



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE  
HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

---

---

**CARACTERIZACIÓN DE LA MICROFLORA DEL QUESO TIPO  
OAXACA Y SU CAPACIDAD ANTIMICROBIANA**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**INGENIERO EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

**P.D.I.A: EMILIA LARIOS CRUZ**

DIRECCION: Dra. IRMA CARO CANALES  
ICAP, UAEH

CODIRECCIÓN: Dr. JAVIER MATEO OYAGÜE  
UNIVERSIDAD DE LEON, ESPAÑA

TULANCINGO DE BRAVO, HIDALGO. Mayo 2007

# DEDICATORIAS

*Gracias a ti mamita por haberme dado la vida, y por toda esa ayuda incondicional que me has brindado durante todo el transcurso de mi estancia en la universidad.*

*Mamita te quiero mucho, gracias por haber hecho de mi una mujer de bien, la promesa que te hice, (Maria Elena Cruz Nochebuena) la he cumplido, debo continuar en el sendero de la vida, el camino es largo y siempre necesitare de tus sabios consejos te amo mamá.*

*A mis niñas preciosas, con las que he compartido mis triunfos y fracasos (mis lindas y queridas hermanitas: Hortensia y Sara).*

*A ti, hermanita Hortensia, gracias por haberme ayudado a que esta tesis se concluyera, gracias por todo lo que has hecho por mí, te quiero mucho.*

*A ti mi tierna y linda hermanita (mi pequeña hija Sara) gracias por el apoyo moral que me has brindado, y por escucharme, cuando decía, hija mía, ya no puedo continuar, siempre me diste aliento de llegar hasta el final, hoy con mucho orgullo puedo decirte mi querida hija eh terminado de estudiar. Te quiero mucho mi pequeña preciosa.*

*A ti hijo mió gracias por compartir buenos y malos momentos, se que aun estas pequeño y quizá en algún momento de tu vida no me supiste comprender, pero tu formas parte de mi corazón y de mi linda familia te quiero mucho mi pequeño ramón.*

*Saben mis pequeños hijos (Hortensia, Sara y Ramón) estoy orgullosa de ustedes porque a pesar de ser menores de edad, y mas aun menores que yo, tuvieron el valor de irse a otro país en busca de mejores oportunidades, dios me los cuide y los bendiga siempre, los amo y los extraño mucho.*

*Para una persona muy especial que llevo a mi vida, en un momento difícil, porque tenia que dejar la universidad por falta de recursos económicos, apareció El, mi ángel convertido en amigo que me brindo su apoyo moral y una ayuda incondicional que no esperaba. El mi gran amigo, siempre me escucho y me dio ánimos de continuar en el camino, en un tiempo corto nos convertimos en los mejores amigos, ambos compartíamos una gran amistad, pero poco a poco nuestra amistad se convirtió en amor, me enamore de El, por su forma de ser, es una muy buena persona, siempre sonrío aunque los tiempos sean adversos, El es el ser mas lindo, tierno y cariñoso que he conocido, El es mi gran amor, su nombre es **Milton González**, te amo mi amor gracias por todo el apoyo incondicional que me has dado, Tu formas parte fundamental de mi vida, y en todo lo que realizo estas "Tu". Con mucho amor y cariño esta tesis va dedicada para ti, te amo mi papito lindo.*

*Te amo se que ahora no podemos estar juntos, pero aquí te esperare, el tiempo que sea necesario, hasta que podamos estar juntos. Te extraño mucho, mi más sincero agradecimiento por todo el apoyo económico y moral que me has brindado. Te amo dios bendiga nuestro amor.*

*A ti papá, a pesar de todo eres mi padre, tu le dices a mi mamá que no te quiero, que pareciera que te odió, no es así, muy en el fondo de mi corazón si te quiero. Señor Félix Larios Mérida.*

*A mis amigas (Adabella Suárez, Nadia Cruz, Diane Muñoz, Yaquelin Ortiz, Isabel Sampayo, Lorena García y Paola Soto). Gracias por todo el cariño y apoyo moral que me han brindado y por el tiempo que hemos compartido juntas.*

*Gracias Adabella por soportarme todo este tiempo, siempre has estado conmigo en las buenas y en las malas, gracias por escucharme y enseñarme a ver la vida de diferente manera. Te quiero mucho.*

*A la familia Olivares en especial a Angélica Olivares Reyes, a la señora Dalinda Reyes y su esposo el señor Enrique Olivares por haberme brindado su apoyo, especialmente por darme un lugar en su casa, yo nunca los traicione al dejar a su hija, yo la quiero mucho, y también a ustedes, solo que entre nosotras se perdió la comunicación sentí que para ella ya no era buena compañera y amiga y fue por eso, que decidí alejarme, **gracias** por todo lo que hicieron por mi.*

# AGRADECIMIENTOS

*A dios por haberme permitido terminar mis estudios en la universidad, porque para mi era algo imposible pues tenia que trabajar para solventar mis estudios, gracias a ti padre eterno nunca me faltó trabajo, ni personas que me tendieran la mano cuando mas necesitaba, gracias mi dios porque para mi si existes porque yo existo.*

*A la Doctora Irma Caro Canales por todo su apoyo moral y por sus conocimientos compartidos en esta tesis, gracias Irma por todo el tiempo que me has dedicado, y por la confianza que me has brindado.*

*Al Doctor Javier Mateo Oyaqüe por todo el tiempo que dedico para que esta tesis pudiera concluirse, gracias por todo el apoyo que me brindo, y por la confianza que deposito en mí.*

*A la Doctora Maria del Rosario García Armesto, de la Universidad de León España por su colaboración y apoyo en la realización de esta tesis.*

*A LOS INTEGRANTES QUE CONFORMAN LA COMISIÓN REVISADORA DE ESTA TESIS*

*A la Dra. Rosa Haydeè Alfaro, al M en C. Sergio Soto, al Dr. Juan Francisco Hernández, al Dr. Rafael Campos, al Dr. Martín Meza, por su colaboración y su tiempo que dedicaron en la revisión de esta tesis **muchas gracias***

*A mis compañeros que conformamos la **primera generación de Ingeniería en alimentos: Adabella Suarez, Rafael Cruz, Julián Bautista y Martín Pérez***

Parte de esta tesis de licenciatura ha sido financiada a través del proyecto PROMEP/103.5/04/2759 "Caracterización de diversos Quesos Mexicanos con especial atención a los elaborados en el Valle de Tulancingo Hidalgo.

Se le agradece al Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la UNIVERSIDAD DE LEÓN (España) por su colaboración y financiamiento de una parte de este trabajo.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	iii
<b>RESUMEN</b>	iv
<b>I INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II OBJETIVO</b>	3
<b>III REVISIÓN DE LITERATURA</b>	4
3.1 Definición de los quesos de pasta filata	4
3.2 Definición del queso tipo Oaxaca e importancia de este queso en la región	4
3.3 Antecedentes de la Producción	5
3.4 Microbiología de los quesos	7
3.5 Microbiología de los quesos de pasta filata	9
3.6 Las bacterias ácido lácticas	11
3.6.1 Generalidades	11
3.7 Identificación de bacterias lácticas	12
3.8 Actividad Antimicrobiana de las Bacterias ácido lácticas (BAL)	15
<b>IV MATERIALES Y METODOS</b>	19
4.1 Toma de muestras	19
4.2 Recuentos de Bacterias Ácido Lácticas (BAL)	19
4.2.1 Preparación de la muestra	19
4.2.2 Recuento de las BAL	19
4.3 Aislamiento	20

4.4	Pruebas de pre-caracterización de las presuntas BAL	20
4.4.1	Prueba de Gram usando KOH	20
4.4.2	Determinación de la catalasa	20
4.4.3	Determinación de la citocromo oxidasa	21
4.4.4	Observación morfológica al microscopio	21
4.4.5	Actividad hemolítica	22
4.4.6	Determinación de la actividad gelatinasa	22
4.5	Identificación bioquímica por el sistema Vitek	23
4.5.1	Pruebas complementarias a la identificación bioquímica por el sistema Vitek	23
4.5.2	Crecimiento en una solución de NaCl al 6.5%	24
4.5.3	Fermentación del piruvato	24
4.5.4	Movilidad a 30°C	24
4.6	Identificación de las cepas microbianas por Ribotipado	25
4.7	Determinación de la actividad antimicrobiana	26
V.	<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	27
5.1	Recuentos de presuntas bacterias ácido lácticas en Agar MRS	27
5.2	Pre-caracterización de bacterias aisladas del queso tipo Oaxaca	28
5.3	Identificación de bacterias ácido lácticas por el sistema Vitek	28
5.4	Perfiles bioquímicos de las presuntas BAL aisladas del queso tipo Oaxaca detectados en el sistema Vitek	32
5.5	Identificación de bacterias ácido lácticas mediante la técnica de Ribotipado	36
5.6	Resumen de identificación obtenido por la técnica de Ribotipado	42

5.7	Adscripción a especie de las bacterias aisladas en el queso tipo Oaxaca	44
5.8.	Actividad antimicrobiana de algunas cepas aisladas del queso tipo Oaxaca	46
VI	<b>CONCLUSIONES</b>	49
VII	<b>ANEXOS</b>	51
	<b>Anexo 1.</b> Bacterias que se encuentran recogidas en la base de datos del sistema Vitek	51
	<b>Anexo 2.</b> Pruebas bioquímicas obtenidas en las tarjetas GPI	53
	<b>Anexo 3.</b> Test complementarios (GPI) para obtener una identificación a nivel especie	56
	<b>Anexo 4. Bacterias Ácido Lácticas que se Encuentran Recogidas en la Base de Datos del Ribotipado</b>	57
VIII	<b>LITERATURA CITADA</b>	61

## ÍNDICE DE TABLAS

Numero de tabla		Pág.
1	Composición Físico-química (%), pH y aw del queso tipo Oaxaca elaborado en el Estado de Hidalgo	5
2	Recuentos de los principales grupos microbianos del queso tipo Tipo Oaxaca (Log ufc/g)	8
3	Recuento en Agar MRS (Log ufc/g) de quesos tipo Oaxaca elaborado artesanalmente	27
4	Precaracterización de bacterias aisladas en Agar MRS a partir de queso tipo Oaxaca elaborado con leche cruda	28
5	Pruebas de caracterización e identificación de las cepas Gram positivas, catalasa negativas y oxidasa negativas aisladas en Agar MRS a partir de quesos tipo Oaxaca elaborados con leche cruda, pruebas preliminares, resultados de la identificación del sistema Vitek y pruebas complementarias #.	30
6	Perfiles bioquímicos de los distintos bionúmeros detectados en el Sistema Vitek	34
7	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 53043010000	37
8	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77361220600	37
9	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77367630400	37
10.	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 76345634210	38
11	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77365630600	38
12	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77341020400	38
13	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 76141000000	38
14	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 76141020400	39
15	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 76141020410	39
16	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 74141000010	39

<b>17</b>	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77347320410	39
<b>18</b>	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 76341220400	40
<b>19</b>	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 75367430400	40
<b>20</b>	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77777731700	40
<b>21</b>	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77365630400	40
<b>22</b>	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77347230600	41
<b>23</b>	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77367731510	41
<b>24</b>	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77347221510	41
<b>25</b>	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 75141000400	41
<b>26</b>	Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77341230410	42
<b>27</b>	Resultados resumidos de los análisis de identificación obtenidos mediante el Ribotipado* para cepas pertenecientes a aquellos bionúmeros que presentaron una fiabilidad de identificación del sistema Vitek inferior al 95%	44
<b>28</b>	Adscripción a especie de las cepas bacterianas aisladas en Agar MRS de muestras de queso tipo Oaxaca elaborado con leche cruda (identificadas en el sistema Vitek $\geq$ (95%), y el Ribotipado $\geq$ (85%))	45
<b>29</b>	Actividad antimicrobiana de algunas cepas aisladas en Agar MRS a partir de queso tipo Oaxaca frente a diversos microorganismos patógenos	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>		<b>Pág.</b>
<b>1</b>	Diagrama de Flujo de Elaboración del Queso Tipo Oaxaca	<b>6</b>

## RESUMEN

En la región del valle de Tulancingo se procesan aproximadamente 219 millones de litros de leche al año en más de 56 queserías; el producto que más se fabrica es el queso tipo Oaxaca, perteneciente a la familia de quesos de pasta filata. La mayoría de los quesos tipo Oaxaca se elaboran con leche cruda.

Actualmente se desconoce la microflora del queso tipo Oaxaca elaborado con leche cruda, no existen estudios al respecto, por lo que se considera de gran importancia saber que bacterias ácido lácticas conforman el mencionado queso para conocer su calidad, así como para proponer cultivos iniciadores.

En este trabajo se estudiaron quesos elaborados con leche cruda provenientes de 8 industrias diferentes, aislándose un total de 160 cepas utilizando como medio de cultivo MRS. Posteriormente a estas cepas se les hizo pruebas de Gram, catalasa, oxidasa con objeto de seleccionar las presuntas bacterias ácido lácticas (BAL), obteniéndose 79 cepas que poseían las siguientes características (Gram +, catalasa – y oxidasa –).

Para identificar las presuntas cepas de BAL a nivel especie se llevaron a estudiar al Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León (España), en donde a las cepas se les determinaron pruebas bioquímicas utilizando el Sistema Vitek en combinación con las tarjetas para la identificación de microorganismos gram positivos (GPI).

Las 79 cepas aisladas fueron adscritas por el Sistema Vitek a las siguientes especies; *Streptococcus equinus* (29%), *Enterococcus durans* (14%), *E. faecium* (6%), *E. gallinarum* (3%), *S. mitis* (1%). Sin embargo, el 47% de las cepas aisladas no pudieron ser adscritas a ninguna especie por este sistema de identificación. Por este motivo, se decidió utilizar una técnica genética, el Ribotipado, para la identificación de las mismas. Con la mencionada técnica, el 52% de las cepas no identificadas se

adscribieron al género *Lactobacillus*, en concreto a las especies *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei*, *subsp. paracasei*.

Finalmente, el 34% de las cepas analizadas no fueron identificadas por ninguna de las dos técnicas utilizadas en este estudio.

Este estudio muestra un perfil característico de las bacterias ácidos lácticos del queso Oaxaca elaborado en el Estado de Hidalgo con leche cruda.

## SUMMARY

In the Mexican region of 'Valle de Tulancingo' approximately 219 million liters of milk per year are processed in more than 56 cheese local factories; the most popular product being Oaxaca cheese, which is a cheese belonging to the filata paste cheese family and made in most cases from raw milk.

At the moment the microbiology of raw milk Oaxaca cheese has scarcely been studied. Specially, it is considered of great importance the knowledge about the lactic acid bacteria (LAB) in the mentioned cheese in order to know its quality, as well as to a further development of starter cultures for be used in pasteurized-milk Oaxaca cheese elaboration.

In this work, raw milk cheeses originating from 8 different industries were studied. A total counts in MRS agar were obtained and 160 strains were isolated from the MRS plates. These isolates investigated with the Gram, catalase and oxidase tests in order to select the presumptive LAB, obtaining 79 isolates showing the expected characteristics (Gram +, catalasa - and oxidasa -). To identify the presumptive LAB isolated at species level they were studied in the Department of Hygiene and Technology of Foods of the 'Universidad de Leon' (Spain), where the biochemical characteristics of the strains were determined using the Vitek System equipped with cards for the identification of positive microorganisms gram (GPI). The 79 isolated stocks were assigned by the Vitek System to the following species: *Streptococcus equinus* (29%), *Enterococcus durans* (14%), and *faecium* (6%), and *gallinarum* (3%), *S. mitis* (1%). Nevertheless, 47% of the isolated stocks could not be assigned to any specie by this system of identification. For this reason, it was decided to use a genetic analysis, the Ribotyping, for the identification of the unidentified strains. With Ribotyping, 52% of the tested strains were assigned to the genus *Lactobacillus*, specifically to *L. plantarum* and *L. paracasei*, supsb. *paracasei*. A total of 34% of the presumptive LAB strains isolated from the cheese were not identified by any of the two techniques. This study shows a characteristic profile of the LAB in the raw milk Oaxaca cheese made in the State of Hidalgo.

### I. INTRODUCCIÓN

El queso es un alimento nutritivo y versátil que juega un papel importante en una dieta saludable. Aunque el consumo de los productos lácteos en todo el mundo esta en descenso, el queso es una excepción esto puede ser debido a diversas causas; i) los beneficios que otorga el queso para la salud, ii) a la variedad de quesos que existen en el mundo – más de 600 variedades – y iii) a la gran aceptabilidad de este como ingrediente en la industria de la hostelería y culinaria, (O'Connor y O'Brien, 2000).

En la región del valle de Tulancingo, se procesan aproximadamente 800 mil litros de leche al día para la elaboración de quesos (Comisión Estatal de la Leche, 2006). En esta región se elabora una gran diversidad de productos lácteos, principalmente el queso denominado tipo "Oaxaca". Sin embargo la elaboración de este queso se lleva a cabo de forma empírica, ya que la mayoría de las empresas que fabrican los quesos son de tamaño pequeño a mediano (2000 y 30,000L) esta circunstancia ha ocasionado diversos problemas; i) una baja tecnificación de las industrias lácteas de la región ii) una falta de cumplimiento con las normas sanitarias establecidas y ii) en ocasiones un uso inadecuado de aditivos, (Caro, comunicación personal).

El queso tipo Oaxaca es un queso que pertenece a la familia de los quesos de pasta "hilada" en cuyo proceso de fabricación, la pasta se acidifica hasta alcanzar un pH cercano a 5.2-5.4. Este pH permite la formación de las correas y trenzado de las mismas, características distintivas del queso tipo Oaxaca, (Palacios, 2006).

La acidificación del queso tipo Oaxaca en la mayoría de las industrias lácteas de la región se lleva acabo mediante una acidificación láctica espontánea (que no se utilizan cultivos lácticos comerciales), provocando, por un lado, una

mala calidad del queso y por otro lado, una proliferación de bacterias patógenas.

La falta del uso de los cultivos lácticos comerciales se debe a que estos, son una mezcla de bacterias ácido lácticas (BAL) que no tienen las aptitudes tecnológicas – capacidad de acidificación y formación de las correas – necesarias para la elaboración de este queso, provocando una fusión “apelmazamiento” de las correas y una disminución de la calidad del queso, (Caro, comunicación personal).

Actualmente y de acuerdo a la bibliografía consultada no existen trabajos sobre la identificación de las especies de BAL aisladas en quesos mexicanos, más aún de las especies de bacterias ácido lácticas presentes en el queso tipo Oaxaca.

Una de las principales razones de este estudio es identificar las BAL presentes en este queso. Por otra parte conocer la capacidad antimicrobiana de las BAL presentes en el queso tipo Oaxaca frente a diversos patógenos – *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua* y *Bacillus cereus*.

## **II.OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO**

Identificar las bacterias ácido lácticas aisladas de quesos artesanales tipo Oaxaca, elaborados en el Valle de Tulancingo Hidalgo.

### III. REVISION DE LITERATURA

#### 3.1.- Definición de los Quesos de Pasta Filata

Los quesos de pasta filata se distinguen por el proceso, el cual incluye un tratamiento de amasado de la cuajada con agua caliente una vez que fue acidificada. Este tratamiento convierte a la cuajada en una masa fundida que después de ser estirada adquiere su textura (Fox *et al.*, 2000). Los quesos de pasta filata son muy populares en varios países de Europa Mediterránea y Latinoamérica, incluyéndose quesos de pastas blandas o semi-blandas, dentro de las cuales el queso Mozzarella o el Scarmorze, siendo el primero el más popular en el ámbito mundial, y semiduras o duras en las que el queso se ha sometido a una larga maduración, como el Caciocavallo o el Provolone (Franco, 1998).

#### 3.2.- Definición del Queso Tipo Oaxaca e Importancia de este Queso en la Región

El queso Oaxaca es conocido solo en México y se fabrica en todo el país, se conoce con otros nombres como son: quesillo, queso de hebra y queso asadero, aunque no está claro si son o no variedades diferentes. Pertenece a la familia de quesos de pasta filata, en donde su tecnología o proceso de elaboración la pasta se acidifica para obtener un pH de 5.3 a 5.2 en cuyo proceso se moldea y se le da forma. El moldeado se hace en forma de correas mediante estiramiento de la cuajada aún caliente y se trenzan, como se puede observar en el diagrama de flujo del queso tipo Oaxaca (Figura 1).

En Tulancingo varias fábricas se dedican a la producción de queso Oaxaca, es difícil contarlas y aún con mayor dificultad evaluar su volumen de producción, su mercado y su rentabilidad, la mayoría de las producciones de queso Oaxaca, se elabora con leche cruda. La secretaria de salud “acepta” al queso Oaxaca

elaborado con leche cruda como “queso pasteurizado” tomando en cuenta que se emplea agua caliente para el fundido de la pasta (malaxado), (Silva, 1991). La composición físico química del queso tipo Oaxaca se muestra en la Tabla 1 (García, 2006).

Tabla 1. Composición físico-química (%), pH y  $a_w$  del queso tipo Oaxaca elaborado en el Estado de Hidalgo.

Características físico-químicas	Media $\pm$ DE
Humedad	50.82
Materia Grasa	22.4
Proteína	21.3
Cenizas	3.6
Lactosa	0.1
pH	5.02
$a_w$	0.973

(García -Islas 2006)

$a_w$ : actividad de agua

En la región del valle de tulancingo se procesan 219 millones de litros de leche al año en más de 56 queserías, el producto que mas se elabora es el queso tipo Oaxaca, la producción de este queso es de forma artesanal, y la calidad del producto es heterogénea dependiendo de la calidad de la leche (SAGARPA, 2003).

### **3.3.- Antecedentes de la Producción**

El objetivo básico de la elaboración de los quesos es prolongar la vida de anaquel y conservar los componentes nutritivos de la leche. Y tras la coagulación de la leche y corte del coágulo, los procesos de calentamiento en tina y agitación, unidos a la acidificación, promueven la sinéresis del suero de los granos de cuajada (Walstra *et al.*, 2001).

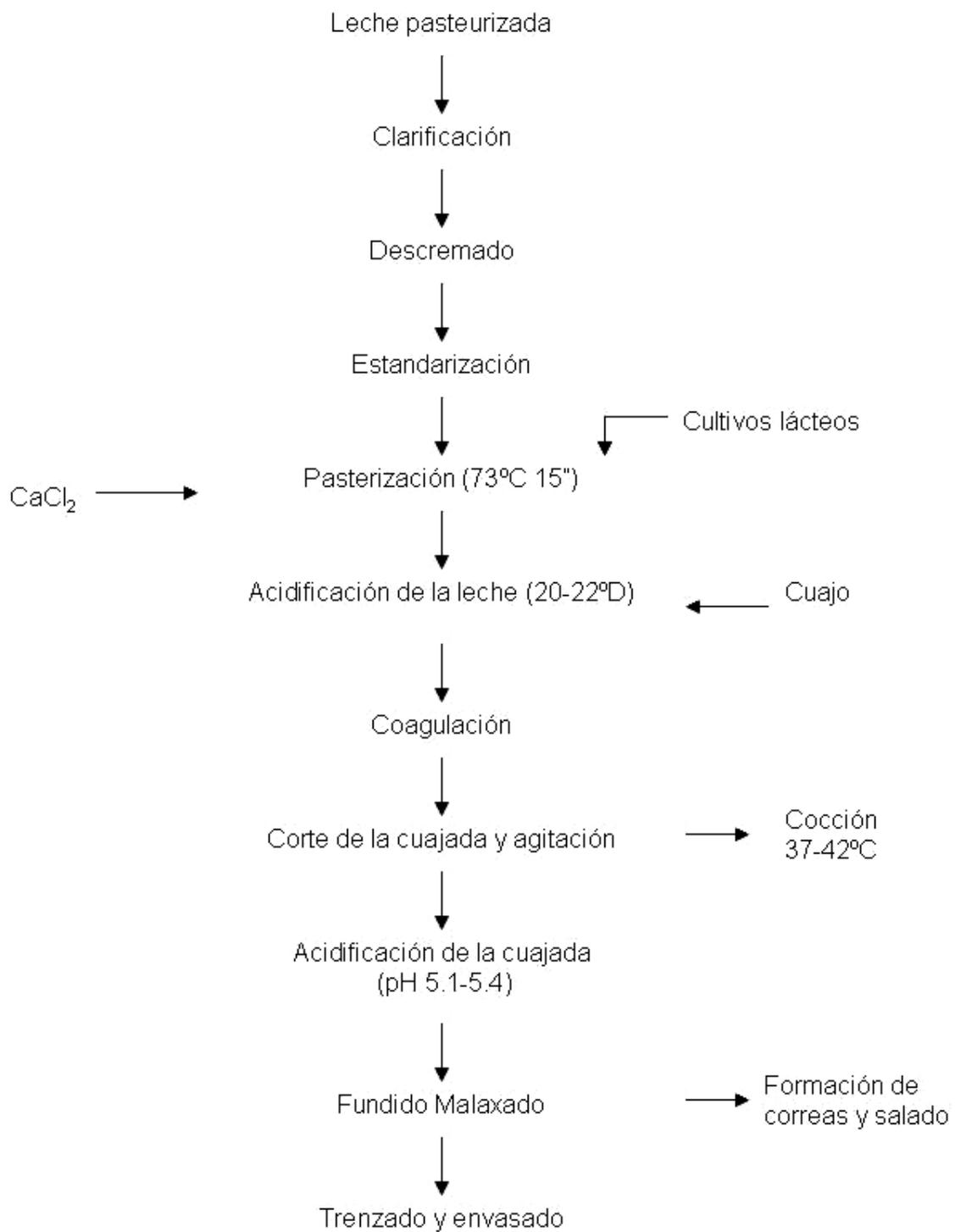


Figura 1. Diagrama de Flujo de Elaboración del Queso Tipo Oaxaca

### 3.4.- Microbiología de los Quesos

La microflora de la leche a temperatura ambiente produce de forma espontánea ácido láctico, siendo esta acidificación el comienzo del proceso de elaboración de la mayoría de los quesos elaborados con leche cruda. Cuando se usa leche pasteurizada, gran parte de la microflora se destruye por el calor y por este motivo se agregan cultivos iniciadores acidificantes (BAL) para que produzcan el decremento del pH.

El queso es un ecosistema en cambio continuo tanto en cuanto a los factores externos de conservación-maduración como a los intrínsecos como la composición y la microbiología. El queso contiene elevados contenidos microbianos que juegan un papel importante en sus características de calidad (Cogan, 2000).

En el queso se producen reacciones bioquímicas e interacciones microbianas, la presencia de las bacterias en los quesos depende de la contaminación microbiana de la leche, la acidificación de la misma previa a la elaboración del queso, los tratamientos térmicos de la leche, el uso de cultivo iniciador, las condiciones del proceso, principalmente en cuanto a tiempos, temperaturas y condiciones higiénicas. La investigación en quesería se ha enfocado en desarrollar tecnología designada a controlar el crecimiento microbiano y sus efectos en la calidad del queso (Peláez y Requena, 2005).

Como se ha mencionado anteriormente los quesos se pueden elaborar con leche cruda, en cuyo caso la flora presente es la que llega a la leche del ambiente y se desarrolla en la misma. También se pueden elaborar con leche pasteurizada, en cuyo caso, la microflora del queso puede ser dividida en 2 grupos: flora ácido láctica utilizada como *estárter* y flora secundaria, que consiste en flora resistente a la pasteurización que llegó a la leche del medio ambiente (Beresford *et al.*, 2001).

Las poblaciones microbianas en el queso son más complejas, en los quesos elaborados con leche cruda, que en los de leche pasteurizada lo que hace que los quesos sean diferentes (Grappin y Beuvier, 1997). La diversidad microbiana que exista en un determinado queso, así como la interacción entre las poblaciones microbianas es uno de los principales factores que contribuyen al *flavor*, por medio de la producción de sustancias sápidas y aromáticas fruto del desarrollo microbiano, y a la textura del queso, por medio de la acidificación y la producción de exopolisacáridos (Leroy y De Vuyst, 2004; Peláez y Requena, 2005).

De acuerdo a la bibliografía consultada al momento de la realización de este trabajo, la microbiología del queso Oaxaca ha sido poco estudiada. Recientemente (Palacios, 2006) realizó un estudio microbiológico del queso tipo Oaxaca proveniente de diversas empresas del Valle de Tulancingo Hgo. Este estudio muestra una elevada cantidad de FAPV y BAL (Tabla 2), lo que indica que el proceso del queso tipo Oaxaca elaborado con leche cruda se lleva a cabo mediante una fermentación láctica.

Tabla. 2 Recuentos de los principales grupos microbianos del queso tipo Oaxaca (Log 10 ufc /g)

Grupo microbiano	Media±DE
FAMV	7.63 ±0.76
FAPV	6.78 ±0.91
BAL	6.52 ±0.85
M Y L	4.82 ± 2.52
Coliformes	4.08 ±1.41
<i>E. coli</i>	3.61 +/-1.21

(Palacios-Vargas 2006)

FAMV: flora aerobia mesofila viable  
 FAPV: flora aerobia psicrotrofa viable  
 BAL: bacterias ácido lácticas  
 M y L: Mohos y Levaduras  
 DE: Desviación estándar

### 3.5.- Microbiología de los Quesos de Pasta Filata

La microflora de los quesos de pasta filata ha sido descrita en diversos trabajos, los autores dejan muy claro los siguientes aspectos.

- En primer lugar, los recuentos de microflora total en el día de elaboración del queso suelen ser bajos (del orden de  $10^5$  ufc/g) debido presumiblemente al proceso de malaxado (Kindstedt, 1993) que implica un calentamiento de la cuajada durante varios minutos a temperaturas que varían entre los 50-70°C. No obstante una cantidad considerable de microorganismos mesófilos y termófilos soportan este tratamiento térmico y son los más importantes en definir la evolución de las características del queso durante su maduración.
- En segundo lugar, la microflora predominante en los quesos de pasta filata evoluciona y varía considerablemente a medida que transcurre el tiempo de maduración de los quesos (Villani *et al.*, 1991). En quesos de pasta filata madurados se observa un incremento de las BAL asociado a un aumento relativo, o proporción, en el número de lactobacilos (Papademas y Robinson, 2000; Gobbetti *et al.*, 2002; Piraino *et al.*, 2005).
- En tercer lugar, la producción de quesos de pasta filata puede estar basada en la pasteurización y el uso de una mezcla de cultivos iniciadores seleccionados, normalmente termófilos (Oberg *et al.*, 1991) (estos cultivos conducen a una baja variabilidad en la microflora de estos quesos). Otra forma es el empleo de leche cruda acidificada espontáneamente. O alternativamente el uso de leche cruda o pasteurizada a la que se inocula (aproximadamente un 10%) suero de un lote del día anterior o leche fermentada espontáneamente en donde han crecido microorganismos no seleccionados (en este caso, existe en el queso una mezcla compleja de microorganismos, cuya composición depende de numerosos factores ambientales como temperaturas de incubación del suero o leche, pH,

interacciones microbianas, etc., siendo la población dominante la de las bacterias ácido lácticas) (Parente *et al.*, 1998; Coppola *et al.*, 2001).

Es importante considerar que el uso de leche cruda en la fabricación de quesos frescos o de corta maduración no está permitido y está asociado a un riesgo para la salud. La desventaja de usar las dos últimas opciones respecto a la calidad del queso es que la población microbiana y las características de calidad del queso asociadas a dicha población pueden sufrir variaciones importantes entre lotes difíciles de predecir, pero por otra parte, las cepas seleccionadas naturalmente son resistentes a fagos e incluso pueden mostrar actividad antimicrobiana (Parente *et al.*, 1998).

La microflora del queso Mozzarella ha sido descrita en varios trabajos científicos. Morea *et al.*, (1999) encontraron en un queso Mozzarella fresco elaborado con leche cruda inoculada con un 10% de suero crudo fermentado a 18°C procedente de un lote de quesos del día anterior, que la microflora estuvo compuesta por cepas pertenecientes a los géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Staphylococcus* y *Enterococcus*.

Morea *et al.*, (1998) demostraron que los lactobacilos no forman parte de la flora dominante de los quesos Mozzarella frescos pero juegan un papel importante en la calidad de los mismos, primero por su función en la acidificación de la leche y segundo por su función durante la maduración. También señala que los principales lactobacilos detectados en este queso fueron heterofermentativos, identificando, mediante perfiles genéticos, un total de 11 cepas distintas en su estudio.

En los trabajos mencionados, los autores coinciden en detectar en quesos Mozzarella elaborados sin adición de cultivos iniciadores seleccionados la presencia dominante de cepas de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Coppola *et al.*, 2001; Morea *et al.*, 1998; De Angelis

*et al.*, 2006). También en otros quesos de pasta filata como el Caciocavallo (Del Prato, 1996; Gobbetti *et al.*, 2002; Piraino *et al.*, 2005) o el Halloumi (Papademas y Robinson, 2000) se han encontrado bacterias de estos géneros como predominantes.

Considerando todos los trabajos revisados, algunas de las especies más repetidas y con mayor presencia fueron *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. parabuchneri*, *L. helveticus*, *Enterococcus faecalis*, *E. durans*, *E. faecium*, etc. Las especies bacterianas identificadas en los trabajos anteriormente comentados suelen estar comprendidas entre 5 y 15, con uno o varios biotipos dentro de cada especie, y pertenecen normalmente a los géneros *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*, y muchas de las cepas mostraron elevada termorresistencia, como era de esperar en quesos en cuyo proceso ha tenido lugar un paso de malaxado con agua caliente (Mateo, J. comunicación personal).

### **3.6.- Las Bacterias Acido Lácticas**

#### **3.6.1.- Generalidades**

El queso elaborado con leche cruda o pasteurizada los grupos microbianos con mayor presencia o mayor interés tecnológico en los quesos son las BAL. El concepto de BAL como grupo de microorganismos se desarrolló a principios del siglo XX.

Las primeras definiciones se basaron en la habilidad de fermentar y coagular la leche, lo cual incluía a los coliformes. Posteriormente, se restringió a los Gram positivos. De acuerdo con Orla-Jensen (1919) citado por Stiles y Holzapfel (1997) las verdaderas BAL son un grupo natural de bacterias Gram positivas, no móviles, que no forman esporas, con forma de bacilos o cocos, que fermentan los carbohidratos y alcoholes de más de 3 átomos de carbono para formar principalmente ácido láctico, (Konings *et al.*, 2000).

Su hábitat lo constituyen tanto sustratos de origen animal como vegetal (Temmerman *et al.*, 2004). Aunque son 11 los géneros de BAL asociados a los alimentos: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Stiles y Holzapfel, 1997), los principales géneros del grupo de las BAL presentes en el queso son los lactococos, lactobacilos, leuconostoc, enterococos y estreptococos Klaenhammer *et al.*, (2002), cada una de los cuales posee una morfología y unas características bioquímicas determinadas (Sneath *et al.*, 1986).

Según Konings *et al.*, (2000), las BAL son agentes implicados en la fermentación de numerosos alimentos, muchas de ellas pueden crecer en condiciones elevadas de presión osmótica, utilizan proteínas de la matriz alimentaria como fuente de aminoácidos, por lo que son proteolíticas en mayor o menor medida, experimentan un proceso de lisis celular cuando el medio de crecimiento no es adecuado liberando enzimas en las matrices alimentarias y son susceptibles al ataque de fagos.

### 3.7.- Identificación de Bacterias Lácticas

Debido a su uso en la industria alimentaria la caracterización metabólica, parámetros de crecimiento, resistencia a los procesos industriales, de las bacterias lácticas ha sido muy completa (Temmerman *et al.*, 2004).

En las últimas décadas se ha puesto especial interés a la correcta identificación de las mismas, existiendo un amplio rango de técnicas destinadas a este cometido. La mayoría de las técnicas requieren de un medio adecuado de aislamiento, dentro de las técnicas que requieren de aislamiento previo en cultivos están las técnicas fenotípicas (características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas y perfiles proteicos) y genotípicas (PCR con uso primers específicos, determinación de secuencias de genes como 16S rDNA, uso de enzimas de restricción, (Temmerman *et al.*, 2004).

Respecto a los sistemas de identificación fenotípicos basados en la caracterización bioquímica se pueden hacer mediante una secuencia de pruebas individuales de utilización, o crecimiento en medios con presencia, de unos determinados compuestos, o se puede realizarse una serie de pruebas bioquímicas simultáneas con métodos miniaturizados comercializados (API, BIOLOG, Vitek).

Las pruebas de caracterización bioquímica en general son técnicas más baratas comparadas con las genotípicas. Estas técnicas ofrecen un resultado de discriminación a nivel de género y a veces de especie. Son útiles para la identificación de ciertas BAL, pero puede haber cepas que presenten fenotipos similares que no correspondan con genotipos relacionados.

Así mismo, a veces ofrecen resultados ambiguos y en el caso de realizar pruebas de forma individual llevan mucho tiempo de trabajo. Respecto a las pruebas basadas en la proteómica, utilizando la técnica como la electroforesis, se ha observado que es un método confiable para la identificación de BAL (Temmerman *et al.*, 2003), pero su mayor inconveniente es la carga de trabajo que representa y que no discrimina entre subespecies (por ejemplo entre el grupo de *Lactobacillus acidophilus*: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. johnsonii* y *L. gasserii*).

Por los inconvenientes de los métodos fenotípicos anteriormente mencionados y dado el desarrollo de las técnicas basadas en la genética, en los últimos años la identificación de BAL ha sido orientada hacia los métodos genotípicos, los cuales proporcionan métodos de clasificación y discriminación más robustos que los anteriores, pudiendo llegar a discriminar entre especies, e incluso entre cepas (McCartney, 2002).

Muchas técnicas genotípicas están basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que amplifica determinados fragmentos de DNA

mediante el uso de primers. Los primers más utilizados para detectar la presencia de una determinada BAL son secuencias específicas del gen 16S rDNA, específicas para diferentes especies de BAL (Temmerman *et al.*, 2004). Si se requiere identificar una cepa de BAL desconocida es útil la secuenciación de los genes 16S rDNA y su comparación (similitud) – mediante algoritmos de búsqueda como el BLAST o el FASTA –, con secuencias de esos fragmentos almacenadas en bases de datos, que recogen las secuencias de múltiples BAL previamente analizadas. (EMBL:<http://www.ebi.ac.uk/embl>; Genbank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

El uso de enzimas de restricción es otro método genotípico desarrollado y utilizado para la identificación de bacterias lácticas. Las enzimas de restricción específicas rompen el DNA en fragmentos específicos que dependen de la cepa que se esté analizando. También la amplificación por PCR aleatoria, es decir sin primers específicos, amplificación polimorfa de DNA al azar (RAPD) es otra técnica muy usada y útil para identificación de BAL, en la que se amplifican fragmentos determinados para cada BAL determinada, por lo que al igual que en la técnica anterior hay perfiles diferentes para BAL diferentes.

El Ribotipado es un método que permite identificar y clasificar las bacterias en función de los genes del RNA ribosomal, esta técnica combina el uso de enzimas de restricción con la detección de los fragmentos resultantes mediante sondas rDNA, también se ha utilizado para la identificación de BAL (Lyhs *et al.*, 2002). El poder de discriminación de esta técnica depende en gran medida del tipo de enzimas de restricción y de las sondas de rDNA utilizadas. Finalmente, otras técnicas utilizadas para la identificación de BAL son las basadas en la hibridación DNA-DNA o en la caracterización de DNA plasmídico.

### 3.8.- Actividad Antimicrobiana de las Bacterias ácido lácticas (BAL)

La fermentación como medio de conservación de los alimentos se ha usado desde tiempos prehistóricos. En gran parte de los alimentos fermentados el punto clave o fundamental es el paso de los azúcares a ácido láctico llevado a cabo por las BAL.

Las BAL, además de ácido láctico pueden producir cantidades apreciables de otros productos antimicrobianos de bajo peso molecular como el peróxido de hidrógeno, acetoína, diacetilo, CO<sub>2</sub>, alcoholes, etc. (Helander *et al.*, 1997), que llegan al alimento con efecto en mayor o menor medida inhibitorio; y además de estos metabolitos de la fermentación, las BAL producen bacteriocinas (Rodríguez *et al.*, 2003; Leroy y De Vuyst, 2004). Estas sustancias son péptidos catiónicos en cantidades suficientes pueden eliminar o inhibir bacterias que compiten por sobrevivir o crecer en el mismo nicho ecológico (Reddy *et al.*, 2004; Deegan *et al.*, 2006). Muchas bacterias Gram positivas o Gram negativas producen bacteriocinas. Las primeras en estudiarse fueron las colicinas producidas por *E. coli* (Cleveland *et al.*, 2001).

Entre las bacterias productoras de bacteriocinas, las BAL son de interés especial para la industria alimentaria. Hay numerosos ejemplos de BAL productoras de bacteriocinas (Cleveland *et al.*, 2001), la mayoría de estas se han aislado de la microflora presente de forma espontánea en los alimentos (Nettles y Barefoot, 1993) por lo que seguramente han sido utilizadas y consumidas inconscientemente durante años.

En la actualidad parece ser que las únicas bacteriocinas comercializadas, son la nisina, producida por *Lactococcus lactis*, que fue detectada por primera vez en 1953, y la pediocina PA-1, producida por *Pediococcus acidilacti*, además se han descrito otras como la lacticina 3147 o lacticina 481 que están en fase de ser comercializadas (Deegan *et al.*, 2006). Muchas otras han sido detectadas pero su aplicación comercial no ha sido considerada, además, como resultado de la

investigación, cabe pensar que se pueden encontrar nuevas bacteriocinas no descritas anteriormente (Ennahar *et al.*, 1999).

Las bacteriocinas producidas por las BAL son sintetizadas en los ribosomas celulares. Hay 5 clases de bacteriocinas, pero la mayoría pertenece a las clases I y II. Las de clase I son pequeños péptidos (< 5 kDa, normalmente entre 19 y 50 aminoácidos) resistentes al calor que contienen aminoácidos azufrados característicos como la lantionina o metil-lantionina por lo que se conocen como lantibióticos (Chatterjee *et al.*, 2005). Estos ejercen su acción sobre las bacterias sensibles interfiriendo en sus reacciones enzimáticas esenciales. Las de clase II son también pequeños péptidos (< 10 kDa) termosensibles pero no contienen los aminoácidos azufrados mencionados anteriormente. A esta clase pertenecen la mayoría de las bacteriocinas (Ennahar *et al.*, 1999).

Dentro de la clase II hay una subclase, la IIb, que se caracteriza por que la bacteriocina está compuesta de dos péptidos que actúan sinérgicamente (Nissen-Meyer *et al.*, 1992; Ennahar *et al.*, 1999).

Los genes responsables de la producción de bacteriocinas suelen estar asociados con DNA cromosómico o plasmídico. En este sentido, se han descrito varias secuencias de DNA, aproximadamente una decena hasta el momento, que contienen los *loci* que codifican la producción de las respectivas bacteriocinas (Nes y Johnsborg, 2004).

Por otra parte, son varios los mecanismos por los cuales las bacteriocinas de las BAL ejercen su efecto antimicrobiano (Deegan *et al.*, 2006). Parece ser que los mecanismos de acción se basan en la interacción bacteriocina – membrana de bacteria sensible (Hécharad y Sahl, 2002). Para empezar la fuerza electrostática es el motor que hace que la bacteriocina llegue a la bacteria una vez realizada la unión bacteriocina-receptor celular uno de los mecanismos descritos es la formación de poros en la membrana alterando el equilibrio celular respecto al pH e intercambio iónico con el exterior. También se han descrito mecanismos de

inhibición de la pared celular. Las bacterias productoras de bacteriocinas se protegen de sus propias bacteriocinas mediante la producción de inmunoproteínas.

La industria alimentaria recomienda el uso de bacteriocinas, para prevenir infecciones alimentarias. Si bien, su uso no se entiende como un proceso o barrera primaria para la prevención del crecimiento o supervivencia de los patógenos, sino como una barrera adicional, algo que ayuda a reducir la probabilidad del crecimiento o supervivencia de los mismos. Su utilidad práctica se ha plasmado en la reducción de los recuentos de patógenos o el aumento en la fase estacionaria o disminución de la velocidad de crecimiento (Ennahar *et al.*, 1999; Cleveland *et al.*, 2001).

La nisina tiene un amplio espectro de actividad que abarca la mayoría de las Gram positivas y además inhibe la germinación de las esporas de *Bacillus* spp. y de *Clostridium* spp. (Gross y Morell, 1971), mientras que la lactocina A tiene un espectro de acción limitado solo a las cepas de lactococos (Stoddard *et al.*, 1992).

Las bacteriocinas se deben de usar junto con adecuadas medidas higiénicas, u otras medidas esenciales como el sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos (HACCP) y otros tratamientos tecnológicos como el calor, la acidificación, el frío, etc.

En relación a la elaboración de quesos, los primeros estudios sobre el uso de cultivos iniciadores productores de bacteriocinas, en concreto nisina, se centraron en el retraso del crecimiento de clostridios en quesos madurados para prevenir la hinchazón tardía (O'Sullivan *et al.*, 2006). En este sentido, se ha sugerido su uso como alternativa al nitrato de potasio para prevenir el defecto de hinchazón tardía de los quesos debido a la contaminación de la leche con *Clostridium* spp. (Thomas *et al.*, 2000). También se ha investigado y sugerido repetidamente el uso de bacteriocinas – cultivos iniciadores productores de bacteriocinas, en muchos casos nisina – para el control de *Listeria monocytogenes*

en quesos elaborados con leche cruda o pasteurizada (Buyong *et al.*, 1998; Ennahar *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2000; Cleveland *et al.*, 2001; Millet *et al.*, 2006), así como de *Staphylococcus aureus* (O'Sullivan *et al.*, 2006).

También las bacteriocinas se pueden usar para mejorar la calidad de los atributos sensoriales de ciertos alimentos como el queso, por medio del control que pueden tener frente microflora alterante o no deseada, o generando ruptura celular y la consecuente liberación de enzima por parte de las bacterias afectadas, lo cual puede usarse para potenciar actividades proteolíticas o lipolíticas cuando sea deseable (Leroy y De Vuyst, 2004; Guinane *et al.*, 2005; Peláez y Requena, 2005).

Las bacteriocinas se pueden incorporar en los alimentos como preparación purificada o semipurificada (Carolissen-MacKay *et al.*, 1997), agregando un ingrediente fermentado con bacterias productoras de bacteriocinas, agregando un cultivo iniciador con BAL productoras de bacteriocinas a un alimento antes de su fermentación (Deegan *et al.*, 2006). A la hora de utilizar microorganismos productores de bacteriocinas en los alimentos hay que considerar los efectos antagónicos o sinérgicos tanto entre dichos microorganismos y la otra flora del alimento así como con determinadas sustancias que lo componen (determinados compuestos de los alimentos, elementos minerales, pH, etc.) (Helander *et al.*, 1997).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1.- Toma de Muestras

Se analizaron 8 muestras de quesos tipo Oaxaca elaborados con leche cruda procedente de 8 industrias artesanales del Valle de Tulancingo. Las muestras analizadas se obtuvieron directamente de las industrias dentro del periodo de vida de anaquel. La cantidad de quesos muestreada estuvo comprendida entre 250 a 500 g de cada uno de los quesos, se transportaron al laboratorio en el envase proporcionado en la industria en un tiempo máximo de una hora y se conservaron en refrigeración (5°C aproximadamente) por un máximo 6 horas antes de proceder a su análisis.

### 4.2.- Recuentos de Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

#### 4.2.1.- Preparación de la Muestra

Se tomaron asépticamente 10 g de queso Oaxaca de las diversas Industrias muestreadas se diluyeron en 90 mL de agua peptonada estéril (la solución contenía 1 g de peptona y 8.5 g NaCl por L de agua destilada). La mezcla se homogenizó en un Stomacher (Seward Stomacher 80, London UK) durante 2 min de esta solución se realizaron las diluciones decimales necesarias para el recuento de las BAL.

#### 4.2.2.- Recuento de las BAL

El recuento de las BAL se realizó tomando por duplicado 1 mL de cada serie de diluciones decimales ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) que fueron agregados a placas de Agar Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Oxoid) acidificado a un pH de 5.4 como medio de cultivo. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h siguiendo la metodología descrita por Menéndez *et al.*, (2001) y Herreros *et al.*, (2006).

### 4.3.- Aislamiento

Después del recuento e incubación se tomaron hasta 5 colonias presuntas BAL por cada placa de Agar MRS sembrada. Con un asa de platino se introdujo una colonia en un tubo de ensayo que contenía 5 mL de caldo MRS previamente esterilizado (Oxoid). Los tubos se incubaron a 37°C por 48 horas. Transcurrido este tiempo, 1 mL de cada tubo de ensayo se introdujo en un tubo de *ependorf* que se centrifugó a 12,000 r.p.m durante 3 min. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 mL de caldo MRS que contenía glicerol al 50% previamente esterilizado, y se mantuvieron a -20°C.

### 4.4.- Pruebas de Pre-caracterización de las Presuntas BAL

#### 4.4.1.- Prueba de Gram usando KOH

A partir de los tubos *ependorf* que se tenían congelados (con las presuntas cepas de BAL) con un asa se sembró una alícuota en placas de agar MRS por estría y se incubaron las placas a 37°C por 48 horas. En un portaobjetos se introdujo una colonia y se agregó una gota de solución de hidróxido de potasio al 3% (Química Meyer), se adscribió como Gram + si no formaba filamentos viscosos.

#### 4.4.2.- Determinación de la Catalasa

Se sembraron todas las cepas aisladas, de las presuntas BAL, en placas de agar MRS por el método de estría y se incubaron a 37°C por 48 h. Transcurrido este tiempo se tomó una colonia de cada muestra y se introdujo en un portaobjetos y se agregó una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3%, (J.T Baker). La presencia de la enzima catalasa se detectó cuando la colonia que presentó burbujas al reaccionar con el peróxido de hidrógeno por lo que se toma como positiva.

### 4.4.3.- Determinación de la Citocromo Oxidasa

Por el método de estría se sembraron todas las presuntas cepas de BAL en placas de agar MRS y se incubaron a 37°C por 48 h. Posteriormente se preparó una solución al 5% de alfa naftol en etanol al 95% (v/v) (Técnica Química) Directamente sobre las placas se vertieron unas gotas de la solución antes mencionada, si las colonias presentaban coloración azul marino se tomaba como positivo (Barrow and Feltham, 1999).

### 4.4.4.- Observación Morfológica al Microscopio

Esta prueba se realizó con dos finalidades por un lado, comprobar los resultados de la técnica de KOH, o sea verificar que las cepas son Gram positivas (bacterias que se tiñen de color violeta) y por otro lado, observar la morfología de las mismas (cocos o bacilos), utilizando como control una cepa *Escherichia coli* para microorganismos Gram negativos (colección de bacterias del laboratorio de microbiología del CICyTA).

Esta prueba se realizó solo con las cepas que fueron Gram positivas de acuerdo a la técnica de KOH (apartado 4.4.1), catalasa negativa (apartado 4.4.2), oxidasa negativa (4.4.3). De las presuntas cepas de BAL congeladas se sembraron a tubos de ensaye con caldo MRS y se incubaron a 37°C por 24 h. Pasado este tiempo se sembraron en placas de agar MRS y se incubaron a 37°C por 48 h.

De cada una de las colonias se tomó la mitad y se colocaron en un portaobjetos con una gota de agua destilada y la mezcla se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron unas gotas de solución de cristal violeta (Técnica Química) y se esperó 2 min, se agregó unas gotas de lugol (1 gramo de yodo, 2 gramos de yoduro potasico en 300 mL de agua destilada) (Química meyer), después de 1 min se agregó una mezcla de alcohol-acetona (Técnica Química) hasta quitar la coloración azul y tras 15 s se enjuagó con agua

destilada y se agregó unas gotas de safranina (0.25g de safranina en 100mL de agua destilada) (Técnica Química) y se espero 1 min se enjuagó de nuevo con agua destilada y se dejo secar a temperatura ambiente, la preparación se observó al microscopio a 100 X.

### 4.4.5.- Actividad Hemolítica

Esta prueba solo se realizó sobre las cepas que fueron Gram positivas, catalasa negativas, oxidasa negativas. Siguiendo las indicaciones de Wilkinson, (1981), se preparó medio de cultivo líquido Triptone Soja Broht (Oxoid) al que se le agregó extracto de levadura (YE) al 0,6% previamente esterilizado (TSB + 0.6% YE), las cepas que se tenían congeladas se sembraron y se incubaron 24 h a 37°C.

Se tomo, alícuotas de cada uno de los tubos y se sembraron por estría en placas de agar sangre (el medio de cultivo se enriqueció con sangre de oveja estéril 50 mL por L de medio) las placas se incubaron en anaerobiosis a 37°C durante 48 h. Las condiciones de anaerobiosis se obtuvieron almacenando las placas en una jarra de anaerobiosis en la que se deposito un sobre generador de condiciones anaerobias (Anaerogen Oxoid) transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la lectura de las placas. Las cepas que tuvieron actividad hemolítica presentaron halos o zonas transparentes alrededor del crecimiento bacteriano, mientras que en las placas con crecimiento de cepas no hemolíticas no se observo ninguna región transparente que indicara la presencia de dicha actividad.

### 4.4.6.- Determinación de la Actividad Gelatinasa

Esta prueba solo se realizó sobre las cepas que fueron Gram positivas, catalasa negativa, oxidasa negativa. Para determinar esta actividad se partió de medio liquido TSB + 0,6% YE de 24 h de incubación a 37°C de todas las cepas aisladas en MRS. Alícuotas de dichos tubos se sembraron por agotamiento en placas de Triptone Soja Agar (TSA) (Oxoid) que contenían un 3% de gelatina

(Sigma) y se incubaron durante 48 h a 35°C.

Finalizado este tiempo se procedió al revelado de las placas, se agregó una solución de ácido tricloroacético al 30%. Transcurridos unos segundos las placas se volvieron opacas como consecuencia de la desnaturalización de la gelatina, salvo en las zonas alrededor del crecimiento microbiano donde esta fue degradada debido a la actividad gelatinasa de la cepa de acuerdo a las recomendaciones de Su *et al.*, (1991).

### **4.5.- Identificación Bioquímica por el Sistema Vitek**

La primera caracterización a nivel de especie de las cepas aisladas que fueron Gram positivas, catalasa negativas, oxidasa negativas se realizó en el equipo sistema Vitek AutoMicrobic System modelo “32” (BioMérieux) utilizando una tarjeta para la identificación de bacterias Gram positivas (GPI) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Esta tarjeta es recomendada para bacterias Gram positivas. Las características del ensayo, recogidas en el manual del proveedor se muestran en el Anexo I.

#### **4.5.1.- Pruebas Complementarias a la Identificación Bioquímica por el Sistema Vitek**

De acuerdo a las instrucciones de él proveedor de él sistema Vitek, cuando las pruebas bioquímicas incluidas en la tarjeta dieron como resultado la posible asignación a dos o más especies, con gran probabilidad para ambas, se realizaron pruebas complementarias según lo estipulado en el boletín técnico de él proveedor (ver Anexo I) como fueron:

### 4.5.2.- Crecimiento en una Solución de NaCl al 6.5%

El crecimiento de las cepas se realizó en medio de cultivo líquido TSB + 0,6% YE de extracto de levadura de 24 horas de incubación a 37°C. Se tomó una alícuota de este medio y se hizo crecer en 5 mL del caldo Brain Heart Infusión (BHI), Oxoid que contenía cloruro de sodio al 6.5% y de glucosa al 1%. Los tubos de ensaye con el medio antes mencionado fueron incubados a 37°C por 24 horas (Barro and Feltham, 1999).

### 4.5.3.- Fermentación del Piruvato

El medio de cultivo para realizar esta prueba se realizó de la siguiente manera: triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; piruvato de sodio, 5 g; azul de bromotimol 10 mL (solución etanólica de 4 mg por mL); fosfato ácido de potasio ( $K_2HPO_4$ ), 5 g, agar 10 g, los reactivos son para preparar un litro de medio de cultivo. Todos los ingredientes sólidos se disolvieron por calor, la mezcla se dejó enfriar y se agregó la solución de indicador, se mezcló y se ajustó el pH de 7.2 a 7.4, repartiéndose el medio en tubos de ensaye que se esterilizan a 115 °C por 20 min. Las cepas problema se sembraron en este medio y se incubaron a 37°C por 48 h y se examinaron diariamente. Si los tubos cambiaron su coloración de verde a amarillo significa que han fermentado el piruvato y se tomó la cepa como positiva (Barro and Feltham, 1999).

### 4.5.4.- Movilidad a 30°C

El crecimiento de las cepas se realizó en medio de cultivo líquido TSB + 0,6% YE de extracto de levadura durante 24 h de incubación a 37°C. Se utilizó el medio de cultivo Motility Test Medium (MTM, DIFCO) previamente esterilizado a 115°C por 20 minutos, sembrándose alícuotas del caldo con una asa sin arillo, que se introdujo justo a la mitad del tubo, incubándose a 37°C (Barro and Feltham, 1999).

### 4.6.- Identificación de las Cepas Microbianas por el Método de Ribotipado

El Ribotipado se llevó a cabo solamente sobre aquellas cepas aisladas del queso Oaxaca que no pudieron ser identificadas a nivel de especies con porcentaje de probabilidad mayor al 95% en el Vitek AutoMicrobic System. Este proceso se realizó en el Instituto de Biología Molecular, Genómica y Proteómica de la Universidad de León, España con el equipo “Riboprinter™ Microbial Characterization system. (Ver más Información en <http://www.Unileon.es/index.php?elementID=1298><sup>1</sup>).

En primer lugar se hicieron crecer las cepas en placas de agar MRS a 37°C por 48 h, posteriormente se recolectaron las células con un palillo de plástico estéril y se pusieron en una solución amortiguadora y se transfieren a un *rack* de 8 pocillos. Posteriormente los *rack* con las bacterias se colocaron en un termobloque que viene con el equipo con el objeto de inactivar térmicamente cualquier bacteria. El DNA se extrae de las células y lo corta con enzimas de restricción.

El análisis incorpora una endonucleasa EcoRI estándar. Los fragmentos se cargan en un minigel de agarosa y se separan mediante electroforesis. Luego se transfieren e inmovilizan sobre una membrana. Posteriormente se desnaturaliza el DNA y se hibrida con una sonda de rDNA marcada a la que se une un anticuerpo acoplado a una enzima, cada muestra, se compara con la base de datos de unas 6000 cepas que tiene el equipo. En el Anexo II figuran las especies de la base de datos pertenecientes a los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Lactococcus*.

---

<sup>1</sup> Un ejemplo ilustrativo en el que se describe una aplicación del Ribotipado en la identificación bacteriana es el de Barney *et al.* (2001) (<http://aem.asm.org/cgi/reprint/67/2/553>).

### 4.7.- Determinación de actividad antimicrobiana

Se eligieron 47 cepas de BAL al azar y fueron sembradas en TSB (Difco) adicionado con un 0,6 % de extracto de levadura (Difco), y se incubaron a 37°C por 48 h. Transcurrido este tiempo, 5 µL de este medio de cultivo se sembraron en TSA (Oxoid) adicionado con 0,2% de glucosa (Sigma) y se incubaron a 37°C durante 24 horas, previamente las placas petri habían sido divididas en 4 segmentos con objeto de sembrar 2 bacterias con su respectiva réplica.

Para conocer el efecto inhibitor de las BAL aisladas del queso tipo Oaxaca se utilizaron las siguientes bacterias sensibles (patógenas); *Staphylococcus aureus* (S9), *S. aureus* (S13), *S. aureus* (S181), *S. aureus* (S192), *S. aureus* (361), *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, que fueron obtenidas de la colección de microorganismos del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León, España.

Estas bacterias fueron sembradas en TSB adicionado con un 0,6 % de extracto de levadura y se incubaron a 35°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo 60 µL (que corresponde a una concentración de  $10^5$  ufc/mL) de bacterias patógenas crecidas en las condiciones antes descritas, fueron sembradas en 60 mL de un cultivo semisólido, que en este caso fue TSB adicionado con 0.5 % de agar. Una sobre-capa de 5 ml del agar semisólido inoculado con el microorganismos patógeno se vertió sobre las placas de TSA +0.2% glucosa que contenían las BAL crecidas, y se incubaron a 30°C por 24 horas. Finalmente, después de 24 horas de incubación las placas fueron revisadas para medir los halos de inhibición, tomando como un organismo inhibitor aquel que formo un halo igual a 1 mm de diámetro.

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1.- Recuentos de Presuntas Bacterias Acido Lácticas en Agar MRS

En la Tabla 3, se muestran los recuentos promedio de las bacterias mesófilas que crecieron en agar MRS, presuntas bacterias ácido lácticas (BAL), presentes en las distintas muestras de queso tipo Oaxaca elaborado artesanalmente. El recuento promedio de las BAL fue de  $6.77 \pm 0.09$  Log ufc/g. Así mismo, como podemos observar que los distintos quesos tuvieron un recuento similar. Estos resultados son coincidentes con los recuentos observados en nuestro laboratorio por Palacios (2006) (6.52 ufc/g) en queso Oaxaca de la región utilizando Agar LBS.

Tabla 3. Recuento en Agar MRS (Log ufc/g) de quesos tipo Oaxaca elaborado artesanalmente

Industria	Recuento medio	Desviación
I	6.66	0.33
II	6.33	0.03
III	6.86	0.03
IV	6.81	0.01
V	6.80	0.02
VI	6.90	0.00
VII	6.76	0.04
VIII	6.84	0.00
<b>Total</b>	<b>6.77</b>	<b>0.09</b>

Los valores obtenidos están por encima de los descritos para queso Mozzarella tradicional, también un queso fresco de pasta filata, que están en torno a  $10^4$ - $10^5$  ufc/g en queso recién elaborado (Morea *et al.*, 1999; Ercolini *et al.*, 2004). Según explican estos autores, el calentamiento de la cuajada durante el malaxado es el principal responsable de los bajos recuentos observados. Sin embargo, en el estudio de Gobbetti *et al.* (2002) sobre otro queso de pasta filata, el queso Caciocacallo, se observaron recuentos en torno a  $10^6$ - $10^7$ , más similares

a los del queso Oaxaca, en el primer día después de su elaboración; valores que experimentaron un ligero incremento (aproximadamente 1 ufc) a lo largo de los 60 días de maduración. Las diferencias entre los recuentos encontrados podrían deberse principalmente a diferencias en la intensidad del tratamiento térmico – diferencias en los tiempos y temperaturas en el proceso de malaxado–.

### 5.2.- Precaracterización de Bacterias Aisladas del Queso Tipo Oaxaca

En la Tabla 4, se pueden observar las principales pruebas preliminares de diferenciación de las bacterias aisladas en Agar MRS a partir de quesos elaborados con leche cruda. Se aislaron un total de 160 cepas de las cuales el 49.4%, 61%, 49.4% fueron gram positivas, catalasa negativas y oxidasa negativas, respectivamente. Sólo 79 de 160 cepas estudiadas mostraron las características esenciales de las bacterias ácido lácticas Gram +, catalasa -, oxidasa -.

Tabla 4. Precaracterización de bacterias aisladas en Agar MRS a partir de queso tipo Oaxaca elaborado con leche cruda.

	frecuencias
Gram +	79/160
Catalasa -	98/160
Oxidasa -	79/160
Gram +, Catalasa – y oxidasa -	79/160

Estas bacterias fueron utilizadas para las pruebas de identificación y estudio de sus propiedades antimicrobianas, aproximadamente la mitad de las colonias crecidas en medio MRS no se correspondieron a bacterias con las características típicas del grupo de las BAL gram +, catalasa – y oxidasa -

### 5.3.- Identificación de Bacterias Ácido Lácticas por el Sistema Vitek

En la Tabla 5, se muestran los resultados de identificación de las cepas Gram +, catalasa – y oxidasa – aisladas en MRS de quesos tipo Oaxaca elaborados a partir de leche cruda asociados al sistema Vitek. En la tabla se

incluyen las pruebas preliminares requeridas antes de analizar las cepas por el sistema (morfología, actividad hemolítica y actividad gelatinasa), los resultados de la identificación – especie y bionúmero –, considerando en caso de que fuese indicado en el manual los resultados de diversas pruebas complementarias (crecimiento en presencia de sal, utilización del piruvato y movilidad).

En relación a las pruebas preliminares, el 88% de las cepas aisladas mostraron una forma de cocobacilos, solo 1 cepa presento una forma clara de bacilo y el resto se observaron en forma de cocos. Por otra parte, el 2 y el 4% mostraron actividad hemolítica y gelatinasa, respectivamente. Estas actividades se presentan en bacterias lácticas (BAL) que pueden ser consideradas como posibles patógenas, especialmente bacterias del género *Enterococcus* (Franz *et al.*, 1999).

Las 79 cepas presuntas bacterias ácido lácticas, se agruparon en 54 perfiles (correspondientes a 54 bionúmeros identificados por el sistema). De acuerdo a los perfiles derivados del sistema Vitek y considerando que la identificación a nivel de especie fue estadísticamente aceptada cuando la probabilidad de la misma obtenida por la base de datos superó el 95%; de las presuntas bacterias ácido lácticas, el 29% fueron adscritas a la especie *Streptococcus equinus*, el 14% a la especie *Enterococcus durans*, el 6% a la especie *E. faecium*, el 3% a la especie *E. gallinarum*, 1% a la especie *S. mitis*.

Sin embargo, el 47% de las cepas aisladas no pudieron ser adscritas a ninguna especie, frente a lo que se puede suponer que podrían pertenecer a los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus* (no recogidos en la base de datos). Este alto porcentaje de microorganismos no identificados también se puede deber a las limitaciones en la identificación que tiene del sistema Vitek, de forma que las pruebas obtenidas en las tarjetas GPI utilizadas no fueran suficientes para la discriminación de las cepas aisladas del queso tipo Oaxaca.

Tabla 5. Pruebas de caracterización e identificación de las cepas Gram positivas, catalasa negativas y oxidasa negativas aisladas en Agar MRS a partir de quesos tipo Oaxaca elaborados con leche cruda, pruebas preliminares, resultados de la identificación del sistema Vitek y pruebas complementarias<sup>#</sup>.

Perfil	n	Pruebas preliminares			Resultados del Vitek System			Pruebas complementarias		
		Morfología	Hemólisis	Gelatinasa	Identificación	Probabilidad <sup>*</sup>	Bionúmero	NaCl	Piruvato	Movilidad
1	1	Cocobacilos	-	-	<i>Aerococcus</i> spp./ <i>E. avium</i>	53/32	77347230600	-	ND	ND
2	1	Cocobacilos	-	-	<i>E. faecium</i>	99	77367602610	+	-	ND
3	1	Cocobacilos	-	-	<i>E. faecium</i>	99	77367741710	+	-	-
4	1	Cocobacilos	-	-	<i>E. faecium</i>	95	77347720700	+	-	-
5	1	Cocos	-	-	<i>E. faecium</i>	95	77367700410	+	-	-
6	1	Cocobacilos	-	-	<i>E. faecium</i>	95	77365220510	+	-	-
7	1	Cocos	ND	ND	<i>E. avium/E.</i> <i>faecium</i>	89/10	77367733610	ND	+/-	+/-
8	1	Cocobacilos	-	ND	<i>E. gallinarum</i>	90	77365630600	+	-	+
9	1	Cocobacilos	-	-	<i>E. gallinarum</i>	97	76367774110	ND	-	+
10	1	Cocobacilos	-	-	<i>E. durans</i>	92	77341020400	ND	ND	ND
11	1	Cocobacilos	-	-	<i>E. durans</i>	93	77341230410	ND	ND	ND
12	1	Cocobacilos	-	-	<i>E. durans</i>	94	77361220600	ND	ND	ND
13	1	Cocobacilos	-	-	<i>E. durans</i>	99	77341200410	ND	ND	ND
14	2	Cocobacilos	-	-	<i>E. durans</i>	99	77341220410	ND	ND	ND
15	5	Cocobacilos	-	-	<i>E. durans</i>	99	77343200400	ND	ND	ND
16	1	Cocobacilos	-	-	<i>E. durans</i>	99	77343220400	ND	ND	ND
17	1	Cocos	-	-	<i>E. durans</i>	99	77343220410	ND	ND	ND
18	1	Cocobacilos	-	-	<i>E. durans</i>	99	77363220400	ND	ND	ND
19	1	Cocobacilos	-	-	<i>E. durans/E.</i> <i>avium</i>	41/24	77347320410	ND	-	-
20	1	Cocos	-	+	<i>E. durans/E.</i> <i>faecium</i>	74/22	77347221510	ND	-	-
21	1	Cocobacilos	-	-	<i>E. faecalis</i>	93	77341631610	ND	ND	ND
22	1	Cocos	-	-	<i>E. gallinarum</i>	99	75765771730	ND	ND	+
23	1	Cocos	-	-	<i>E. gallinarum/E.</i> <i>avium</i>	31/26	77367630400	ND	ND	ND
24	1	Cocobacilos	-	-	<i>E. gallinarum/E.</i> <i>avium</i>	92/4	77367731510	ND	ND	ND

## Continuación

25	1	Cocobacilos	-	-	<i>E. gallinarum</i> / <i>E. casseliflavus</i>	93/5	76365370330	ND	ND	ND
26	1	Cocobacilos	-	-	NI		76345634210	ND	ND	ND
27	1	Cocobacilos	-	-	NI		77343621710	ND	ND	ND
28	1	Cocobacilos	-	-	NI		77777731700	ND	ND	ND
29	2	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i>	95	74141000000	ND	ND	ND
30	1	Bacilos	-	-	<i>S. equinus</i>	96	76341020400	ND	ND	ND
31	1	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i>	97	74141020400	ND	ND	ND
32	1	Cocos	-	-	<i>S. equinus</i>	98	74341020000	ND	ND	ND
33	1	Cocobacilos	+	+	<i>S. equinus</i>	98	76141000400	ND	ND	ND
34	1	Cocobacilos	ND	ND	<i>S. equinus</i>	99	54341220400	ND	ND	ND
35	2	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i>	99	74141000400	ND	ND	ND
36	1	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i>	99	74341000000	ND	ND	ND
37	2	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i>	99	74341000400	ND	ND	ND
38	2	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i>	99	74341020400	ND	ND	ND
39	2	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i>	99	74341200400	ND	ND	ND
40	4	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i>	99	74341220400	ND	ND	ND
41	1	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i>	99	74341220410	ND	ND	ND
42	2	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i>	99	76341000400	ND	ND	ND
43	6	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i>	76/15	76341220400	ND	ND	ND
44	3	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i> / <i>S. constellatus</i>	88/11	76341200400	ND	ND	ND
45	1	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i> / <i>S. acidominimus</i>	53/24	76141000000	ND	ND	ND
46	1	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i> / <i>S. agalactiae</i>	87/12	74141000010	ND	ND	ND
47	1	Cocos	-	+/-	<i>S. equinus</i> / <i>S. agalactiae</i>	88/8	76141020410	ND	ND	ND
48	2	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i> / <i>S. constellatus</i>	80/17	76141020400	ND	ND	ND
49	1	Cocobacilos	-	-	<i>S. equinus</i> / <i>S. intermedius</i>	88/4	75341020400	ND	ND	ND
50	4	Cocobacilos	ND	-	<i>S. equinus</i> / <i>S. salivarius</i>	93/2	75141000400	ND	ND	ND
51	1	Diplococos	-	-	<i>S. mitis</i> / <i>S. oralis</i>	93/3	53043010000	ND	ND	ND
52	1	Cocobacilos	+	-	<i>S. mitis</i> / <i>S. oralis</i>	95/3	51043010000	ND	ND	ND
53	1	Cocobacilos	-	-	<i>S. uberis</i> / <i>E. gallinarum</i>	77/12	77365630400	ND	ND	ND
54	1	Cocobacilos	-	-	<i>S. uberis</i> / <i>S. mutans</i>	72/12	75367430400	ND	ND	ND

# Pruebas recomendadas por el proveedor para completar la identificación del sistema Vitek: crecimiento en NaCl al 6.5%, permite diferenciar entre *Enterococcus* "+" y *Streptococcus* "-"; fermentación de piruvato, permite diferenciar entre *E. faecium* "-" y *E. avium* "+"; movilidad, expresión motil en el medio *Motility Test Medium* a 30°C, permite diferenciar entre *E. faecium* "-" y *E. gallinarum* "+"

\* Probabilidad normalizada en porcentaje de la fiabilidad de la identificación proporcionada por el sistema Vitek

ND: No determinado (estas pruebas solo se realizaron en caso de que se indicara su realización en el manual del sistema Vitek)

#### 5.4.- Perfiles Bioquímicos de las Presuntas BAL Aisladas del queso Tipo Oaxaca Detectados en el Sistema Vitek

En la Tabla 6, se muestran los perfiles bioquímicos y los bionúmeros de las presuntas bacterias ácidos lácticos aislados del queso tipo Oaxaca de acuerdo al sistema Vitek. En resumen, las cepas aisladas crecieron generalmente en presencia de los antibióticos optoquina (100%), novobiocina (100%) y bacitracina (95%). El 100% de las cepas fermentaron la glucosa, el 97% crecieron a temperaturas de 10 y 40 °C y el 78% crecieron a altas concentraciones NaCl (6%), que son características fenotípicas propias de las bacterias lácticas, especialmente lactobacilos y enterococos (Kandler, O., y N. Weiss, 1986). Además, el 86% hidrolizaron la esculina. Por otra parte, la mayoría de las cepas aisladas no presentaron actividad ureasa (98.7%), arginina descarboxilasa (97.4%) y no fermentaron el pullulano (97.4%) y la xilosa (97.4%). Para el resto de las pruebas hubo mayor variabilidad entre las cepas estudiadas.

Las pruebas fenotípicas basadas en las características morfológicas, fisiológicas y en los patrones de fermentación de carbohidratos, crecimiento en presencia de inhibidores, etc., obtenidas en sistemas rápidos de identificación como el Vitek, el sistema API (BioMérieux), etc., son utilizadas en los análisis de rutina de la identificación de las BAL u otros grupos bacterianos. Sin embargo, estos sistemas presentan limitaciones importantes, como son el elevado número de cepas no identificadas, 60% o más según los trabajos de Corsetti *et al.*, (2001) y Muyanja *et al.*, (2003), la baja reproductibilidad y resolución taxonómica (muchas veces solo se consigue identificar a nivel de género), además la información de cómo están hechas las bases de datos algunas veces es escasa y está mal documentada (Temmerman *et al.*, 2004). Su utilización radica sobre todo en su bajo costo, comparado con el costo de los sistemas de identificación más eficaces basados en la genómica o proteómica.

En cualquier caso, las especies identificadas por el Vitek en el queso Oaxaca pertenecieron fundamentalmente a los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*. Estos géneros han sido descritos por varios autores entre los géneros más frecuentemente en quesos de pasta filata elaborados con leche cruda: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Del Prato, 1996; Morea *et al.*, 1998 y 1999; Papademas y Robinson, 2000; Coppola *et al.*, 2001; Gobbetti *et al.*, 2002; Piraino *et al.*, 2005; De Angelis *et al.*, 2006). La ausencia de lactobacilos y lactococos en esta identificación con el sistema Vitek está sin duda relacionada con el hecho de que las especies de los mencionados géneros no se encuentran en la base de datos del mencionado sistema.

En los estudios anteriormente mencionados sobre quesos de pasta filata y en relación con los enterococos, en concordancia con nuestros resultados se ha observado frecuentemente la presencia de *E. faecalis*, *E. durans*, *E. faecium*. No obstante, respecto a los *Streptococcus*, al comparar las especies identificadas en el queso Oaxaca con el sistema Vitek con las especies identificadas en resultados en los otros quesos de pasta filata, sorprende la excesiva cantidad de *S. equinus*, cuando la especie más frecuente en los otros quesos es *S. thermophilus*. Esta discrepancia tal vez se deba a las limitaciones en la identificación del sistema Vitek en cuanto a la adscripción a especie (o incluso a género), ya que la base de datos del sistema Vitek está especialmente desarrollada para detectar estreptococos de muestras de origen clínico.

Tabla 6. Perfiles bioquímicos de los distintos bionúmeros detectados en el sistema Vitek

Bionúmero	BAC	OPT	HCS	6NC	10B	40B	ESC	ARG	URE	TZR	NOV	DEX	LAC	MAN	RAF	SAL	SOR	SUC	TRE	ARA	PYR	PUL	INU	MEL	MLZ	CEL	RIB	XYL
51043010000	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53043010000	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54341220400	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
74141000000	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74141000010	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
74141000400	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
74141020400	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
74341000000	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74341000400	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
74341020000	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
74341020400	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
74341200400	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
74341220400	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
74341220410	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
75141000400	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
75341020400	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
75367430400	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
75765771730	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
76141000000	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76141000400	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
76141020400	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
76141020410	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
76341000400	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
76341020400	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
76341200400	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
76341220400	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
76345634210	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
76365370330	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
76367774110	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-



### 5.5.- Identificación de Bacterias Ácido Lácticas Mediante la Técnica de Ribotipado

Debido al alto número de cepas no identificadas por el sistema Vitek, se decidió utilizar un método genético de identificación, el Ribotipado, sobre una cepa representativa de cada uno de los bionúmeros que obtuvieron menos de un 95% de probabilidad en la fiabilidad de identificación con el mencionado sistema (Tabla 5).

En las tablas 7 a 26 se muestran los perfiles electroforéticos obtenidos por la técnica molecular de Ribotipado para las cepas que no se identificaron por el sistema Vitek con un porcentaje de probabilidad > al 95%, indicándose el bionúmero correspondiente, el resultado de la identificación en el que se muestran las especies con mayor índice de similitud y dicho índice –comprendido entre 0 y 1.

Respecto al índice de similitud, de acuerdo a las especificaciones del método, se consideró que la confiabilidad de la identificación fue aceptable con un índice superior a 0.85 y no aceptable con un índice igual o inferior a 0.85. En el primer caso, se adscribió la bacteria problema a la especie con mayor similitud y en el segundo caso, a la bacteria problema se le clasificó como no identificada.

Con el Ribotipado y de acuerdo a lo anteriormente explicado se identificaron 10 cepas de las 19 analizadas. Un total de 9 cepas fueron adscritas a la especie *Lactobacillus plantarum* (Tablas 8-9, 11, 16, 17, 18, 19, 24 y 26) y una cepa más fue identificada como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (Tabla 10).

En el resto de las tablas se muestran los perfiles electroforéticos obtenidos por el Ribotipado de las cepas aisladas del queso tipo Oaxaca que mostraron una similitud < 0.85. Entre los resultados de las cepas clasificadas por el ribotipado como no identificadas con mayor índice de similitud, los resultados indicaron que una cepa tenía una similitud de 0.81 con *Leuconostoc argentinum* (Tabla 7), dos

con *Lactobacillus brevis* con una similitud de 0.68 (Tabla 20 y 22), tres con *Lactobacillus plantarum* con una similitud de 0.68, 0.82 y 0.81 (Tablas 21, 23y 25), respectivamente.

Tabla 7. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 53043010000

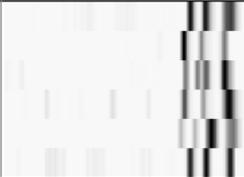
	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont Neighbor	DUP-13200	0.81	Leuconostoc argentinum	
2	DuPont Neighbor	DUP-17039	0.77	Pseudomonas stutzeri	
3	DuPont Neighbor	DUP-18337	0.72	Roseivivax halodurans	
4	DuPont Neighbor	DUP-18292	0.67	Deinococcus radiopugnans	
5	DuPont Neighbor	DUP-6643	0.65	Vibrio vulnificus	
6	RiboGroup	ECORI 219-47-S-1	1.00		

Tabla 8. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77361220600

	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont ID	DUP-14061	0.87	Lactobacillus plantarum	
2	DuPont Neighbor	DUP-5031	0.82	Lactobacillus plantarum	
3	DuPont Neighbor	DUP-14401	0.81	Lactobacillus plantarum	
4	DuPont Neighbor	DUP-18192	0.79	Lactobacillus plantarum	
5	DuPont Neighbor	DUP-18186	0.77	Lactobacillus plantarum	
6	RiboGroup	ECORI 219-47-S-3	0.99		

Tabla 9. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77367630400

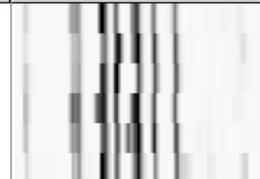
	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont ID	DUP-5031	0.90	Lactobacillus plantarum	
2	DuPont ID	DUP-14401	0.85	Lactobacillus plantarum	
3	DuPont Neighbor	DUP-18186	0.83	Lactobacillus plantarum	
4	DuPont Neighbor	DUP-14075	0.83	Lactobacillus plantarum	
5	DuPont Neighbor	DUP-14061	0.80	Lactobacillus plantarum	
6	RiboGroup	ECORI 219-47-S-5	1.00		

Tabla 10. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 76345634210

	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont ID	DUP-16503	0.88	Lactobacillus paracasei ss. paracasei	
2	DuPont ID	DUP-18643	0.88	Lactobacillus paracasei ss. paracasei	
3	DuPont Neighbor	DUP-16501	0.85	Lactobacillus paracasei ss. paracasei	
4	DuPont Neighbor	DUP-13076	0.82	Lactobacillus paracasei ss. paracasei	
5	DuPont Neighbor	DUP-16606	0.79	Lactobacillus paracasei ss. paracasei	
6	RiboGroup	ECORI 219-47-S-6	1.00		

Tabla 11. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77365630600

	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont ID	DUP-18552	0.90	Lactobacillus plantarum	
2	DuPont ID	DUP-16541	0.89	Lactobacillus plantarum	
3	DuPont ID	DUP-14401	0.88	Lactobacillus plantarum	
4	DuPont Neighbor	DUP-5031	0.84	Lactobacillus plantarum	
5	DuPont Neighbor	DUP-18191	0.82	Lactobacillus plantarum	
6	RiboGroup	ECORI 219-47-S-7	1.00		

Tabla 12. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77341020400

	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont Neighbor	DUP-5011	0.72	Lactobacillus brevis	
2	DuPont Neighbor	DUP-13457	0.67	Lactobacillus brevis	
3	DuPont Neighbor	DUP-14076	0.66	Lactobacillus plantarum	
4	DuPont Neighbor	DUP-14053	0.66	Lactobacillus brevis	
5	DuPont Neighbor	DUP-5007	0.64	Lactobacillus brevis	
6	RiboGroup	ECORI 219-47-S-8	1.00		

Tabla 13. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 76141000000

	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont Neighbor	DUP-14061	0.74	Lactobacillus plantarum	
2	DuPont Neighbor	DUP-13438	0.70	Lactobacillus acidophilus	
3	DuPont Neighbor	DUP-13471	0.69	Lactobacillus plantarum	
4	DuPont Neighbor	DUP-18183	0.67	Lactobacillus plantarum	
5	DuPont Neighbor	DUP-18188	0.66	Lactobacillus plantarum	
6	RiboGroup	ECORI 219-48-S-1	0.98		

Tabla 14. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 76141020400

	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont Neighbor	DUP-14061	0.73	Lactobacillus plantarum	
2	DuPont Neighbor	DUP-13471	0.70	Lactobacillus plantarum	
3	DuPont Neighbor	DUP-13438	0.68	Lactobacillus acidophilus	
4	DuPont Neighbor	DUP-18188	0.67	Lactobacillus plantarum	
5	DuPont Neighbor	DUP-5031	0.67	Lactobacillus plantarum	
6	RiboGroup	ECORI 219-46-S-1	0.99		

Tabla 15. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 76141020410

	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont Neighbor	DUP-13471	0.76	Lactobacillus plantarum	
2	DuPont Neighbor	DUP-14061	0.73	Lactobacillus plantarum	
3	DuPont Neighbor	DUP-5031	0.72	Lactobacillus plantarum	
4	DuPont Neighbor	DUP-13470	0.68	Lactobacillus plantarum	
5	DuPont Neighbor	DUP-14075	0.68	Lactobacillus plantarum	
6	RiboGroup	ECORI 219-48-S-3	1.00		

Tabla 16. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 74141000010

	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont ID	DUP-5031	0.91	Lactobacillus plantarum	
2	DuPont ID	DUP-18186	0.88	Lactobacillus plantarum	
3	DuPont ID	DUP-14061	0.86	Lactobacillus plantarum	
4	DuPont ID	DUP-14401	0.86	Lactobacillus plantarum	
5	DuPont ID	DUP-14075	0.85	Lactobacillus plantarum	
6	RiboGroup	ECORI 219-48-S-4	1.00		

Tabla 17. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77347320410

	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont ID	DUP-14061	0.95	Lactobacillus plantarum	
2	DuPont ID	DUP-5031	0.87	Lactobacillus plantarum	
3	DuPont Neighbor	DUP-14075	0.83	Lactobacillus plantarum	
4	DuPont Neighbor	DUP-14401	0.82	Lactobacillus plantarum	
5	DuPont Neighbor	DUP-18186	0.79	Lactobacillus plantarum	
6	RiboGroup	ECORI 219-48-S-5	1.00		

Tabla 18. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 76341220400

	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont ID	DUP-16952	0.90	Lactobacillus plantarum	
2	DuPont ID	DUP-13075	0.86	Lactobacillus plantarum	
3	DuPont Neighbor	DUP-13470	0.83	Lactobacillus plantarum	
4	DuPont Neighbor	DUP-5031	0.82	Lactobacillus plantarum	
5	DuPont Neighbor	DUP-18191	0.80	Lactobacillus plantarum	
6	RiboGroup	ECORI 219-48-S-6	1.00		

Tabla 19. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 75367430400

	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont ID	DUP-5031	0.89	Lactobacillus plantarum	
2	DuPont Neighbor	DUP-14401	0.85	Lactobacillus plantarum	
3	DuPont Neighbor	DUP-18186	0.83	Lactobacillus plantarum	
4	DuPont Neighbor	DUP-14075	0.82	Lactobacillus plantarum	
5	DuPont Neighbor	DUP-14061	0.82	Lactobacillus plantarum	
6	RiboGroup	ECORI 219-48-S-7	1.00		

Tabla 20. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77777731700

	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont Neighbor	DUP-13462	0.68	Lactobacillus brevis	
2	DuPont Neighbor	DUP-14401	0.66	Lactobacillus plantarum	
3	DuPont Neighbor	DUP-14060	0.64	Lactobacillus paracasei ss. paracasei	
4	DuPont Neighbor	DUP-5031	0.63	Lactobacillus plantarum	
5	DuPont Neighbor	DUP-13067	0.62	Lactobacillus paracasei ss. paracasei	
6	RiboGroup	ECORI 219-50-S-1	1.00		

Tabla 21. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77365630400

	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont Neighbor	DUP-14061	0.68	Lactobacillus plantarum	
2	DuPont Neighbor	DUP-18183	0.68	Lactobacillus plantarum	
3	DuPont Neighbor	DUP-5031	0.63	Lactobacillus plantarum	
4	DuPont Neighbor	DUP-18188	0.62	Lactobacillus plantarum	
5	DuPont Neighbor	DUP-13471	0.60	Lactobacillus plantarum	
6	RiboGroup	ECORI 219-50-S-3	1.00		

Tabla 22. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77347230600

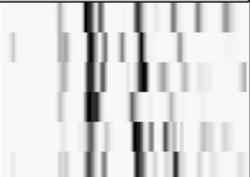
	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont Neighbor	DUP-5011	0.68	Lactobacillus brevis	
2	DuPont Neighbor	DUP-14076	0.65	Lactobacillus plantarum	
3	DuPont Neighbor	DUP-13010	0.64	Lactobacillus brevis	
4	DuPont Neighbor	DUP-5605	0.62	Pediococcus pentosaceus	
5	DuPont Neighbor	DUP-13476	0.61	Lactobacillus buchneri	
6	RiboGroup	ECORI 219-50-S-4	1.00		

Tabla 23. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77367731510

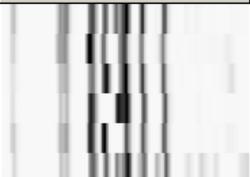
	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont Neighbor	DUP-14061	0.82	Lactobacillus plantarum	
2	DuPont Neighbor	DUP-5031	0.72	Lactobacillus plantarum	
3	DuPont Neighbor	DUP-14401	0.71	Lactobacillus plantarum	
4	DuPont Neighbor	DUP-18192	0.69	Lactobacillus plantarum	
5	DuPont Neighbor	DUP-18186	0.67	Lactobacillus plantarum	
6	RiboGroup	ECORI 219-50-S-5	0.99		

Tabla 24. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77347221510

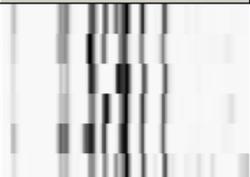
	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont ID	DUP-14061	0.87	Lactobacillus plantarum	
2	DuPont Neighbor	DUP-5031	0.77	Lactobacillus plantarum	
3	DuPont Neighbor	DUP-18192	0.77	Lactobacillus plantarum	
4	DuPont Neighbor	DUP-14401	0.74	Lactobacillus plantarum	
5	DuPont Neighbor	DUP-14075	0.73	Lactobacillus plantarum	
6	RiboGroup	ECORI 219-50-S-7	1.00		

Tabla 25. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 75141000400

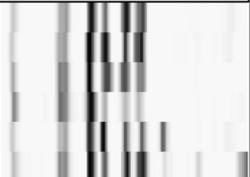
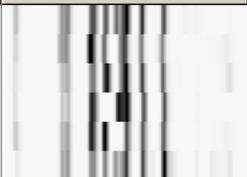
	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont Neighbor	DUP-13075	0.81	Lactobacillus plantarum	
2	DuPont Neighbor	DUP-14413	0.77	Lactobacillus plantarum	
3	DuPont Neighbor	DUP-18191	0.74	Lactobacillus plantarum	
4	DuPont Neighbor	DUP-16952	0.73	Lactobacillus plantarum	
5	DuPont Neighbor	DUP-18186	0.73	Lactobacillus plantarum	
6	RiboGroup	ECORI 219-50-S-8	1.00		

Tabla 26. Resultados del Ribotipado para la cepa con bionúmero 77341230410

	Type	Number	Similarity	Label	RiboPrint™ Pattern
					1 kbp 5 10 15 50
1	DuPont ID	DUP-14061	0.91	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
2	DuPont Neighbor	DUP-5031	0.84	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
3	DuPont Neighbor	DUP-14401	0.82	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
4	DuPont Neighbor	DUP-18192	0.81	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
5	DuPont Neighbor	DUP-18186	0.79	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
6	RiboGroup	ECORI 219-47-S-3	0.99		

### 5.6.- Resumen de Identificación Obtenido por el Ribotipado

Un resumen de los resultados del Ribotipado para aquellas cepas que presentaron una fiabilidad de identificación en el sistema Vitek menor al 95 % se muestra en la Tabla 27. Como era de esperar y debido a la ausencia del género *Lactobacillus* en la base del sistema Vitek, el 52% de las cepas fueron adscritas al género *Lactobacillus*, en concreto a las especies *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei, supsb. paracasei*.

En concordancia con este estudio, *Lactobacillus plantarum* es una de las especies que con mayor frecuencia ha sido aislada en quesos de pasta filata semi-blandos, por ejemplo, Mozzarella, Caciocavallo Podolico, Halloumi (Villani *et al.*, 1991; Morea *et al.*, 1998; Papademas y Robinson, 2000; De Angelis *et al.*, 2006). Sin embargo, ese microorganismo no ha sido aislado en otros quesos de pasta filata como el queso Grana, que es un queso de pasta cocida en el que se aislaron principalmente la especie *Latobacillus helveticus* (Parente *et al.*, 1998) y el queso Mozzarella elaborado con leche de búfala en donde se aislaron principalmente *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus crispatus* (Ercolini *et al.*, 2001).

Posiblemente la presencia de – *L. plantarum* – puede estar relacionada con las temperaturas de elaboración del queso o con el tipo de leche utilizada como lo han observado Papademas and Robinson (2000), quiénes encontraron especies de bacterias ácido lácticas distintas dependiendo de la especie de la cual se obtuvo la leche utilizada.

La presencia de *L. plantarum* y *L. casei subsp. casei* han sido observadas por Morea *et al.*, (1998) en la cuajada del queso Mozzarella después del fundido, así mismo, la primera especie fue la única especie bacteriana encontrada en el queso después de 24 h a 4°C, estos resultados son similares a los encontrados en este estudio mediante el Ribotipado.

Por otra parte, el 48% de las cepas analizadas por el Ribotipado no fueron identificadas (Tabla 25). Aunque el Ribotipado es una técnica con alto poder de discriminación para la identificación de microorganismos, su eficiencia depende del número y tipo de enzimas de restricción utilizadas, así como las sondas de rADN utilizadas para hibridar con una secuencia de ADN específica del microorganismos a identificar (Temmerman *et al.*, 2004), posiblemente, sea este el caso, debido a que en esta identificación se utilizó únicamente la enzima EcoRI, lo implicó una menor eficiencia del método.

Tabla 27. Resultados de los análisis de identificación obtenidos mediante el Ribotipado\* para cepas pertenecientes a aquellos bionúmeros que presentaron una fiabilidad de identificación del sistema Vitek inferior al 95%

Bionúmero del Vitek	Identificación por Ribotipado	
	Especie	Fiabilidad %
53043010000	NI	-
74141000010	<i>Lb. plantarum</i>	91
75341020400	NI	-
75367430400	<i>Lb. plantarum</i>	89
76141000000	NI	-
76141020400	NI	-
76141020410	NI	-
76341200400	NI	-
76341220400	<i>Lb. plantarum</i>	90
76345634210	<i>Lb. paracasei</i>	88
77341020400	NI	-
77341230410	<i>Lb. plantarum</i>	91
77347221510	<i>Lb. plantarum</i>	87
77347230600	NI	-
77347320410	<i>Lb. plantarum</i>	95
77361220600	<i>Lb. plantarum</i>	87
77365630400	NI	-
77365630600	<i>Lb. plantarum</i>	90
77367630400	<i>Lb. plantarum</i>	-
77367731510	NI	-
77777731700	NI	-
751410000400	NI	-

\* 85% es la fiabilidad mínima aconsejada en el Ribotipado para poder asignar a una especie con una certeza aceptable.

- fiabilidad del Ribotipado < 85%

### 5.7 -Adscripción a Especie de las Bacterias Aisladas en el Queso Tipo Oaxaca

En la Tabla 28 muestra los resultados conjuntos de adscripción a especie de las bacterias aisladas en MRS a partir del queso tipo Oaxaca elaborado con leche cruda, utilizando los dos sistemas de identificación, el sistema Vitek y el Ribotipado. El 55% de las cepas fueron identificadas por el sistema Vitek, 11% por la técnica del Ribotipado y el 34% no fueron identificadas por ninguno de los métodos utilizados.

Las 42 cepas identificadas por el sistema Vitek fueron adscritas a las siguientes especies: *Streptococcus equinus* (23 cepas), *Enterococcus durans* (11), *Enterococcus faecium* (5), *Enterococcus gallinarum* (2) y *Streptococcus mitis* (1). Mientras que por la técnica del Ribotipado se adscribieron a las especies *Lactobacillus plantarum* (9) y *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* (1). El resto de cepas (27), pertenecientes a 14 bionúmeros del Vitek, no fueron identificadas.

El número de cepas no identificadas en este estudio ha sido superior a otros estudios donde se realiza el análisis de fragmentos específicos en el gen 16S rDNA (Morea *et al.*, 1998; Ercolini *et al.*, 2001; Gobbetti *et al.*, 2002). Con la utilización de esta metodología basada en ese gen o bien con la utilización de enzimas específicos en la técnica del Ribotipado podrían haberse obtenido una identificación más fiable. Para demostrar este hecho se requeriría de estudios comparativos entre métodos.

Tabla 28. Adscripción a especie de las cepas bacterianas aisladas en Agar MRS de muestras de queso tipo Oaxaca elaborado con leche cruda (identificadas en el sistema Vitek  $\geq$  (95%), y el Ribotipado  $\geq$  (85%).

Número cepas	Especie	Sistema de identificación	Fiabilidad %
23	<i>S. equinus</i>	VITEK	95-99
9	<i>Lb. plantarum</i>	Ribotipado	87-95
11	<i>E. durans</i>	VITEK	99
5	<i>E. faecium</i>	VITEK	95-99
2	<i>E. gallinarum</i>	VITEK	97-99
1	<i>Lb. paracasei</i>	Ribotipado	88
1	<i>S. mitis</i>	VITEK	95
27	No identificados*		
77377230600, 77367733610, 77341020400, 77341631610, 77367630400, 77367731510, 76365370330, 77343621710, 77777731700, 76341200400, 76141000000, 76141020410, 76141020400, 75341020400			

En caso de cepas no identificadas con las fiabilidades indicadas se muestra en la última fila los bionúmeros de las mismas según el sistema VITEK

$\geq$  Mayor o igual

### 5.8.- Actividad antimicrobiana de algunas cepas aisladas del queso tipo Oaxaca

En la tabla 29, se muestra la actividad antimicrobiana de las cepas bacterianas aisladas del queso tipo Oaxaca frente a diferentes microorganismos patógenos, observándose que el 100% de las cepas inhibieron al menos un microorganismo patógeno.

De un total de 47 cepas estudiadas, el 87% de las bacterias ácido lácticas fueron capaces de inhibir a *Listeria innocua*, el 76 % a *Bacillus cereus* y a la cepa de *Staphylococcus aureus* denominadas por la colección del Departamento de Higiene y Tecnología (DHT) de la Universidad de León, España como *S. aureus* S181 el 80%, a la cepa de *S. aureus* S361 el 72%, a la cepa de *S. aureus* S192 el 68%, a la cepa de *S. aureus* S13 el 64 % y a la cepa de *S. aureus* S9 el 34 %.

La inhibición de las bacterias ácido lácticas puede deberse por una parte a la producción de diversos compuestos derivados de su metabolismo, por ejemplo ácido láctico, peróxido de hidrógeno, etc. (Klaenhammer, T. R. 1993). Por otra parte, se sabe que algunas cepas de BAL son capaces de producir bacteriocinas, compuestos peptídicos que inhiben de forma específica el crecimiento bacteriano (Helander *et al.*, 1997).

Diversos autores han observado, el efecto inhibitorio de las BAL debido a la producción de bacteriocinas frente a microorganismos patógenos o alterantes similares a los ensayados en este estudio como es el caso *S. aureus* y *B. cereus* (Muñoz *et al.*, 2004; Ananou *et al.*, 2005; Grande *et al.*, 2005). Según los anteriores autores es frecuente encontrar BAL en quesos de leche cruda productoras de bacteriocinas.

No obstante lo dicho, en este estudio no se pudo saber el origen de la inhibición pues no se determinó qué tipo de compuesto la produjo – no se ha estudiado la naturaleza del compuesto inhibitorio, siendo esta una tarea programada para estudios posteriores.

Tabla 29. Actividad antimicrobiana de algunas cepas aisladas en Agar MRS a partir de queso tipo Oaxaca frente a diversos microorganismos patógenos.

Bionúmero	<i>S. aureus</i>					<i>B.cereus</i>	<i>L. inocua</i>
	S9	S13	S181	S192	S361		
53043010000	-	+	+	+	-	-	-
74141000010	+	+	+	+	-	+	+
75141000400	-	-	-	+	+*	+	+
75141000400	+	+	+	+	+	-	+
75141000400	+	+	+	+	-	+	+
75141000400	-	-	+	+	+	+	+*
75341020400	-	-	+	-	-	-	-
75367430400	-	-	+	+	+	+	++
76141000000	-	-	+	+	+	+	+
76141020400	+	+	+	+	+	-	+
76141020400	-	-	+*	+*	+	+	+*
76141020410	-	+	+	+	+	+	+
76341200400	+	+	+	-	+	+	+
76341200400	-	-	+	+	+	+	+
76341220400	+	+	+	+	+	+	+
76341220400	-	-	-	-	-	-	+
76341220400	-	+	+	+	+	+	+
76341220400	-	-	+	+	+	+	+
76341220400	-	+	+*	+	-	-	+
76341220400	-	+	+*	++	+	+	+
76345634210	+	+	+	+	+	-	+
76367774110	-	+	+	-	-	-	-
77341020400	-	+	+	+	+	+	+
77341200410	-	+	-	-	-	-	+
77341220410	-	-	-	-	-	-	+
77341220410	-	-	+*	+	+	+	+*
77341230410	-	-	+*	+	-	+*	+

## Continuación

77341631610	-	+	+	++	+	+	+
77343200400	+	+	+	-	+	+	+
77343200400	+	+	+	-	+	+	+
77343200400	+	+	++	-	+	+	-
77343200400	-	-	-	-	-	+	-
77343220400	+	+	-	-	+	+	-
77343621710	-	+	-	+	+	+	+
77347221510	-	+	+	+	+	+	+
77347230600	-	-	+	+	+	+	+
77347320410	-	+	+	++	+	+	+
77347720700	++	+	+	++	+	+	+
77361220600	-	++	+	++	+	+	+
77365630400	-	-	+	+	+	+	+
77365630600	+	-	+	-	+	+	+
77367602610	-	+	-	-	-	-	+
77367630400	-	+	-	+	-	+	+
77367700410	+	+	+	+	+	+	+
77367731510	-	+	+	+	+	+	+
77367741710	+	+	+	-	+	+	+
77777731700	+	-	+	-	+	+	+

- Ausencia de actividad microbiana (sin halo)

+\* Halo difuso

+ Actividad microbiana con un halo  $\geq 1$ mm

++ Actividad microbiana con un halo  $\geq 2$ mm

## VI. CONCLUSIONES

La flora láctica del queso Oaxaca elaborado con leche cruda ha sido caracterizada.

Los principales géneros de BAL identificados en el queso Oaxaca elaborado con leche cruda con el sistema Vitek fueron: *Streptococcus equinus* (23 cepas), *Enterococcus durans* (11), *Enterococcus faecium* (5), *Enterococcus gallinarum* (2) y *Streptococcus mitis* (1) y ii) con la técnica del Ribotipado aplicada a las cepas no identificadas con el sistema anterior: *Lactobacillus plantarum* (9) y *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* (1).

No fueron identificadas 27 cepas por ninguno de los dos métodos empleados en este estudio debido a las limitaciones de los métodos.

Respecto a la presencia de *S. equinus*, debido a que no ha sido detectado en quesos de pasta filata por otros autores y a las limitaciones del sistema Vitek, podríamos suponer que puede haber error de identificación, por lo que se requeriría estudiar estas cepas mediante metodología genética.

La mayoría de las bacterias ácido lácticas estudiadas mostraron un efecto inhibitorio frente a los microorganismos patógenos ensayados en este estudio, especialmente inhibieron a *Listeria innocua* y *Bacillus cereus*.

Este es el primer estudio que se ha hecho con el fin de buscar un cultivo iniciador que utilice bacterias autóctonas para queso Oaxaca. Además, este trabajo que ha consistido en caracterizar las BAL presentes en el queso tiene la utilidad de conocer qué géneros y en qué proporción podrían incluirse en dicho cultivo iniciador.

## **Conclusiones**

---

Se recomienda realizar posteriores estudios con el fin de conocer la evolución de la flora láctica durante el proceso de elaboración, conservación del queso, la aptitud tecnológica de las cepas aisladas y su capacidad de producción de bacteriocinas.

## VII. ANEXOS

**ESPECIFICACIONES DEL USO DE LAS TARJETAS GPI (identificación de gram positivos) RECOGIDAS EN EL MANUAL DE REFERENCIA DE MICROBIOLOGIA DEL SISTEMA VITEK**

**Anexo 1.** Bacterias Gram positivas que se encuentran recogidas en la base de datos del sistema Vitek

---

**Uso previsto**

---

**IMPORTANTE:** *Para uso diagnóstico in vitro*

La tarjeta GPI (identificación de gram positivos) VITEK está diseñada para ser utilizada con el sistema VITEK para la identificación automatizada de estreptococos clínicamente significativos, estafilococos y un grupo seleccionado de bacilos gram positivos.

El sistema identifica las siguientes bacterias:

- *Aerococcus* spp.
- *Arcanobacterium haemolyticum*
- *A. Actinomyces pyogenes*
- *Corynebacterium xerosis* y *Especies de Corynebacterium*
- *Enterococcus avium*
- *E. casseliflavus*
- *E. durans*
- *E. faecalis*
- *E. faecium*
- *E. gallinarum*
- *E. hirae*
- *Erysipelothrix rhusiopathiae*
- *Gemella morbillarum*
- Estreptococos grupo G
- *Especies de Listeria*
- *Staphylococcus aureus*
- *S. auricularis*
- *S. capitis*
- *S. cohnii*
- *S. epidermidis*
- *S. haemolyticus*
- *S. hominis*
- *S. hyicus*
- *S. intermedius*
- *S. lentus*
- *S. saprophyticus*
- *S. sciuri*
- *S. simulans*
- *S. warneri*
- *S. xylosus*
- *Streptococcus acidominimus*
- *S. agalactiae*
- *S. anginosus*
- *S. anginosus (Strep. milleri)*
- *S. bovis*

Ficha técnica GPI	Descripción
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>S. bovis</i> var.</li> <li>• <i>S. constellatus</i></li> <li>• <i>S. equi</i> ssp. <i>equi</i></li> <li>• <i>S. equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i></li> <li>• <i>S. equinus</i></li> <li>• <i>S. dysgalactiae</i> (<i>S. equisimilis</i>)</li> <li>• <i>S. intermedius</i></li> <li>• <i>S. mitis</i></li> <li>• <i>S. mutans</i></li> <li>• <i>S. oralis</i></li> <li>• <i>S. pneumoniae</i></li> <li>• <i>S. pyogenes</i></li> <li>• <i>S. salivarius</i></li> <li>• <i>S. sanguinis</i> (<i>S. sanguis</i>)/<i>gordonii</i></li> <li>• <i>S. uberis</i></li> </ul>

## Descripción

La tarjeta GPI contiene 30 pocillos. De los mismos, 29 pocillos contienen caldos bioquímicos y un pocillo contiene caldo de control negativo. La tarjeta utiliza medios basados en tests bioquímicos convencionales adaptados para su uso con el sistema VITEK. Véase la sección Resultados en este capítulo para obtener un resumen de las propiedades químicas y físicas de los medios.

Se debe realizar un test de catalasa convencional, un test de coagulasa (cuando proceda, test requerido para cocos catalasa positivos) y una tinción de Gram antes de inocular y rehidratar la tarjeta. Cuando proceda, determinar los resultados de beta-hemólisis (determinados en agar de tripticase soja [TSA] con sangre de carnero al 5%). También debe prepararse una solución bacteriana normalizada.

Después de inocular la tarjeta y colocarla dentro del lector/incubador, no es necesario añadir más reactivos ni manipular más la tarjeta.

Un entorno microaerófilo reproducido de una manera singular favorece el crecimiento de las bacterias gram positivas. El tiempo de incubación varía de 2 a 15 horas y se basa en la velocidad de crecimiento del organismo. Las especies con una velocidad rápida de crecimiento, tal como *Enterococcus faecalis*, pueden ser identificadas en un plazo de dos horas. Otros organismos pueden requerir hasta 15 horas de incubación.

Los resultados positivos a la catalasa, coagulasa y beta-hemolíticos, se codifican en la tarjeta y se describen brevemente en este documento.

**Anexo 2. Pruebas bioquímicas obtenidas en las tarjetas GPI**

RESUMEN DE RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS OBTENIDAS EN LAS TARJETAS GPI

lector/incubador. Una probabilidad porcentual normalizada, acompaña a los organismos tanto de primera como de segunda opción.

Un informe de identificación preliminar está disponible después de dos horas de incubación, si se ha logrado un crecimiento bacteriano suficiente. Antes de dicho período, se encuentran disponibles solamente los resultados de test bioquímico y el bionúmero.



**PRECAUCIÓN: Se debe confirmar una identificación preliminar mediante un informe final.**

Para GPI *Streptococcus*, el informe de identificación final indica la designación de grupo común. Esto tiene el propósito de facilitar la clasificación de los organismos *exclusivamente*. Confirmar las designaciones de grupo mediante métodos serológicos. Consultar el Capítulo 16, Boletín técnico GPI, en este manual.

**Tabla 15-1: Resumen de resultados GPI**

Medio	Abrev.	Pocillo N°	Interpretación		Comentarios	Propiedades químicas/físicas	Componentes		Ref.
			Pos.	Neg.			Ingrediente activo	Cant.	
Base de peptona	PB	1	Azul	Transparente	Puede utilizarse como fuente para subcultivos.	Caldo de peptona enriquecido. Crecimiento indicado mediante la producción de ácido. La reducción del pH causa un cambio de color en el indicador.	Peptona Glucosa	0,2 mg 0,4 mg	3, 5, 7
Bacitracina	BAC	2	Azul	Transparente	El resultado de test positivo indica crecimiento y resistencia a la bacitracina. El resultado negativo indica sensibilidad.	El crecimiento se inhibe evitando la síntesis en la pared celular. Los carbohidratos en el medio no se utilizan y no se reduce el pH.	Bacitracina	0,5 µg	5, 7, 9, 10, 16
Optoquina	OPT	3	Azul	Transparente	El resultado de test positivo indica crecimiento y resistencia a la optoquina. El resultado negativo indica sensibilidad.	Inhíbe el crecimiento causando lisis de la membrana celular.	Hidrocloruro etilhidro-cupreína	0,2 µg	6, 7, 13

Ficha técnica GPI

Resultados

Tabla 15-1: Resumen de resultados GPI

Medio	Abrev.	Pocillo N°	Interpretación		Comentarios	Propiedades químicas/físicas	Componentes		Ref.
			Pos.	Neg.			Ingrediente activo	Cant.	
Cloruro de sodio al 6%	GNC	5	Azul	Transparente		Tolerancia a la alta concentración de NaCl indicada por la producción de ácido y el cambio de color del indicador.	Cloruro de sodio	1,6 mg	5, 6, 10
*10% Bilis *40% Bilis * Concentraciones equivalentes	10B 40B	6 7	Azul	Amarillo Amarillo		Tolerancia a altos niveles de bilis indicado por la producción de ácido y cambio de color en el indicador.	Bilis	0,4 mg 1,4 mg	4, 6
Esculina	ESC	8	Marrón-negro	Amarillo claro		Hidrólisis de esculina a esculetina, la cual reacciona con citrato férrico para formar un complejo marrón-negro.	Esculina Citrato de amonio férrico	0,04 mg 0,02 mg	1, 4, 6, 7
Control de base de decarboxilasa	ANC	9							6, 7, 8, 13
Arginina	ARG	10	Azul	Amarillo verdoso	Se produce una reacción positiva cuando ANC retiene un color verde amarillento y ARG presenta un color azul.	La arginina dihidrolasa transforma la arginina en ornitina, amoníaco y dióxido de carbono. Se incrementa el pH, lo que causa un cambio de color de amarillo a azul.	Mono-hidrocloruro de arginina	0,2 mg	6, 7, 8, 13
Urea	URE	11	Azul	Amarillo verdoso		La ureasa libera amoníaco a partir de la urea. El amoníaco libre causa un incremento del pH y modifica el color del indicador de verde amarillento a azul.	Urea	0,2 mg	3, 4, 13

Tabla 15-1: Resumen de resultados GPI

Medio	Abrev.	Pocillo N°	Interpretación		Comentarios	Propiedades químicas/físicas	Componentes		Ref.
			Pos.	Neg.			Ingrediente activo	Cant.	
Rojo tetrazolium	TZR	12	Rosa-rojo	Transparente	Puede decantar un precipitado de color rojo después de una incubación prolongada. Esto no afecta el resultado del test.	Al reducirse, la sal de tetrazolium forma un precipitado de color rojo.	Cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolium	25,0 µg	3
Novobiocina	NOV	13	Azul	Transparente Azul claro	El resultado de test positivo indica crecimiento y resistencia a la novobiocina.	Inhibe la síntesis de ADN y ácido teicoico en la membrana.	Sal sódica de novobiocina	0,10 µg	12
Hemicelulasa	HCS	4	Azul	Azul claro transparente		El uso de carbohidratos tiene como resultado la formación de ácidos. La reducción del pH causa un cambio de color del indicador de azul claro o transparente a azul oscuro.	Hemicelulasa	0,3 mg	2, 3, 4, 6, 7, 8, 12, 17
Dextrosa	DEX	14					Dextrosa	0,4 mg	
Lactosa	LAC	15					Lactosa	0,1 mg	
Manitol	MAN	16					Manitol	0,4 mg	
Rafinosa	RAF	17					Rafinosa	0,2 mg	
Salicina	SAL	18					Salicina	0,2 mg	
Sorbitol	SOR	19					Sorbitol	0,2 mg	
Sacarosa	SUC	20					Sacarosa	0,4 mg	
Trehalosa	TRE	21					Trehalosa	0,2 mg	
Arabinosa	ARA	22					Arabinosa	0,4 mg	
Piruvato	PYR	23					Ácido pirúvico	0,4 mg	
Pullulan	PUL	24					Pullulan	0,3 mg	
Inulina	INU	25					Inulina	0,1 mg	
Melibiosia	MEL	26					Melibiosia	0,2 mg	
Melezitosa	MLZ	27	Melezitosa	0,3 mg					
Celobiosia	CEL	28	Celobiosia	0,2 mg					
Ribosa	RIB	29	Ribosa	0,2 mg					
Xilosa	XYL	30	Xilosa	0,3 mg					

### Mensajes especiales

Varios tipos de mensajes especiales pueden aparecer en el informe de identificación impreso final. Estos mensajes especiales explican por qué la identificación no puede realizarse o actúa como una declaración de calificación para la identificación.

### Anexo 3. Test complementarios (GPI) para obtener una identificación a nivel especie

NOTAS DEL MANUAL DE IDENTIFICACIÓN GPI

#### Nota 8: *Enterococcus faecium/casseliflavus/gallinarum*

Un número mínimo de *Enterococcus faecium* puede dar una identificación de *E. casseliflavus* o *E. gallinarum*. Utilizar los siguientes tests para obtener una identificación definitiva a nivel especie.

Tabla 16-6: Tests GPI para *Enterococcus faecium/casseliflavus/gallinarum*

Organismo	Motilidad (30 °C)	Pigmento amarillo
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	+
<i>E. gallinarum</i>	+	-

#### Nota 12: *Enterococcus faecium*

Los resultados bioquímicos obtenidos de cepas raras de *Enterococcus faecium* en la tarjeta GPI se asemejan mucho a los obtenidos de cepas de *Enterococcus avium*. Utilizar los siguientes tests para diferenciar estas dos especies.

Tabla 16-10: Tests GPI para *Enterococcus avium/faecium*

Organismo	SOR	ARG	PYV
<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-
<i>E. avium</i>	+	-	+

**Anexo 4. Bacterias Ácido Lácticas que se Encuentran Recogidas en la Base de Datos del Ribotipado**

<b>ENTEROCOCCUS</b>	<b>LACTOBACILLUS</b>	<b>LACTOCOCCUS</b>	<b>STREPTOCOCCUS</b>
Enterococcus avium	Lactobacillus acetotolerans	Lactococcus garvieae	Streptococcus agalactiae
Enterococcus casseliflavus	Lactobacillus acidophilus	Lactococcus lactis	Streptococcus anginosus
Enterococcus cecorum	Lactobacillus agilis	Lactococcus lactis ss. cremoris	Streptococcus bovis
Enterococcus dispar	Lactobacillus alimentarius	Lactococcus lactis ss. lactis	Streptococcus constellatus
Enterococcus durans	Lactobacillus amylophilus	Lactococcus piscium	Streptococcus cristatus
Enterococcus faecalis	Lactobacillus amylovorus	Lactococcus plantarum	Streptococcus downei
Enterococcus faecium	Lactobacillus animalis	Lactococcus raffinolactis	Streptococcus dysgalactiae ss. equisimilis
Enterococcus flavescens	Lactobacillus aviarius ss. araffinosus		Streptococcus equi ss. Equi
Enterococcus gallinarum	Lactobacillus aviarius ss. aviarius		Streptococcus equi ss. zooepidemicus
Enterococcus hirae	Lactobacillus bifermentans		Streptococcus intermedius
Enterococcus malodoratus	Lactobacillus bifermentans		Streptococcus mitis
Enterococcus mundtii	Lactobacillus brevis		Streptococcus mutans
Enterococcus pseudoavium	Lactobacillus buchneri		Streptococcus oralis

Enterococcus raffinosus	Lactobacillus casei	Streptococcus parasanguinis
Enterococcus saccharolyticus	Lactobacillus casei ss. casei	Streptococcus pneumoniae
Enterococcus species	Lactobacillus catenaformis	Streptococcus pyogenes
Enterococcus sulfureus	Lactobacillus collinoides	Streptococcus salivarius
	Lactobacillus coryniformis	Streptococcus species
	Lactobacillus coryniformis ss. coryniformis	Streptococcus thermophilus
	Lactobacillus coryniformis ss. torquens	Streptococcus uberis
	Lactobacillus crispatus	Streptococcus vestibularis
	Lactobacillus curvatus	
	Lactobacillus curvatus ss. curvatus	
	Lactobacillus cypricasei	
	Lactobacillus delbrueckii	
	Lactobacillus delbrueckii ss. bulgaricus	
	Lactobacillus delbrueckii ss. delbrueckii	
	Lactobacillus delbrueckii ss. lactis	
	Lactobacillus equi	
	Lactobacillus farciminis	
	Lactobacillus	

---

fermentum  
Lactobacillus  
fructivorans  
Lactobacillus  
gallinarum  
Lactobacillus  
gasseri  
Lactobacillus  
graminis  
Lactobacillus  
hamsteri  
Lactobacillus  
helveticus  
Lactobacillus  
hilgardii  
Lactobacillus  
homohiochii  
Lactobacillus  
intestinalis  
Lactobacillus  
jensenii  
Lactobacillus  
johnsonii  
Lactobacillus  
kefiranofaciens ss.  
kefiranofaciens  
Lactobacillus  
kefiranofaciens ss.  
kefirgranum  
Lactobacillus kefiri  
Lactobacillus  
kimchii  
Lactobacillus  
lindneri  
Lactobacillus  
malefermentans  
Lactobacillus mali  
  
Lactobacillus  
murinus  
Lactobacillus oris  
Lactobacillus  
parabuchneri  
Lactobacillus  
paracasei  
Lactobacillus

---

---

paracasei ss.  
paracasei  
Lactobacillus  
paracasei ss.  
tolerans  
Lactobacillus  
parakefiri  
Lactobacillus  
paraplantarum  
Lactobacillus  
pentosus  
Lactobacillus  
plantarum  
Lactobacillus  
pontis  
Lactobacillus  
reuteri  
Lactobacillus  
rhamnosus  
Lactobacillus  
ruminis  
Lactobacillus sakei  
Lactobacillus sakei  
ss. sakei  
Lactobacillus  
salivarius ss.  
salicinius  
Lactobacillus  
sanfranciscensis  
Lactobacillus  
sharpeae  
Lactobacillus  
species  
Lactobacillus  
suebicus  
Lactobacillus  
vaccinostercus  
Lactobacillus  
vaginalis  
Lactobacillus zeae

---

### VIII .LITERATURA CITADA

Ananou, S., Garriga, M., Hugas, M., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Valdivia, E. 2005. Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology* 103, 179–190.

Barney, M., Volgyi, A., Navarro, A., Ryder, D. (2001). Riboprinting and 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of Brewery *Pediococcus* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 553-560.

Barrow, G.I., Feltham, P.K.A. (1999). *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. Edit Cambridge, University Press, UK.

Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A; Brennan, N.L; Cogan, T.M. (2001) Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11, 259 – 247.

Beuchat , L.R., y Golden, D.A. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods *Food technology* , 43, 134- 142.

Buyong, N., Kok, J., & Luchansky, J. B. (1998). Use of a genetically enhanced,pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM2177, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4842–4845.

Carolissen-MacKay, V., Arendse, G., Hastingsb, J.W. (2004). Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *International Journal of Food Microbiology* 34, 1-16.

Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., & van der Donk, W. A. (2005). Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemistry Reviews*, 105, 633–683.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71, 1–20.

Cogan, T.M. (2000) Cheese microbiology. En: *Fundamentals of Cheese Science*, Eds: P.F Fox, T. Ginee, T.M Cogan y P.L.H. McSweeny. Gaithersburg: Aspen publishers.

COMISION ESTATAL DE LA LECHE (2006) comunicación personal con el director de la comisión estatal de la leche.

Coppola, S., Valiota, G., Ercolini, D., Moschetti, G. (2001). Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 414-420.

Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N. y Gobetti, M. (2001). Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeast from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 95-104.

De Angelis, M., Candi, S., Di Cagno, R., McSweeny, P.L.H., Gobbetti, M. (2006). Microbiology and biochemistry of traditional mozzarella cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61, 128-131.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Colin, H., Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058-1071.

Del Prato, O.S. (1996). Il Provolone. *Il Latte*, 16, 732-738.

Ennahar, S., Assobhei, O., and Hasselmann, C. (1998). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE

92, a pediocin AcH producer. *J. Food Prot.*, 61, 186-191 (1998).

Ennahar, S., Sonomoto, K., Ishizaki, A. (1999). Class IIA Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Antibacterial activity and food preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87, 705-716. 1999.

Ercolini, D., Mauriello, G., Blaiotta, G., Moschetti, G., Coppola, S. (2004). PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 263-270.

Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S. (2001). The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture independent analyses. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 610-617.

Fox, F. P., Guinee, T. P., Cogan, T.M., and Mc Sweeney, P.L.H. (2000). "Fundamentals of cheese Science". AspecPublihers. Inc. Caithersburg Maryland.

Franco, F. M. J. (1998). Estandarización del proceso de fabricación del queso tipo Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 1-24, 47.

Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 215-222.

Gobbetti, M., Morea, M., Baruzzi, F., Corbo, M.R., Matarante, A., Considine, T., Cagno, R., Guinee, T., Fox, P.F. (2002). Microbiological, compositional, biochemical and textural characteristics of Caciocavallo Pugliese cheese during

ripening. *International Dairy Journal*, 12, 511-523.

Grande, Ma J., Lucas, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., Valdivia, E., Gálvez, A., (2005a). Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology* 104, 289–297.

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

Gross, E., & Morell, J. L. (1971). The structure of nisin. *Journal of American Chemistry Society*, 93, 4634 – 4635.

Guinane, C. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Microbial solutions to microbial problems: Lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1316–1325.

Helander, I. M., Wright, A., Mattila-Sandholm, T.M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 147-150.

Hérchard, Y., Sahl, H.G. (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria, *Biochimie*, 84, 545-557.

Herreros, M.A., Arenas, R., Sandoval, M.H., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. 2006. Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. *International Dairy Journal* (In press).

Kandler, O., and N. Weiss. 1986. Genus *Lactobacillus*,. In, P. H. A. Sneath, N. S.

Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1063-1065.

Kindstedt, P.S. (1993). *Mozzarella and Pizza Cheese*. En: *Cheese: physics and microbiology*. Vol. 2. Editado por Fox, P.F. Chapman & Hall, Londres.

Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:39-86

Konings, W.N., Kok, J., Kuipers, O.P., Poolman, B. (2000). Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Current Opinion in Microbiology*, 3, 276-282.

Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 67–78.

Lysh, U., Korkeala, H., Bjorkroth, J. (2002). Identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged 'gravad' rainbow trout using ribotyping. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 147-153.

McCartney, A. L. (2002). Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88(Suppl. 1), S29–S37.

Menéndez, S., Godinez, R., Centeno, J.A., Rodriguez-Otero, J.L. (2001). Microbiological, chemical and biochemical characteristics of Tetilla raw cows-milk cheese. *Food Microbiology*, 18, 151-158.

Millet, L., Saubusse, M., Didiene, R., Tessier, L., Montel, M.C. (2006). Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 108, 105 – 114.

Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R. (2006). Technological and molecular characterization of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *International Dairy Journal*, 16, 867-875.

Morea, M., Baruzzi, F., Cappa, F., Cocconcelli, P.S. (1998). Molecular characterization of the *Lactobacillus* community in traditional processing of Mozzarella cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 53-60.

Morea, M., Baruzzi, F., Cocconcelli, P.S. (1999). Molecular and physiological characterization of dominant bacteria populations in traditional Mozzarella cheese processing. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 574-582.

Muñoz, A., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., Valdivia, E., 2004. Biocontrol of psychrotrophic enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a non fat hard type cheese by an enterococcal strain producing enterocin AS-48. *Journal of Food Protection* 67, 1517–1521.

Muyanja, C., Narvhus, J.A., Treimo, J. y Langsrud, T. (2003). Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 201-210.

Nes, I.F., Johnsborg, O. (2004). Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 15:100–104.

Nettles, C. G., & Barefoot, S. F. (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 56, 338–356.

Nissen-Meyer, J., Holo, H., Harvastein, L. S., Sletten, K., & Nes, I. F. (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action

of two peptides. *Journal of Bacteriology*, 174, 5686–5692.

O' Connor, T. P, O'Brien, N.M. (200). Nutritional aspects of Cheese. In *Fundamentals of cheese science* (eds. Fox, P.F., Guinee, T., Cogan, T.M., McSeveeney, P.L.H.). Aspen publishers, Inc. Gaithersburg Maryland, 504-512.

O'Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M., Siezen, R. (2002). Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82, 29–58.

Oberg, C.J., Wang, A., Moyes, L.V., Brown, R.J., Richardson, G.H. (1991). Effects of proteolytic activity of thermolactic cultures on physical properties of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 74, 389-397.

Palacios, V. S. (2006). Caracterización microbiológica de diversos tipos de quesos elaborados en el Valle de Tulancingo Hidalgo. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Papademas, P., Robinson, R.K. (2000). A comparison of the chemical, microbiological and sensory characteristics of bovine and ovine Halloumi cheese. *International Dairy Journal*, 10, 761-768.

Parente, E., Rota, M.A., Ricciardi, A., Clementi, F. (1998). Characterization of natural starter cultures used in the manufacture of pasta filata cheese in Basilicata (Southern Italy). *International Dairy Journal*, 7, 775-783.

Peláez, C., Requena, T. (2005). Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal* 15, 831–844.

Piraino, P., Zotta, T., Ricciardi, A., Parente, E. (2005). Discrimination of commercial Caciocavallo cheeses on the basis of the diversity of lactic microflora and primary proteolysis. *International Dairy Journal*, 1138-1149.

Reddy, K.V.R., Yedery, R.D., Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents* 24, 536–547.

Rodríguez, E., González, B., Gaya, P., Nuñez, M., Medina, M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 10, 7-15.

Rodríguez, J.M., Martínez, M.I., Horn, N., Dodd, H.M. (2003). Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 101-116.

SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadera, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2003). Relación de industrias de la leche del Valle de Tulancingo a través de la Comisión Estatal de la Leche.

Silva, G; (1991) Manual de fabricación de quesos PROUNILAC, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.S., Holt, J.G. (1986). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.

Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.

Stoddard, G. W., Petzel, J. P., van Belkum, M. J., Kok, J., McKay, L.L. (1992). Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1952–1961.

Su, Y.A., Sulavik, M.C., He, P., Makine, P., Fiedler, S., With, R., y Clewell, D.B.

(1990). Nucleotide sequence of the gelatinase gene (gelE) form *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect. Immun*, 59, 415-420.

Temmerman, R., Huys, G., Swings, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 348-359.

Temmerman, R., Scheirlinck, I., Huys, G., Swings, J. (2003). Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 220-226.

Thomas, L. V., Clarkson, M. R., Delves-Broughton (2000). Nisin. In A. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems* Boca Raton, Florida: CRC Press, (pp. 463–524).

Villani, F., Pepe, O., Coppola, R., Andolfi, R., Coppola, S. (1991). Microbiological aspects of manufacture of “Caciocavallo podolico”. *Il Latte*, 16, 780-784.

Walstra, P; Geurts, T.J; Noomen, A; Jellema, A; y Van Boekel, M; (2001) *Ciencia y tecnología de leche y tecnología de los productos lácteos* , Marcel Dekker.