas**  
Segundo vocal



---

**Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal**  
Tercer vocal

**DIVERSIDAD Y DINÁMICA DEL MICROBIOMA  
DE BACTERIAS LÁCTICAS  
DEL QUESO CHIHUAHUA**

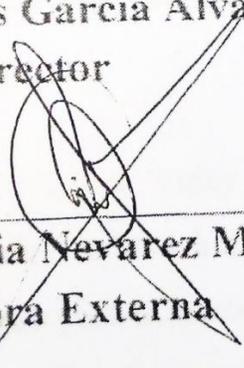
Dirección de tesis



---

**Dr. José Santos García Alvarado**

**Director**



---

**Dra. Gpe. Virginia Nevarez Moorillón**

**Directora Externa**

## **AGRADECIMIENTOS**

Trabajo financiado por fondos del proyecto de Ciencia Básica CONACYT CB-2011-168960. La sustentante agradece al CONACYT por la beca otorgada para la realización de sus estudios de Doctorado, así como a la Comisión Estatal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COESPRIS) del Estado de Chihuahua por las facilidades brindadas para la visita y obtención de las muestras de las cinco queserías y al personal administrativo de la Secretaría de Investigación y Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL), especialmente a Mirthala Páez, así como de la Facultad de Ciencias Químicas (UACH), especialmente a Maribel García y Belinda Márquez.

Agradezco de manera especial a mi familia por su cariño y confianza en mí, y especialmente a mis padres, porque gracias a su gran amor y esfuerzo me fue posible llegar hasta aquí.

Gracias al comité de tesis, especialmente a la Dra. Vicky por haberme invitado a formar parte de este proyecto del que he aprendido muchísimo bajo su dirección. Agradezco también al Dr. Santos por el apoyo brindado para la asistencia a los congresos nacionales donde se presentó este trabajo, así como por valiosa colaboración en la elaboración de los manuscritos de los artículos.

Agradezco a Diana y Román por enseñarme las técnicas de biología molecular, así como a la Dra. Blanca Rivera y al Dr. Javier Zavala por facilitarme los equipos requeridos para realizar los experimentos relacionados con la caracterización molecular de las cepas.

Gracias a TODOS mis compañeros tesisistas de licenciatura y posgrado con quienes compartí gratos momentos fuera y dentro del laboratorio.

## DEDICATORIA

*A mis padres,*

*Con todo mi cariño.*

# ÍNDICE GENERAL

Sección	Página
Índice de Tablas.....	vii
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Apéndices.....	x
Abreviaturas.....	xi
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
3. Justificación.....	12
4. Hipótesis.....	13
5. Objetivos.....	14
6. Materiales y Métodos.....	15
6.1 Obtención de las muestras.....	15
6.2 Análisis microbiológico.....	16
6.3 Aislamiento de cepas de BAL y caracterización metabólica.....	18
6.3.1 Metabolismo del citrato y proteólisis.....	18
6.3.2 Producción de diacetilo, capacidad acidificante y producción de CO <sub>2</sub> .....	19
6.4 Análisis de la diversidad microbiana mediante técnicas independientes de cultivo.....	20
6.4.1 Extracción de ADN.....	20
6.4.1.1 Electroforesis en gel de agarosa.....	21
6.4.2 Amplificación de la región V3 del gel <i>16S rARN</i> .....	22

6.4.3 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE).....	23
6.5 Análisis estadístico.....	25
<b>7. Resultados y Discusión.....</b>	<b>26</b>
7.1 Análisis microbiológico de las muestras obtenidas durante la elaboración del queso Chihuahua.....	26
7.1.1 Dinámica de microorganismos indicadores.....	26
7.1.2 Determinación de <i>Salmonella</i> sp. en queso.....	31
7.1.3 Dinámica de bacterias lácticas (BAL).....	31
7.2 Análisis microbiológico del proceso de maduración del queso Chihuahua.....	36
7.2.1 Microorganismos indicadores.....	36
7.2.2 Dinámica de BAL y <i>Enterococcus</i> sp.....	40
7.3 Caracterización metabólica de las cepas de BAL.....	45
7.4 Análisis metagenómico: PCR-DGGE.....	46
7.4.1 Extracción de ADN metagenómico y amplificación de la región V3 del gen <i>16S rARN</i> .....	47
7.4.2 Diversidad y dinámica de la microbiota durante la elaboración del queso Chihuahua.....	48
7.4.3 Diversidad y dinámica de la microbiota durante la maduración del queso Chihuahua.....	52
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>56</b>
<b>9. Perspectivas.....</b>	<b>57</b>
<b>10. Bibliografía.....</b>	<b>58</b>
<b>11. Apéndices.....</b>	<b>68</b>
<b>12. Resumen Biográfico.....</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Microorganismos determinados de acuerdo al tipo de muestra obtenido durante la elaboración y maduración del queso Chihuahua de leche cruda.....	17
2. Composición de la solución de urea y formamida del 100% para preparar los geles de DGGE.....	24
3. Cantidad y tipo de muestras obtenidas durante la elaboración y maduración del queso Chihuahua de leche cruda durante tres estaciones del año.....	26
4. Resultados del análisis microbiológico de las muestras tomadas durante la elaboración del queso Chihuahua de leche cruda.....	28
5. Resultados del análisis microbiológico de las muestras de leche y queso de cada una de las queserías.....	30
6. Determinación de BAL durante la elaboración del queso Chihuahua de leche cruda en tres estaciones del año.....	32
7. Determinación de BAL durante la elaboración del queso Chihuahua de leche cruda en cinco queserías artesanales.....	35
8. Resultados del análisis microbiológico durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda elaborado en cinco queserías artesanales.....	37
9. Determinación de BAL durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda elaborado en diferentes queserías.....	41
10. Determinación de la capacidad acidificante de cepas de BAL aisladas durante la elaboración y maduración del queso Chihuahua de leche cruda.....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Proceso de elaboración del queso Chihuahua.....	6
2. Esquema general de trabajo .....	16
3. Condiciones de operación para realizar la amplificación de la región V3 del gen <i>16S rRNA</i> .....	22
4. Dinámica de bacterias lácticas durante la elaboración del queso Chihuahua de leche cruda durante A, verano; B, invierno, y C, verano.....	34
5. Dinámica de coliformes totales y <i>S. aureus</i> durante el tiempo de maduración del queso Chihuahua de leche cruda elaborado en tres estaciones del año.....	38
6. Dinámica de mohos (A), levaduras (B) y mesófilos aerobios (C) durante el tiempo de maduración del queso Chihuahua de leche cruda elaborado en tres estaciones del año.....	39
7. Dinámica de BAL durante el tiempo de maduración del queso Chihuahua de leche cruda elaborado en A, otoño; B, invierno; C, verano.....	42
8. Extracción de metagenoma de las muestras tomadas durante el proceso de elaboración y maduración del queso .....	47
9. Amplificación de la región V3 del gen <i>16S rARN</i> .....	48
10. Perfil de DGGE de los amplicones de la región V3 del gen <i>16S rARN</i> pertenecientes a las muestras obtenidas durante la elaboración del queso Chihuahua de leche cruda en las queserías A y B.....	49
11. Perfil de DGGE de los amplicones de la región V3 del gen <i>16S rARN</i> pertenecientes a las muestras obtenidas durante la elaboración del queso Chihuahua de leche cruda en las queserías C, D y E.....	50
12. Perfil de DGGE de los amplicones de la región V3 del gen <i>16S rARN</i> pertenecientes a las muestras obtenidas durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda en la quesería A .....	52

<b>13.</b> Perfil de DGGE de los amplicones de la región V3 del gen <i>16S rARN</i> pertenecientes a las muestras obtenidas durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda en la quesería B.....	53
<b>14.</b> Perfil de DGGE de los amplicones de la región V3 del gen <i>16S rARN</i> pertenecientes a las muestras obtenidas durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda en la quesería C.....	54
<b>15.</b> Perfil de DGGE de los amplicones de la región V3 del gen <i>16S rARN</i> pertenecientes a las muestras obtenidas durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda en la quesería D.....	54
<b>16.</b> Perfil de DGGE de los amplicones de la región V3 del gen <i>16S rARN</i> pertenecientes a las muestras obtenidas durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda en la quesería E.....	55

## ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice	Página
<b>I.</b> Composición del agar Elliker.....	68
<b>II.</b> Análisis estadístico de las muestras tomadas durante la elaboración del queso Chihuahua de leche cruda en cinco queserías artesanales durante tres estaciones del año.....	69
<b>III.</b> Análisis estadístico de las muestras tomadas durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda en cinco queserías artesanales durante tres estaciones del año.....	71
<b>IV.</b> Cuantificación de ADN de los productos de PCR (amplificación de la región V3 del gen <i>16S rARN</i> ) de las muestras obtenidas durante la elaboración del queso Chihuahua de leche cruda durante tres estaciones del año en cinco queserías artesanales.....	74
<b>V.</b> Cuantificación de ADN de los productos de PCR (amplificación de la región V3 del gen <i>16S rARN</i> ) de las muestras obtenidas durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda durante tres estaciones del año en cinco queserías artesanales.....	75

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>rARN</b>	Ácido Ribonucleico (ribosomal)
<b>BAL</b>	Bacterias Ácido-Lácticas
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>DGGE</b>	Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante
<b>DNTP</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilen diamino-tetra-acético
<b>g</b>	gramos
<b>h</b>	horas
<b>L</b>	Litros
<b>log<sub>10</sub></b>	Logaritmo decimal
<b>M</b>	Molar
<b>min</b>	minutos
<b>mL</b>	mililitros
<b>mM</b>	milimolar
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Magnesio
<b>MRS</b>	Mann-Rogosa-Sharpe
<b>nm</b>	nanómetros
<b>ng</b>	nanogramos
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Sodio Dodecil-Sulfato
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>μL</b>	microlitros
<b>μM</b>	Micromolar
<b>V</b>	Volts

## RESUMEN

El queso Chihuahua es un alimento artesanal elaborado con leche cruda, por lo que posee características sensoriales que lo distinguen, pero el uso de la leche pasteurizada para este fin, afectó sus características sensoriales. A fin de describir la ecología microbiana durante la elaboración y maduración de este queso, se visitaron cinco queserías artesanales del Estado de Chihuahua durante tres estaciones del año y se tomaron muestras durante la elaboración del producto en cada establecimiento (leche, cuajada, chedarizado, queso recién elaborado), así como de la maduración en el laboratorio (30-270 días). Se emplearon técnicas dependientes (conteo en placa) e independientes de cultivo (PCR-DGGE), además de caracterizar metabólicamente algunas cepas autóctonas. Durante la preparación del queso, las cuentas de coliformes y mesófilos no se influenciaron por la estación del año ni por el tipo de muestra; los niveles de mohos y levaduras fueron mayores durante el otoño y los de *S. aureus* en el verano. La temporada de muestreo afectó los conteos de todos los grupos de bacterias lácticas, encontrando las cuentas más elevadas durante el verano. Se observó una prevalencia de los lactobacilos mesófilos durante la formación de la cuajada, y se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los niveles de *Enterococcus* sp. en las cinco queserías. Por su parte, el tiempo de maduración influyó la dinámica de coliformes y *S. aureus*, ya que éstos disminuyeron drásticamente o desaparecieron a través del tiempo. Por otra parte, se observó una dinámica diferente de bacterias lácticas de acuerdo con la temporada del año; las cepas mesófilas y termófilas del género *Lactobacillus* permanecieron en niveles elevados, mientras que los de *Lactococcus* sp. y cocos termófilos disminuyeron durante este periodo. Adicionalmente, se observó que las cuentas de *Enterococcus* sp dependían de la quesería analizada. El perfil de DGGE permitió observar la influencia estacional y el tiempo de maduración sobre la dinámica de microorganismos, aunque también mostró el efecto de las condiciones de manufactura sobre la dinámica microbiana durante la elaboración del queso. El análisis metabólico de las cepas reveló la existencia de algunos microorganismos con características de interés que pueden contribuir a la generación del aroma y sabor característicos de este queso y que podrían emplearse además en la elaboración del queso a partir de leche pasteurizada. Los datos obtenidos permiten concluir que la diversidad y dinámica de la microbiota del queso Chihuahua elaborado con leche cruda están influenciadas por la temporada del año en la que se elabora el queso, así como por las prácticas y condiciones de manufactura particulares de los establecimientos que lo preparan.

## ABSTRACT

Chihuahua cheese is an artisanal food made from raw milk, which is characterized by its sensorial properties. Milk pasteurization was introduced to improve its quality, but as a consequence sensorial attributes were affected. To describe microbial ecology during elaboration and ripening of that cheese, five artisanal dairies from Chihuahua State were surveyed throughout a year. On each factory, samples during cheese elaboration were collected (milk, curd, cheddaring, cheese), and also cheese was ageing in the laboratory during 270d. Culture dependent (plate count) and independent methods (PCR-DGGE) were used, and metabolic characteristics of some autochthonous strains were determined. Counts of coliforms and mesophiles were not affected by season or sample type during cheese elaboration, while levels of mould and yeast were influenced by season, being during autumn the biggest. The greatest counts of *S. aureus* were detected during cheese elaboration on summer; also, counts of all groups of lactic acid bacteria were affected by the season in which cheese was made, with higher counts during summer. Mesophilic lactobacilli predominated during curd formation, and also, a marked influence of cheese factory on *Enterococcus* sp. levels was observed. During maturation coliforms and *S. aureus* tended drastically to decrease or even to disappear throughout this period; different profile of dynamic of lactic acid bacteria was observed between seasons. During ripening, it was observed a prevalence of mesophilic and thermophilic species of lactobacilli, and lactococci and thermophilic cocci tended to decrease; cheese factory influenced dynamics of *Enterococcus* sp. DGGE profiles showed that season and manufacturing conditions influenced microbial population. Various native strains showed important metabolic characteristics that could contribute to generation of sensorial properties. Such microorganisms could be used for cheese elaboration with pasteurized milk. Cheese microbiota and its dynamic is affected by season and particular manufacturing conditions of each dairy.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Leche.

La leche es la secreción de la glándula mamaria de las hembras de los mamíferos que sirve de alimento y protección inmunológica para las crías. La leche producida por vacas, búfalos, ovejas, cabras y camellos se utiliza tanto para el consumo humano (Harjinder y Bennet, 2002), como para la elaboración de miles de productos diferentes. En los países occidentales, tanto la leche como sus derivados constituyen una parte importante en la dieta de sus habitantes, ya que aportan el 30% de las proteínas y lípidos y alrededor del 80% del calcio necesarios (Fox, 2003).

## 1.2 Industria láctea en México.

En México la producción de leche de bovino es muy heterogénea desde el punto de vista tecnológico, agroecológico y socioeconómico, incluyendo la gran variedad de climas regionales y características de tradiciones y costumbres de las poblaciones. Sin embargo, la industria de productos lácteos es la tercera actividad más importante dentro de la rama de la industria de alimentos en México, y depende de la disponibilidad de la leche nacional su crecimiento (SE, 2012). En el 2014 la producción de leche bovina fue de 11 129918 000L; los principales Estados productores (en orden decreciente) son Jalisco, Coahuila, Durango, Chihuahua, Guanajuato y Veracruz. Estas cifras posicionan al país como el segundo productor de leche en Norte América (después de Estados Unidos), aunque su producción es superada por Brasil y Argentina. La producción de leche en el país se lleva a cabo mediante el sistema intensivo y el de producción de doble propósito o de lechería familiar. El primero se realiza con ganado de razas especializadas en la producción de leche como la *Holstein*, que consume alimento balanceado y forraje de corte, por lo que la producción de leche mantiene un volumen constante. En el segundo sistema la producción láctea es dependiente de la disponibilidad de forraje, que a su vez está determinada por la temporada de lluvias,

presentando mayor producción de leche en el periodo de julio a octubre (SAGARPA, 2010).

La leche que se produce puede consumirse en cualquiera de sus diversas presentaciones (evaporada, condensada, en polvo, pasteurizada, ultrapasteurizada, etc.) o a través de los productos que se derivan de ella (crema, mantequilla, margarina, yogurt, queso, etc.) (SAGARPA, 2014). De la leche fluida que se produce en el país, el 30.9% se emplea para manufacturar leche pasteurizada, homogeneizada y ultrapasteurizada; el 17.6% se distribuye como leche entera y leche para lactantes; el 15.7% para la elaboración de quesos industriales; 9% para yogurt natural o con frutas; 6% para la rehidratación de leche; la crema, mantequilla, margarinas y grasas butíricas se elaboran a partir del 4%, mientras que los quesos artesanales, dulces y otros productos lácteos regionales se elaboran con el 17% de la leche restante (SAGARPA, 2010).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Queso.

El queso es un alimento derivado de la leche, del cual existen alrededor de 1000 variedades en todo el mundo (Fox, 2003). Aunque su origen se desconoce, es probable que surgiera de manera accidental hace unos siete u ocho mil años en el área de la antigua Asiria (territorios actuales de Siria, Iraq, Kuwait, Israel, Palestina, Egipto, una parte de Turquía, una parte de Irán y Chipre) (Heller *et al.*, 2003). Se cree que surgió cuando un comerciante árabe colocó su reserva de leche en una bolsa elaborada con el estómago de oveja al salir unos días al desierto. El calor del sol y la renina adherida a las paredes de la bolsa provocaron la separación de la leche en cuajada y suero (Prajapati y Nair, 2003). La producción de queso se extendió como una forma de conservación de la leche ya que poseía un alto valor energético y nutricional (Heller *et al.*, 2003; Beresford *et al.*, 2001). Las diversas variedades de queso surgieron al ver el efecto positivo de la adición de sal, la acidificación de la leche, la deshidratación del producto final y el tiempo de maduración, sobre la vida en anaquel y el sabor del queso. Para concentrar la grasa y la caseína de la leche en el queso, es necesario la adición de enzimas y/o la acidificación de la leche por los microorganismos que se encuentran en ella, que favorecen la formación de un gel de caseína (Heller *et al.*, 2003). La concentración de nutrientes en la mayoría de las variedades de queso, se obtiene al combinar cuatro ingredientes: leche, renina, microorganismos y sal. En general, los pasos para la obtención del queso es la formación del gel o cuajada, la expulsión del suero, producción de ácido y adición de sal (Badui, 1999), seguida del prensado y un periodo de maduración (Beresford *et al.*, 2001) durante el cual se presenta una serie de cambios ocasionados por las enzimas del propio alimento o por los microorganismos presentes en él (Orozco-Morales, 2008). Sin embargo, el proceso de elaboración varía de acuerdo al tipo de queso (Uaboi-Egbenni *et al.*, 2010), teniendo variaciones en la temperatura de cocimiento de la cuajada y la manipulación de misma (Beresford *et al.*, 2001).

Cuando se emplea leche pasteurizada, el primer paso es la inoculación de la leche pasteurizada con cultivos lácticos comerciales (Jay, 2000), debido a que el tratamiento

térmico de la leche disminuye la población bacteriana involucrada en la producción del queso (Morea *et al.*, 1999); esto no es necesario en el caso de la leche cruda, ya que se aprovecha la actividad de las bacterias lácticas (BAL) presentes de forma natural en ella (Jay, 2000).

Además de concentrar los nutrientes de la leche, el queso constituye una forma más segura de consumo de la misma, ya que las condiciones que ocurren durante la fermentación (disminución del pH, el agotamiento de los nutrientes y la producción de metabolitos) y durante la maduración (disminución de la actividad acuosa, temperatura alrededor de los 15°C) crean condiciones que dificultan el crecimiento de microorganismos patógenos, aunque el efecto de dichas condiciones depende de las prácticas de manufactura y maduración del queso (Montel *et al.*, 2014). De esta manera, los microorganismos patógenos y/o contaminantes pueden crecer, sobrevivir o inactivarse debido a las circunstancias de producción y almacenamiento del queso (Verraes *et al.*, 2015).

## **2.2 Quesos artesanales.**

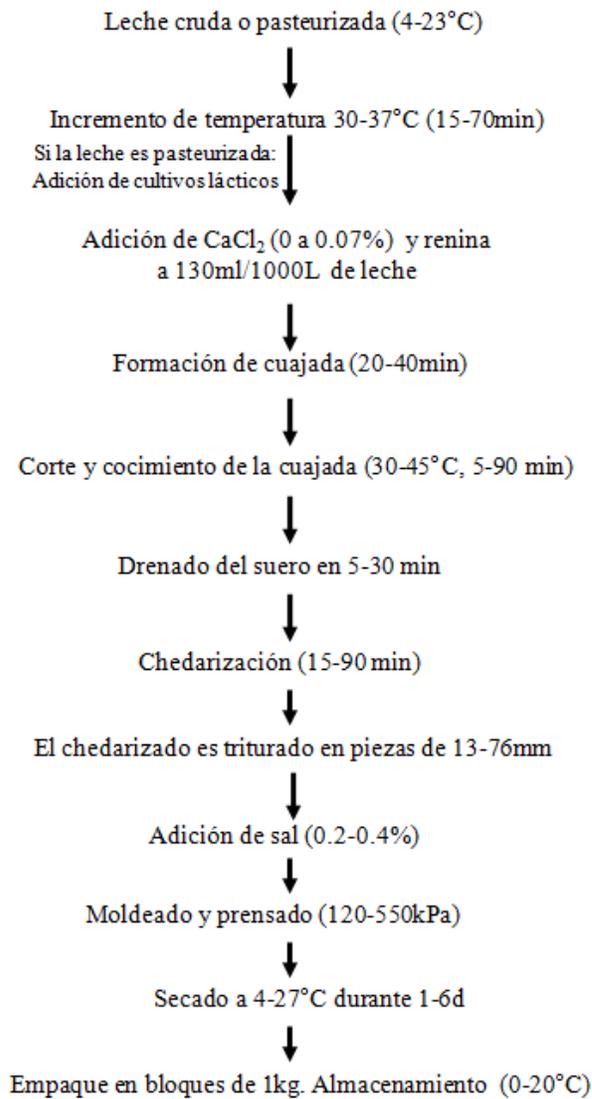
En el mundo se elaboran miles de quesos artesanales, los cuales se caracterizan por su distintivo e intenso sabor; pueden ser consumidos inmediatamente después de ser elaborados o madurarse incluso durante años. Debido a que se producen de manera artesanal, a pequeña escala en granjas o pueblos, se les considera parte de la historia, la cultura y el estilo de vida de la comunidad que los elabora. Sus propiedades particulares se deben a la interacción de varios factores durante su producción, tales como la alimentación del ganado, el empleo de leche sin pasteurizar (y por lo tanto de sus microorganismos nativos), la adición de ingredientes naturales, el recurso humano como principal ejecutor del proceso de elaboración, el uso de utensilios propios de cada comunidad, así como el aprovechamiento de las condiciones naturales para la maduración del queso (Licitra, 2010). Las diferentes condiciones de manufactura favorecen el desarrollo de una gran diversidad de microorganismos en los quesos artesanales (Randazzo *et al.*, 2009).

Los quesos artesanales elaborados con leche cruda maduran más rápido y poseen sabores más intensos en comparación con aquellos elaborados de manera industrial con leche pasteurizada. Debido al tratamiento térmico de la leche, algunas enzimas como proteasas y/o lipasas son desnaturalizadas, mientras que la diversidad de los microorganismos nativos se ve afectada. Tanto las enzimas como los microorganismos presentes, están involucrados en el desarrollo de las características distintivas de los quesos de leche cruda (Montel *et al.*, 2014).

### **2.2.1 Queso Chihuahua.**

En México se elaboran diversos tipos de queso, de los cuales el queso Chihuahua ocupa el quinto lugar en producción nacional después de los quesos fresco, panela, amarillo y doble crema (SAGARPA, 2014).

El queso Chihuahua es elaborado en el Estado de Chihuahua, y su origen está íntimamente ligado a la llegada de la comunidad menonita a dicha región en 1922 (Almanza-Rubio *et al.*, 2013). Para su elaboración se emplea leche de vaca (cruda o pasteurizada), resultando un queso semiduro, rebanable, de color amarillo pálido, que se torna dorado si es madurado. El queso resultante de la leche pasteurizada es carente de hoyos, mientras que el de leche cruda poseerá pequeños agujeros (Gutiérrez-Méndez y Nevárez-Moorillón, 2009). Este queso se consume generalmente después de 30 días de su elaboración (Bricker *et al.*, 2005), y se le han encontrado características reológicas y tecnológicas similares a los quesos Cheddar, Brick y Colby fresco (Gutiérrez-Méndez y Nevárez-Moorillón, 2009). En el 2014 se produjeron 39 712 toneladas del este queso, lo cual representó un valor en el mercado de 2 432 474 000 millones de pesos (SAGARPA, 2014). Su proceso de elaboración se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Proceso de elaboración del queso Chihuahua (modificado de Tunick *et al.*, 2008)

### 2.3 Diversidad microbiana de los quesos artesanales

Durante el proceso de elaboración del queso, los microorganismos tienen un papel muy importante, contribuyendo especialmente durante las primeras etapas en la producción de ácido, y durante la maduración, en la generación de los compuestos responsables de las propiedades sensoriales (Hymery *et al.*, 2014). Sin embargo, la diversidad microbiana de los quesos artesanales, así como su desarrollo y prevalencia durante la maduración, están influenciados por las condiciones que resultan del empleo de una metodología artesanal para su elaboración, así como el uso de los cultivos iniciadores indefinidos y las

condiciones ambientales durante el añejamiento (Pogačić *et al.*, 2013). Debido al empleo de tecnologías artesanales (no estandarizadas), pueden presentarse variaciones estacionales de los microorganismos observados, como consecuencia de las diferencias en la composición química y microbiológica de la leche, así como cambios en el proceso de manufactura y en el ambiente del lugar donde se elabora el queso (Terzic-Vidojevic *et al.*, 2014).

La leche es la principal fuente de microorganismos para el queso; no obstante, la diversidad de éstos depende de factores como las prácticas y equipo empleados para la ordeña, el aire, agua, alimentación del ganado, la etapa de lactancia, las superficies que están en contacto con ella, así como las prácticas y condiciones ambientales y tecnológicas que se presentan durante la manufactura del queso (Quigley *et al.*, 2013; Montel *et al.*, 2014). Algunos géneros bacterianos que participan activamente en la generación de los compuestos relacionados al sabor y aroma del queso son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Carnobacterium*, así como ciertos mohos y levaduras: *Kluyveromyces*, *Debaromyces*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus*, entre otros (Quigley *et al.*, 2013). Además, en los quesos elaborados con leche cruda pueden encontrarse microorganismos contaminantes de los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Escherichia* (Chambers, 2002), que aunque pueden contribuir de manera no significativa al desarrollo de las características del queso, su ausencia se traduce en una mejor calidad del producto y mayor vida de anaquel, beneficiando tanto al productor como al consumidor (Bricker *et al.*, 2005).

### **2.3.1 Bacterias lácticas (BAL)**

Las BAL son un grupo muy heterogéneo de microorganismos que tienen en común ser cocos o bacilos Gram positivos, no formadores de esporas, catalasa negativa (excepto el género *Pediococcus*), anaerobios aerotolerantes, ácido tolerantes y estrictamente fermentativos. Están asociados a hábitats ricos en nutrientes, por lo que se dice que son “fastidiosos”; algunos son parte de la flora normal de boca e intestinos de algunos mamíferos (Axelson, 2004). En el caso del queso, su presencia se considera benéfica (Pintado *et al.*, 2008). De acuerdo a los metabolitos que producen como resultado de la

fermentación de la glucosa, las BAL pueden ser homofermentadoras, si el ácido láctico es el producto principal de la fermentación; mientras que si además de dicho ácido producen otros compuestos como el etanol, ácido acético y CO<sub>2</sub>, son heterofermentadoras. Este segundo grupo es ampliamente utilizado en la industria debido a que producen algunas moléculas importantes para el olor y aroma del queso, como el diacetilo y aldehídos (Axelsson 2004; Carr *et al.*, 2002). Las cepas de BAL procedentes de quesos artesanales pueden emplearse como cultivos bioprotectores, debido a que son capaces de producir una amplia variedad de compuestos antimicrobianos, disminuir la cantidad de azúcares fermentables y/o disminuir el pH del medio (Montel *et al.*, 2014). Desde el punto de vista tecnológico, las BAL participan activamente durante todo el proceso de elaboración y maduración del queso. De esta manera, se les clasifica en:

**Bacterias lácticas iniciadoras (“starters”)**. El papel principal de este grupo de BAL es la producción de suficiente ácido láctico para disminuir el pH de la leche a valores inferiores de 5.3 en un tiempo de 6 horas a una temperatura entre 30 y 37°C (Beresford *et al.*, 2001). Los géneros de BAL que se emplean como iniciadores son: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y algunas especies de *Lactobacillus* (Heller *et al.*, 2003), que pueden agregarse al inicio de la elaboración del queso en el proceso que emplea leche pasteurizada; sin embargo, cuando el queso se elabora a partir de leche cruda, se aprovecha la actividad de los microorganismos que se encuentran presentes de manera natural en la leche cruda, es decir, no es necesario la incorporación de cultivos iniciadores comerciales (Beresford *et al.*, 2001). Poco después de la fabricación del queso, el número de estos microorganismos aumenta rápidamente (Heller *et al.*, 2003), logrando densidades de hasta 10<sup>8</sup> UFC/g después de las primeras horas de manufactura (Beresford *et al.*, 2001). Sin embargo, los recuentos de células viables disminuyen conforme avanza el tiempo (Heller *et al.*, 2003), posiblemente como consecuencia del bajo pH generado durante la fermentación de azúcares, así como por el incremento de la concentración de sal, la baja actividad acuosa (Piras *et al.*, 2013) y la acumulación de metabolitos, que favorecen la disminución de microorganismos por autólisis. Debido a la autólisis de las BAL iniciadoras, se liberan al medio diversas enzimas (Fitzsimons *et al.*, 1999) que promueven la degradación de los péptidos y proteínas en el queso durante el proceso de maduración (Heller *et al.*, 2003). Como consecuencia, producen algunos compuestos aromáticos y

sustratos para el crecimiento de otros microorganismos, regulando el crecimiento de la población microbiana en el queso (Montel *et al.*, 2014).

**Bacterias lácticas no iniciadoras (Non-starter lactic acid bacteria, NSLAB)** Las NSLAB son un grupo muy heterogéneo de microorganismos que incluye especies mesófilas y termófilas, así como homofermentadores y heterofermentadores (Heller *et al.*, 2003), de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Pediococcus* (Montel *et al.*, 2014). A pesar de que forman parte de los microorganismos nativos de la leche cruda (Montel *et al.*, 2014), generalmente no crecen bien en ella, por lo que no contribuyen en la elaboración del queso (Beresford *et al.*, 2001). No obstante, son de gran importancia durante la maduración, debido a que poseen una amplia gama de proteinasas, peptidasas y esterasas, además de que son capaces de fermentar aminoácidos y producir ésteres (Crow *et al.*, 2002). En los quesos de leche cruda, las NSLAB encontradas provienen principalmente de la leche, mientras que en el caso de la leche pasteurizada, el tratamiento térmico destruye muchos de los géneros que se encuentran como flora normal, por lo que su presencia en el queso se atribuye a contaminación posterior al tratamiento térmico o a especies que sobreviven el proceso de pasteurización (Fitzsimons *et al.*, 1999). Crecen en el queso durante la maduración, a pesar que dicho periodo se caracteriza por el agotamiento de los azúcares fermentables y el acumulamiento de compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas (De Pasquale *et al.*, 2014); soportan además condiciones adversas como temperaturas de 2-53°C, ambientes con pH tan bajo como 4.9, concentraciones de sal de hasta 6%, humedades menores al 50% (Montel *et al.*, 2014; Fitzsimons *et al.*, 1999). Al ser empleados como cultivos adjuntos durante la elaboración del queso, se incrementa la concentración de ácidos grasos libres así como péptidos asociados al sabor intenso del queso y a la rápida maduración del mismo (De Pasquale *et al.*, 2014).

#### **2.4 Importancia del estudio de los quesos artesanales.**

Los quesos tradicionales son considerados, ecosistemas naturales, cuyos componentes dependen del origen de la leche, el proceso de manufactura y las prácticas de higiene durante la ordeña, la elaboración y maduración del queso (Martín-Platero *et al.*, 2008). Estos quesos conservan la diversidad microbiana de la leche, y se distinguen por sus

características sensoriales (Callon *et al.*, 2005), que resultan del balance de los compuestos aromáticos derivados de diversas vías metabólicas (Montel *et al.*, 2014). De esta manera, el sabor de un queso está en función del número y tipo de microorganismos presentes (Broadbent *et al.*, 2012).

Debido a que los microorganismos patógenos que se encuentran en la leche pueden prevalecer en el queso, ésta se somete a tratamiento térmico a fin reducir su carga microbiana, lo que previene el crecimiento de microorganismos patógenos y contaminantes (Quigley *et al.*, 2013). Sin embargo, la pasteurización también desnaturaliza algunas enzimas (proteasas, lipasas) y reduce drásticamente los microorganismos benéficos que están presentes de manera natural en la leche, los cuales juegan un papel muy importante en el desarrollo de las características distintivas de los quesos artesanales (Montel *et al.*, 2014; Grappin y Beuvier, 1997). Como resultado, en los quesos elaborados con leche tratada térmicamente se ve un moderado desarrollo de los aromas, sabores, texturas y colores característicos del queso (Licitra, 2010).

El implemento de la pasteurización y la producción a gran escala, ha llevado a una pérdida de la biodiversidad característica de los alimentos tradicionales, por lo que es necesario estudiar la microbiota natural en los productos elaborados a pequeña escala, a fin de evitar la desaparición de algunos microorganismos con características metabólicas interesantes, como parte de la microbiota presente en alimentos fermentados (Baruzzi *et al.*, 2000). Algunas de estas especies microbianas que se encuentran de manera natural en los quesos tradicionales pueden ser empleadas para elaborar dichos alimentos a gran escala (Martín-Platero *et al.*, 2009).

## **2.5 Técnicas independientes de cultivo para el estudio de los microorganismos del queso.**

Las diversas poblaciones microbianas que se encuentran en el queso incluyen especies de mohos, levaduras y bacterias. Con el fin de estudiar las comunidades microbianas, se han empleado las técnicas dependientes de cultivo, pero debido a que no todos los microorganismos son capaces de crecer en los medios de cultivo empleados, es imposible conocer la totalidad de los miembros de la comunidad. Estas técnicas además requieren tiempo, lo que es un inconveniente cuando se requiere conocer la distribución espacial y

temporal de las poblaciones microbianas. Por ello, se emplean las técnicas independientes de cultivo, que permiten estimar el tipo de microorganismos y su abundancia en una población microbiana, sin la necesidad de aislar a cada uno de los microorganismos por separado (Giraffa, 2004).

Debido a que del 25 al 50% de los microorganismos predominantes en los alimentos fermentados están activos pero no pueden ser cultivados *in vitro*, el estudio de una comunidad microbiana puede llevarse a cabo mediante el análisis del material genético de dicha comunidad, es decir, mediante el estudio del microbioma. Sin embargo, el estudio de la totalidad del ADN de todos los microorganismos que forman la comunidad (microbioma) generaría una gran cantidad de datos, por lo que pueden emplearse ciertos genes específicos como marcadores de la diversidad microbiana. Uno de los genes más empleados debido a su presencia universal, es el *16S rARN*, y debido a que posee regiones altamente conservadas entre organismos, permite discriminar entre ellos mediante la técnica de PCR; el empleo de iniciadores universales genera una mezcla muy variada de amplicones que pueden ser analizados mediante técnicas como el DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, o Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante) (Justé *et al.*, 2008).

El DGGE permite la separación de la mezcla de amplicones obtenida mediante PCR. Esta técnica se basa en que los fragmentos del mismo tamaño (200-500 pb) pero de diferente secuencia de pares de bases migran a diferente velocidad en un gel de poliacrilamida que contiene un gradiente creciente desnaturalizante de ADN (compuesto por una mezcla de urea y formamida), bajo una temperatura constante (entre 50 y 65°C). El empleo de un broche de Guanina-Citosina (aprox. 50 pb) en uno de los dos iniciadores impide que la doble cadena de ADN se desnaturalice por completo cuando el amplicón se mueve a través del gel, evitando la formación de dos cadenas (y por tanto de dos bandas), que se interpretarían como dos microorganismos diferentes (Muyzer y Smalla, 1998). El número de bandas en el perfil de DGGE en cada muestra, se considera un indicador de la diversidad de las comunidades microbianas (Giannino, *et al.*, 2009).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Desde sus orígenes, el queso Chihuahua se ha elaborado mediante un proceso artesanal, empleando leche cruda. La reciente implementación de la pasteurización de la leche utilizada en su manufactura, ha contribuido a mejorar su calidad microbiológica aunque se han detectado diferencias sensoriales entre el producto de leche cruda y el de pasteurizada. Debido a que existe evidencia de la influencia de los microorganismos en el desarrollo de las características sensoriales de los quesos artesanales, es importante caracterizar el producto de leche cruda a fin de obtener información que permita la posterior identificación de los microorganismos responsables de las propiedades distintivas de este queso y su aplicación en el proceso de elaboración que emplea leche pasteurizada.

#### **4. HIPÓTESIS**

La diversidad del microbioma de bacterias lácticas del queso Chihuahua elaborado artesanalmente con leche cruda, varía durante el proceso de elaboración y está influenciada por la estación del año en que se produce el queso. Algunas de las especies de bacterias lácticas encontradas pueden poseer características metabólicas de importancia para su aplicación en la elaboración de queso Chihuahua con leche pasteurizada.

## 5. OBJETIVOS

### **General.**

Identificar y caracterizar las bacterias lácticas iniciadoras y no iniciadoras en las diferentes etapas del proceso artesanal para la elaboración de queso Chihuahua con leche no pasteurizada.

### **Específicos.**

- Caracterizar los microorganismos presentes en la elaboración y maduración del queso Chihuahua, mediante técnicas de ecología microbiana independientes de cultivo.
- Aislar las bacterias lácticas iniciadoras en diferentes etapas del proceso de elaboración del queso Chihuahua.
- Aislar las bacterias lácticas no iniciadoras en muestras de queso Chihuahua con diferentes tiempos de maduración.
- Determinar las características metabólicas de importancia para la elaboración del queso, en cepas de bacterias lácticas aisladas durante la elaboración y maduración del queso Chihuahua de leche cruda.
- Conocer la dinámica poblacional del queso Chihuahua elaborado artesanalmente con leche cruda en diferentes estaciones del año, durante el proceso de elaboración y durante el periodo de maduración, utilizando cultivo y técnicas independientes de cultivo.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención de las muestras.

Se realizaron tres muestreos durante un año en cinco queserías (denominadas A-E) del Estado de Chihuahua, que elaboraban queso Chihuahua con leche cruda de vaca, artesanalmente, sin la adición de cultivos o aditivos químicos. Dos de los establecimientos eran operados por menonitas de dicho Estado (queserías B y C), mientras que las tres restantes (A, D y E) por personas no pertenecientes a dicho grupo.

Las visitas a las queserías fueron realizadas en los meses de octubre-noviembre, febrero y julio (2012-2013), con la colaboración de personal de la Comisión Estatal para la Prevención de Riesgos Sanitarios (COESPRIS) del Estado de Chihuahua. La toma de muestras se inició una vez que en el establecimiento se recolectó toda la leche de los proveedores locales en la tina de proceso, tomando cuatro diferentes tipos de muestra por duplicado. Antes de que se elevara la temperatura, se tomaron las dos porciones de leche (aprox. 500mL) con la ayuda de los utensilios empleados en cada quesería para la elaboración del queso y se colocaron en bolsas de plástico estériles (Nasco Whirl-Pack, U.S.A); de igual manera, se tomaron dos muestras de cuajada y dos de chedarizado.

Finalmente, los bloques de queso de aproximadamente 2kg fueron obtenidos después del tiempo de prensado y se conservaron en el empaque original de cada establecimiento: los productos del establecimiento A estaban empacados al vacío; los quesos de los establecimientos B y C, envueltos en manta y los quesos de los establecimientos D y E estaban envueltos en una película plástica. Todas las muestras fueron conservadas en hielo hasta su transporte al laboratorio, donde se tomaron dos porciones (aprox. 100g) de los bloques de los quesos recién elaborados y al igual que el resto de las muestras de leche, cuajada y chedarizado, una de las porciones fue destinada al análisis microbiológico, y se conservó en refrigeración (2-4°C), mientras que la otra se destinó para la extracción de metagenoma, siendo conservada a -20°C hasta su análisis (6 meses después de su obtención).

Para su maduración, los quesos fueron empacados al vacío y mantenidos en refrigeración a 6.5-7°C, tomando porciones para el análisis microbiológico y metagenómico una vez cada 30 días durante 180 días y también a los 270 días de añejamiento. En la Figura 2 puede apreciarse el esquema general de trabajo.



**Figura 2.** Esquema general de trabajo

## 6.2 Análisis microbiológico.

Se prepararon diluciones decimales de cada una de las muestras, empleando amortiguador de fosfatos (pH 7.2). Una porción de 10g o 10mL de ellas fue colocada en una bolsa de plástico estéril (Nasco Whirl-Pack, U.S.A), donde se agregaron 90 mL del amortiguador previamente esterilizado en una olla de presión para esterilización comercial (All American Model 1941X) a 121°C durante 15 min. Para obtener la primera dilución, se empleó un homogenizador peristáltico Modelo CC (Bag Mixer Interscience, Francia) a velocidad media durante 1min, y a partir de ella se prepararon las diluciones seriadas necesarias, que fueron procesadas por triplicado para la cuantificación de coliformes totales en placa, mohos y levaduras, mesófilos aerobios, *S. aureus* y *Salmonella* sp., de acuerdo a la metodología establecida en las normas oficiales mexicanas correspondientes. En la Tabla 1 se muestran los microorganismos determinados en cada tipo de muestra, así como la metodología empleada.

El grupo de BAL y *Enterococcus* sp., se determinaron en todas las muestras colocando 100µL de las diluciones preparadas en placas de agar MRS (Difco™) para las especies de lactobacilos y de agar Elliker (formulado en el laboratorio; Apéndice I) para las especies de lactococos y cocos termófilos. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 48h para la determinación de las especies mesófilas, mientras que para las termófilas, las condiciones

de incubación fueron a 42°C durante 48h. El estudio de los enterococos se realizó en placas de agar Kanamicina Esculina Azida (Caridi, 2003; Giannou *et al.*, 2009; Franciosi *et al.*, 2009), o Bilis Esculina (Difco™) incubadas a 37°C por 24h.

Para realizar el cálculo del número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo

**Tabla 1.** Microorganismos determinados de acuerdo al tipo de muestra obtenido durante la elaboración y maduración del queso Chihuahua de leche cruda.

Muestra	Microorganismos determinados	Referencia
*Leche	Coliformes totales	NOM-113-SSA1-1994
	Mesófilos aerobios	NOM-092-SSA1-1994
	<i>S. aureus</i>	NOM-115-SSA1-1994
	Mohos y levaduras	NOM-111-SSA1-1994
*Queso recién elaborado (tiempo 0)	<i>Lactococcus</i> sp.,	Caridi (2003)
	<i>Lactobacillus</i> sp. mesófilos y	Giannou <i>et al.</i> 2009
**Queso (30-270 días)	termófilos, cocos termófilos	Franciosi <i>et al.</i> 2009
	<i>Enterococcus</i> sp.	Giannou <i>et al.</i> 2009
	* <i>Salmonella</i> sp. (sólo en queso recién elaborado)	NOM-114-SSA1-1994
*Cuajada *Chedarizado	<i>Lactococcus</i> sp.,	Caridi (2003)
	<i>Lactobacillus</i> sp. mesófilos y termófilos, cocos termófilos	
	<i>Enterococcus</i> sp.	

\*Muestras obtenidas durante la elaboración del queso (una por cada quesería en cada temporada de muestreo)

\*\*Muestras tomadas durante la maduración de los quesos en el laboratorio.

o mililitro de muestra, se seleccionaron las placas en las que se observaron entre 25 y 250 colonias. Se obtuvo el promedio de las tres placas y se multiplicó por el inverso de la dilución para obtener las UFC/g o mL de coliformes totales, mohos y levaduras y mesófilos aerobios. En el caso de las BAL, *Enterococcus* sp. y *S. aureus*, el promedio de UFC se multiplicó por el inverso de la dilución y enseguida se multiplicó por 10 para obtener las UFC/g o mL, ya que el volumen inoculado en las placas fue de 0.1 mL.

### 6.3 Aislamiento de cepas de BAL y caracterización metabólica

Una vez que se registraron las UFC/ g o mL de BAL de cada una de las muestras (leche, cuajada, chedarizado, queso recién elaborado y queso madurado 30-270 días), a partir del

crecimiento obtenido en los agares MRS (Difco™) y Elliker, se seleccionaron colonias de BAL al azar y fueron transferidas a tubos con caldo MRS y/o Elliker e incubados a 25 o 42°C según correspondiera. Posteriormente se agregó la cantidad de glicerol (FagaLab®, México) estéril (121°C, 15min) preparado al 80% que fuese necesaria para lograr una concentración final del 40%; la mezcla fue transferida a tubos de plástico de 1.7 mL (Corning, U.S.A) estériles y conservados a -20°C hasta su análisis (24 meses después de su aislamiento).

Para la caracterización metabólica, se tomaron 100 µL de los cultivos de BAL conservados a -20°C y se transfirieron a un tubo con 5 mL de caldo MRS que fue incubado a la temperatura a la cual fue aislado el microorganismo (25 o 42°C). Después, se inocularon placas de agar MRS, que se incubaron a las temperaturas señaladas, con el fin de obtener el cultivo puro de la cepa y realizar tinción de Gram y prueba de catalasa.

### **6.3.1 Metabolismo del citrato y proteólisis.**

El metabolismo del citrato se realizó de acuerdo a la metodología de Kempler y McKay (1980). Para ello, se preparó un medio de cultivo agregando en un matraz Erlen-Meyer 10g de leche en polvo (Svelty, Nestlé, México), 2.5g de peptona de caseína (BD Bioxon, México), 50 g de dextrosa, 15 g de agar bacteriológico y 1000 mL de agua destilada. El medio se clarificó y se ajustó el pH a 6.9 antes de esterilizarse en autoclave a 121°C durante 15 min. Por otro lado, se prepararon 40 mL de una solución acuosa de ferrocianuro de potasio colocando 4 g de ferrocianuro de potasio (Productos Químicos Monterrey, México), 1 g de citrato férrico (SIGMA, U.S.A) y 1 g de citrato de sodio (J.T. Baker, México). La solución fue tratada térmicamente en baño maría (VWR Scientific, Mod. 1203, U.S.A) a 96°C durante 30 min. Una vez que se esterilizó y se enfrió el agar (≈45°C), se agregaron 10 mL de la solución de ferrocianuro, se mezcló y vació en cajas Petri estériles de 90 mm (BD, México), que una vez solidificadas fueron almacenadas en refrigeración protegidas de la luz.

Para la determinación de proteólisis, se preparó una solución de leche en polvo descremada (Svelty, Nestlé, México) reconstituida al 20% en agua y se esterilizó a 115°C durante 8 minutos y se dejó enfriar. Posteriormente, se preparó y esterilizó agar MRS

(Difco™) y después de enfriarse hasta una temperatura aproximada a los 45-50°C, se le agregó la cantidad necesaria de la solución de leche en polvo para obtener una concentración final de 1.5%. Se agitó manualmente para homogenizar y posteriormente se llenaron cajas Petri estériles de 90 mm (BD, México); una vez solidificado el medio fue conservado en refrigeración hasta su uso. Ambos agares (citrato y MRS-leche) fueron inoculados con cada cepa de BAL por picadura empleando mondadientes estériles e incubados en carboxifilia a 25 o 42°C según correspondiera, durante 24h.

### **6.3.2 Producción de diacetilo, capacidad acidificante y producción de CO<sub>2</sub>**

La producción de diacetilo fue evaluada en tubos estériles con 5mL de leche UHT (LALA, Comercializadora de Lácteos y Derivados, S.A. de C. V., México) que fueron inoculados con 100 µL de un cultivo de 24h de la cepa en caldo MRS. Los tubos se incubaron durante 24h a 32°C en condiciones de carboxifilia; posteriormente, se agregaron 0.5mL de α-naftol (Sigma, U.S.A) (preparado al 1% en etanol 95%) y 0.5mL de KOH (FagaLab®, México) (preparado al 16% en agua destilada) sin agitar la mezcla del tubo, y se incubaron a 32°C durante 15-30 min. Aquellas cepas en las que se observara la presencia de un anillo rojo se tomaron como productoras de diacetilo.

Para evaluar la capacidad acidificante, se preparó un medio de cultivo líquido agregando 10 g de leche en polvo, 3 g de extracto de levadura, 2 de dextrosa y 1000mL de agua destilada; se repartieron 5 mL de este medio en tubos de vidrio con rosca que se esterilizaron (121°C, 15min) previo a su uso. Los medios se inocularon con 100µL de un cultivo de 24h de la cepa en caldo MRS (Difco™) e incubados según la temperatura requerida para el crecimiento de la cepa durante 24h. El crecimiento observado en dicho medio de cultivo fue considerado como pre-inóculo, por lo que de ellos se tomaron 100µL y se transfirieron a tubos con 30 mL de leche UHT (LALA, Comercializadora de Lácteos y Derivados, S.A. de C. V., México), que fueron incubados a la temperatura correspondiente durante 24h. Después de ese tiempo, se midió el pH empleando un potenciómetro modelo Orion Star Series (Thermo Scientific, Singapore).

Finalmente, la producción de CO<sub>2</sub> fue evaluada en tubos con caldo MRS (Difco™) y una campana de Durham en su interior, que fueron inoculados con 100µL de un cultivo

de 24h de la cepa en caldo MRS (Difco™), en incubados 24h a la temperatura de crecimiento de las cepas. Aquellos microorganismos donde se observó una burbuja de gas dentro de la campana de Durham fueron tomados como productores de CO<sub>2</sub>.

#### **6.4 Análisis de la diversidad microbiana mediante técnicas independientes de cultivo.**

La descripción de la ecología microbiana en las muestras obtenidas durante la elaboración y maduración del queso Chihuahua de leche cruda se realizó empleando técnicas independientes de cultivo.

##### **6.4.1 Extracción de ADN**

Se realizó la extracción de ADN a las muestras recolectadas durante la elaboración y maduración del queso Chihuahua, que fueron conservadas a -20°C, de acuerdo a la metodología empleada por Cullen y Hirsch (1998). Para ello, se colocaron 0.5 g o mL de las muestras en un tubo para microcentrífuga de 1.7 mL (Corning, U.S.A), y se agregaron 500 µL de amortiguador de fosfatos 240 mM y 100 µL de SDS preparado al 10% (Sigma-Aldrich, China). Posteriormente, fueron colocados en un agitador vórtex modelo M37615 (Thermo Scientific, China) en lapsos de 1min durante 15 min y centrifugados (Velab, U.S.A) a 6464 rpm durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y estéril, y se agregó EDTA 500mM (J.T. Baker, México) en proporción 1:5 con el volumen recuperado, así como acetato de potasio 5M (FagaLab<sup>®</sup>, México) en proporción 1:10 con dicha fracción. Inmediatamente después, los tubos se colocaron en baño de hielo durante 20 min y posteriormente se centrifugaron a 6464 rpm durante 5 min. De nuevo, se transfirió la fase superior a un tubo limpio y estéril y se le realizó un lavado con 200 µL de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (preparado en proporción 25:24:1) (todos de J.T. Baker, U.S.A), dejando reposar a temperatura ambiente durante 10 min antes de centrifugar a 4886 rpm, 5 min. El sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo limpio y estéril, agregando 200µL de cloroformo-alcohol isoamílico (preparado en proporción 24:1) (J.T. Baker, U.S.A) e incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos previo a la centrifugación (4886 rpm, 5 min). La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio y se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (J.T. Baker, U.S.A),

dejando reposar durante toda la noche en un congelador vertical a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Norlake Scientific, U.S.A). Después de ese tiempo, los tubos fueron centrifugados para eliminar el etanol (6464rpm, 5min); el precipitado se lavó con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, que fueron eliminados mediante centrifugación (6464rpm, 5min). Los restos de etanol se eliminaron por evaporación, dejando los tubos cerca del mechero en forma inclinada, cuidando de no eliminar la pastilla, que fue disuelta en 400 $\mu\text{L}$  de agua inyectable (Laboratorios Pisa S.A de C.V., México).

#### **6.4.1.1 Electroforesis en gel de agarosa**

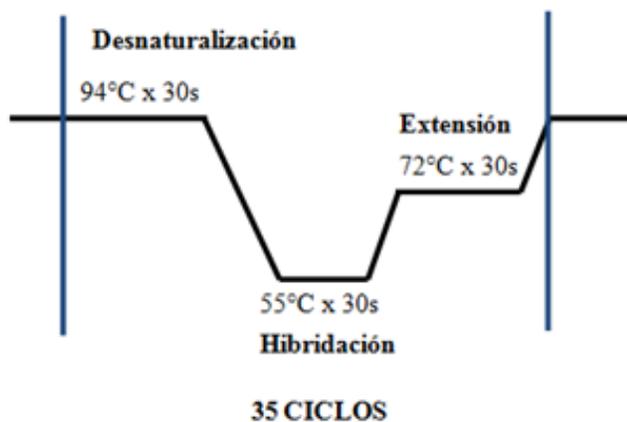
Para confirmar la extracción de ADN, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% (Promega, Madison, U.S.A), empleando una cámara de electroforesis Mini-Sub Cell GT Basic System (Biorad). Previo a la electroforesis se preparó la solución concentrada del amortiguador de corrida (TAE 50X), mezclando 242 g Trizma base(Sigma, U.S.A), 57.1mL ácido acético glacial (Golden Bell Reactivos, México), 100mL de EDTA(J.T. Baker, México) 0.5 M pH 8 y agua destilada en un vaso de precipitado de 500mL. Una vez que todos los componentes estuvieron disueltos, la mezcla se transfirió a un matraz aforado de 1L y se completó el volumen con agua destilada. A partir de esta solución, se preparó el amortiguador de corrida TAE 0.5X necesario para realizar la electroforesis.

Para la preparación del gel se pesaron 0.3 g de agarosa (Promega, U.S.A) y se disolvieron en 30 mL del amortiguador TAE 0.5 X mediante calentamiento en un horno de microondas (L.G mod. MS-0745VS, U.S.A). La mezcla se vertió en el portagel al que previamente se le habían colocado ambos peines y se dejó solidificar. Posteriormente, el portagel fue colocado dentro de la cámara de electroforesis, a la cual se le vertieron entre 200 y 300 mL de TAE 0.5X, y con cuidado se retiraron los peines. Para colocar las muestras en los pocillos del gel, se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  de ellas con 3  $\mu\text{L}$  del amortiguador de carga naranja G (migración 50 pb) (Sigma, U.S.A), sobre un tozo de papel parafilm (Parafilm, U.S.A). Para evaluar la integridad y tamaño del ADN extraído, se empleó el marcador de peso molecular  $\lambda\text{Hind III}$  (Promega, U.S.A) en proporción 1:1 con el amortiguador de carga. La electroforesis se realizó empleando una fuente de poder Power Pac Basic (Biorad) a 60V durante 45-60 min; los geles fueron teñidos durante 10-15 min

en una solución al 0.01% de bromuro de etidio (Sigma, U.S.A) en TAE 0.5X antes de ser observados en luz UV en un transiluminador (Benchtop UV, mod. M-26x, U.S.A).

#### 6.4.2 Amplificación de la región V3 del gen *16S rARN*

Para la amplificación de la región V3 del gen *16S rARN*, se utilizó un volumen de reacción de 50  $\mu$ L cuya composición fue la siguiente: 1X de Amortiguador 10X (Invitrogen, Brazil), 2 mM de  $MgCl_2$  50 mM (Invitrogen, Brazil), 0.4 mM de cada dNTP 10 mM (Promega, U.S.A), 0.4  $\mu$ M de cada uno de los iniciadores 3R(5'-TAC GGG AGG CAG CAG -3) y 3F-GC (5'- GCG CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG -3') (ambos iniciadores de IDT, U.S.A), 0.15 U de taq polimerasa (5U/ $\mu$ L) (Invitrogen, Brazil) y la cantidad necesaria de agua inyectable (Laboratorios Pisa S.A de C.V., México) para completar el volumen. Todos los reactivos así como las muestras se mantuvieron en hielo durante la preparación de la mezcla para PCR. Los microtubos (Pack, China) con las mezclas de reacción fueron colocados en un termociclador punto final modelo T100 (Biorad), cuyas condiciones de operación se muestran en la Figura 3.



**Figura 3.** Condiciones de operación para realizar la amplificación de la región V3 del gen *16S rARN*

La amplificación del ADN fue confirmada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, colocando en los pocillos 3 $\mu$ L de las muestras y 3 $\mu$ L de naranja G como amortiguador de carga. Para verificar el tamaño de los fragmentos amplificados se empleó 1 $\mu$ L del marcador de peso molecular 100 pb (Promega, Madison, U.S.A). La electroforesis

se realizó a 60 V durante 60 min, y posteriormente los geles fueron teñidos durante 10-15 min en una solución al 0.01% de bromuro de etidio en TAE 0.5X antes de ser observados en luz UV mediante un transiluminador (Benchtop UV, mod. M-26x, U.S.A) para confirmar la presencia de bandas de aproximadamente 300pb en el gel.

Además, se determinó la concentración del ADN de los amplificadores empleando un biofotómetro (Eppendorf, Alemania). Se prepararon diluciones de las muestras con agua inyectable y se obtuvo el valor de la absorbancia a 260nm; el blanco consistió en agua inyectable. La concentración de ADN fue obtenida mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Conc. ADN} = A_{260} * 50 * \text{Inverso de la dilución}$$

### **6.4.3 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante**

#### **(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)**

Esta técnica se realizó a fin de separar la mezcla de fragmentos de 300 pb de los amplificadores del ADN metagenómico, y obtener el patrón de bandas de cada una de las muestras. Se preparó una solución con un gradiente desnaturalizante de urea y formamida del 100% (equivale a 7.37M urea y 40% de formamida), cuya composición se muestra en la Tabla 2. Esta solución se filtró al vacío empleando un filtro de tamaño de poro de 0.22µm (S-Pak® Membrane Filters, Milipore, Francia), almacenada en frascos de vidrio color ámbar y conservada en refrigeración; posteriormente, a partir de esta se prepararon soluciones acuosas al 30 y 70%, que fueron almacenadas bajo las mismas condiciones que la de 100%.

Antes de emplear el sistema de DGGE (DCode™ System, Biorad, U.S.A), se lavó el juego de vidrios con agua y jabón, dando un enjuague final con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente; posteriormente se limpiaron con una solución al 70% de etanol. Se siguieron las instrucciones del fabricante para colocar los vidrios en el soporte de polimerización. Para la preparación de los geles, se tomaron dos tubos de 50 mL que se etiquetaron como A y B; en el primero se colocaron 20 mL de la solución de mayor gradiente (70%), mientras que en el segundo, se agregaron 20 mL de la solución de menor gradiente (30%). A ambos tubos se les agregaron 90 µL de una solución acuosa al 20% de persulfato de amonio (Sigma-Aldrich, U.S.A) recién preparada y 9 µL de TEMED

(N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) (Sigma-Aldrich, U.S.A) y se agitaron moderadamente. De cada tubo, se tomaron 17 mL mediante jeringas de 30mL (Terumo Corporation, Japón), tratando de eliminar las burbujas formadas en el interior de las mismas, para evitar la introducción de aire en el gel. Las jeringas se adaptaron en el sistema formador de gradiente del equipo para vaciar la mezcla de las soluciones en el espacio existente entre el par de vidrios; una vez vaciada la mezcla, se colocó el peine para la formación de los pocillos y se esperó entre 30 y 60 min para la polimerización de los geles. Después de ese tiempo se retiró el peine y los pocillos se lavaron con TAE 0.5X para eliminar los restos de acrilamida no polimerizada. El sistema de vidrios fue colocado en el core del equipo y posteriormente en cada pozo se colocaron 20µL de la mezcla del producto de PCR ajustado a una concentración de 200 ng/µL de ADN con el amortiguador de carga naranja G en proporción 1:1 (es decir, 10 µL del amplificado ajustado y 10 µL de naranja G). Posteriormente, el core fue introducido en el tanque de electroforesis, que previamente fue llenado con 7-8 L de amortiguador TAE 0.5X; se tuvo precaución de agregar un exceso del amortiguador en la parte superior del core, para asegurar el flujo de la corriente a través del alambre de platino de dicho accesorio y se colocó el módulo de control de temperatura. Una vez que el equipo alcanzó la temperatura de 60 °C, la electroforesis se llevó a cabo a 200 V durante 20 min y posteriormente a 60 V durante 16 h, empleando una fuente de poder Power Station 300 (Labnet, U.S.A).

**Tabla 2.** Composición de la solución de urea y formamida del 100% para preparar los geles de DGGE

Componente	Cantidad
Urea (J.T. Baker)	22.16g
Acilamida/Bis-acilamida (30%/0.8%) (J.T.Baker, U.S.A/Promega, U.S.A)	26.65mL
TAE 50X	1mL
N,N-Dimetilformamida (FagaLab®, México)	20mL

Una vez finalizada la electroforesis, se apagó el equipo y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 2-3h; posteriormente el core fue retirado del tanque de electroforesis y se desprendió el sistema de vidrios. Con cuidado, se retiraron las pinzas y se separaron

ambos vidrios empleando suficiente agua destilada para evitar la ruptura del gel. Con la ayuda de una transparencia de acetato, los geles fueron separados del vidrio al que se adhirieron y se transfirieron a un recipiente que contenía bromuro de etidio al 0.01%, donde permanecieron durante 20-30 minutos, para ser observados posteriormente con luz UV en un transiluminador (Benchtop UV, mod. M-26x, U.S.A).

### **6.5 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de UFC/g o UFC/mL determinados para cada microorganismo en las muestras de la elaboración y maduración del queso, se expresaron como  $\log_{10}$  UFC/g o  $\log_{10}$ UFC/mL. Dichos resultados fueron sometidos a un análisis de varianza, tomando como variables independientes la estación del año y la quesería, en el caso de los datos correspondientes al proceso de elaboración. Se realizó un análisis de medias mediante la Prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%. Para el análisis de los datos obtenidos durante la maduración del queso se realizó un análisis de varianza mediante un diseño de mediciones repetidas usando como co-variable el tiempo de maduración. El análisis de medias se realizó mediante la Prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%. Todos los análisis se efectuaron utilizando el paquete estadístico Minitab 17 (Minitab, 2010).

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se realizaron tres visitas durante un año a cinco queserías ubicadas en el Estado de Chihuahua, en la cuales se obtuvieron y analizaron un total de 164 muestras. La Tabla 3 detalla la clasificación de las muestras de acuerdo al punto de muestreo en que fueron obtenidas.

**Tabla 3.** Cantidad y tipo de muestras obtenidas durante la elaboración y maduración del queso Chihuahua de leche cruda durante tres estaciones del año.

Lugar de obtención	Muestra	Cantidad
Durante la elaboración del queso cada quesería	Leche	14
	Cuajada	15
	Chedarizado	15
	Queso	15
Tomadas durante la maduración del queso en el laboratorio	Queso (30-270 días)	105
Total		164

## 7.1 Análisis microbiológico de las muestras obtenidas durante la elaboración del queso Chihuahua.

### 7.1.1 Dinámica de microorganismos indicadores.

En los alimentos fermentados como el queso, los microorganismos juegan un importante papel en el desarrollo de sus propiedades sensoriales (Hymery *et al.*, 2014). Sin embargo, las condiciones ambientales que rigen la diversidad y dinámica de los microorganismos, cambian durante las diferentes etapas que involucra el proceso de elaboración del queso (De Pasquale *et al.*, 2014). Dichas variaciones son particularmente importantes en los productos artesanales, por lo que previo al establecimiento de una denominación de origen de los productos, se requiere realizar una descripción de la evolución microbiana a través de los procesos de elaboración y maduración de los mismos (Carraro *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se caracterizó la dinámica microbiana durante el proceso de elaboración del queso Chihuahua. Uno de los puntos de interés fue evaluar la dinámica de microorganismos indicadores antes de iniciar el proceso (en la leche cruda) y al término del mismo (en el queso recién elaborado o denominado queso 0). El análisis estadístico de los datos mostró (ver Apéndice II) que la quesería no tuvo efecto significativo ( $P > 0.05$ ) en las cuentas de ninguno de los microorganismos indicadores.

Los niveles de coliformes totales y mesófilos aerobios tampoco estuvieron influenciados por la época de muestreo ni el tipo de muestra ( $P > 0.05$ ), aunque los niveles más elevados se observaron en el verano, notando además que las cuentas de los

microorganismos se incrementaron en las muestras de queso, como puede observarse en la Tabla 4. A pesar de que estadísticamente no son diferentes ( $P > 0.05$ ), se observó que los niveles en queso fueron mayor que los encontrados en la leche cruda; esto puede ser atribuido principalmente al efecto de retención física de dichos microorganismos durante la formación de la cuajada (Tornadijo *et al.*, 1993), así como a las condiciones favorables de pH y temperatura durante la elaboración del queso, lo que favorece el desarrollo de organismos mesófilos (Volken de Souza *et al.*, 2003).

La presencia de estos microorganismos en el queso se relaciona con el uso de leche cruda para su elaboración (Piras *et al.*, 2013; Volken de Souza *et al.*, 2003). A pesar de que la leche en la ubre es estéril, los microorganismos que se observan en ella pueden llegar a través del sistema de ordeña (manual o mecánica), el ambiente (aire, suelo, agua) los contenedores o recipientes, entre otros; por ello, la composición microbiana puede variar de una granja a otra, dependiendo de las fuentes contaminantes de la leche (Quigley *et al.*, 2013). Las malas prácticas de manufactura y un deficiente sistema de desinfección e higiene en los establecimientos, favorecen la prevalencia de microorganismos indicadores en el queso (Ordiales *et al.*, 2013; Piras *et al.*, 2013). Es probable que estos microorganismos participen en la generación del sabor característico de los quesos elaborados con leche cruda (Ordiales *et al.*, 2013; Wilkinson y Kilcawley, 2005), aunque también se reconoce que organismos como los coliformes son los responsables de sabores desagradables y pequeños agujeros en el queso, como resultado de la producción de gas a partir de la fermentación de la lactosa (Sheehan, 2013).

No obstante que no existieron diferencias entre las queserías, las cuentas más altas de coliformes en leche se encontraron en la muestra tomada en la quesería D durante el otoño (8.25 log<sub>10</sub> UFC/mL), mientras que los niveles más bajos se observaron en leche de la misma quesería durante el invierno (4.22 log<sub>10</sub> UFC/mL). En queso, las cuentas más grandes se encontraron en el producto elaborado en la quesería B durante el verano (7.58 log<sub>10</sub> UFC/g), mientras que el queso con menor cantidad de dichos microorganismos fue el elaborado en la quesería C durante el otoño (5.21 log<sub>10</sub> UFC/g). Todas las muestras

**Tabla 4.** Resultados del análisis microbiológico de las muestras tomadas durante la elaboración del queso Chihuahua de leche cruda.

Microorganismos	Temporada de muestreo/tipo de muestra* (log <sub>10</sub> UFC/ g o mL)					
	Otoño		Invierno		Verano	
	Leche	Queso	Leche	Queso	Leche	Queso
<b>Coliformes totales<sup>▲</sup></b>	6.30±1.22	5.95±0.68	5.58±1.09	6.42±0.46	6.32±0.65	6.87±0.56
<b>Mesófilos<sup>▲</sup></b>	7.38±0.83	7.62±0.73	7.06±1.05	7.66±0.45	7.58±0.70	8.10±0.48
<b>Mohos<sup>**</sup></b>	3.40±0.58	4.41±1.18	2.63±0.23	2.43±0.51	3.00±0.43	4.07±1.16
<b>Levaduras<sup>**</sup></b>	5.51±0.45	5.68±0.82	3.90±0.67	4.36±0.48	3.73±0.67	5.51±0.48
<b><i>S. aureus</i><sup>◇</sup></b>	5.22±0.80	5.13±1.5	4.65±0.64	4.92±0.58	5.96±0.85	6.14±0.35

\*Los datos se expresan como la media ± desviación estándar calculada a partir de los datos obtenidos de las cinco queserías en cada una de las temporadas de muestreo.

▲ No se observó diferencia significativa entre tipo de muestra y temporada de muestreo (P>0.05).

\*\* Se observó diferencia significativa (P<0.05) entre el tipo de muestra y la temporada de muestreo.

◇ Solo existió diferencia significativa entre temporadas de muestreo (P<0.05).

analizadas de leche y queso mostraron niveles de coliformes totales muy superiores a aquellos establecidos en la normatividad mexicana vigente, en la que se establece que en leche estos deben estar presentes en cantidades menores o iguales a 1 log<sub>10</sub> UFC/mL, mientras que en queso no deben sobrepasar 2 log<sub>10</sub> UFC/g (DOF, 2012).

Por su parte, los microorganismos mesófilos se mantuvieron prácticamente constantes durante el proceso de elaboración, ya que como se mencionó anteriormente, no se observó diferencia entre la leche y el queso. Si bien el crecimiento de bacterias fermentadoras limita el crecimiento de algunos microorganismos patógenos, es probable que tanto coliformes como mesófilos aerobios hayan permanecido en el queso debido a que la concentración microbiana que se presenta durante la formación del gel o cuajada (Verraes *et al.*, 2015).

En el caso de los mohos y levaduras, se observó que tanto la estación del año como el tipo de muestra tuvieron un efecto significativo (P<0.05), notando los niveles más

elevados en las muestras obtenidas durante el otoño, y al igual que los coliformes y mesófilos, en las muestras de queso se observó un incremento en sus niveles al compararse con las muestras de leche. Al igual que los coliformes totales, los niveles de mohos y levaduras determinados en queso fueron superiores a los señalados en la normatividad mexicana vigente, ya que el límite permisible es de  $2.7 \log_{10}$  UFC/g (DOF, 2012). La presencia de estos microorganismos en la leche cruda está influenciada por factores como el clima y la alimentación. Debido a la producción de enzimas que pueden ayudar a generar aromas y mejora la textura del queso (Quigley *et al.*, 2013), algunas especies en particular pueden ser agregados de manera intencional al proceso de elaboración de algunos tipos de queso. Sin embargo, debido a la elaboración artesanal del queso Chihuahua, la presencia de estos microorganismos puede ser debido a la contaminación del ambiente donde se elaboraba el queso (Hymery *et al.*, 2014; Sheehan, 2013; Ferreira *et al.*, 2003), aunque, en el caso de las levaduras, su presencia puede ser debida a la colonización de las superficies y equipos de trabajo, ya que algunas son resistentes a los sanitizantes comerciales (Sheehan, 2013).

Como ya se mencionó, no se observaron diferencias en las cuentas de los microorganismos indicadores entre queserías; pero en la determinación de mohos, se observó que el queso de invierno de la quesería E tuvo las cifras más pequeñas ( $1.56 \log_{10}$  UFC/g), mientras que el queso C de otoño fue la más contaminada ( $5.89 \log_{10}$  UFC/g). De levaduras, la muestra de leche recolectada durante el verano en la quesería C tuvo las cuentas más pequeñas ( $3.02 \log_{10}$  UFC/mL), mientras que en el queso de otoño elaborado en dicha quesería se observaron los niveles más elevados ( $6.67 \log_{10}$  UFC/g.).

Uno de los microorganismos que se encuentran comúnmente en leche no pasteurizada y que es importante debido a la producción de enterotoxinas es *S. aureus*. Este microorganismo causa infecciones en la glándula mamaria (O'Brien *et al.*, 2009) y llega a la leche a través de las herramientas empleadas para la ordeña, ya sea manual o mecánica (Quigley *et al.*, 2013). El análisis de los datos obtenidos durante la elaboración del queso Chihuahua permitió advertir que sólo la temporada del año afectó significativamente ( $P < 0.05$ ) las cuentas de dicho microorganismo, las cuales fueron mayores en las muestras procesadas durante el verano. Algunas cepas producen una enterotoxina termoestable (Quigley *et al.*, 2013), que se acumula en condiciones que pueden afectar al ser humano,

cuando la carga microbiana es mayor a 5 log<sub>10</sub> CFU (O'Brien *et al.*, 2009). En la Tabla 5 puede observarse que solo las muestras recolectadas en la quesería A permanecen por debajo de dicho valor, mientras que las muestras de leche y queso provenientes de los establecimientos B, C y E sobrepasan dicha cifra, al igual que los quesos elaborados en la quesería D. Los niveles más altos de *S. aureus* en leche se observaron en la muestra colectada en verano en la quesería B (6.77 log<sub>10</sub> UFC/mL), mientras que la leche con menores cuentas fue aquella obtenida durante el invierno en la quesería D (3.84 log<sub>10</sub>

**Tabla 5.** Resultados del análisis microbiológico de las muestras de leche y queso de cada una de las queserías

Quesería	Microorganismos*				
	Coliformes totales	Mesófilos	<i>S. aureus</i>	Mohos	Levaduras
<i>Quesería A</i>	Log <sub>10</sub> UFC/g o mL				
Leche	5.56±0.875	7.01±0.87	4.75±0.848	3.41±0.578 <sup>b</sup>	4.39±0.682 <sup>b</sup>
Queso	6.47±0.650	7.56±0.76	3.71±2.625	3.47±0.984 <sup>a</sup>	5.27±0.491 <sup>a</sup>
<i>Quesería B</i>					
Leche	6.45±0.453	7.58±0.48	5.66±0.959	3.11±0.566 <sup>b</sup>	3.99±1.172 <sup>b</sup>
Queso	6.67±1.031	7.96±0.97	5.10±1.159	4.02±1.098 <sup>a</sup>	5.66±0.583 <sup>a</sup>
<i>Quesería C</i>					
Leche	6.37±0.188	7.77±0.63	5.68±1.155	3.11±0.493 <sup>b</sup>	4.31±1.819 <sup>b</sup>
Queso	6.04±0.723	7.95±0.36	5.04±0.912	4.11±1.695 <sup>a</sup>	5.40±1.350 <sup>a</sup>
<i>Quesería D</i>					
Leche	5.90±2.096	6.67±1.18	4.77±1.025	3.00±0.669 <sup>b</sup>	4.34±1.079 <sup>b</sup>
Queso	6.42±0.75	7.60±0.64	5.81±1.222	4.20±1.626 <sup>a</sup>	4.75±0.905 <sup>a</sup>
<i>Quesería E</i>					
Leche	6.33±0.433	7.93±0.33	5.87±0.561	2.70±0.474 <sup>a</sup>	5.01±1.092 <sup>a</sup>
Queso	6.46±0.422	7.90±0.17	6.11±1.026	2.40±0.773 <sup>b</sup>	4.82±0.516 <sup>b</sup>

\*Los datos representan la media ± desviación estándar calculada a partir de los datos obtenidos en las muestras de leche y queso durante las tres temporadas de muestreo.

Letras diferentes implican diferencia significativa entre los dos tipos de muestra (P<0.05)

UFC/mL). De los quesos, durante la temporada otoñal se observaron tanto aquel con las cuentas más altas (queso E, 6.81 log<sub>10</sub> UFC/g) como el de los niveles más bajos (queso A, 3.73 log<sub>10</sub> UFC/g). Ninguna de las muestras cumplió con las especificaciones de la normatividad mexicana, que señala que *S. aureus* debe estar presente en niveles de hasta 2 log<sub>10</sub> UFC/g en queso y menor a 1 log<sub>10</sub> UFC/mL en leche (DOF, 2012).

### 7.1.2 Determinación de *Salmonella* sp. en queso

Debido a que es un microorganismo que puede crecer en diversas condiciones ambientales (tolerancia de concentraciones de sal de 0.4 a 4%, rango de temperatura de 5 a 47°C, pH de 4 a 9) (Puiet *al.*, 2011), este microorganismo es una de las principales causas de enfermedad alimenticia en los países industrializados (Mølbak, 2005). Es un bacilo Gram negativo causante de la fiebre tifoidea y gastroenteritis y el consumo de lácteos está incluido como una de las vías principales de transmisión (Puiet *al.*, 2011). Este microorganismo no fue detectado en las muestras de queso analizadas probablemente a causa de la producción de compuestos antimicrobianos por los microorganismos iniciadores (Leyer y Johnson, 1992), la competencia microbiana, presencia en bajos niveles (1-2 UFC/mL) en la leche cruda (Mata y Vanetti, 2012) y/o al sistema lactoperoxidasa que se encuentra de manera natural en la leche sin pasteurizar y que posee actividad antimicrobiana contra *S. enteritidis*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* (Licitra, 2010). La ausencia de este microorganismo en queso cumple con las especificaciones de la normatividad mexicana vigente (DOF, 2012).

### **7.1.3 Dinámica de BAL**

Durante la elaboración de los quesos artesanales, diversos factores como el tiempo y grado de acidificación, tiempo y rango de temperatura, la actividad antimicrobiana de la leche cruda (debida a enzimas como la lactoperoxidasa, lizosima, lactoferrina), competencia microbiana, producción de bacteriocinas u otros compuestos antimicrobianos, contenido de nutrientes, entre otros, juegan un papel muy importante en la diversidad microbiana y su actividad (Licitra, 2010). Los diversos géneros y especies microbianos de un queso artesanal, participan en el desarrollo de sus características sensoriales y de textura. Debido a que se encuentran de manera natural en la leche cruda y pueden ser añadidas durante el proceso de elaboración del queso, sobresale el grupo de las bacterias lácticas (Randazzo *et al.*, 2009), ya que participan en la acidificación inicial y en la generación de compuestos importantes para el sabor y aroma del queso (Alegría *et al.*, 2009).

El análisis estadístico (ver Apéndice I) reveló que los niveles de todos los grupos de bacterias lácticas estuvieron fuertemente influenciados por la temporada del año en la cual se elaboró el queso ( $P < 0.05$ ), encontrándolos niveles más elevados en las muestras del verano (Tabla 6).

**Tabla 6.** Determinación de BAL durante la elaboración del queso Chihuahua de leche cruda en tres estaciones del año.

Microorganismos	Otoño	Invierno	Verano
<i>Lactobacillus</i> sp. mesófilos	7.30 ± 0.66 <sup>b</sup>	7.67 ± 0.58 <sup>a,b</sup>	8.02 ± 0.67 <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus</i> sp. termófilos	6.88 ± 0.97 <sup>a,b</sup>	6.49 ± 0.66 <sup>b</sup>	7.25 ± 0.60 <sup>a</sup>
<i>Lactococcus</i> sp.	6.65 ± 0.87 <sup>b</sup>	6.37 ± 0.99 <sup>b</sup>	7.37 ± 0.44 <sup>a</sup>
Cocos termófilos	6.22 ± 0.76 <sup>b</sup>	5.49 ± 0.89 <sup>c</sup>	7.306 ± 0.57 <sup>a</sup>
<i>Enterococcus</i> sp.	6.07 ± 1.06 <sup>b</sup>	5.83 ± 0.25 <sup>b</sup>	6.85 ± 0.59 <sup>a</sup>

Los datos son expresados como el log<sub>10</sub> de la media UFC ± desviación estándar calculada a partir de los datos obtenidos en las muestras de leche, cuajada, chedarizado y queso recién elaborado en cada temporadas de muestreo.

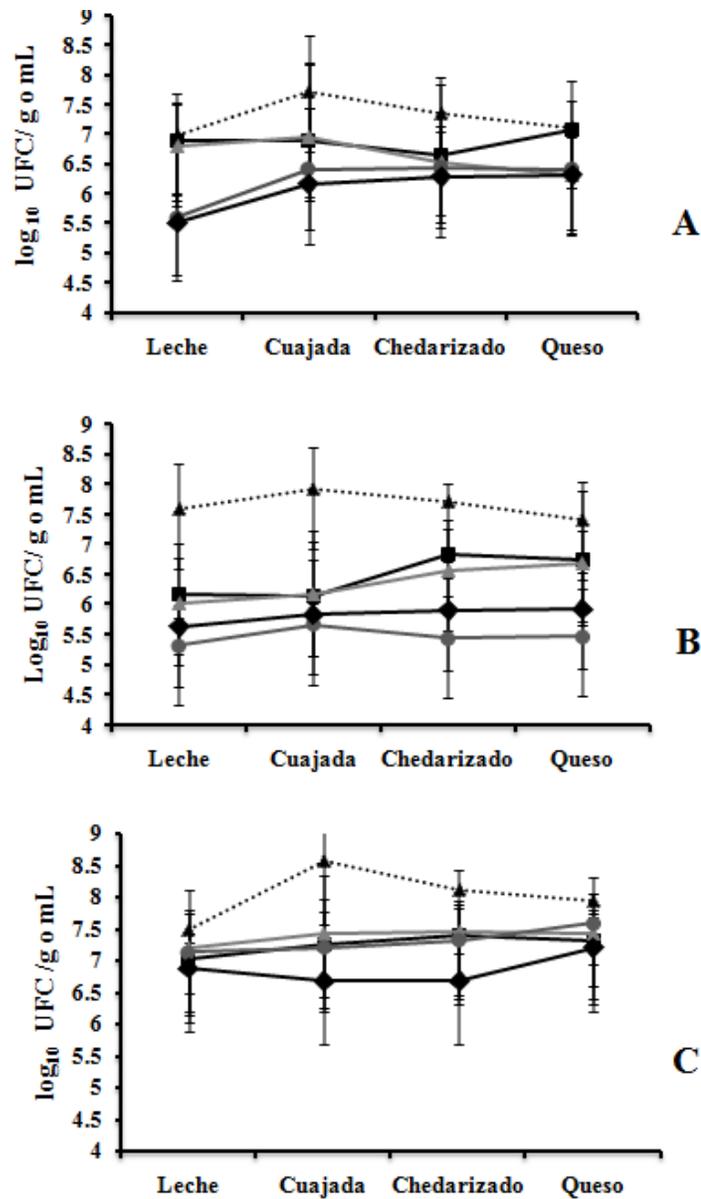
Letras diferentes implican diferencia significativa entre las tres estaciones del año (P<0.05)

Esto puede deberse a las variaciones en la composición química de la leche a través de las estaciones del año (Barron *et al.*, 2001); además, las condiciones de manufactura varían a través del tiempo, ya que se trata de un proceso de manufactura no estandarizado. La estacionalidad también es determinante para el ambiente particular de cada establecimiento, lo cual afecta de manera significativa la diversidad y dinámica microbiana de los quesos artesanales (Terzic-Vidojevic *et al.*, 2014).

La elaboración de queso incluye una serie de pasos que afectan los microorganismos y/o las condiciones del ambiente en el que crecen (De Pasquale *et al.*, 2014), por lo que pueden encontrarse diferentes comunidades microbianas en cada una de las etapas del proceso (Bokulich y Mills, 2013). Además se ha notado la existencia de microorganismos característicos de acuerdo a la región geográfica o establecimiento donde se elabora el queso (Golić *et al.*, 2013), o más aún, pueden observarse diferencias en la comunidad microbiana dentro de una misma quesería dependiendo de la temporada del año (Crow *et al.*, 2002). No obstante, en el presente trabajo el análisis estadístico de las cuentas de lactobacilos termófilos, *Lactococcus* sp., y cocos termófilos, permitió observar que el tipo de muestra y el establecimiento no ejercen un efecto significativo sobre ellas (P> 0.05). Una probable explicación para ello es la formación de biopelículas en los utensilios y superficies de las tinas de proceso, utensilios y/o contenedores de la leche cruda, ya que

se ha observado la persistencia de especies de *Lactobacillus* y *Streptococcus*, en los equipos que procesan productos lácteos incluso después de varias sesiones de limpieza (Simões *et al.*, 2010), aunque sería necesario realizar un análisis más detallado para comprobar la existencia de biopelículas en las superficies y utensilios que están en contacto directo con la leche durante la elaboración del queso. El contacto directo de las superficies con los microorganismos y nutrientes de la leche durante la elaboración del queso favorece la adsorción de los mismos, formando películas (Kumar y Anand, 1998) que transfieren continuamente los microorganismos de los utensilios al queso. La formación de biopelículas de algunos grupos de microorganismos previene la colonización de otros más perjudiciales (Bokulich y Mills, 2013) y además, los microorganismos que incorporan al proceso de elaboración, contribuyen en la generación del aroma a partir de aminoácidos libres, como algunas especies mesófilas de *Lactobacillus* (Giraffa, 2004).

Por el contrario, además de la influencia estacional, los niveles de lactobacilos mesófilos estuvieron afectados por el tipo de muestra ( $P < 0.05$ ). Como muestra la Figura 4, este grupo de microorganismos predominó durante la elaboración del queso, incrementando notablemente durante la etapa de formación de la cuajada, en la que se observaron cuentas de hasta  $10.02 \log_{10}$  UFC/g, en el caso de la muestra de verano procesada en la quesería A, seguida por la muestra otoñal de la quesería D ( $9.07 \log_{10}$  UFC/g) y la invernal de la quesería B ( $8.71 \log_{10}$  UFC/g). Otras muestras de cuajada con valores elevados fueron las obtenidas durante el verano en las queserías D y B ( $8.56$  y  $8.53 \log_{10}$  UFC/g, respectivamente). Esto puede deberse a la resistencia de los microorganismos al bajo pH que predomina durante la formación de la cuajada (Bokulich y Mills, 2013), etapa crucial que también ha sido identificada en otros tipos de quesos (Bokulich y Mills, 2013; Carraro *et al.*, 2011; Dolci *et al.*, 2010).



**Figura 4.** Dinámica de bacterias lácticas durante la elaboración del queso Chihuahua con leche cruda durante A, verano; B, invierno y C, verano.  
 ...▲ *Lactobacillus sp. mesófilos*    ■ *Lactobacillus sp. termófilos*    ▲ *Lactococcus sp.*  
 ● Cocos termófilos    ◆ *Enterococcus sp.*

La temperatura a la cual se lleva a cabo la transformación de la leche en cuajada favorece el crecimiento de este grupo de microorganismos, que posee especies reportadas como NSLAB o no iniciadoras, por lo que las condiciones que se presentan durante la preparación del queso determinan en cierta manera, los microorganismos que prevalecerán durante la maduración (Delbés *et al.*, 2007; Volken de Souza *et al.*, 2003).

La detección de microorganismos pertenecientes al género *Enterococcus* es común en quesos elaborados con leche cruda, aunque se ha visto que su presencia también puede ser dependiente de la estación del año en la que se elabora el queso (Martín-Platero *et al.*, 2008). Durante la elaboración del queso Chihuahua, la estación del año y la quesería ejercieron un efecto significativo ( $P < 0.05$ ) sobre los niveles de enterococos. Se identificó una mayor carga de estos microorganismos en las muestras de la quesería D, y menor en la quesería C, tal como puede observarse en la Tabla 7, donde también es posible ver que en las cuentas de los demás grupos de BAL, el efecto de la quesería no fue significativo. Como ya se mencionó anteriormente, la estacionalidad juega un papel importante en la diversidad microbiana de la leche y por lo tanto, del queso; además, la carga inicial y tipo de microorganismos de la leche cruda es muy importante, ya que junto con las prácticas de manufactura, marca las diferencias que existen entre los establecimientos (Montel *et al.*, 2014; Poznanski *et al.*, 2004).

**Tabla 7.** Determinación de BAL durante la elaboración del queso Chihuahua de leche cruda en cinco queserías artesanales.

Quesería	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Lactobacillus</i> sp. mesófilos	<i>Lactobacillus</i> sp. termófilos	<i>Lactococcus</i> sp.	Cocos termófilos
A	6.38 ± 0.60 <sup>ab</sup>	7.67 ± 0.85	6.94 ± 0.8	6.95 ± 0.63	6.52 ± 0.6
B	5.98 ± 0.82 <sup>ab</sup>	7.81 ± 0.6	6.88 ± 1.00	6.63 ± 0.78	6.27 ± 1.15
C	5.89 ± 1.06 <sup>c</sup>	7.34 ± 0.74	6.75 ± 0.60	6.62 ± 0.78	6.57 ± 0.77
D	6.65 ± 0.76 <sup>a</sup>	7.60 ± 0.81	6.86 ± 1.06	7.18 ± 0.93	6.40 ± 1.3
E	6.38 ± 0.77 <sup>ab</sup>	7.87 ± 0.40	6.95 ± 0.61	6.62 ± 1.21	6.02 ± 1.30

Los datos se expresan como el  $\log_{10}$  de la media de UFC ± desviación estándar calculada a partir de los datos obtenidos en las muestras de leche, cuajada, chedarizado y queso recién elaborado durante las tres temporadas de muestreo en cada quesería.

Letras diferentes implican diferencia significativa entre las queserías ( $P < 0.05$ )

Existe controversia sobre el papel que juegan las especies del género *Enterococcus* en el queso, pues al igual que a los coliformes totales, también se les considera indicadores de contaminación fecal y por lo tanto, de deficientes prácticas de higiene (Alegría *et al.*, 2009). Por otro lado, también se reconoce que gracias a su actividad proteolítica, lipolítica y la degradación de aminoácidos, dichos microorganismos contribuyen al desarrollo de

las características sensoriales de los quesos artesanales (Martín-Platero *et al.*, 2009; Duthoit *et al.*, 2005; Wilkinson y Kilcawley, 2005).

## **7.2 Análisis microbiológico del proceso de maduración del queso Chihuahua.**

Por ser un queso que se consume después de 2 a 4 semanas posteriores a su elaboración (Van Hekken *et al.*, 2008), los cambios microbiológicos que ocurren durante la maduración del queso Chihuahua no habían sido descritos en trabajos previos a este. El estudio de la biodiversidad del queso durante la maduración es importante, ya que es el resultado de la influencia tanto de la población microbiana de la leche como de los parámetros tecnológicos y ambientales durante su elaboración (Van Hoorde *et al.*, 2008).

### **7.2.1. Microorganismos indicadores**

Durante la maduración del queso, la población microbiana puede estar compuesta de una extensa variedad de bacterias, levaduras, bacteriófagos, dependiendo del tipo de leche (cruda o pasteurizada) empleada así como de la adición (en su caso) de los cultivos iniciadores, enzimas, salmueras y/o contaminación ambiental. El crecimiento, prevalencia y actividad metabólica de tales microorganismos se rige por diversos factores intrínsecos como el contenido de humedad, la concentración de sal y el pH, que varían a través del tiempo (Fleet, 1999). Debido al empleo de leche sin pasteurizar para su elaboración, se detectaron altos niveles de microorganismos indicadores durante la maduración del queso Chihuahua, especialmente en aquellos elaborados durante el verano. El análisis estadístico de los datos obtenidos (Apéndice III) mostró que la dinámica de estos microorganismos estuvo influenciada por la temporada de muestreo y el tiempo de maduración ( $P < 0.05$ ).

Las cuentas más elevadas de coliformes totales al inicio del añejamiento se observaron en las muestras de verano (media  $6.87 \log_{10}$  UFC/g), seguidas por las de invierno ( $5.95 \log_{10}$  UFC/g) y al final, las de otoño ( $5.95 \log$  UFC/g). La combinación de los efectos del tiempo de maduración, el establecimiento de producción de queso y la estación del año se detecta en la dinámica de tales microorganismos, tal como muestran la Tabla 8 y la Figura 5, que muestran que durante los tres muestreos la quesería E mostró los niveles menores de estos microorganismos, mientras que los quesos del local D mantuvieron las cuentas más elevadas. Después de 270 días, los quesos elaborados en

verano tuvieron la mayor contaminación por coliformes totales ( $1.82 \log_{10}$  UFC/g), seguidos de los de invierno ( $1.12 \log_{10}$  UFC/g) y los de otoño ( $0.77 \log_{10}$  UFC/g). En la Figura 5 puede observarse la dinámica de los coliformes durante la maduración en las diferentes estaciones del año en que se elaboró el queso, donde resalta la tendencia a disminuir a través del tiempo, misma que se ha observado en otros tipos de queso como el Cheddar (Shakeel-Ur-Rehman *et al.*, 2000), Canestrato Pugliese (De Pasquale *et al.*, 2014), Serra da Etrela (Dahl *et al.*, 2000), y Fiore Sardo (Piras *et al.*, 2013; Pisano *et al.*, 2006).

**Tabla 8.** Resultados del análisis microbiológico durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda elaborado en cinco queserías artesanales.

Microorganismos	Quesería				
	A	B	C	D	E
<b>Coliformes totales</b>	4.64 ± 1.88 <sup>ab</sup>	4.23 ± 2.51 <sup>b</sup>	3.98 ± 2.03 <sup>b</sup>	5.27 ± 1.88 <sup>a</sup>	2.55 ± 2.35 <sup>c</sup>
<b>Mohos</b>	2.21 ± 1.64 <sup>c</sup>	3.10 ± 1.58 <sup>bc</sup>	4.30 ± 1.19 <sup>a</sup>	2.78 ± 1.76 <sup>bc</sup>	3.36 ± 1.52 <sup>ab</sup>
<b>Levaduras</b>	5.04 ± 1.54	5.01 ± 1.06	5.42 ± 0.93	5.36 ± 1.21	5.50 ± 1.19
<b><i>S. aureus</i></b>	2.58 ± 2.37 <sup>b</sup>	2.62 ± 2.63 <sup>b</sup>	2.08 ± 2.41 <sup>b</sup>	2.63 ± 2.41 <sup>b</sup>	3.65 ± 2.31 <sup>a</sup>
<b>Mesófilos aerobios</b>	7.61 ± 0.82	8.12 ± 0.52	7.80 ± 0.71	7.91 ± 0.75	7.73 ± 0.65

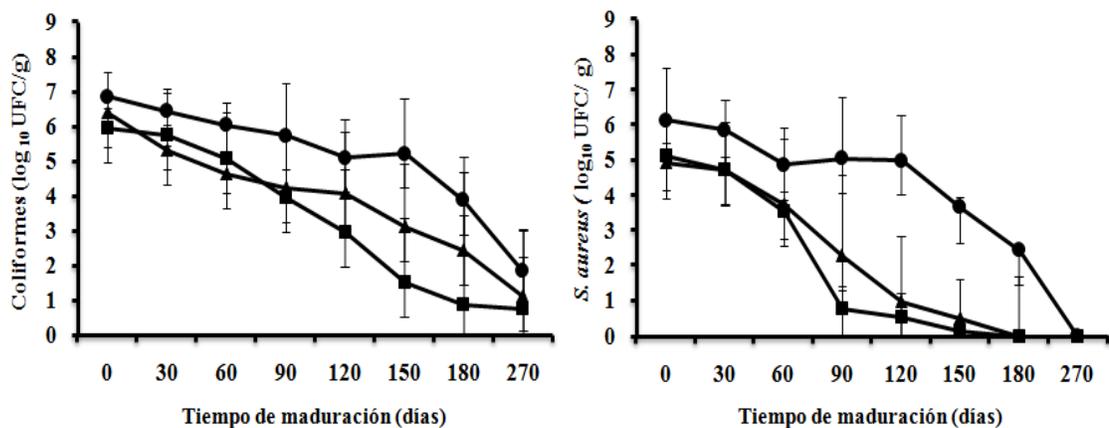
Los datos se expresan como el  $\log_{10}$  la media de UFC ± desviación estándar calculada a partir de los datos obtenidos en las muestras de tomadas durante la maduración de los quesos (30-270 días) elaborados en tres temporadas de muestreo.

Letras diferentes denotan efecto significativo de la quesería sobre las cuentas de los microorganismos (P<0.05)

Es probable que la disminución de pH, la producción de antimicrobianos, el incremento de la concentración de sal y la baja humedad que se presentan durante la maduración del queso (Piras *et al.*, 2013; Pisano *et al.*, 2006), fuesen los factores que determinaron la disminución de los coliformes en el queso durante el periodo de estudio.

De igual manera, en la Figura 5 puede apreciarse el comportamiento descendente de los niveles de *S. aureus* hasta que fue indetectable a partir de los 90 días. Al igual que los coliformes, las cuentas más elevadas de este coco Gram positivo se obtuvieron al inicio de la maduración ( $5.40 \log_{10}$  UFC/g), y posteriormente se observó el fuerte efecto del tiempo de maduración ya que sus cuentas disminuyeron drásticamente conforme avanzaba la maduración. Este microorganismo se encuentra en las fosas nasales y piel de los mamíferos (incluido el hombre), por lo que dado que el proceso de elaboración del queso

Chihuahua es artesanal, es muy probable que haya llegado al queso como resultado de la manipulación de la leche por parte de los operadores de cada quesería (Schelin *et al.*, 2011). A partir de los 90 días *S. aureus* desapareció en los quesos A, B, C y D elaborados en otoño y en los quesos B y C del invierno; mientras que a los 150 días tampoco se observó en los quesos A y D de la temporada invernal, y fue indetectable en todos los quesos a los 270 días, lo que permitió identificar el efecto de la quesería en la dinámica de este microorganismo, ya que aparte de tener diferentes niveles, su desaparición no fue al mismo tiempo de maduración en todos los quesos. Este microorganismo es capaz de crecer y producir sus enterotoxinas en un amplio rango de temperatura, pH, concentraciones de sal y actividad acuosa (Schelin *et al.*, 2011); sin embargo, su drástica disminución puede atribuirse a uno o varios de los siguientes factores que ocurrieron durante la maduración: la presencia de cepas de BAL productoras de bacteriocinas (Arqués *et al.*, 2005), el bajo pH y actividad acuosa, la elevada concentración de sal y la competencia microbiana (Verraes *et al.*, 2015). Además, la temperatura a la cual se realiza la maduración del queso (por debajo de los 15°C), también contribuye a la generación de un ambiente hostil para el desarrollo de los microorganismos patógenos (Montel *et al.*, 2014).

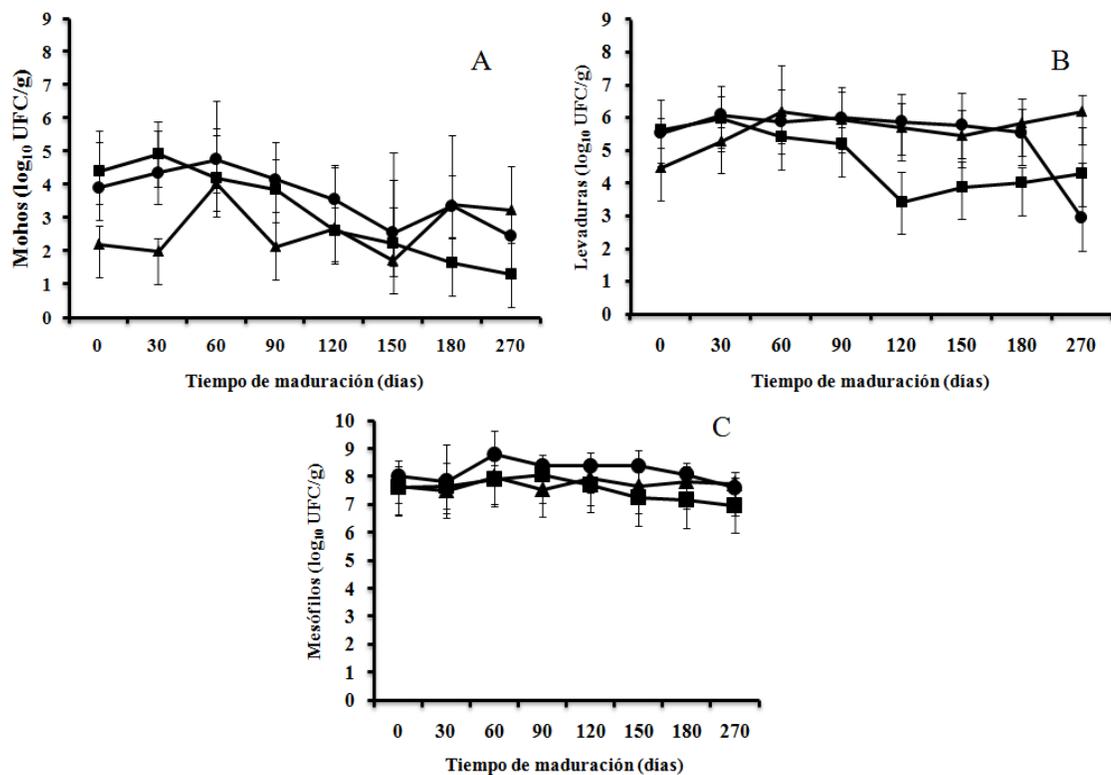


**Figura 5.** Dinámica de coliformes totales y *S. aureus* durante el tiempo de maduración del queso Chihuahua de leche cruda elaborado en tres estaciones del año.

● Verano    ▲ Invierno    ■ Otoño

Por otro lado, en la Figura 6 se muestra la dinámica de mohos, levaduras y mesófilos aerobios a través del tiempo de maduración, los cuales se desarrollan principalmente en

la superficie del queso debido a la mayor disponibilidad de oxígeno (Montel *et al.*, 2014). Durante las tres temporadas de muestreo, se observó que los tres grupos de microorganismos muestran los niveles más elevados a los 60 días de maduración; en el caso de los mohos, las cuentas promedio fueron de 4.33 log<sub>10</sub> UFC/g en dicho periodo, y luego, a los 150 días, alcanzan su punto más bajo (2.16 log<sub>10</sub> UFC/g), mientras que se observaron cuentas de levaduras de 5.83 log<sub>10</sub> UFC/g a los 60 días, llegando a 4.46 log<sub>10</sub> UFC/g al final del estudio. Se han detectado alrededor de 70 especies de levaduras y 40 de mohos en la leche cruda. Ambos grupos, al metabolizar el ácido láctico producen amoníaco, lo que incrementa el pH de 4.8-5.2 hasta 6-8.2 (Montel *et al.*, 2014); además contribuyen en la generación de compuestos que se reflejan en mejores aromas y en la modificación de la textura durante la maduración del queso (Quigley *et al.*, 2013).



**Figura 6.** Dinámica de mohos (A), levaduras (B) y mesófilos (C) durante el tiempo de maduración del queso Chihuahua de leche cruda elaborado en tres estaciones del año.  
 ● Verano ▲ Invierno ■ Otoño

Se han detectado en la leche sin pasteurizar aproximadamente 90 especies de bacterias Gram negativas y 90 especies de bacterias Gram positivas (Montel *et al.*, 2014). Al analizar los datos se observó que al igual que los mohos y las levaduras, las bacterias

mesófilas aerobias también alcanzaron valores máximos después de 60 días ( $8.25 \log_{10}$  UFC/g), pero se mantienen relativamente constantes durante la maduración, ya que solo disminuyen  $0.78 \log_{10}$  UFC/g respecto a dicho valor al final de la evaluación. La prevalencia de este grupo bacteriano puede deberse a condiciones favorables durante la elaboración y almacenamiento del queso, ya que estas definen el comportamiento de los microorganismos que están presentes en la leche. En este sentido, algunos pueden crecer, sobrevivir o inactivarse (Verraes *et al.*, 2015).

### **7.2.2 Dinámica de BAL y *Enterococcus* sp.**

Los quesos elaborados con leche cruda albergan una gran diversidad de BAL, que son las responsables de la bioconservación de dicho alimento, ya que producen una amplia gama de compuestos antimicrobianos, consumen los azúcares fermentables y/o disminuyen el pH del medio (Montel *et al.*, 2014). Por tal motivo, se les considera los principales microorganismos benéficos del queso (Pintado *et al.*, 2008). Durante la maduración del queso, predomina el grupo de las BAL no iniciadoras, ya que toleran ambientes con pH tan bajos como 4.9, concentración de sal de 6%, humedad menor del 50% y temperaturas que van desde los 2 hasta los 53°C (Montel *et al.*, 2014).

Las cuentas de *Lactobacillus* sp. mesófilos, *Lactococcus* sp., y cocos termófilos, estuvieron fuertemente influenciadas por la temporada de muestreo y el tiempo de maduración ( $P < 0.05$ ), mientras que los niveles de *Lactobacillus* sp. termófilos, estuvieron influenciados por la temporada y la quesería ( $P < 0.05$ ), pero no por el tiempo de maduración ( $P > 0.05$ ). Las cuentas de *Enterococcus* sp., estuvieron afectadas por el tiempo de maduración, la temporada del año y la quesería ( $P < 0.05$ ) (Ver Apéndice III).

En la Tabla 9, puede apreciarse que los quesos elaborados en la quesería C mostraron los niveles más bajos de lactobacilos mesófilos y termófilos, lactococos y enterococos, mientras que en la quesería D se produjeron los quesos con las cuentas más altas de lactobacilos termófilos, lactococos y cocos termófilos. Cabe mencionar que en las queserías A y E se observaron los mismos niveles de enterococos, a pesar de que su ubicación, la materia prima empleada y las prácticas de manufactura son diferentes.

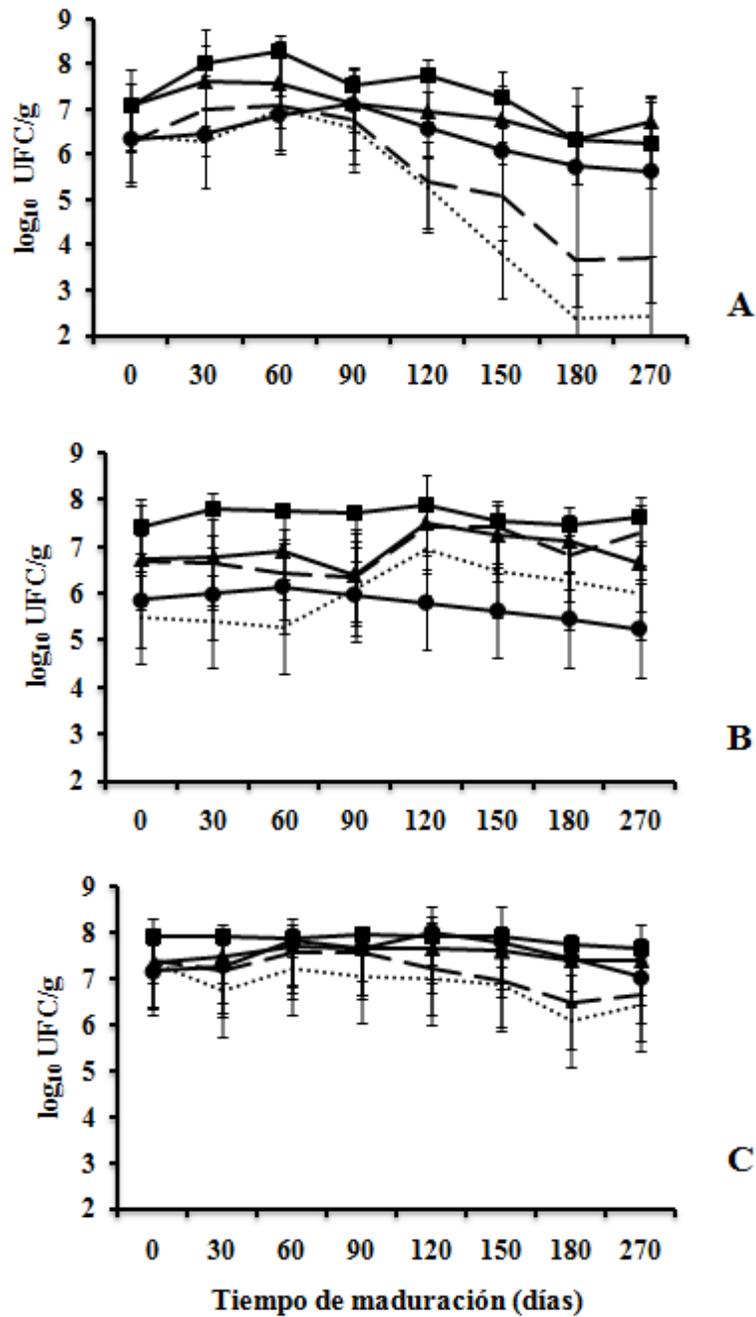
**Tabla 9.** Determinación de BAL durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda elaborado en diferentes queserías.

Microorganismos	Quesería				
	A	B	C	D	E
<i>Lactobacillus</i> sp. mesófilos	7.61± 0.95	7.71± 0.60	7.39± 0.72	7.65± 0.40	7.70± 0.37
<i>Lactobacillus</i> sp. termófilos	7.00± 0.62 <sup>b</sup>	7.22±0.65 <sup>ab</sup>	6.80± 0.75 <sup>b</sup>	7.55± 0.54 <sup>a</sup>	7.23± 0.58 <sup>ab</sup>
<i>Lactococcus</i> sp.	6.42± 2.15	6.53± 1.25	6.01± 2.08	7.12± 0.51	6.67± 0.83
Cocostermófilos	5.49± 2.31	5.82± 2.01	5.79± 2.00	6.41± 1.10	6.27± 0.62
<i>Enterococcus</i> sp.	6.94± 0.73 <sup>a</sup>	6.26± 1.00 <sup>bc</sup>	5.79± 1.51 <sup>c</sup>	6.81± 1.11 <sup>ab</sup>	6.94± 0.83 <sup>a</sup>

Los datos se expresan como el log<sub>10</sub> de la media de UFC ± desviación estándar calculada a partir de los datos obtenidos en las muestras tomadas durante la maduración de los quesos (30-270 días) elaborados en tres temporadas de muestreo.

Letras diferentes implican diferencia significativa entre las queserías (P<0.05)

En la Figura 7 puede apreciarse la dinámica de bacterias lácticas durante el tiempo de maduración en las tres diferentes temporadas de muestreo. Puede observarse la influencia de la estación en la dinámica de los diferentes grupos de BAL, ya que la tendencia a disminuir es muy notoria en las cuentas de otoño de los lactobacilos mesófilos, lactococos y cocos termófilos, mismos que mantienen un comportamiento similar durante las temporadas de verano e invierno. Por su parte, la dinámica de enterococos se muestra con dinámicas muy similares durante el otoño e invierno, mientras que en el caso de los lactobacilos termófilos se distingue que no existe diferencia entre los tiempos de maduración pero sí entre las estaciones del año, ya que sus niveles también tienden a disminuir de manera más evidente en las muestras colectadas durante el otoño.



**Figura 7.** Dinámica de BAL durante el tiempo de maduración del queso Chihuahua de leche cruda elaborado en A, otoño; B, invierno; C, verano.

*Lactobacillus sp. mesófilos*    
 *Lactobacillus sp. termófilos*    
 *Lactococcus sp.*    
 *Enterococcus sp.*    
 Cocos termófilos

Todos los grupos de bacterias lácticas excepto los cocos termófilos alcanzaron sus niveles máximos a los 60 días de maduración. En el caso de los lactobacilos mesófilos, se observaron  $7.98 \log_{10}$  UFC/g en dicho periodo, mientras que el valor promedio de durante las tres temporadas de muestreo a los 270 días fue  $7.17 \log_{10}$  UFC/g (es decir, una reducción de  $0.81 \log_{10}$  UFC/g). Un dato relevante es que se observaron cuentas altas de este grupo de microorganismos después de 30 días de maduración en el queso elaborado en invierno en el establecimiento A ( $9.14 \log_{10}$  UFC/g), no obstante que en este queso también se encontraron las cuentas más bajas de estos microorganismos al término del periodo de maduración ( $4.68 \log_{10}$  UFC/g). Este grupo bacteriano es habitante natural de la leche cruda, aunque en menor proporción que las especies productoras de ácido láctico, como las del género *Lactococcus*; sin embargo, logran proliferar y formar parte de la microbiota de los quesos durante la maduración (Aydemir *et al.*, 2015).

Por su parte, el valor más elevado de lactobacilos termófilos después de 2 meses de maduración fue  $7.40 \log_{10}$  UFC/g; estos microorganismos mantuvieron un comportamiento más o menos constante, ya que como se mencionó anteriormente, su dinámica no se vio influenciada por el tiempo de maduración, por lo que al término del estudio se observó una media de  $6.93 \log_{10}$  UFC/g (una reducción de  $0.47 \log_{10}$  UFC/g). A pesar del valor de la media, el queso de verano de la quesería D registró  $8.00 \log_{10}$  UFC/g al final de la maduración, aunque también hubo quesos en los que se observó una menor carga de estos microorganismos, como en el caso del queso C de invierno, que registró cuentas de  $6.01 \log_{10}$  UFC/g después de los 9 meses de maduración. Al igual que los lactobacilos mesófilos, forman parte del grupo de las BAL no iniciadoras y proliferan durante la maduración del queso gracias a que resisten la elevada concentración de sal y el pH bajo (Piras *et al.*, 2013).

El incremento en las cuentas de lactococos también fue notable después de 60 días de maduración ( $7.04 \log_{10}$  UFC/g), pero disminuyeron drásticamente después de 270 días ( $5.89 \log_{10}$  UFC/g). Esta reducción se debe a que los organismos pertenecientes a este género, a pesar de ser los principales productores de ácido láctico, no toleran bien el bajo pH, ni la baja actividad acuosa y las altas concentraciones de sal (Piras *et al.*, 2013) En

los quesos A y C del otoño fueron indetectables a partir de los 180 días, pero en otros, como en el queso E de invierno estuvieron presentes a un nivel considerablemente alto ( $7.93 \log_{10}$  UFC/g) en el mismo periodo de estudio, probablemente como consecuencia de la no selectividad de los medios de cultivo empleados (Wullschleger *et al.*, 2013), y/o a la existencia de cepas que son capaces de soportar las condiciones adversas durante la maduración del queso como respuesta a la exposición a situaciones de estrés y ambientes hostiles (Terzic-Vidojevic *et al.*, 2014).

Contrario a los demás grupos de BAL, los cocos termófilos alcanzaron las cuentas más altas después de 90 días ( $6.59 \log_{10}$  UFC/g), aunque disminuyeron severamente después de 9 meses de maduración de  $4.97 \log_{10}$  UFC/g. Estos microorganismos fueron indetectables a partir de los 150 días en el queso A de otoño y a los 270 días en los quesos B y C de la misma temporada. Es probable que dentro de los microorganismos detectados como cocos termófilos se encuentren algunas especies del género *Streptococcus*, ya que están presentes naturalmente en la leche cruda (Pogačić *et al.*, 2013; Quigley *et al.*, 2013). Como ya se mencionó anteriormente, las especies del género *Enterococcus* han sido relacionadas a contaminación fecal, aunque también es probable que su presencia en los alimentos no siempre sea consecuencia del contacto directo con un material contaminado. Más allá de indicar malas prácticas de higiene, estos microorganismos pueden contribuir al desarrollo de las características sensoriales de los quesos debido a sus actividades proteolíticas y lipolíticas, el metabolismo del citrato y la producción de diversos compuestos volátiles (Di Grigoli *et al.*, 2015). Estos microorganismos también alcanzaron niveles elevados a los 60 días ( $6.96 \log_{10}$  UFC/g) durante la maduración del queso Chihuahua, y al término de ésta, el valor promedio fue de  $5.96 \log_{10}$  UFC/g. En los quesos elaborados en el local A fueron se observaron las cuentas más elevadas de estos microorganismos (media de los tres muestreos durante la maduración:  $6.94 \log_{10}$  UFC/g), mientras que los quesos de la empresa C mostraron una menor carga de ellos (media de los tres muestreos durante la maduración:  $5.79 \log_{10}$  UFC/g).

### **7.3 Caracterización metabólica de las cepas de BAL**

Los microorganismos presentes naturalmente en la leche pueden influenciar la calidad del queso dependiendo de su diversidad y de la carga microbiana, las prácticas de higiene, la acumulación de microorganismos dentro de la fábrica, la adición de cultivos iniciadores, la tecnología de elaboración, la composición del queso, así como el ambiente y las condiciones de maduración (Sheehan, 2013).

El principal grupo que contribuye al desarrollo de las características y la calidad de los quesos, es el de las BAL (Bautista-Gallego *et al.*, 2014). Estos microorganismos son importantes ya que producen diversas enzimas que actúan sobre los diferentes sustratos que se encuentran en el queso, como los carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos orgánicos (Steele *et al.*, 2013). Si bien la pasteurización afecta los microorganismos patógenos y contaminantes de la leche cruda, también disminuye drásticamente la microbiota nativa (Grappin y Beuvier, 1997). Esto hace que los quesos de leche pasteurizada posean atributos sensoriales menos atractivos en comparación con aquellos elaborados con leche cruda (Licitra, 2010).

El aislamiento y caracterización metabólica de las cepas que se encuentran en los quesos artesanales debe realizarse con el propósito de identificar los microorganismos que podrían tener un impacto positivo en las propiedades sensoriales que caracterizan a dichos alimentos. En el presente trabajo, se aislaron y analizaron 100 cepas de BAL, compuestas principalmente por bacterias con morfología cocoide (12 bacilos, 88 cocos), y en su mayoría, de microorganismos mesófilos (62 mesófilos, 38 termófilos). Al determinar su capacidad acidificante en leche, partiendo de un pH inicial de 6.6, se observó que solo 5 cepas disminuyeron el pH de la leche a valores de pH entre 4 y 4.9, como puede apreciarse en la Tabla 10. Dado que estas cepas proceden de leche y cuajada principalmente y a que son cocos Gram positivos, es probable que sean especies del género *Lactococcus*, que se distingue por su gran capacidad para producir ácido láctico, lo cual disminuye el pH (Piras *et al.*, 2013). En general las cepas que disminuyeron el pH en los rangos más pequeños son cocos, mientras que en el grupo de cepas en el que el pH se mantuvo entre 6.5 y 5.5 se ubican las cepas de bacilos analizados. Es probable que dichos microorganismos formen parte de la microbiota secundaria, que no son reconocidos por acidificar el medio, sino que participan activamente durante la maduración (Sheehan, 2013). A partir de la producción de diacetilo y CO<sub>2</sub>, así como el metabolismo del citrato y proteólisis se

obtuvieron diferentes perfiles metabólicos de las cepas. Cabe mencionar que el 21% de las cepas fueron heterofermentadoras, pues produjeron CO<sub>2</sub>, mientras que el 56% es capaz de producir diacetilo. Se observó una gran fracción que metabolizó el citrato (78%) y solo una pequeña parte mostró habilidades proteolíticas (23%).

**Tabla 10.** Determinación de la capacidad acidificante de cepas de BAL aisladas durante la elaboración y maduración del queso Chihuahua de leche cruda.

Rango de disminución de pH*	No. de cepas	Morfología	Procedencia
4.0-4.49	5	Todos cocos	Leche, queso 0 y madurado (90 días), cuajada
4.5-4.9	21	1 bacilo; 20 cocos	Leche, cuajada, chedarizado, queso madurado (60, 90, 120 y 180 días)
5.0-5.49	15	Todos cocos	Leche, cuajada, queso 0, queso madurado (60, 90, 180 días)
5.5-5.9	41	5 bacilos; 36 cocos	Leche, cuajada, chedarizado, queso 0, queso madurado (30, 60, 90, 150, 180 días)
6.0-6.49	18	6 bacilos; 12 cocos	Leche, cuajada, chedarizado, queso 0, queso madurado (30, 90, 150, 180 días)
<b>Total</b>	100 cepas		

\*Determinación en leche UHT después de 24h de incubación

Las 12 cepas de bacilos no mostraron actividad proteolítica, pero sobresalen tres cepas aisladas de leche y cuajada de la quesería B durante el invierno que son bacilos mesófilos productores de diacetilo y que utilizan el citrato. Algunas cepas que metabolizan el citrato producen acetato y formato, compuestos que al parecer pueden inhibir el crecimiento de propionibacterias, al igual que el diacetilo (Sheehan, 2013).

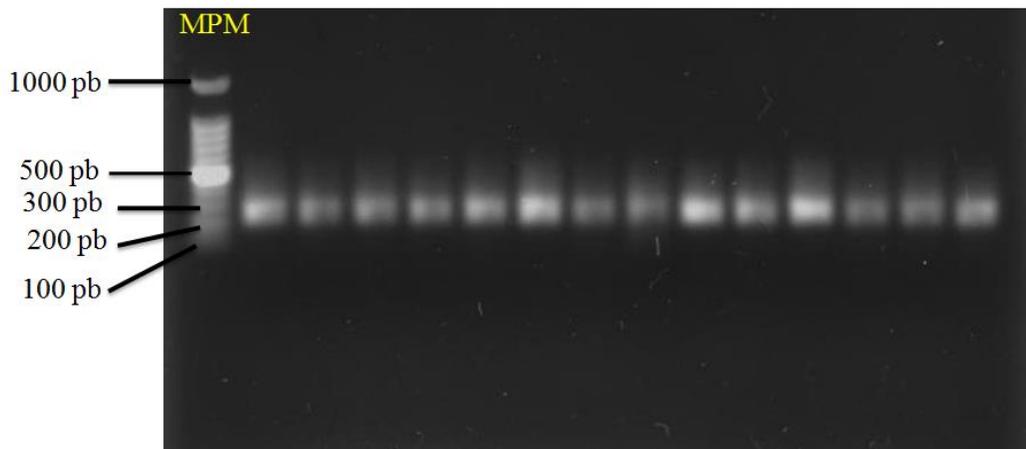
#### 7.4 Análisis metagenómico: PCR-DGGE

Con el propósito de mejorar la calidad y seguridad de los alimentos, es importante conocer la composición y dinámica de las comunidades microbianas que se encuentran en ellos. Los cambios en las condiciones físicas y químicas del microambiente del alimento (pH, temperatura, concentración de sal), así como de la habilidad para colonizar y crecer en la matriz alimenticia juegan un papel muy importante en la diversidad microbiana que

prevalece en un alimento. El empleo de técnicas dependientes de cultivo limita la detección de aquellos organismos que no crecen en los medios de cultivo existentes (Giraffa y Neviani, 2001), por lo que aprovechar las diferencias en el genoma de los microorganismos se ha vuelto una herramienta muy importante para describir la composición de dichas comunidades (Randazzo *et al.*, 2009).

#### 7.4.1 Extracción de ADN metagenómico y amplificación de la región V3 del gen *16S rARN*

Se logró la extracción de ADN metagenómico de cada una de las 164 muestras obtenidas durante la elaboración (59 muestras) y maduración del queso (105 muestras), así como la amplificación de la región V3 del gen *16S rARN*, obteniendo un fragmento de aproximadamente 300 pb, como puede apreciarse en las Figuras 8 y 9, respectivamente (Ver Apéndice IV).



**Figura 9.** Amplificación de la región V3 del gen *16S rARN*. Agarosa 1 % . Marcador de peso molecular 100pb

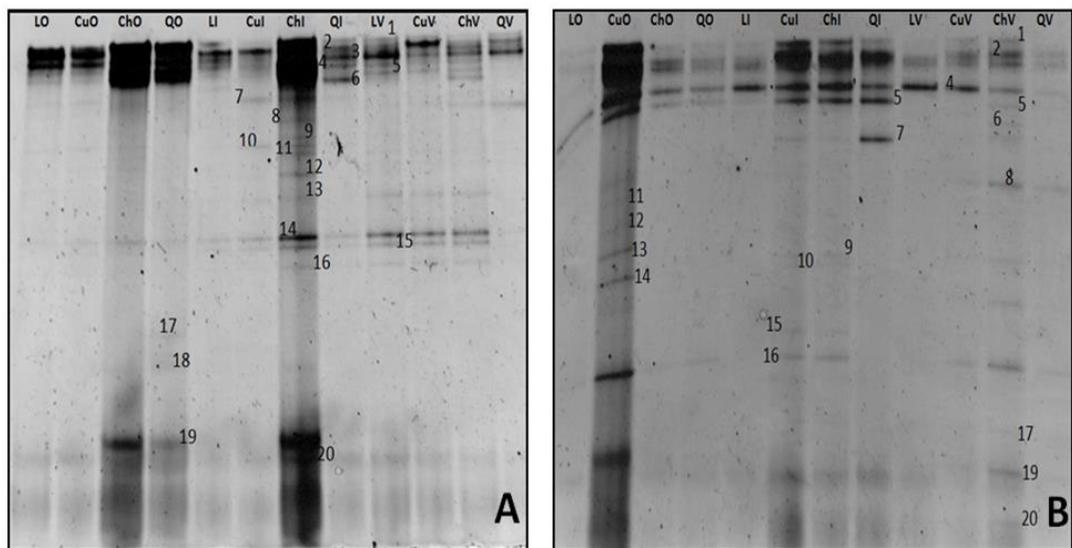


**Figura 8.** Extracción de metagenoma en las muestras tomadas durante el proceso de elaboración (A y B) y maduración del queso (C) de las queserías B, E y A, respectivamente. L, C, Ch, Q: Leche, Cuajada, Chedarizado, Queso. O, Otoño; I, Invierno; V, verano. Los números al lado de las letras en el gel C indican el tiempo de maduración del queso (30-270 días). Agarosa 1%; mpm  $\lambda$ Hind III (23 000 pb)

#### 7.4.2 Diversidad y dinámica de la microbiota durante la elaboración del queso Chihuahua.

La descripción de la composición microbiana de un ambiente no debe limitarse a los resultados obtenidos a través de métodos dependientes de cultivo, ya que muchos microorganismos son incapaces de crecer en los medios empleados, aun en los más selectivos (Santarelli *et al.*, 2013; Alegría *et al.*, 2009). En el caso de los alimentos, se les considera como un ambiente donde se encuentra una diversa y compleja población microbiana que aún permanece desconocida (Giraffa y Neviani, 2001). En el presente trabajo se aprovechó la variabilidad que existe en el gen *16S rARN*, para describir la heterogeneidad de microorganismos durante la elaboración y maduración del queso Chihuahua tradicional mediante la técnica PCR-DGGE. Esta técnica permite apreciar el incremento o disminución de los organismos de acuerdo a la aparición o desaparición de bandas específicas en el gel (Giraffa y Neviani, 2001). En las Figuras 10 y 11 pueden apreciarse los patrones de bandeo obtenidos durante la elaboración del queso en los cinco establecimientos visitados durante tres diferentes estaciones del año. En ella se muestra el efecto de la estación del año sobre la composición microbiana durante el proceso de elaboración del queso en las tres estaciones del año; además, se observa la dinámica de los microorganismos a través de las etapas de dicho proceso. Puede apreciarse además que las queserías con menor diversidad fueron la C y la D, con 6 y 5 bandas, respectivamente; mientras que aquellas en las que se observó la mayor variedad de microorganismos fueron la A y B, con 20 bandas cada una y la E, con 14.

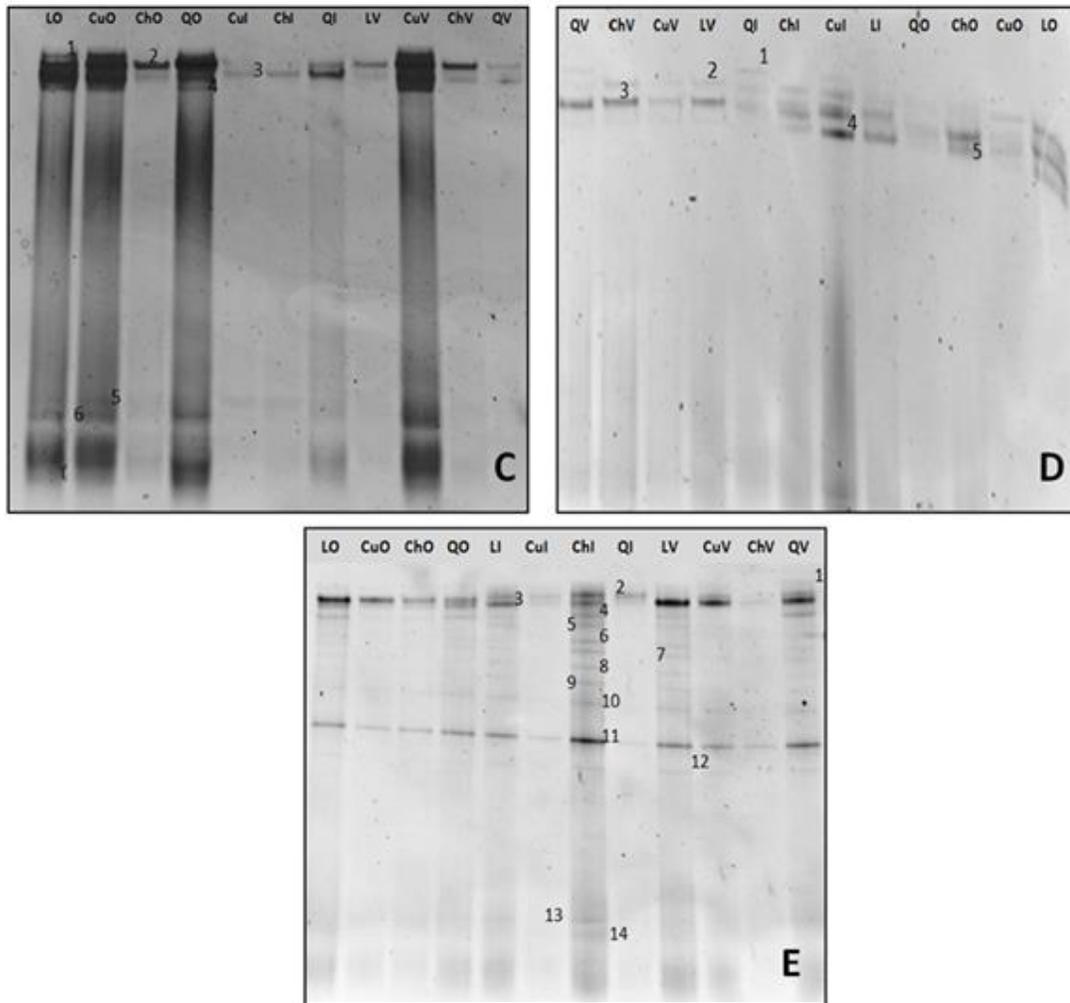
El análisis de los geles del establecimiento A permitió distinguir la gran diversidad microbiana en la muestra de chedarizado del invierno, que posee el mayor número de bandas (y con mayor intensidad). Además, se nota el efecto de las condiciones de proceso sobre los organismos, ya que la banda 15 está presente en las muestras de leche, cuajada y chedarizado del verano pero no el queso resultante (QV); asimismo, la banda 14 se observa en la leche y la cuajada del invierno, incrementándose notablemente durante el Chedarizado y disminuye en el queso. Este mismo comportamiento se observó en el microorganismo representado por la banda 19, pero en las muestras del otoño.



**Figura 10.** Perfil de DGGE de los amplicones de la región V3 del gen *16S rARN* pertenecientes a las muestras obtenidas durante la elaboración del queso Chihuahua de leche cruda en las queserías A y B. Cada banda se identificó con un número diferente; no existe relación en la numeración de las bandas de ambos geles. L, leche; Cu, cuajada; Ch, chedarizado; Q, queso  
O, otoño; I, invierno; V, verano

Por su parte, en el establecimiento B se observó una gran diversidad microbiana durante la formación de la cuajada en el proceso de otoño, estando muy intensas las bandas en la 11, 12, 13, 14 y 16, mismas que no están ni en la leche cruda ni en las etapas posteriores a la cuajada. Por otro lado, el organismo representado con la banda 7 se encuentra durante la cuajada y el chedarizado del invierno, pero su intensidad aumenta en el queso de esa temporada; por el contrario, las bandas 15 y 16 se observan en la cuajada y el Chedarizado pero no en la leche cruda ni en el queso. La banda 14 está intensa en la leche y cuajada

del verano, disminuye durante el chedarizado y casi es imperceptible en el queso resultante.



**Figura 11.** Perfil de DGGE de los amplicones de la región V3 del gen *16S rARN* pertenecientes a las muestras obtenidas durante la elaboración del queso

Chihuahua de leche cruda en las queserías C, D y E.

Cada banda se identificó con un número diferente; no existe relación en la numeración de las bandas observadas en los tres geles. L, leche; Cu, cuajada; Ch, chedarizado; Q, queso O, otoño; I, invierno; V, verano

En los establecimientos C y D, en los que de acuerdo al patrón de bandeo existió la menor diversidad microbiana, puede notarse que la mayoría de ellas se encuentran en todas las muestras de las tres estaciones, aunque la abundancia (interpretada por la intensidad de la banda) es diferente entre muestras y también entre épocas de muestreo. Esto podría

deberse más que a la influencia estacional sobre las poblaciones microbianas, al dominio y prevalencia de la microbiota establecida en las diferentes superficies que están en contacto directo con la leche durante el proceso y que son resistentes incluso a las prácticas de limpieza recurrentes, pero que resultan importantes para mantener la baja diversidad microbiana y prevenir la colonización de otras especies no deseables (Bokulich y Mills, 2013). Resalta que las muestras de leche, cuajada y queso de otoño, así como la cuajada de verano de la quesería C poseen las bandas con mayor intensidad que dan la impresión de ser una sola; mientras que en la quesería D las bandas estuvieron bien definidas, aunque la intensidad es variable a conforme avanza el proceso de elaboración del queso.

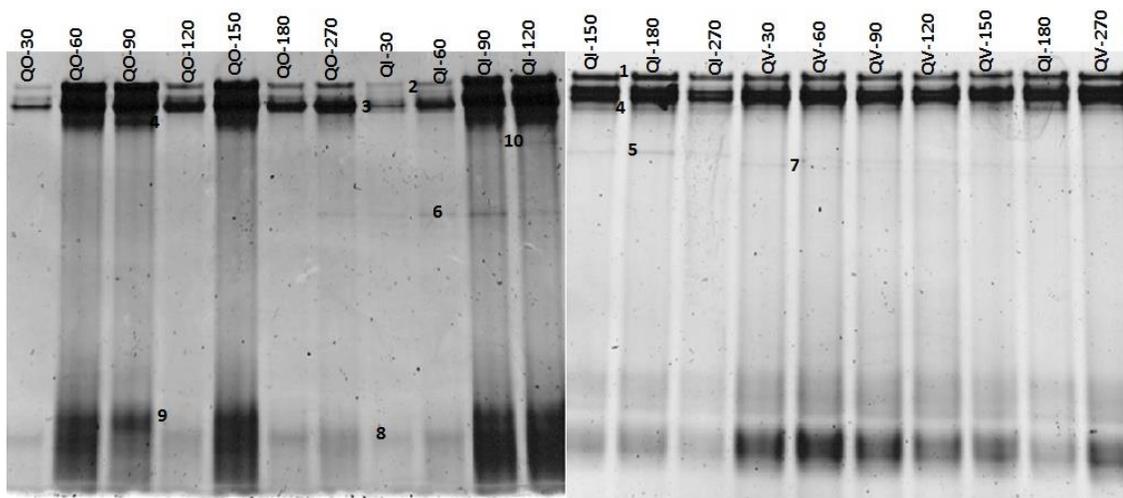
En el local E también se observó una gran diversidad microbiana en todas las muestras, aunque sobresale especialmente la muestra de chedarizado del invierno, ya que en ella están presentes todas las bandas que se identificaron en dicho establecimiento. Resalta el hecho de que las tres muestras de leche parecen tener una composición microbiana similar y el efecto que tienen las variaciones técnicas durante la elaboración del queso a través de las estaciones del año, ya que mientras en el invierno se observa la mayor diversidad en la muestra de chedarizado, en dicha muestra pero de verano las bandas microbianas están muy difuminadas, y resulta contradictorio que el queso de verano posea una población bacteriana más diversa que el queso de invierno. Es interesante además que las bandas 3 y 11 estén presentes en todas las muestras, con mayor intensidad en unas que en otras, pero permanecen a pesar de la temporada del año. Esto podría deberse a la existencia de comunidades microbianas establecidas en las superficies y que se proliferan durante algunas etapas o bajo ciertas condiciones durante el proceso de manufactura (Bokulich y Mills, 2013).

Es posible que exista una relación entre el número de bandas observadas en los geles con las cuentas de microorganismos obtenidas mediante las técnicas dependientes de cultivo, ya que las queserías A, B y E fueron en las que se observaron las cuentas más elevadas de coliformes totales, *S. aureus*, y *Lactobacillus* sp. mesófilos y termófilos (como ya se dijo, no existió diferencia significativa entre queserías, pero se hace referencia a los datos con el fin de comparar los resultados obtenidos con ambas técnicas), y fueron en las que se observó la mayor diversidad microbiana. Asimismo, también es probable que en

los diferentes medios de cultivo empleados se hayan detectado repetidamente los mismos microorganismos, debido a su baja selectividad (Wullschleger *et al.*, 2013),

### 7.4.3 Diversidad y dinámica de la microbiota durante la maduración del queso Chihuahua.

El empleo de las técnicas independientes de cultivo permite determinar la biodiversidad de los ecosistemas naturales y seguir la evolución de las poblaciones microbianas a través del tiempo y/o el espacio. Los resultados que arrojan pueden ser analizados desde el punto de vista cuanti o cualitativo sin la necesidad del cultivo y aislamiento de cada elemento por separado (Giraffa, 2004).

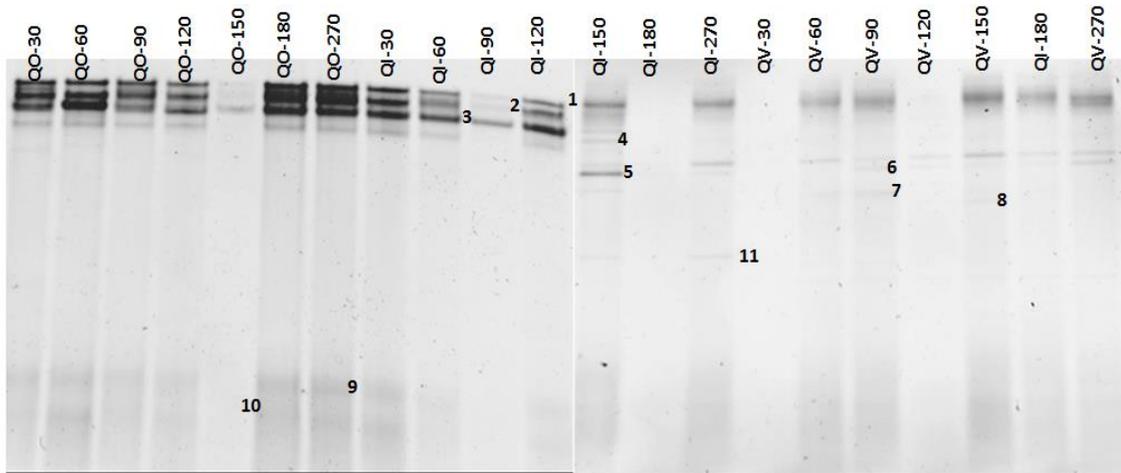


**Figura 12.** Perfil de DGGE de los amplicones de la región V3 del gen *16S rARN* pertenecientes a las muestras obtenidas durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda en la quesería A.

Cada banda se identificó con un número diferente.

Q, Queso; O, otoño; I, invierno; V, verano; 30-270, días de maduración

Durante la maduración del queso Chihuahua elaborado de manera tradicional pudo observarse sobre todo el efecto del tiempo de maduración sobre las comunidades microbianas.

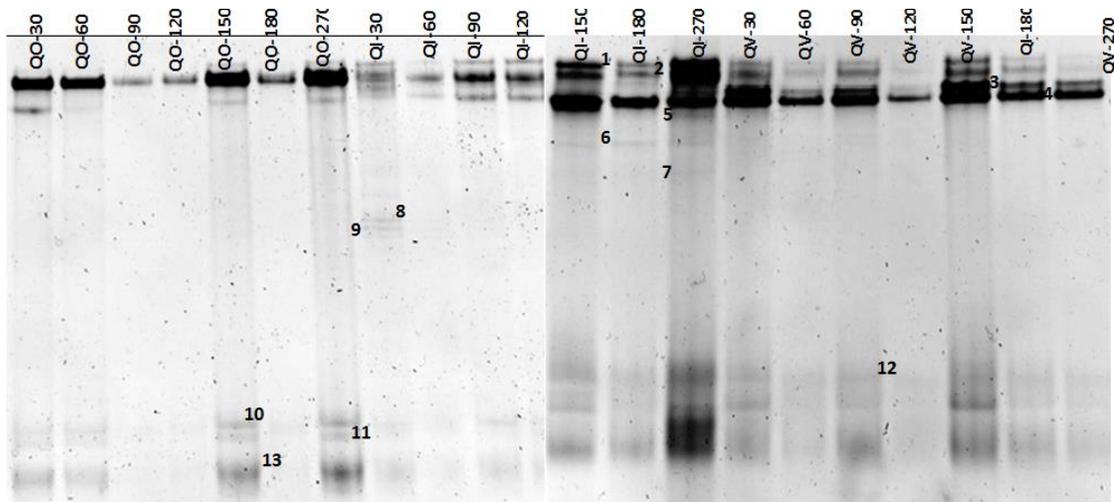


**Figura 13.** Perfil de DGGE de los amplicones de la región V3 del gen *16S rARN* pertenecientes a las muestras obtenidas durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda en la quesería B. Cada banda se identificó con un número diferente.

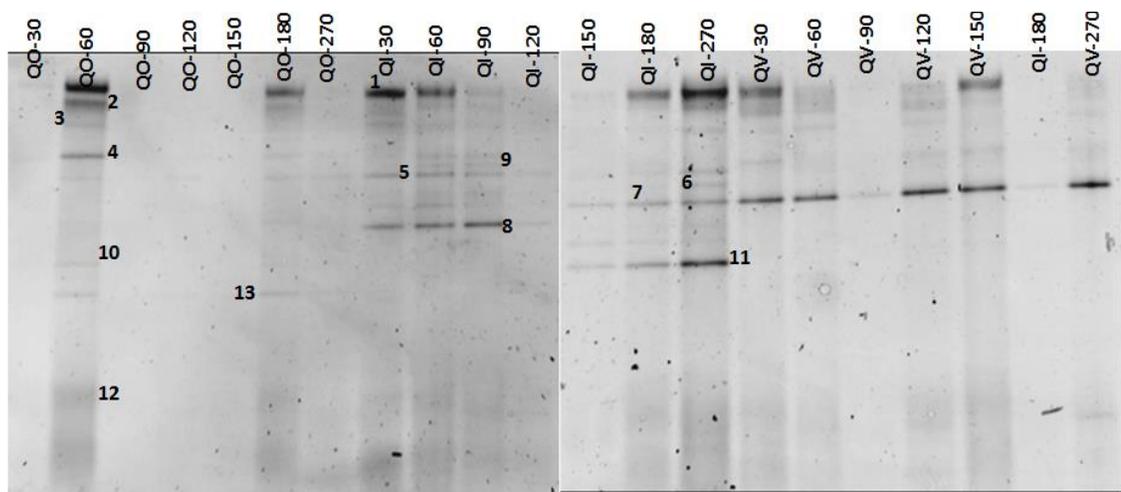
Q, Queso; O, otoño; I, invierno; V, verano; 30-270, días de maduración

Los quesos con la mayor diversidad de organismos fueron aquellos elaborados en los establecimientos E (16 bandas), D (13 bandas) y C (13 bandas), mientras que los provenientes de las queserías A (10 bandas) y B (11 bandas), mostraron una menor biodiversidad. Durante la elaboración del queso las queserías D y C mostraron una menor diversidad microbiana (6 y 5 bandas, respectivamente), aunque durante la maduración se observó una población microbiana más variada. Por el contrario, el tiempo de maduración influyó negativamente la población microbiana de los quesos A y B, que redujeron el número de bandas observado durante el proceso (20 bandas) a la mitad durante la maduración.

Durante el complejo proceso de maduración del queso, se experimentan importantes cambios microbiológicos, que incluyen la muerte y lisis de los microorganismos iniciadores, así como el crecimiento de microorganismos no iniciadores (McSweeney, 2004). En las Figuras 12-16 puede observarse que según el patrón de bandeo, algunos microorganismos desaparecieron o se presentaron en menor proporción durante el añejamiento. La disminución en el número de bandas durante el añejamiento en



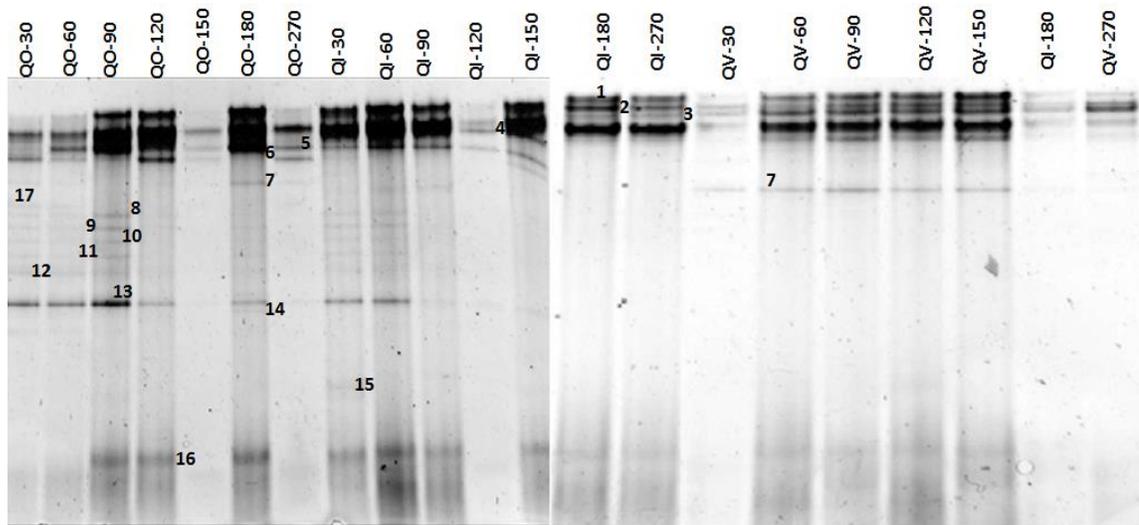
**Figura 14.** Perfil de DGGE de los amplicones de la región V3 del gen *16S rARN* pertenecientes a las muestras obtenidas durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda en la quesería C. Cada banda se identificó con un número diferente.  
Q, Queso; O, otoño; I, invierno; V, verano; 30-270, días de maduración



**Figura 15.** Perfil de DGGE de los amplicones de la región V3 del gen *16S rARN* pertenecientes a las muestras obtenidas durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda en la quesería D. Cada banda se identificó con un número diferente.  
Q, Queso; O, otoño; I, invierno; V, verano; 30-270, días de maduración

comparación con la elaboración, puede explicarse por los cambios microbianos que resultan como consecuencia de las reacciones bioquímicas que acontecen en dicho periodo. Los organismos característicos de esta etapa deben fermentar la lactosa residual del medio, metabolizar el ácido láctico y producir enzimas que degraden las proteínas y los lípidos de la cuajada (Broadbent y Steele, 2005; Fleet, 1999), lo que hace que la

población microbiana se reduzca. Por otro lado, debido a que una de las desventajas del uso del DGGE para describir la diversidad microbiana es la imposibilidad de detectar en el perfil electroforético las poblaciones que constituyan menos del 1% de la comunidad (Dolci *et al.*, 2013), es probable que no se haya podido identificar a todos los integrantes, limitando hasta cierto punto la descripción total de las variaciones en la abundancia y tipo de microorganismos involucrados en la maduración de dicho queso.



**Figura 16.** Perfil de DGGE de los amplicones de la región V3 del gen *16S rARN* pertenecientes a las muestras obtenidas durante la maduración del queso Chihuahua de leche cruda en la quesería E.

Cada banda se identificó con un número diferente.  
 Q, Queso; O, otoño; I, invierno; V, verano; 30-270, días de maduración

Además, es probable que los resultados se hayan visto afectados por la dificultad para lisar las células de algunos microorganismos (ya que no existe ningún método de extracción de ADN que sea efectivo para todos los microorganismos), o que algunas de las bandas observadas se deban a la presencia de ADN de microorganismos muertos (Alegría *et al.*, 2009). También puede apreciarse que en algunas muestras las bandas observadas son muy gruesas e intensas, lo que pudo deberse a que algunos fragmentos con diferentes secuencias pueden tener un comportamiento de fusión similar y por lo tanto migraron a la misma posición en el gel, a pesar de que los amplicones procedan de organismos filogenéticamente no relacionados (Ryssel *et al.*, 2015).

## 8. CONCLUSIONES

La diversidad y dinámica de los microorganismos presentes en el queso Chihuahua están fuertemente afectadas por la estación del año, así como por las prácticas y condiciones de manufactura de cada establecimiento, ya que son importantes en la selección de los microorganismos predominantes. La prevalencia de algunos organismos durante el proceso de elaboración y maduración en las tres estaciones del año podría indicar el establecimiento de ciertos grupos de microorganismos en los utensilios y herramientas de cada quesería, revelando que podrían existir cepas autóctonas de cada región. Dichas cepas poseen características metabólicas de gran interés, por lo que podrían ser empleadas para la producción de este queso con leche pasteurizada a gran escala empleando un proceso estandarizado. Durante la elaboración de este queso existe una prevalencia de cepas pertenecientes al género *Lactococcus* sp., aunque sobresale la alta incidencia de las especies mesófilas del género *Lactobacillus* sp., durante la formación de la cuajada así como la prevalencia de cepas de *Enterococcus* sp., en todo el proceso de elaboración. La detección de organismos contaminantes como los coliformes totales, mohos y levaduras se atribuye principalmente al uso de leche sin pasteurizar y a deficientes prácticas de manufactura.

En el queso Chihuahua la maduración se lleva a cabo principalmente por cepas mesófilas de *Lactobacillus* sp., aunque las especies termófilas de dicho género también podrían contribuir en los procesos que ocurren en dicho periodo. El tiempo de añejamiento determina fuertemente la diversidad de la microbiota presente y reduce los niveles de los microorganismos patógenos y/o contaminantes, así como de aquellas especies pertenecientes al género *Lactococcus* sp., y de los organismos que fueron determinados en el grupo de los cocos termófilos.

Es probable que las características sensoriales del queso Chihuahua de leche cruda elaborado de manera artesanal sean el resultado de la actividad metabólica de las cepas autóctonas que prevalecen durante su elaboración y maduración, que participan activamente en la generación de aromas y sabores característicos.

## **9. PERSPECTIVAS**

El estudio de la ecología microbiana durante la elaboración y maduración del queso Chihuahua ayudará a la mejora de su calidad, ya que conociendo las características microbiológicas del queso artesanal, así como los factores que afectan la diversidad microbiana del mismo, es posible diseñar procesos estandarizados empleando leche pasteurizada y cultivos lácticos (comerciales o cepas autóctonas aisladas del producto nativo). De esta manera, se obtendría un producto más homogéneo y de mayor calidad, encaminado hacia la obtención de la Denominación de Origen.

## 10.BIBLIOGRAFÍA

- Alegría, A., Álvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S., Mayo, B., 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*. 136 , 44–51
- Almanza-Rubio, J.L., Orozco-Mena, R.E., Gutiérrez-Méndez, N., 2013. Assessing consumer preference toward Chihuahua cheese and Chihuahua-type cheese. *Tecnociencia Chihuahua*. 3, 123-131
- Arqués, J.L., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M., Guamis, B., Núñez, M., 2005. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin producing lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 254-260.
- Axelsson L. (2004). *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. En: *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. Edited by: S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand. Third edition. USA. Marcel Dekker, Inc. 1-66
- Aydemir, O., Harth, H., Weckx, S., Dervişoğlu, M., De Vuyst, L., 2015. Microbial communities involved in Kaşar cheese ripening. *Food Microbiology*, 46, 587-595
- Badui, D.S., 1999. *Química de los Alimentos*. 3ª Ed. Longman de México Editores SA de CV.
- Barron, L.J.R., Fernández de Labastida, E., Perea, S., Chávarri, F., de Vega, C., Vicente, M.S., Torres, M.I., Nájera, A.I., Virto, M., Santisteban, A., Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M., Salmerón, J., Mendía, C., Torre, P., Ibáñez, F.C., de Renobales, M., 2001. Seasonal changes in the composition of bulk raw ewe's milk used for Idiazabal cheese manufacture. *International Dairy Journal*. 11, 771–778
- Bautista-Gallego, J., Alessandria, V., Fontana, M., Bisotti, S., Taricco, S., Dolci, P., Cocolin, L., Rantsiou, K., 2014. Diversity and functional characterization of

- Lactobacillus* spp. Isolated throughout the ripening of a hard cheese. International Journal of Food Microbiology. 181, 60-66
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. International Dairy Journal. 11, 259-274
- Bokulich, N.A., Mills, D.A., 2013. Facility-Specific “House” Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheesemaking Plants. Applied and Environmental Microbiology. 79, 5214–5223
- Bricker, L.A., Van Hekken, D.L., Guerrero, V.M., Gardea, A.A., 2005. Microflora Isolated from Mexican Mennonite-style Cheeses. Food Protection Trends. 25, 637-640
- Broadbent, J.R., Steele, J.L., 2005. Cheese flavor and the genomics of lactic acid bacteria. ASM News. 71, 121-128
- Broadbent, J.R., Brighton, C., McMahon, D.J., Farkye, N.Y., Johnson, M.E., Steele, J. L., 2012. Microbiology of Cheddar cheese made with different fat contents using a *Lactococcus lactis* single-strain starter. Journal of Dairy Science. 96, 4212–4222
- Callon, C., Berdagué, J.L., Dufour, E., Montel, M.C., 2005. The Effect of Raw Milk Microbial Flora on the Sensory Characteristics of Salers-Type Cheeses. Journal of Dairy Science. 88, 3840–3850
- Caridi A., 2003. Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from the artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. International Journal of Dairy Technology. 56: 105-110
- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N., 2002. The Lactic Acid Bacteria: A literature Survey. Critical Reviews in Microbiology. 28, 281-370
- Carraro, L., Maifreni, M., Bartolomeoli, I., Martino, M.E., Novelli, E., Frigo, F., Marino, M., Cardazzo, B., 2011. Comparison of culture-dependent and -independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing. Research in Microbiology. 162, 231-239

- Chambers, J.V., 2002. The microbiology of raw milk. En: Dairy Microbiology Handbook. The Microbiology of Milk and Milk Products. Edited by Richard K. Robinson. Third edition. USA. Wiley-Interscience, Inc. 39-85
- Crow, V., Curry, B., Christison M., Hellier, K., 2002. Raw milk flora and NSLAB as adjuncts. Australian Journal of Dairy Technology. 57, 99-105
- Cullen, D.W., Hirsch, P.R., 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. Soil Biology and Biochemistry. 30, 983-993
- Dahl, S., Tavaría, F.K., Malcata, F.X., 2000. Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. International Dairy Journal. 10, 255-262.
- Delbès, C., Ali-Mandjee, L. and Montel, M.C., 2007. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 73, 1882–1891.
- De Pasquale, I., Calasso, M., Mancini, L., Ercolini, D., LaStoria, A., De Angelis, M., DiCagno, R., Gobbetti, M., 2014. Causal Relationship between Microbial Ecology Dynamics and Proteolysis during Manufacture and Ripening of Protected Designation of Origin (PDO) Cheese Canestrato Pugliese. Applied and Environmental Microbiology. 80, 4085-4094
- Diario Oficial de la Federación (DOF). Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y Servicios. Leche, Formula Láctea, Producto Lácteo Combinado y Derivados Lácteos. Disposiciones y Especificaciones Sanitarias. Métodos de Prueba. Diciembre, 2012
- Di Grigoli, A., Francesca, N., Gaglio, R., Guarrasi, V., Moschetti, M., Scatassa, M.L., 2015. The influence of the wooden equipment employed for cheese manufacture on the characteristics of a traditional stretched cheese during ripening. Food Microbiology. 46, 81-91.
- Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Bertolino, M., Cocolin, L., 2010. Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of

- Castelmagno PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 143, 71–75.
- Duthoit, F., Tessier, L., Montel, M.C., 2005. Diversity, dynamics and activity of bacterial populations in 'Registered Designation of Origin' Salers cheese by single-strand conformation polymorphism analysis of 16S rRNA genes. *Journal of Applied Microbiology*. 98, 1198-1208.
- Ferreira, A.D., Viljoen, B.C., 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology* 86, 131– 140
- Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S., Beresford, T., 1999. Phenotypic and Genotypic Characterization of Non-Starter Lactic Acid Bacteria in Mature Cheddar Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 3418-3416
- Fleet, G.H., 1999. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*. 50, 101–117.
- Fox, P.F., 2003. The major constituents of milk. En: *Dairy processing: Improving Quality*. Edited by Gerrit Smit. First edition. England. Woodhead Publishing.
- Franciosi E., Settanni L., Cavazza, A., Poznanski, E., 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal* 19, 3–11. doi:10.1016/j.idairyj.2008.07.008
- Giannou, E., Kakouri, A., Matijašić, B.B., Rogelj, I., Samelis, J., 2009. Fate of *Listeria monocytogenes* on fully ripened Greek Graviera Cheese stored at 4, 12, or 25 °C in air or vacuum packages: In Situ PCR detection of a cocktail of bacteriocins potentially contributing to pathogen inhibition. *Journal of Food Protection*. 72, 531–538
- Giraffa, G., 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 251–260
- Giraffa, G., Neviani, E., 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*. 67, 19-34

- Golić, N., Čadež, N., Terzić-Vidojević, A., Šuranská, H., Beganović, J., Lozo, J., Kos, B., Šušković, J., Raspor, P., Topisirović, L., 2013. Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *International Journal of Food Microbiology*. 166, 294–300
- Grappin, R., Beuvier, E., 1997. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*. 7, 751-761
- Gutiérrez-Méndez, N., Nevárez-Moorillón, G.V., 2009. Queso Chihuahua: Historia de un queso mexicano. *Carnilac Industrial*. Octubre/Noviembre, 27-34.
- Harjinder, S., Bennet RJ., 2002. Milk and milk processing. En: *Dairy Microbiology Handbook*. Edited by: Richard K. Robinson. Third edition. New York. Wiley-Interscience, Inc. 1-35
- Heller, K.J., Bockelmann, W., Schrezenmeir, J., deVrese, M., 2003. Cheese and its potential as a probiotic food. En: *Handbook of Fermented Functional Foods*. Edited by Edward R. Farnworth. First edition. USA. Taylor & Francis. 203-220
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.L., Barbier, G., Coton, E., 2014. Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13, 437-456
- Jay, J.M., 2000. *Modern Food Microbiology*. Sixth edition. USA. Aspen Publishers. 123-124
- Justé, A., Thomma, B.P.H.J., Lievens, B., 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*. 25, 745– 761
- Kempler, G.M., McKay, L.L., 1980. Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 39, 926-927
- Kumar, C.G., Anand, S.K., 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 42, 9–27

- Leyer, G.J, Johnson, E.A., 1992. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 58, 2075-2080
- Licitra, G., 2010. World wide traditional cheeses: Banned for business?. *Dairy Science and Technology*. 90, 357-374
- Martín-Platero, A.M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martín-Sánchez, I., Martínez-Bueno, M., 2008. Polyphasic approach to bacterial dynamics during the ripening of spanish farmhouse cheese, using culture-dependent and -independent methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 5662–5673
- Martín-Platero, A.M., Maqueda, M., Valdivia, E., Purswani, J., Martínez-Bueno, M., 2009. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiology*. 26, 294–304
- Mata, G.M.S.C., Vanetti, M.C.D., 2012. Comparison of conventional and rapid methods for *Salmonella* detection in artisanal Minas Cheese. *Journal of Food Research*. 1, 178-183.
- McSweeney, P.L.H., 2004. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 57, 127-144
- Minitab 17 Paquete estadístico. 2010. State College, PA: Minitab, Inc. (www.minitab.com)
- Mølbak, K., 2005. Human Health Consequences of Antimicrobial Drug-Resistant *Salmonella* and Other Foodborne Pathogens. *Food Safety*. 41, 1613–1620
- Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., Berthier, F., 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*. 177, 136-154
- Morea, M., Baruzzi, F., Coconcelli, P.S., 1999. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *Journal of Applied Microbiology*. 87, 574-582

- Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73, 127–141
- O'Brien M, Hunt K, McSweeney S, Jordan K., 2009. Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese. *Food Microbiology*. 26, 910–914
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M.J., Hernández, A., Ruiz-Moyano, S., Córdoba, M. G., 2013. Role of the microbial population on the flavor of the soft-bodied cheese Torta del Casar. *Journal of Dairy Science*. 96, 5477-5486.
- Orozco-Morales, E., 2008. Determinación de proteólisis, caracterización microbiológica y cambios sensoriales durante la maduración del queso Chihuahua. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chihuahua. 82pp
- Pintado, A.I.E., Pinho, O., Ferreira, M.P.L.V.O. I., M. Pintado, M.E., Gomes, Malcata, A.M.P., F.X., 2008. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *International Dairy Journal*. 18, 631-640
- Piras, C., Marincola, F.C., Savorani, F., Engelsen, S.B., Cosentino, S., Viale, S., Pisano, M.B., 2013. A NMR metabolomics study of the ripening process of the Fiore Sardo cheese produced with autochthonous adjunct cultures. *Food Chemistry*. 141, 2137-2147
- Pisano MB, Fadda ME, Deplano M, Corda A, Cosentino S., 2006. Microbiological and chemical characterization of Fiore Sardo, a traditional Sardinian cheese made from ewe's milk. *International Journal of Dairy Technology*. 59, 171-179
- Pogačić, T., Mancini, A., Santarelli, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E., Gatti, M., 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, 207-215
- Poznanski E, Cavazza A, Cappa F, Cocconcelli PS., 2004. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *International Journal of Food Microbiology*. 92, 141– 151

- Prajapati, J.B., Nair, B.M., 2003. The history of fermented foods. En: Handbook of fermented functional foods. Edited by Edward R. Farnworth. First edition. USA. Taylor & Francis. 2-25
- Pui, C.F., Wong, W. C., Chai, L.C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noor Hidayah, M.S., Ubong, A., Farinazleen, M.G., Cheah, Y.K., Son, R., 2011. Salmonella: A foodborne pathogen. International Food Research Journal 18: 465-473
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. (2013). The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiology Reviews. 37, 664-698
- Randazzo, C.L., Caggia, C., Neviani, E., 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. Journal of Microbiological Methods. 78, 1-9
- Santarelli, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E., Gatti, M., 2013. Survey on the community and dynamics of lactic acid bacteria in Grana Padano cheese. Systematic and Applied Microbiology. 36, 593- 600
- Schelin J, Wallin-Carlquist N, Thorup MC, Lindqvist R, Barker GC, Rådström P. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. Virulence 2, 580-592
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Boletín de leche. Enero-Marzo 2015. Información electrónica disponible en: [http://www.siap.gob.mx/wp-content/uploads/boletinleche/boletinlechenero-marzo\\_2015.pdf](http://www.siap.gob.mx/wp-content/uploads/boletinleche/boletinlechenero-marzo_2015.pdf). Fecha de consulta: Enero, 2015
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2010. Claridades Agropecuarias. Información electrónica disponible en: <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/207/ca207-34.pdf>. Fecha de consulta: Enero, 2015

- Secretaría de Economía (SE). Dirección General de Industrias Básicas. Análisis del sector lácteo en México Marzo 2012. Información electrónica disponible en: [http://www.economia.gob.mx/files/comunidad\\_negocios/industria\\_comercio/informacionSectorial/analisis\\_sector\\_lacteo.pdf](http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacionSectorial/analisis_sector_lacteo.pdf). Fecha de consulta: Enero, 2015
- Shakeel-Ur-Rehman, Banks, J.M., McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., 2000. Effect of ripening temperature on the growth and significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese made from raw or pasteurized milk. *International Dairy Journal*. 10, 45-53
- Sheehan, J.J., 2013. Milk quality and cheese diversification. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 52, 243-253
- Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*. 43, 573–583
- Steele, J., Broadbent, J., Kok, J., 2013. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. *Current Opinion in Biotechnology*. 24:135–141
- Terzic-Vidojevic, A., Mihajlovic, S., Uzelac, G., Veljovic, K., Tolinacki, M., Nikolic, M., Topisirovic, L., Kojic, M., 2014. Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Travnik young cheeses, sweet creams and sweet kajmaks over four seasons. *Food Microbiology*. 39, 27-38
- Tornadijo, E., Fresno, J.M., Carballo, J., Martin-Sarmiento, R., 1993. Study of Enterobacteriaceae throughout the manufacturing and ripening of hard goats' cheese. *Journal of Applied Bacteriology*. 75, 240-246
- Tunick, M.H., Van Hekken, V.L., Molina-Corral, F.J., Tomasula, P.M., Call, J., Luchansky, J., Gardea, A.A., 2008. Queso Chihuahua: manufacturing procedures, composition, protein profiles, and microbiology. *International Journal of Dairy Technology*. 61, 62-69
- Uaboi-Egbeni, P.O., Okolie, P.N., Akitunde, T.I., Busi-Johnson, O., Enwe, L., Bessong, P.O., 2010. Proximate Analysis and Microbiological Quality of Cheese Produced from Raw Cow Milk obtained from Fulani Settlement in Ogun State

- Nigeria, using Lactic Acid Bacteria and Extract from Sodom Apple Leaf (Calotropisprocera). *Pakistan Journal of Nutrition*. 9, 920-925
- Van Hekken DL, Drake MA, Tunick MH, Guerrero VM, Molina-Corral FJ, Gardea AA., 2008. Effect of pasteurization and season on the sensorial and rheological traits of Mexican Chihuahua cheese. *Dairy Science Technology*.88, 525–536
- Van Hoorde, K., Verstraete, T., Vandamme, P., Huys, G., 2008. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food Microbiology*. 25, 929-935.
- Verraes, C., Vlaemynck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., Uyttendaele, M., Herman, L., 2015. A review of the microbiological hazardz of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal*. 50, 32-44
- Volken de Souza CF, Dalla-Rosa T, Zachia-Ayud MA., 2003. Changes in the microbial and physicochemical characteristics of Serraro cheese during manufacture and ripening. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34, 260-266
- Wilkinson, M.G., Kilcawley, K.N., 2005. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *International Dairy Journal*. 15, 817-830.
- Wullschleger, S., Lacroix, C., Bonfoh, B., Sissoko-Thiam, A., Hugenschmidt, S., Romanens, E. Baumgartner, S., Traoré, I., Yaffee, M., Jans, C., Meile, L., 2013. Analysis of lactic acid bacteria communities and their seasonal variations in a spontaneously fermented dairy product (Malian fènè) by applying a cultivation/genotype-based binary model. *International Dairy Journal*. 29, 28-35.

## 11.APÉNDICES

### Apéndice I. Composición del agar Elliker

**Tabla I. 1. Composición del agar Elliker**

Componente	Cantidad *
Caseína	20.0 g
Agar	15.0 g
Glucosa	5.0 g
Lactosa	5.0 g
Sacarosa	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	4.0 g
Gelatina	2.5 g
Acetato de sodio	1.5 g
Ácido ascórbico	0.5 g

\* Fórmula para 1L

## Apéndice II. Análisis estadístico de las muestras tomadas durante la elaboración del queso

### Coliformes

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Quesería	4	1.2154	0.3038	0.40	0.807
Estación	2	1.8375	0.9187	1.21	0.319
Muestra	1	0.8115	0.8115	1.07	0.313
Error	21	15.9672	0.7603		
Total	28	19.6494			

### Mesófilos

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Quesería	4	2.875	0.7188	1.62	0.207
Estación	2	1.055	0.5277	1.19	0.324
Muestra	1	1.318	1.3178	2.97	0.100
Error	21	9.325	0.4441		
Total	28	14.700			

### Mohos

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Quesería	4	4.614	1.1534	2.05	0.124
Estación	2	10.204	5.1020	9.08	0.001
Muestra	1	2.795	2.7949	4.97	0.037
Error	21	11.802	0.5620		
Total	28	29.415			

### *Lactobacillus sp. mesófilos*

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Quesería	4	2.213	0.5532	1.64	0.180
Estación	2	5.244	2.6219	7.76	0.001
Muestra	3	4.692	1.5641	4.63	0.006
Error	49	16.559	0.3379		
Total	58	28.472			

### *Lactobacillus sp. termófilos*

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Quesería	4	0.4566	0.1141	0.18	0.949
Estación	2	5.8105	2.9053	4.50	0.016
Muestra	3	1.1513	0.3838	0.59	0.622
Error	49	31.6524	0.6460		
Total	58	38.7668			

### Levaduras

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Quesería	4	0.4637	0.1159	0.21	0.931
Estación	2	10.8569	5.4284	9.71	0.001
Muestra	1	4.7879	4.7879	8.57	0.008
Error	21	11.7355	0.5588		
Total	28	27.3673			

### *S. aureus*

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Quesería	4	4.1111	1.0278	1.59	0.214
Estación	2	8.1840	4.0920	6.33	0.007
Muestra	1	0.1175	0.1175	0.18	0.674
Error	21	13.5798	0.6467		
Total	28	25.7783			

### *Enterococcus sp.*

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Quesería	4	5.187	1.2968	2.81	0.035
Estación	2	11.768	5.8838	12.76	0.000
Muestra	3	1.879	0.6264	1.36	0.267
Error	49	22.597	0.4612		
Total	58	40.637			

### *Lactococcus sp.*

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Quesería	4	3.2829	0.8207	1.24	0.306
Estación	2	10.6931	5.3465	8.08	0.001
Muestra	3	0.3016	0.1005	0.15	0.928
Error	49	32.4081	0.6614		
Total	58	46.3660			

### Cocos termófilos

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Quesería	4	1.927	0.4818	0.85	0.501
Estación	2	32.621	16.3103	28.73	0.000
Muestra	3	1.893	0.6309	1.11	0.354
Error	49	27.822	0.5678		
Total	58	64.154			

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Levaduras, Term = Estación**

Estación	N	Mean	Grouping
1	10	5.59834	A
3	10	4.62433	B
2	9	4.11115	B

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Levaduras, Term = Muestra**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Muestra	N	Mean	Grouping
4	15	5.18641	A
1	14	4.36947	B

Means that do not share a letter are significantly different

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Hongos, Term = Estación**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Estación	N	Mean	Grouping
1	10	3.94828	A
3	10	3.54077	A
2	9	2.50603	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Cocostermófilos, Term = Estación**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Estación	N	Mean	Grouping
3	20	7.30625	A
1	20	6.22317	B
2	19	5.48823	C

Means that do not share a letter are significantly different.

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Lb termófilos, Term = Estación**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Estación	N	Mean	Grouping
3	20	7.24899	A
1	20	6.88803	A B
2	19	6.47555	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = enterococcus, Term = Quesería**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Quesería	N	Mean	Grouping
4	12	6.65179	A
5	12	6.38978	A B
1	12	6.38490	A B
2	12	5.98402	A B
3	11	5.82720	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = enterococcus, Term = Estación**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Estación	N	Mean	Grouping
3	20	6.85952	A
1	20	6.07929	B
2	19	5.80379	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**Estación:** 1= Otoño; 2= Invierno; 3= Verano **Quesería:** 1= A; 2 =B; 3 = C; 4 = D, 5 = E **Muestra:** 1 = Leche; 2= Cuajada; 3= Chedarizado; 4= Queso recién elaborado

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Hongos, Term = Muestra**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Muestra	N	Mean	Grouping
4	15	3.64378	A
1	14	3.01961	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Lactococcus, Term = Estación**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Estación	N	Mean	Grouping
3	20	7.37218	A
1	20	6.65053	B
2	19	6.35726	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Lb mesofilos, Term = Estación**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Estación	N	Mean	Grouping
3	20	8.02814	A
2	19	7.63726	A B
1	20	7.30475	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Lb mesofilos, Term = Muestra**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Muestra	N	Mean	Grouping
2	15	8.07947	A
3	15	7.73110	A B
4	15	7.48935	B
1	14	7.32695	B

Means that do not share a letter are significantly different.

## Apéndice III. Análisis estadístico de las muestras tomadas durante la maduración del queso

### Coliformes

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
season	2	66.36	33.179	24.86	0.000
cheese	4	98.30	24.574	18.41	0.000
time	7	323.65	46.236	34.64	0.000
Error	106	141.49	1.335		
Total	119	629.79			

### Levaduras

Analysis of Variance

Source	DF	AdjSS	Adj MS	F-Value	P-Value
season	2	18.354	9.177	7.71	0.001
cheese	4	5.015	1.254	1.05	0.383
time	7	23.695	3.385	2.85	0.009
Error	106	126.101	1.190		
Total	119	173.165			

### *Lactobacillus sp. mesófilos*

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
season	2	5.830	2.9150	9.55	0.000
cheese	4	1.622	0.4054	1.33	0.264
time	7	10.404	1.4862	4.87	0.000
Error	106	32.343	0.3051		
Total	119	50.199			

### *Lactococcus sp.*

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
season	2	51.73	25.864	14.73	0.000
cheese	4	15.46	3.864	2.20	0.074
time	7	27.53	3.933	2.24	0.036
Error	106	186.06	1.755		
Total	119	280.77			

### *Enterococcus sp.*

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
season	2	64.51	32.2526	61.16	0.000
cheese	4	24.57	6.1416	11.65	0.000
time	7	12.84	1.8338	3.48	0.002
Error	106	55.90	0.5274		
Total	119	157.81			

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = coliforms, Term = season**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

season	N	Mean	Grouping
3	40	5.14014	A
2	40	3.91124	B
1	40	3.36132	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### Mohos

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
season	2	19.01	9.506	4.97	0.009
cheese	4	57.30	14.325	7.48	0.000
time	7	56.67	8.095	4.23	0.000
Error	106	202.87	1.914		
Total	119	335.85			

### *S. aureus*

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
season	2	122.57	61.286	45.67	0.000
cheese	4	31.31	7.828	5.83	0.000
time	7	415.78	59.397	44.26	0.000
Error	106	142.24	1.342		
Total	119	711.90			

### *Lactobacillus sp. termófilos*

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
season	2	8.588	4.2942	13.27	0.000
cheese	4	7.477	1.8692	5.77	0.000
time	7	3.710	0.5300	1.64	0.133
Error	106	34.314	0.3237		
Total	119	54.089			

### *Cocos termófilos*

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
season	2	66.22	33.109	15.22	0.000
cheese	4	13.67	3.419	1.57	0.187
time	7	49.56	7.080	3.26	0.004
Error	106	230.53	2.175		
Total	119	359.98			

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = coliforms, Term = cheese**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

cheese	N	Mean	Grouping
D	24	5.27186	A
A	24	4.64535	A B
B	24	4.23429	B
C	24	3.98587	B
E	24	2.55046	C

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = fungi, Term = season**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

season	N	Mean	Grouping
3	40	3.64802	A
1	40	3.14648	A B
2	40	2.67319	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = S.aureus, Term = season**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

season	N	Mean	Grouping
3	40	4.13684	A
2	40	2.15377	B
1	40	1.86193	B

Means that do not share a letter are significantly different.

***Lactobacillus sp. mesófilos***

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Lbm, Term = season**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

season	N	Mean	Grouping
3	40	7.86526	A
2	40	7.66352	A
1	40	7.33068	B

Means that do not share a letter are significantly different.

***Lactobacillus sp. termófilos***

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Lbt, Term = season**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

season	N	Mean	Grouping
3	40	7.53778	A
1	40	7.04251	B
2	40	6.91853	B

Means that do not share a letter are significantly different.

***Lactococcus sp.***

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Lc, Term = season**

Means that do not share a letter are significantly different.

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = fungi, Term = cheese**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

cheese	N	Mean	Grouping
C	24	4.30804	A
E	24	3.36117	A B
B	24	3.10597	B C
D	24	2.78558	B C
A	24	2.21873	C

Means that do not share a letter are significantly different

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = S.aureus, Term = cheese**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

cheese	N	Mean	Grouping
E	24	3.65300	A
D	24	2.63085	B
B	24	2.62811	B
A	24	2.58844	B
C	24	2.08718	B

Means that do not share a letter are significantly different.

***Lactobacillus sp. mesófilos***

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Lbm, Term = cheese**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

cheese	N	Mean	Grouping
B	24	7.71526	A
E	24	7.70903	A
D	24	7.65879	A
A	24	7.61750	A
C	24	7.39852	A

Means that do not share a letter are significantly different.

***Lactobacillus sp. termófilos***

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Lbt, Term = cheese**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

cheese	N	Mean	Grouping
D	24	7.55198	A
E	24	7.23781	A B
B	24	7.22731	A B
A	24	7.00617	B
C	24	6.80809	B

Means that do not share a letter are significantly different.

***Lactococcus sp.***

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Lc, Term = cheese**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

season	N	Mean	Grouping
3	40	7.13178	A
2	40	6.89013	A
1	40	5.63401	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**Cocos termófilos**

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = ct, Term = season**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

season	N	Mean	Grouping
3	40	6.85091	A
2	40	6.00196	B
1	40	5.03265	C

Means that do not share a letter are significantly different.

**Enterococcus sp.**

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Enterococcus, Term = season**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

season	N	Mean	Grouping
3	40	7.53173	A
1	40	6.35979	B
2	40	5.76726	C

Means that do not share a letter are significantly different.

**Estación:** 1= Otoño; 2= Invierno; 3= Verano

**Queso:** A; B; C; D, E

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

cheese	N	Mean	Grouping
D	24	7.12437	A
E	24	6.66428	A B
B	24	6.53376	A B
A	24	6.42041	A B
C	24	6.01703	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**Cocos termófilos**

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = ct, Term = cheese**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

cheese	N	Mean	Grouping
D	24	6.41800	A
E	24	6.27500	A
B	24	5.82888	A
C	24	5.79106	A
A	24	5.49626	A

Means that do not share a letter are significantly different

**Enterococcus sp.**

**Tukey Pairwise Comparisons: Response = Enterococcus, Term = cheese**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

cheese	N	Mean	Grouping
A	24	6.94323	A
E	24	6.94206	A
D	24	6.81493	A B
B	24	6.26554	B C
C	24	5.79888	C

Means that do not share a letter are significantly different.

**Apéndice IV. Cuantificación de ADN de los productos de PCR (amplificación de la región V3 del gen *16S rRNA*) de las muestras obtenidas durante la elaboración del queso Chihuahua.**

**Tabla I. 1. Cuantificación de ADN de los productos de PCR (amplificación de la región V3 del gen *16S rRNA*) de las muestras obtenidas durante la elaboración del queso Chihuahua. .**

Muestra	A 260	DNA (µg/mL)	Muestra	A 260	DNA (µg/mL)
LA1	0.484	1210	QC2	0.439	1097.5
CA1	0.415	1037.5	LC3	0.629	1572.5
CHA1	0.286	715	CC3	0.561	1402.5
QA1	0.336	840	CHC3	0.512	1280
LA2	0.484	1210	QC3	0.504	1260
CA2	0.376	940	LD1	0.441	1102.5
CHA2	0.344	860	CD1	0.522	1305
QA2	0.32	800	CHD1	0.49	1225
LA3	0.473	1182.5	QD1	0.541	1352.5
CA3	0.356	890	LD2	0.562	1405
CHA3	0.318	795	CD2	0.589	1472.5
QA3	0.33	825	CHD2	0.55	1375
LB1	0.464	1160	QD2	0.618	1545
CB1	0.397	992.5	LD3	0.631	1577.5
CHB1	0.402	1005	CD3	0.603	1507.5
QB1	0.324	810	CHD3	0.636	1590
LB2	0.406	1015	QD3	0.541	1352.5
CB2	0.4	1000	LE1	0.788	1970
CHB2	0.338	845	CE1	0.526	1315
QB2	0.355	887.5	CHE1	0.435	1087.5
LB3	0.458	1145	QE1	0.455	1137.5
CB3	0.422	1055	LE2	0.525	1312.5
CHB3	0.388	970	CE2	0.468	1170
QB3	0.417	1042.5	CHE2	0.432	1080
LC1	0.816	2040	QE2	0.307	767.5
CC1	0.683	1707.5	LE3	0.485	1212.5
CHC1	0.606	1515	CE3	0.745	1862.5
QC1	0.602	1505	CHE3	0.464	1160
CC2	0.523	1307.5	QE3	0.485	1212.5
CHC2	0.424	1060	Total : 59 muestras		

L, C, CH, Q = Leche, Cuajada, Chedarizado, Queso  
A-E= Queserías A-E 1; Otoño; 2, Invierno; 3, Verano

**Apéndice V. Cuantificación de ADN de los productos de PCR (amplificación de la región V3 del gen *16S rRNA*) de las muestras obtenidas durante la maduración del queso Chihuahua.**

**Tabla V. 1. Cuantificación de ADN de los productos de PCR (amplificación de la región V3 del gen *16S rRNA*) de las muestras obtenidas durante la elaboración del queso Chihuahua.**

Muestra	A 260	DNA (µg/mL)	Muestra	A 260	DNA (µg/mL)	Muestra	A 260	DNA (µg/mL)
QA1-30	0.328	820	QB3-30	0.41	305.3	QD2-30	0.259	224
QA1-60	0.253	632.5	QB3-60	0.26	312.8	QD2-60	0.253	316
QA1-90	0.807	12105	QB3-90	0.394	292.4	QD2-90	0.464	580
QA1-120	0.671	10065	QB3-120	0.39	292.5	QD2-120	0.249	423.3
QA1-150	0.597	8955	QB3-150	0.286	243.1	QD2-150	0.788	637.5
QA1-180	0.918	2295	QB3-180	0.411	349.35	QD2-180	0.541	352
QA1-270	0.86	10750	QB3-270	0.316	268.6	QD2-270	0.37	277.5
QA2-30	0.444	1110	QC1-30	0.528	475.2	QD3-30	0.378	283.5
QA2-60	0.47	1175	QC1-60	0.842	547.3	QD3-60	0.399	499
QA2-90	0.747	1867.5	QC1-90	0.665	498.75	QD3-90	0.524	393
QA2-120	0.887	15522.5	QC1-120	0.741	666.9	QD3-120	0.32	400
QA2-150	0.579	1447.5	QC1-150	0.182	227.5	QD3-150	0.515	335
QA2-180	0.583	1457.5	QC1-180	0.661	594.9	QD3-180	0.403	302.25
QA2-270	0.629	1572.5	QC1-270	0.231	288.75	QD3-270	0.191	239
QA3-30	0.256	217.6	QC2-30	0.418	418	QE1-30	0.328	278.8
QA3-60	0.843	2107.5	QC2-60	0.505	505	QE1-60	0.352	299.2
QA3-90	0.882	2205	QC2-90	0.385	481.25	QE1-90	0.34	221
QA3-120	0.854	2135	QC2-120	0.59	531	QE1-120	0.217	271.42
QA3-150	0.535	1337.5	QC2-150	0.168	210	QE1-150	0.958	502.95
QA3-180	0.512	1280	QC2-180	0.397	397	QE1-180	0.328	246
QA3-270	0.845	2112.5	QC2-270	0.288	244.8	QE1-270	0.535	401.25
QB1-30	0.744	483.6	QC3-30	0.22	275	QE2-30	0.325	211
QB1-60	0.26	221	QC3-60	0.885	885	QE2-60	0.253	0.316
QB1-90	0.478	406.3	QC3-90	0.664	664	QE2-90	0.55	0.358
QB1-120	0.154	130.9	QC3-120	0.476	476	QE2-120	0.931	698.25
QB1-150	0.46	347.3	QC3-150	0.364	309.4	QE2-150	0.599	389
QB1-180	0.243	206.55	QC3-180	0.57	570	QE2-180	0.522	339
QB1-270	0.567	481.95	QC3-270	0.622	622	QE2-270	0.33	247.5
QB2-30	0.465	395.25	QD1-30	0.857	642.75	QE3-30	0.626	469.5
QB2-60	0.401	340.85	QD1-60	0.367	275.25	QE3-60	0.511	332
QB2-90	0.408	306	QD1-90	0.526	394.5	QE3-90	0.331	352.75
QB2-120	0.28	378.25	QD1-120	0.545	408.75	QE3-120	0.611	397
QB2-150	0.298	253.3	QD1-150	0.85	637.5	QE3-150	0.545	354
QB2-180	0.66	492	QD1-180	0.356	267	QE3-180	0.555	416.25
QB2-270	0.412	350.2	QD1-270	0.505	378.75	QE3-270	0.648	486
<b>Total : 135</b>								

**Q = Queso 30, 60, 90, 120, 150, 180, 270 = Días de maduración**  
**A-E = Queserías A-E 1; Otoño; 2, Invierno; 3, Verano**

## 12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Cristina Sánchez Gamboa

Candidata para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: DIVERSIDAD Y DINÁMICA DEL MICROBIOMA DE BACTERIAS LÁCTICAS DEL QUESO CHIHUAHUA

Campo de estudio: Microbiología de alimentos.

Datos personales: Nacida en Chihuahua, Chihuahua el 28 de noviembre de 1986.

Educación: Egresada de la carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo y de la Maestría en Ciencias en Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua.

Experiencia profesional: trabajo con análisis microbiológico de alimentos; caracterización metabólica y molecular de bacterias lácticas; determinación *in vitro* de producción de compuestos antimicrobianos.