



IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN EL QUESO COTIJA POR METODOS MOLECULARES

Alma Berenice Zúñiga Bustos y Maricarmen Quirasco Baruch

L-312 Conj. E, Fac. de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México. quirabma@servidor.unam.mx, tel. y fax (55) 5622-5305.

Palabras clave: DGGE, 16s ARNr, *Enterococcus sp.*

Introducción. El Cotija es un queso madurado, que se elabora artesanalmente a partir de leche cruda de vaca, contiene un elevado contenido de sal y un sabor-aroma muy pronunciado. Éste depende principalmente de la microbiota colonizadora, hasta ahora inexplorada, por lo que resulta importante conocer a los individuos que la conforman. Su calidad, tradición y autenticidad son resguardadas por la Asociación Prosierra de Jal-Mich bajo la Marca Colectiva Queso Cotija Región de Origen (IMPI; 867585 y 86) (1); sin embargo, existen productos en el mercado que se denominan Cotija sin ser auténticos.

En este trabajo se pretende realizar un análisis global, que permita conocer la dinámica y diversidad de las comunidades bacterianas presentes en el “auténtico” Cotija, enfocándose en la identidad de las bacterias huella que lo pudieran distinguir de los no auténticos, utilizando métodos independientes de cultivo, los que complementan a las técnicas de microbiología tradicional.

Metodología. El estudio se hizo en tres muestras de queso Cotija, 2 auténticas (A1, A2) y 1 no auténtica (NoA), durante los primeros 7 meses de su maduración. El PCR-DGGE (2), incluye las siguientes etapas: (I) Extracción del ADN total directamente del alimento, (II) Amplificación de la región V3 del gen 16S ARNr, utilizando cebadores universales para bacterias, (III) Separación de los productos de PCR en un Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE), conocido como huella génica, donde cada banda representa una bacteria, (IV) Identificación de las bandas en el gel, a) por comparación con patrones de migración de bacterias aisladas de las muestras en estudio o b) mediante escisión de las bandas, reamplificación, secuenciación y comparación (BLAST) con bases de datos. Los geles fueron digitalizados y analizados mediante el software Quantity One y Diversity Date Base, respectivamente.

Resultados y discusión. Los resultados del análisis global por PCR-DGGE (Tabla 1), muestran que la **dinámica** bacteriana es de dos tipos: una población presente desde el principio de la maduración y que se mantiene hasta el final, la que corresponde a la mayoría de los individuos: 52, 73 y 95% en A1, A2 y NoA, respectivamente. Y la población que se detectó o incorporó tardíamente, que representa 27% en A2, 5% en NoA y el 0% en A1. En cuanto a la **diversidad** se observó la presencia de un gran número de individuos en cada muestra, 25, 15 y 21 para A1, A2 y NoA, respectivamente. Para el caso de A1, el 44% de la población está presente desde etapas previas a la cuajada y además es capaz de sobrevivir a concentraciones elevadas de sal (4-7.4%) y a_w bajo (0.9-0.86) (3), condiciones prevalecientes en el producto durante

aproximadamente 7 meses de maduración. Por otro lado, las etapas de salado y oreado contribuyen con el 52% restante de la población.

Tabla 1. Análisis global de las poblaciones bacterianas mediante el % de presencia.

Detección	No. Bandas	Población (%)
Muestra Auténtica 1 (A1)		
Cuajada	1	4
Cuajada- 238 días	11	44
18 a 238 días	13	52
Total	25	100
Muestra Auténtica 2 (A2)		
15 a 235 días	11	73
Tardía	4	27
Total	15	100
Muestra No Auténtica (NoA)		
22 a 242 días	20	95
Tardía	1	5
Total	21	100

Como bacterias huella se **identificaron** a: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y *Dolosigranulum pigrum* con identidades de 99, 100 y 98%, respectivamente; las dos primeras mediante la comparación con los patrones de migración de cepas aisladas, y la última por secuenciación del amplicón separado por DGGE.

Conclusiones. El método de extracción y purificación de ADN directamente del alimento permitió obtenerlo de calidad y en cantidad suficiente para la PCR. En el análisis global de las poblaciones se observó una gran complejidad, lo que dificultó el análisis e identificación de cada individuo, por lo que se recomienda hacer búsquedas grupo, genero o especie-específicas. Las muestras auténticas se relacionan en un 87%. Se identificaron microorganismos pertenecientes al grupo de bacterias lácticas que se han encontrado en otros productos lácteos tradicionales de fermentación espontánea.

Agradecimientos. Proyecto Financiado por DGAPA-PAPIT IN200705-2

Bibliografía.

- (1) Barajas, R. Barragán, E. Chombo, P. (2005). *Reglas de Uso, Marca Colectiva “Queso Cotija Región de Origen”* México 1-24.
- (2) Muyzer, G. (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol.* 2:317-22.
- (3) Hernández, V. (2006). Queso Cotija: Análisis Físicoquímico, Proximal y Actividad Antioxidante. Tesis de licenciatura, Fac. Química, UNAM.