

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Caracterización de la microbiota láctica de quesos de cabra artesanales mediante
PCR-TTGE-secuenciación**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

Yael Carolina Codriansky Rodríguez

Agosto, 2007
Santiago-Chile

Director de Tesis: Dr. Martin Gotteland

Co-Director de Tesis: Dr. Jaime Romero

Profesor Patrocinante: Dra. Margarita Carú





*Llegué a la Biotecnología porque en una clase de biología en séptimo u octavo básico la profe hablaba de la célula, y yo me enamoré (seguramente también porque crecí en una farmacia ariqueña jugando con una hermosa balanza de platillos y con frascos azules llenos de eter u otros extraños líquidos). Más me gustó cuando la profe habló del ADN. No sé qué dijo exactamente pero si sé que ese día decidí que quería comprender el cómo suceden las cosas dentro de una célula. Di la prueba de aptitud, si no quedaba en biotecnología sería en biología o bachillerato, quizás en bioquímica. Entré, y aquí estoy ahora, 8 años después, a punto de titularme. Pasé por tres laboratorios: el de genética molecular vegetal en segundo año porque me gustan las plantas, el Rayo en quinto año, porque quería investigar experimentando en mí misma y empaparme de su manera de pensar "autopoiética" (ahí aprendí más que en toda mi vida y participé en investigaciones sobre cómo está organizada la célula). Y finalmente en el gastro en el INTA, donde hice mi muy biotecnológica tesis y crecí como persona, alumna y profesional. Mis próximos pasos los quiero dirigir hacia otras áreas de la biología, hacia mi interés por la estructura de otro tipo de relaciones, las relaciones mente-cuerpo, que las siento más concretas, manejables, entretenidas, sociables y estudiadas que las relaciones celulares, motivos que me hacen sentir cómoda y gustosa. No sé concretamente cuál será **él** próximo paso, pero ahora ya sé hacia dónde quiero dirigirme. Espero poder concretar mis anhelos, y ser buena profesional en ello.*



Dedico esta tesis a TODA mi familia: la que fue, la que es y a la que viene.

AGRADECIMIENTOS

Los cimientos de esta tesis:

Quiero agradecer enormemente a mi familia por comprender mis decisiones y dejarme llevarlas a cabo y porque sin ellos mi historia sería otra. A mis amigos de la universidad: Jocelyn, Cata, Ximena, Bárbara y Carlos por todos los gratos momentos y por la amistad que forjamos, a mis compañeros de labores en el INTA: Paola, Magaly, Elmer y Cristian, por ser grandes amigos, acompañantes en momentos de laboratorística soledad e intercambiadores de pareceres no tan científicos. También a todos aquellos con los que conviví en el segundo piso del INTA. Y finalmente a mis profesores: Martín Gotteland quien me dejó utilizar mi tiempo según mi albedrío y que me mostró que la relación alumno-profesor también es una relación de amistad y cariño, a Jaime Romero porque además de enseñarme a experimentar y a analizar los datos obtenidos, en el convivir, primero denso y luego fluido, me enseñó que para aprender y trabajar, las relaciones distendidas son las mejores, al Dr. Brunser por nuestras esporádicas pero ricas conversaciones, al profesor Juan Carlos Letelier por aceptarme aún niña en su laboratorio y a la Bea, mi profe de mi exquisita segunda actividad: la danza, porque es una excelente coreógrafa "mente-cuerpo".



INDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCION	1
1. El queso: producto de la fermentación de la leche	1
2. Modos de producción del queso y cualidades organolépticas	2
3. Dinámica de las bacterias lácticas durante la elaboración del queso	4
4. Métodos moleculares aplicados al estudio de la microbiota láctica	4
5. Proyecto dentro del cual se enmarca esta tesis	6
HIPOTESIS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECIFICOS	7
MATERIALES Y METODOS	8
1. Obtención de las muestras	8
2. Extracción de ADN	9
3. Amplificación del ADNr 16S con partidores dirigidos a eubacterias	10
4. Amplificación del ADNr 16S con partidores dirigidos a bacterias lácticas	12
5. Electroforesis en Gradiente Temporal de Temperatura (TTGE)	12
6. Re-amplificación de bandas escindidas de los TTGE para posterior secuenciación	13
7. Secuenciación, edición de cromatogramas e identificación de bandas dominantes de los TTGE	14



8. Frecuencia	15
9. Análisis Estadístico	16
RESULTADOS	17
1. Muestras de leche	17
2. Composición de la microbiota láctica de quesos	17
2.1 Identificación de géneros bacterianos mediante TTGE con partidores dirigidos a eubacterias	17
2.2 Identificación de los géneros bacterianos mediante TTGE con partidores dirigidos a bacterias lácticas	20
2.3 Composición de la microbiota láctica según zona geográfica	22
2.4 Composición de la microbiota láctica en dos etapas de la maduración	24
2.5 Análisis de los perfiles observados en los TTGE	26
2.5.1 Perfiles de TTGE de amplicones obtenidos con los partidores dirigidos a eubacterias	26
2.5.2 Perfiles de TTGE con los amplicones obtenidos con los partidores dirigidos a bacterias lácticas	27
DISCUSION	28
1. Géneros bacterianos identificados	28
1.1 En las leches	29
1.2 En los quesos	33
2. Bandas no consideradas en el análisis	31
3. Composición de la microbiota láctica según zona geográfica	31



4. Composición de la microbiota láctica en dos etapas de la maduración	32
5. Posibles sesgos de la técnica	33
6. Relevancia de este trabajo	35
CONCLUSION	37
BIBLIOGRAFIA	38



INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Géneros bacterianos identificados mediante secuenciación con partidores HDA1	20
Tabla 2: Géneros bacterianas identificadas mediante secuenciación con partidores LAC1	22
Tabla 3: Perfiles observados en los TTGE con amplicones obtenidos con HDA	26
Tabla 4: Perfiles observados en los TTGE con amplicones obtenidos con LAC	27



INDICE DE FIGURAS

Fig.1: Posiciones relativas de los partidores HDA1, HDA2, LAC1 y LAC2 en el ADNr 16S de <i>Lactobacillus plantarum</i> (Lopez y col, 2003)	8
Fig.2: TTGE de los amplicones obtenidos con partidores dirigidos a eubacterias (HDA1 y HDA2) de muestras de quesos con 15 y 30 días de maduración provenientes de distintos productores de valle.	18
Fig.3: TTGE de amplicones obtenidos con partidores dirigidos a eubacterias (HDA1 y HDA2) de muestras de quesos con 15 y 30 días de maduración provenientes de distintos productores de cordillera.	19
Fig.4: TTGE de los amplicones obtenidos con partidores dirigidos a bacterias lácticas (LAC1-LAC2) de muestras de quesos con 15 y 30 días de maduración obtenidas de productores de valle.	21
Fig.5: Perfiles de TTGE de los amplicones obtenidos con partidores dirigidos a bacterias lácticas (LAC1 y LAC2) de muestras de quesos con 15 y 30 días de maduración obtenidas de productores de cordillera.	21
Fig.6: Frecuencia de géneros bacterianos identificados mediante secuenciación con HDA1 según zona geográfica.	23
Fig.7: Frecuencia de géneros bacterianos identificados mediante secuenciación con LAC1 según zona geográfica.	24
Fig.8: Frecuencia de géneros bacterianos identificados con HDA1 en dos etapas de la maduración.	25
Fig.9: Frecuencia de géneros bacterianos identificados con LAC1 en dos etapas de la maduración.	25



LISTA DE ABREVIATURAS

b: bases nucleotídicas

F: frecuencia

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Q15: quesos con 15 días de maduración

Q30: quesos con 30 días de maduración

T_m: Temperatura de denaturación

TTGE: "Temporal temperature gradient gel electrophoresis"

ufc: unidad formadora de colonias

%GC: porcentaje de guanidinas y citocinas



RESUMEN

Actualmente en Chile la producción de quesos artesanales de cabra se concentra en la IV Región. La recurrente contaminación de estos quesos con bacterias patógenas dificulta su comercialización y disminuye el valor agregado de estos productos. Al buscar la inocuidad de estos quesos los productores pasteurizan la leche con la consecuente pérdida de la microbiota láctica nativa y de las cualidades organolépticas que los caracterizan, lo que resulta en un queso sin personalidad propia. Para asegurar la calidad e inocuidad del queso de cabra chileno, beneficiando así su comercialización, y debido a que no se conoce la diversidad de bacterias utilizadas en la fermentación natural de estos alimentos en Chile, se caracterizó la microbiota láctica a través de PCR-TTGE-secuenciación. Mediante esta aproximación se compararon quesos provenientes de distintas zonas geográficas (valle y cordillera) de la IV Región y diferentes etapas de maduración encontrándose poblaciones bacterianas de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Weissella*. Estas bacterias pueden ser aisladas y utilizadas como fermentos exógenos en quesos de cabra pasteurizados para obtener un producto inocuo y que conserve parte de las cualidades organolépticas que caracterizan al queso de cabra artesanal de la IV Región de Chile.



ABSTRACT

In Chile artisanal production of goat cheese is concentrated in the IV Region. The presence of pathogenic bacteria in these cheeses reduce their value and also difficult its commercialization. To improve safety, the producers use pasteurized milk which could outcome in cheeses without own qualities. This may be due to the consequent loss of native lactic microbiota and the organoleptic properties that characterize them. In order to assure the quality and inocuity of the Chilean goat cheese, and considering that the bacterial populations who make possible the natural fermentation is unknown, lactic microbiota was characterized through PCR-TTGE-sequencing. Using this approach, cheeses from different geographic zones (valley and mountain) and with different stage of maturation, were compared. Populations of *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* and *Weissella* were found in the samples. These bacteria could be isolated and used like exogenous cheese starters in pasteurized goat cheeses to obtain an innocuous product conserving part of the organoleptic qualities that characterize the artisanal goat cheese of the IV Region of Chile.

INTRODUCCION

1. El queso: producto de la fermentación de la leche.

La elaboración del queso requiere de un intenso proceso de fermentación de la leche realizado por bacterias lácticas, donde la lactosa, el carbohidrato más abundante de la leche, es transformada en ácido láctico. Una permeasa transporta la lactosa dentro de la célula bacteriana donde es hidrolizada por una β -galactosidasa en glucosa y galactosa. La glucosa es fosforilada y convertida en ácido pirúvico por una aldolasa y luego a ácido láctico por la lactato-deshidrogenasa (Marshall & Cole, 1983). Este proceso disminuye el pH del medio, lo cual provoca la desestructuración y precipitación de la principal proteína de la leche, la caseína, que se encuentra agrupada en micelas estabilizadas mediante fosfato de calcio (Roberts y col, 1998). La caseína precipitada junto a la grasa de la leche y bacterias lácticas conforman la cuajada. La fracción líquida que se elimina es el suero que contiene lactosa, otras proteínas de la leche como la β -lactoglobulina y la α -lactalbúmina, y oligoelementos (Alonso-Calleja y col, 2002). La cuajada es cortada de manera de facilitar la eliminación del suero y posteriormente es prensada en moldes, salada y madurada hasta obtener el producto final el cual posee características fisicoquímicas y organolépticas propias.

En el queso además de bacterias lácticas se encuentran otros tipos de bacterias (Ogier y cols, 2004), hongos (Barrios y cols, 1998; Montagna y cols, 2005) y levaduras (Foschino y cols, 2006). Estos microorganismos se relacionan por lo general con contaminación durante la maduración del queso y lo habitan principalmente en su corteza.

Existen más de 1.000 tipos distintos de quesos artesanales en el mundo (Fox & McSweeney, 2004) los cuales se clasifican según el origen de la leche utilizada (vaca, cabra, oveja, búfalo) y su textura (muy dura, dura, semi-dura, semi-blanda, blanda). El protocolo de manufactura de estos quesos difiere en los detalles pero en general todos siguen los siguientes pasos: acidificación (por bacterias lácticas naturalmente presentes en la leche o añadidas, o mediante la adición de cuajo), coagulación, eliminación del suero, moldeo y maduración.

El queso de cabra es un producto mundialmente consumido, siendo Francia, España, Brasil y Argentina los principales productores. En Chile, la producción de queso de cabra se realiza principalmente en la cuarta región. El 80% de dicha producción se comercializa en el mercado informal debido a las malas condiciones de higiene que prevalecen durante su elaboración y a su frecuente contaminación por coliformes fecales y/o por bacterias patógenas como *Salmonella* y *Staphylococcus*. Para mejorar este aspecto se han creado centros de acopio a cargo de recolectar y pasteurizar la leche de cabra.

2. Modos de producción del queso y cualidades organolépticas.

Las bacterias lácticas están presentes en forma natural sobre las ubres de las cabras y también, en algunos casos, en las manos del ordeñador. Durante la ordeña dichas bacterias colonizan la leche contribuyendo al desarrollo de la fermentación láctica y a la maduración del queso. En estos procesos las bacterias lácticas metabolizan los distintos constituyentes proteicos, glucídicos y lipídicos de la leche, generando un gran número de metabolitos (péptidos, diacetilos, cetonas, ácidos orgánicos, ácidos grasos libres) que se acumulan en el queso durante su maduración, otorgándole características organolépticas propias (Khalid & Marth 1990; Fox &

Wallace 1997; Grappin & Beuvier 1997; Chavarri y col, 2000; McSweeney & Sousa 2000; Fernández-García y col, 2002; Kieronczyk y col, 2003; Mauriello y col, 2003; Macedo y col, 2004; Menéndez y col, 2004).

La estación del año (Caridi y col, 2003) y la zona geográfica de producción (Buchin y col, 1999; Mauriello y col, 2003), así como las prácticas higiénicas de los productores (Desmaures y col, 1997; Klantschitsch y col, 2000; Michel y col, 2001; Lafarge y col, 2004) son factores importantes que determinan la composición bacteriana de la leche y las cualidades organolépticas de los quesos. Esto ha sido atribuido al tipo y calidad del alimento consumido por los animales y a algunas condiciones ambientales de producción como la temperatura.

Para disminuir la alta frecuencia de contaminación por patógenos, debido a deficientes prácticas higiénicas de los productores, algunas cooperativas han implementado la pasteurización de la leche cruda. En este proceso, en que se calienta la leche a 63°C por 30 min, se altera la estructura de la leche y se reduce la carga de patógenos y de bacterias lácticas (Buchin y col, 1998; Buffa y col, 2001; Menéndez y col, 2004). Esto hace indispensable utilizar nuevos fermentos lácticos, generalmente importados, para fermentar la leche procesada y permitir la elaboración de queso.

Las cualidades organolépticas de los quesos producidos con leche cruda son más intensas que las de los quesos elaborados a partir de la leche pasteurizada con fermentos importados (Buchin y col, 1998; Fitzsimons y col, 1999; Kieronczyk y col, 2003; Macedo y col, 2004). Esto se debe a diferencias considerables en la composición y carga de la microbiota láctica, y por lo tanto en los aminoácidos y ácidos grasos libres de estos quesos que son los que otorgan la textura, sabor y olores característicos a cada uno de ellos (Beuvier y col, 1997; McSweeney & Sousa 2000; Fernández-García y col, 2002).

3. Dinámica de las bacterias lácticas durante la elaboración del queso.

La comunidad de bacterias lácticas encontrada en quesos está conformada principalmente por bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* (Coppola y col, 2001; Alonso-Calleja y col, 2002; Randazzo y col, 2002; Duthoit y col, 2003; Ercolini y col, 2003; Fortina y col, 2003; Badis y col, 2004; Poznanski y col, 2004; Oksuztepe y col, 2005; Aquilanti y col, 2006).

En 11 tipos de quesos de cabra provenientes de España se observó que las bacterias dominantes pertenecían a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Buffa y col, 2001; Alonso-Calleja y cols, 2002). El recuento de cada género bacteriano a través de la maduración varió en 1 a 2 órdenes de magnitud. *Lactococcus* era abundante en los comienzos de la maduración y disminuyó a medida que esta transcurrió (de $3,2 \times 10^9$ a $3,2 \times 10^7$ ufc/g de queso), mientras que los recuentos de *Lactobacillus* y de *Leuconostoc* aumentaron (de 10^6 a 10^8 ufc/g de queso y de 10^7 a 3.2×10^8 ufc/g de queso, respectivamente).

En quesos artesanales de cabra españoles se pudieron distinguir las siguientes especies de *Lactobacillus* aislados de las muestras: *L. paracasei*, *L. curvatus*, *L. pentosus*, *L. cellobiosus* y *L. rhamnosus* (Sanchez y col, 2005). Si bien existen estudios describiendo la microbiota láctica de quesos de vaca a través de métodos moleculares (Ogier y col, 2002; Randazzo y col, 2002; Andrighetto y col, 2004; Ogier y col, 2004), en el caso de los quesos de cabra, la mayoría de los estudios usaron métodos cultivo-dependientes.

4. Métodos moleculares aplicados al estudio de la microbiota láctica.

Se pueden monitorear las comunidades bacterianas mediante técnicas microbiológicas clásicas. Sin embargo, la mayoría de las bacterias que constituyen

ecosistemas complejos no son cultivables en los medios disponibles actualmente (Amann y col, 1995). Por esta razón en la última década se han desarrollado técnicas moleculares que permiten caracterizar a las comunidades bacterianas independientemente de su habilidad de crecer en los medios de cultivo convencionales. Estos métodos han incrementado nuestro entendimiento de la ecología microbiana en diversos ecosistemas (acuático, terrestre, intestinal, alimenticio, entre otros) (Muyzer y col, 1993; Walter y col, 2000; Walter y col, 2001; Heilig y col, 2002; Handelsman 2004; Endo & Okada 2005; Zoetendal y col, 2006).

Los métodos cultivo-independientes consisten en la extracción del ADN directamente desde la muestra y en la amplificación y análisis de algunos genes específicos del ADN bacteriano, principalmente el gen del ADNr 16S y en su posterior secuenciación (Ogier y col, 2002; Randazzo y col, 2002; Duthoit y col, 2003; Ercolini y col, 2003). La Electroforesis en Gradiente Temporal de Temperatura (TTGE) es un método que ha sido utilizada con éxito para comparar y monitorear las dinámicas de comunidades bacterianas complejas (Doare-Lebrun y col, 2006; Magne y col, 2006; Nicholson y col, 2007). Generalmente, a partir de una población heterogénea de ADN bacteriano, se amplifica por PCR una región variable del ADNr 16S obteniendo una mezcla de amplicones de igual tamaño pero de secuencias diferentes según los distintos géneros, especies o cepas bacterianas presentes en la muestra. Luego los amplicones son separados por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes (urea) y de gradiente creciente de temperatura. La movilidad electroforética de los amplicones varía en función del %GC de la secuencia y, por lo tanto, de su T_m (Muyzer & Smalla 1998). Aquellos fragmentos con una T_m menor, es decir con un menor %GC, migrarán menos que aquellas moléculas con mayor T_m y

%GC. Así, esta diferencia de movilidad electroforética entre los amplicones, resultará en un perfil de bandas correspondiente a la muestra analizada (Muyzer y col, 1993).

5. Proyecto dentro del cual se enmarca esta tesis.

Esta tesis se enmarca dentro del proyecto "Mejoramiento de la Calidad y Diferenciación de Quesos de Cabra Elaborados con Leche Pasteurizada mediante la Incorporación de Fermentos Lácticos Locales Seleccionados" financiado por el Fondo para la Innovación Agraria (FIA) (FIA-PI-C-2004-1-P-040).

HIPOTESIS

Existen diferencias cualitativas en la composición de la microbiota láctica de quesos artesanales de cabra según su origen geográfico y las distintas etapas de su proceso de elaboración.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los cambios que ocurren en la composición de la microbiota láctica durante la elaboración de quesos artesanales de cabra provenientes de distintos orígenes geográficos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar la microbiota láctica dominante presente en quesos de cabra artesanal de la IV Región de Chile
- Comparar la microbiota láctica de los quesos según la zona geográfica de producción
- Comparar la microbiota láctica de los quesos según las etapas de la elaboración: leche y quesos con 15 y 30 días de maduración

MATERIALES Y METODOS

Para el estudio de la comunidad bacteriana del queso se emplearon métodos moleculares cultivo-independientes basados en el análisis del ADN bacteriano extraído directamente de las muestras. En primer lugar se exploró la diversidad bacteriana presente en las leches y quesos empleando partidores dirigidos al dominio bacteria (HDA1 y HDA2) y en una segunda etapa el análisis se centró en el uso de partidores dirigidos a bacterias lácticas (LAC1 y LAC2) (Fig. 1).

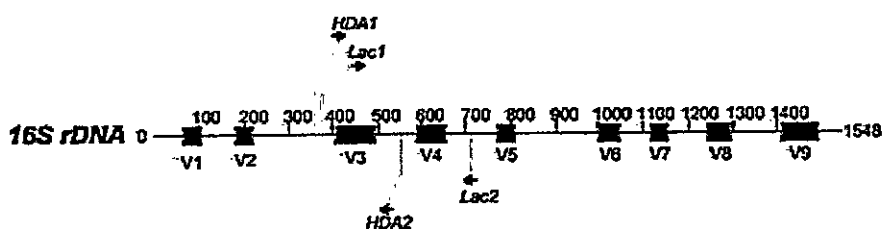


Fig.1: Posiciones relativas de los partidores HDA1, HDA2, LAC1 y LAC2 en el ADNr 16S de *Lactobacillus plantarum* (López y col, 2003)

En ambas etapas se comparó la diversidad entre muestras de diferente origen geográfico y se estudió la dinámica de las bacterias lácticas durante el proceso de elaboración del queso de cabra.

1. Obtención de las muestras.

Se obtuvieron 77 muestras de leche y quesos artesanales de pequeños productores de la IV Región de Coquimbo, Provincia de Limarí, Comunas de Ovalle, Río Hurtado y Punitaqui. Los quesos fueron producidos sin pasteurización previa de la leche y sin la adición de fermentos exógenos. Los métodos y herramientas utilizadas en la producción eran artesanales y tradicionales. Una parte de estas muestras fue

producida en zonas de valle y otra en zonas cordilleranas en el caso de los criadores que trashumaban con sus animales. Sólo se obtuvieron muestras de leche de productores de valle. Los quesos recolectados tenían 15 o 30 días de maduración. La recolección de muestras fue realizada en el mismo lugar de producción y almacenamiento de los productos. Las muestras se conservaron a 4°C en un "cooler" con hielo hasta su llegada a Santiago. En el laboratorio fueron almacenadas a -20°C hasta la realización del estudio molecular.

2. Extracción del ADN.

El ADN bacteriano de las muestras se aisló utilizando el método del "Bead Beater" según el protocolo adaptado de Godon y col (1997).

Dos gramos de queso fueron homogenizados sobre hielo en 3 ml de buffer citrato al 2% (P/V). El homogenizado se centrifugó 25 min a 3.800 x g para obtener las células bacterianas y eliminar la grasa. Al pellet se le agregaron 125 µl de isotiocianato de guanidinio 4M en Tris-Cl 0,1 M pH 7,5 para inhibir la acción de nucleasas y 19 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%. Esta mezcla fue homogeneizada con un vórtex y se le adicionaron inmediatamente 400 µl de SDS al 5% en amortiguador fosfato 0,1 M pH 8,0 para fragilizar las membranas bacterianas. Después de una incubación de una hora a 70°C para pre-lisar las células se añadió a cada tubo un volumen de microesferas estériles de zirconio (0,1 mm de diámetro). Los tubos fueron agitados en un "Mini Bead Beater" (Biospec Products, USA) dos veces a máxima velocidad durante 5 min para romper mecánicamente las células y liberar el ADN. Posteriormente se le agregó a cada muestra 0,02 g de polivinilpirrolidona (PVPP), un quelante de los anillos aromáticos inhibidores de la reacción de PCR, y se centrifugaron 3 min a 15.000 x g. El sobrenadante se recuperó en un tubo estéril y al pellet que contenía las micro-

esferas y el material sólido se le añadieron 500 μ l de TENP (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM de EDTA, 100 mM NaCl, 1% PVPP), luego se centrifugó nuevamente por 3 min a 15.000 x g. Este paso se repitió tres veces y todos los sobrenadantes obtenidos se colectaron en el mismo tubo y se centrifugaron 1 min a 15.000 x g para eliminar suspensiones. Las micro-esferas y el material sólido fueron descartados.

El ADN de cada sobrenadante se precipitó con 1 ml de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Después de una centrifugación a 15.000 x g por 15 min el pellet fue resuspendido en 450 μ l de amortiguador fosfato 0,1 M pH 8,0 y 50 μ l de acetato de potasio 5 M e incubado 90 min en hielo con el fin de decantar impurezas y ADN plasmidial. Las impurezas fueron eliminadas centrifugando 30 min a 15.000 x g. Cada sobrenadante fue incubado con 15 μ l de RNasa A (1 mg/ml) 30 min a 37°C. El ADN fue precipitado con 1 ml de etanol y 50 μ l de acetato de sodio 3 M, incubándose 10 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó 15 min a 15.000 x g y se resuspendió el pellet en 500 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Al ADN resuspendido se le agregaron 500 μ l de isopropanol. Estos tres últimos pasos fueron repetidos nuevamente. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70%, se centrifugó 5 min a 15.000 x g, se secó y se resuspendió en 100 μ l de buffer TE. El ADN se mantuvo almacenado a -20°C. Se confirmó la calidad del ADN obtenido en un gel de agarosa al 1,2% teñido con bromuro de etidio y visualizado en transiluminador a 254 nm.

3. Amplificación del ADNr 16S con partidores dirigidos a eubacteria.

El ADN obtenido se amplificó por PCR utilizando Platinum® Taq DNA Polimerasa (Invitrogen Corporation, Estados Unidos) y los partidores universales HDA1-GC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG

GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3') y HDA2 (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3') sintetizados por Invitrogen que amplifican 200 bases de la región V3 del ADNr 16S de eubacterias (Lopez y col, 2003). La secuencia resaltada en negrita corresponde a una sucesión de 30 a 50 guanidinas (G) y citosinas (C) (CLAMP GC) adicionada al extremo 5' de uno de los partidores para impedir la completa disociación de los fragmentos de ADN durante la TTGE y aumentar así la resolución de las bandas en el gel.

Un microlitro de cada muestra de ADN obtenido fue adicionado a 24 µl de mezcla de reacción que contenía Buffer Taq (concentración final: 20 mM Tris-HCl pH 8,4 y 50 mM KCl), 0,1 mM de cada dNTP, 0,75 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada partidor y 0,5 U de Taq polimerasa. Para la amplificación se utilizó un protocolo de TouchDown PCR adaptado de Muyzer y col (Muyzer y col, 1993) cuya particularidad es que la temperatura de apareamiento inicial es mayor a la correspondiente para los partidores utilizados. Esta temperatura va disminuyendo grado a grado durante los ciclos sucesivos hasta llegar a la temperatura de apareamiento ideal la cual se estabiliza en los ciclos restantes. La PCR comenzó con un paso de denaturación de 3 min a 95°C para liberar el anticuerpo unido al sitio activo de la Taq que impide amplificaciones inespecíficas. Los siguientes 25 ciclos de PCR consisten en un paso de denaturación (95°C por 30 s), apareamiento (65°C durante 30 s, disminuyendo 1°C cada ciclo hasta llegar a los 55°C), y finalmente en un paso de extensión (72°C por 1 min). Los productos de PCR fueron verificados en electroforesis en gel de agarosa al 1,2% junto con un marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp Plus (Fermentas Internacional Inc., Canadá) y visualizados luego de ser teñidos con bromuro de etidio en un transiluminador a 254 nm.

4. Amplificación del ADNr 16S con partidores dirigidos a bacterias lácticas.

Para la reacción de PCR con partidores dirigidos a bacterias lácticas 1 μ L de cada ADN fue adicionado a una mezcla de reacción que contenía en un volumen final de 25 μ l buffer Taq (concentración final: 20 mM Tris-HCl pH 8,4 y 50 mM KCl) 0,25 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 μ M de cada partidor y 0,5 U de Taq polimerasa. Los partidores utilizados fueron LAC1 (5'-AGC AGT AGG GAA TCT TCC A-3') y LAC2-GC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGC CCG GGG GCA CCG GGG GAT TYC ACC GCT ACA CAT G-3') que amplifican 340 bases de la región V3 y V4 del ADNr 16S de bacterias lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Weissella* (Lopez y col, 2003). La amplificación comenzó con una etapa inicial de denaturación (95°C por 3 min) seguida de 25 ciclos de PCR consistentes de un paso de denaturación (95°C por 30 s), apareamiento (61°C por 1min), extensión (72°C por 1 min) y finalmente un paso de extensión final de 68°C por 7 min. La integridad de los productos de PCR fue confirmada en un gel de agarosa al 1,2% junto con un marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp Plus (Fermentas Internacional Inc., Canadá). El gel fue teñido con bromuro de etidio y luego visualizado en un transiluminador a 254 nm.

5. Electroforesis en Gradiente Temporal de Temperatura (TTGE).

El TTGE de los amplificados obtenidos con los partidores HDA y LAC se realizó en un gel de poliacrilamida denaturante (7 M de urea, buffer TAE 1,25X (50 mmol/l Tris base, 25 mmol/l ácido acético glacial, 1,25 mmol/l EDTA, pH 8,0) y 8% de acrilamida/bisacrilamida) de 16 x 16 x 1 cm. La desgasificación previa de la solución y la adición de 550 μ l de persulfato de amonio al 10% (APS) más 55 μ l de Temed

permitió la polimerización del gel. La TTGE se realizó utilizando un Sistema de Detección Universal de Mutaciones (DCode System, Bio-Rad, USA) en buffer TAE 1,25X. Una vez que el buffer y el gel alcanzaron una temperatura de 66°C se cargaron 15 µl de amplificado mezclado con 15 µl de buffer de carga (0,05% de azul de bromofenol en 70% de glicerol) en cada pocillo. Luego el gel se corrió desde 66°C hasta 70°C con una rampa de temperatura de 0,2°C/hora a 65 V. Una vez terminada la migración y estabilizado el equipo, el gel fue desmontado, lavado con agua destilada, teñido por 30 min con SYBR Safe 1X, visualizado en un transiluminador a 254 nm y fotografiado con una cámara digital Olympus (Modelo Camedia C-3040ZOOM).

6. Re-amplificación de bandas escindidas de los TTGE para posterior secuenciación.

Las bandas observadas en los TTGE fueron escindidas del gel e incubadas una hora en agua libre de nucleasas para lavar el gel y eliminar urea y sales que interfieren en la PCR. Luego se eliminó esta agua y se incubaron las bandas en 30 µl de agua libre de nucleasas durante una noche a 4°C para permitir la elución en el agua del ADN presente en cada porción de gel. El ADN recuperado fue posteriormente amplificado por sextuplicado mediante el protocolo de PCR para eubacteria o bacterias lácticas según los partidores utilizados inicialmente. Los productos de PCR fueron verificados en electroforesis en minigeles de poliacrilamida al 8% y visualizados a luz directa luego de ser teñidos con nitrato de plata.

Para cuantificar el ADN de los amplicones correspondientes a las bandas destinadas a ser secuenciadas se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,2% teñidos con bromuro de etidio. Como marcador para la cuantificación del ADN se utilizó

un marcador de masa molecular (MassRuler™ DNA Ladder Low Range, Fermentas International Inc., Canadá). Los geles fueron fotografiados con cámara digital y analizados con el programa Gel Pro Analyzer v3.1 (Media Cybernetics, UK). La intensidad de cada banda se comparó con las intensidades de las bandas del marcador de masa, obteniéndose por interpolación, la concentración de los amplicones a secuenciar.

7. Secuenciación, edición de cromatogramas e identificación de bandas dominantes escindidas de los TTGE.

Los géneros y especies bacterianas que componen la microbiota láctica de leches y quesos fueron identificados mediante secuenciación parcial del ADNr 16S. La secuenciación fue realizada por la empresa MacroGen (Seúl, Corea del Sur). La concentración mínima de amplicón necesaria para secuenciar, según los requisitos de la empresa era de 50 ng/μl. Se secuenciaron los amplicones con los partidores directos HDA1 y LAC1 sin la cola de GC.

Los cromatogramas correspondientes a cada banda secuenciada fueron editados en el programa "BioEdit Sequence Alignment Editor" (Hall, 1999). Para evaluar la calidad de las secuencias se analizó la longitud, altura, claridad y equidistancia de los picos en el cromatograma y el nivel de la línea de fondo. El límite 3' de la secuencia se definió por la presencia del partidor reverso (reverso complementario) y esta secuencia fue eliminada. El límite 5' fue definido desde el comienzo de la lectura correcta, típicamente 20-40 bases a contar del inicio de la lectura que siempre presenta picos confusos de leer. Una vez definidos los extremos se editaron directamente desde el cromatograma los picos que no eran claros (tomando en cuenta su equidistancia o altura). Se colocó la base correcta cuando se

presentó un error de lectura, o la base degenerada correspondiente si la base estaba definida por más de un pico de altura considerable.

Se buscó si las secuencias editadas correspondían a secuencias depositadas en la base de datos de secuencias ribosomales (RDPII, http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) (Cole y col, 2005), ingresándolas en formato fasta. Se utilizaron los parámetros por defecto del RDPII que incluyeron a todas las secuencias de la base de datos con longitudes mayores a 1.200 bases asignadas o no a microorganismos tipo. Se obtuvieron las 20 correspondencias más cercanas.

El alineamiento de las secuencias se realizó con el "ClustalW Multiple Alignment" disponible en el programa "BioEdit Sequence Alignment Editor".

8. Frecuencia.

Se calculó para cada población bacteriana la frecuencia en que se presentó en las muestras de quesos en función de su origen geográfico o de su tiempo de maduración. Dicha frecuencia se calculó contando en todas las muestras el número de bandas correspondientes a cada población identificada y dividiendo el resultado obtenido por el número total de muestras; estos resultados se expresaron como porcentaje. Entonces,

$$F = (N / T) \times 100$$

donde,

F = frecuencia

N = número de bandas observadas en los perfiles de TTGE correspondientes a cada uno de los géneros o especies bacterianas identificados mediante secuenciación

T = número total de muestras en cada uno de los dos grupos (definidos por el origen geográfico y por el tiempo de maduración)

La frecuencia de los perfiles, entendidos éstos como la combinación de bandas en una muestra, se calculó como el número de muestras con el perfil definido (I al X) dividido por el número total muestras analizadas, según la zona geográfica de producción o el tiempo de maduración.

9. Análisis Estadístico.

Las frecuencias de los géneros o especies bacterianas presentes en las muestras según la zona geográfica o el tiempo de maduración se compararon por prueba de X^2 (http://www.georgetown.edu/faculty/ballc/webtools/web_chi.html).

RESULTADOS

1. Muestras de leche.

De un total de 21 muestras de leche provenientes de productores de valle sólo fue posible extraer el ADN a 10 de ellas. De 9 muestras se obtuvo ADN amplificable con HDA y sólo de 2 con los partidores LAC.

De las 9 muestras de leche amplificadas con los partidores HDA se obtuvieron perfiles de TTGE en 7 de ellas donde se observaron de 1 a 2 bandas por carril (dato no mostrado). Estas bandas fueron identificadas como bacterias pertenecientes a los géneros *Lactococcus* y *Streptococcus*. *Leuconostoc* se encontró en las leches analizadas con los partidores LAC. No se identificó *Lactobacillus* ni *Weissella* en este tipo de muestras.

Debido al bajo número de muestras de leche analizadas y a que estas sólo correspondían a muestras provenientes de valle, los datos obtenidos de ellas no fueron considerados en los análisis de la microbiota láctica según zona geográfica y tiempo de maduración. Sin embargo, se hace una referencia a estos datos en la discusión.

2. Composición de la microbiota láctica de quesos.

2.1 Identificación de géneros bacterianos mediante TTGE con partidores dirigidos a eubacterias.

Se analizaron 54 muestras de quesos con 15 días de maduración (Q15) y con 30 días de maduración (Q30) provenientes de productores de valle y cordillera. A todas estas muestras se les extrajo ADN que se amplificó y que posteriormente fue analizado mediante TTGE. En las Fig.2 y 3 se muestran como ejemplo los perfiles de 19 muestras en donde se observan de 1 a 7 bandas por carril.

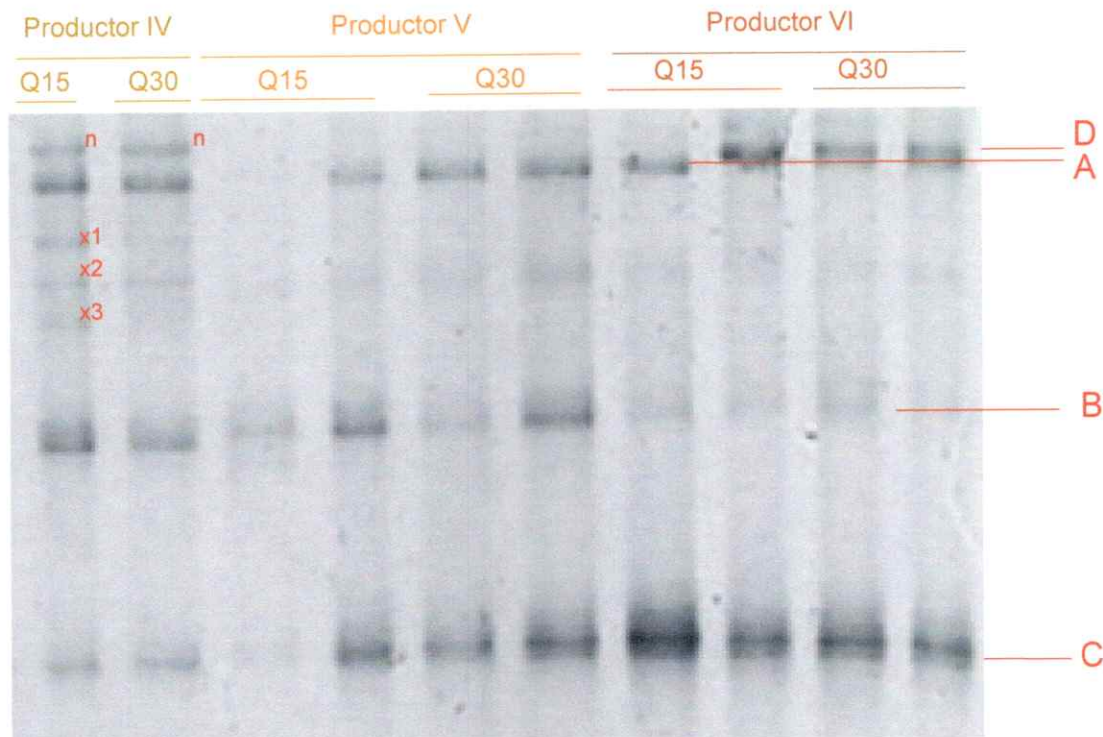


Fig. 3: TTGE de amplicones obtenidos con partidores dirigidos a eubacterias (HDA1 y HDA2) de muestras de quesos con 15 y 30 días de maduración provenientes de distintos productores de cordillera. A, B, C y D son las bandas dominantes cuyas identidades son: A: *Lactobacillus*; B: *Streptococcus*; C: *Lactococcus*; D: *Weissella*. Las bandas x1, x2 y x3 son bandas poco frecuentes no consideradas en los análisis de la microbiota láctica. De la banda n no se obtuvo ADN reamplificado.

En estos gels, se distinguieron bandas correspondientes a 11 movilidades electroforéticas distintas. Se escindieron y eluyeron todas las bandas observadas (136) en los perfiles de TTGE provenientes de las 54 muestras analizadas. Se reamplificaron y secuenciaron 20 bandas (dos de cada movilidad, excepto de la movilidad n).

Fue posible identificar las bandas correspondientes a cuatro de estas movilidades electroforéticas (A, B, C y D) como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Weissella* con un 100% de identidad con las secuencias depositadas en la base de datos RDPII (Fig.2 y 3, Tabla 1). Estas bandas predominaban en la microbiota láctica observándose respectivamente en el 52, 50, 98, y 9% de las 54

Tabla 1: Géneros bacterianos identificados mediante secuenciación con HDA1

bandas	Correspondencia con género	Id (%)	largo secuencia (b)	Frecuencia (%)			
				zona geográfica		maduración	
				valle	cordillera	Q15	Q30
A	<i>Lactobacillus</i>	100	100	34	35	60	48
B	<i>Streptococcus</i>	100	100	32	39	56	52
C	<i>Lactococcus</i>	100	100	83	83	96	96
D	<i>Weissella</i>	100	100	0	22	4	8

muestras analizadas, por lo que se consideraron como las poblaciones más frecuentes y dominantes de dicha microbiota.

Las demás movilidades electroforéticas fueron denominadas a1, a2, a3, x1, x2, x3 y n las que se observaron en menos de un 15% de las muestras. Por encontrarse en baja frecuencia y presentar cromatogramas con lecturas ambiguas, ninguna de ellas fue considerada en los análisis posteriores de la microbiota láctica. A pesar de su baja frecuencia, se consideró a *Weissella* dentro de la microbiota dominante porque los cromatogramas de estas bandas fueron claros de leer y de identificar.

2.2 Identificación de los géneros bacterianos mediante TTGE con partidores dirigidos a bacterias lácticas.

Se obtuvieron amplicones usando los partidores LAC sólo de 43 de las 54 muestras, los que fueron evaluados por TTGE. Las 19 muestras con los perfiles más complejos se muestran en las Fig. 6 y 7 donde se observan de 1 a 5 bandas por carril. Se escindió la totalidad de las bandas observadas (72 bandas) y se secuenciaron 27 bandas correspondientes a cada una de las 8 movilidades electroforéticas observadas.

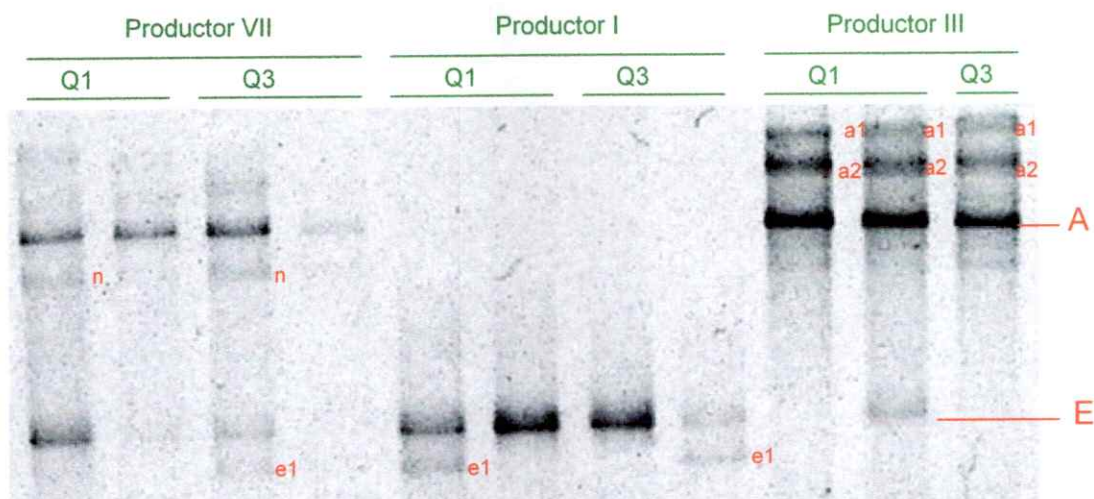


Fig. 4: TTGE de los amplicones obtenidos con partidores dirigidos a bacterias lácticas (LAC1 y LAC2) de muestras de quesos con 15 y 30 días de maduración obtenidas de productores de valle. A y E son las bandas dominantes, cuyas identidades son: A: *Lactobacillus*; E: *Leuconostoc*. Las bandas a1, a2 y e1 son bandas poco frecuentes no consideradas en los análisis de la microbiota láctica. De la banda n no se obtuvo ADN reamplificado.

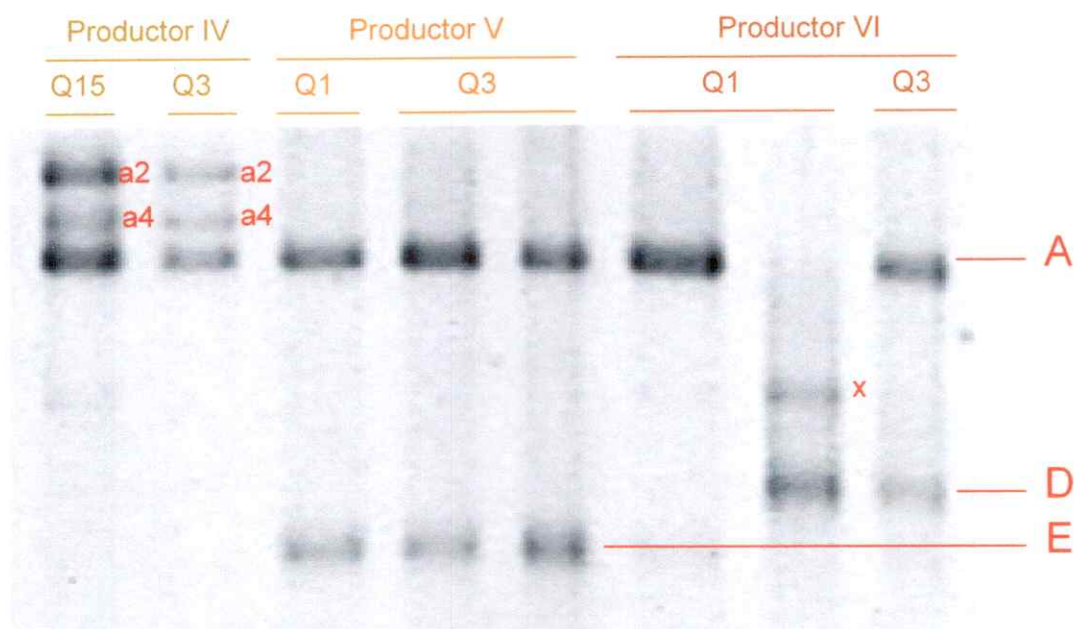


Fig. 5: Perfiles de TTGE de los amplicones obtenidos con partidores dirigidos a bacterias lácticas (LAC1 y LAC2) de muestras de quesos con 15 y 30 días de maduración obtenidas de productores de cordillera. A, D y E son las bandas dominantes, cuyas identidades son: A: *Lactobacillus*, D: *Weissella* y E: *Leuconostoc*. Las bandas a2, a4 y x son bandas poco frecuentes no consideradas en los análisis de la microbiota láctica.

Mediante secuenciación del ADNr 16S amplificado con LAC1 se identificaron 3 movilidades electroforéticas distintas (A, D y E) cuyas bandas fueron identificadas como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Weissella* con un 98-100% de identidad con las secuencias depositadas en el RDPII (Fig. 5 y 6, Tabla 2). Estas se observaron en un 74, 72 y 9% de las muestras por lo que se consideraron como las poblaciones más frecuentes y dominantes de la microbiota láctica.

Tabla 2: Géneros bacterianos identificados mediante secuenciación con LAC1

bandas	Correspondencia con género	Id (%)	largo secuencia (b)	Frecuencia (%)			
				zona geográfica		maduración	
				valle	cordillera	Q15	Q30
A	<i>Lactobacillus</i>	100	263	46	56	71	61
E	<i>Leuconostoc</i>	100	263	46	44	71	55
D	<i>Weissella</i>	98	263	0	25	9	5

Las bandas denominadas como a1, a2, a4, e1, x y n no fueron consideradas en el análisis de la microbiota láctica del queso por encontrarse en menos del 18% de las muestras.

2.3 Composición de la microbiota láctica según zona geográfica.

En las 54 muestras de queso analizadas mediante TTGE con los partidores HDA, 35 provenientes de valle y 19 de cordillera, se observaron bandas dominantes pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Weissella*. La frecuencia de cada género en función de su origen geográfico está detallada en la Fig. 8 y Tabla 1.

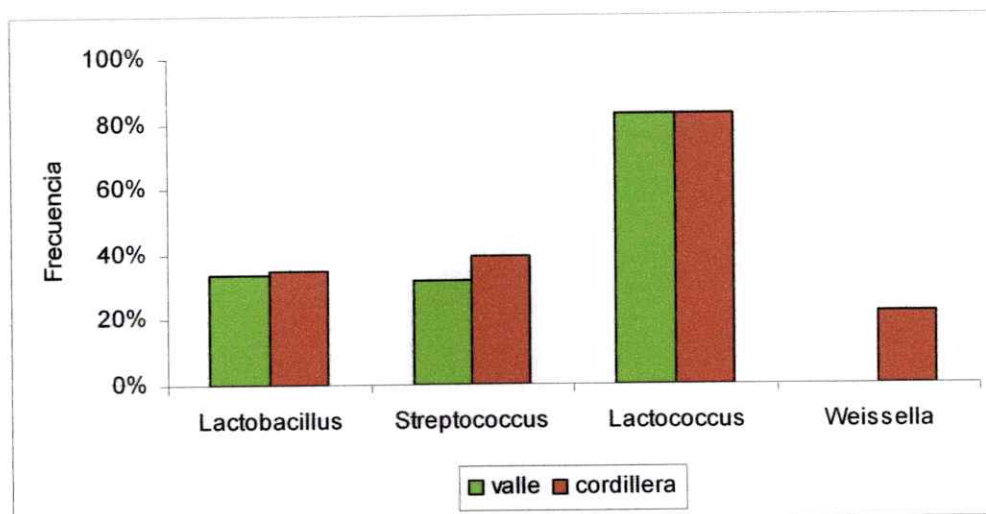


Fig. 6: Frecuencia de géneros bacterianos identificados mediante secuenciación con HDA1 según zona geográfica. Prueba X^2 no significativa.

Al comparar cada género bacteriano entre valle y cordillera se encontró que la frecuencia de *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Lactococcus* era similar, siendo *Lactococcus* el género más frecuente en ambas zonas geográficas, encontrándose en un 83% de las muestras analizadas. La gran diferencia fue que el género menos frecuente, *Weissella*, se encontró sólo en muestras provenientes de cordillera.

En 43 muestras analizadas mediante TTGE con los partidores LAC, 29 provenientes de valle y 14 de cordillera, las bandas dominantes correspondieron a las especies *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Weissella*. En ambas zonas geográficas *Lactobacillus* y *Leuconostoc* presentaron una frecuencia similar (Fig. 9 y Tabla 2). La especie *Weissella* sólo se encontró en un 25% de las muestras pertenecientes a cordillera.

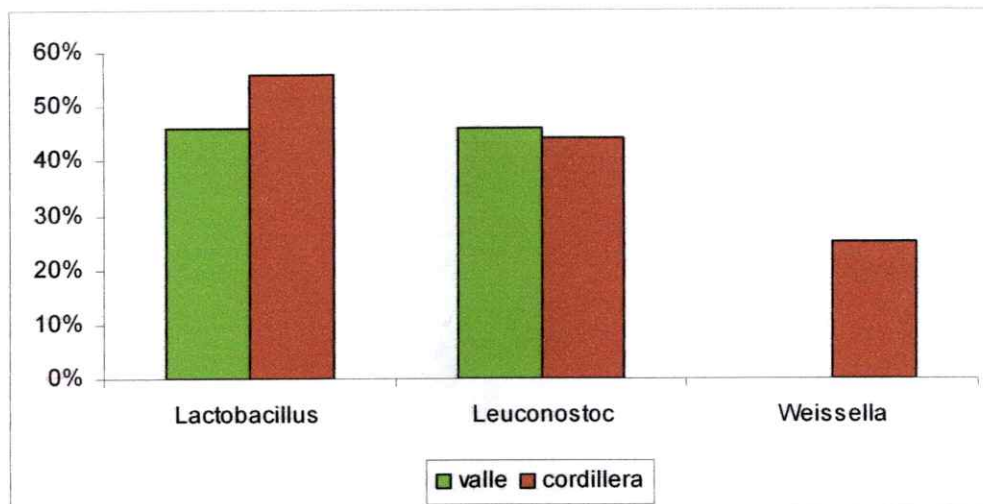


Fig. 7: Frecuencia de géneros bacterianos identificados mediante secuenciación con LAC1 según zona geográfica. Prueba X2 no significativa.

2.4 Composición de la microbiota láctica en dos etapas de la maduración.

Los cambios en la maduración se analizaron en base a la frecuencia de los géneros bacterianos. De las 54 muestras analizadas exitosamente mediante PCR-TTGE con los partidores HDA 25 correspondían a muestras de Q15 y 29 a Q30, y de las 43 muestras analizadas exitosamente con los partidores LAC 23 correspondían a muestras de Q15 y 20 a Q30. En las Fig. 10 y 11 se observa que la frecuencia no varió significativamente entre Q15 y Q30 lo que indica que la composición se mantuvo estable durante el proceso de maduración. El género *Lactococcus* fue el más frecuente encontrándose en un 96% de las muestras. Los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* se encontraron en más del 50% de las muestras de ambas etapas de maduración. *Weissella* fue el género bacteriano menos frecuente encontrándose sólo en un 6% de las muestras de Q15 y Q30 (Tabla 1 y 2).

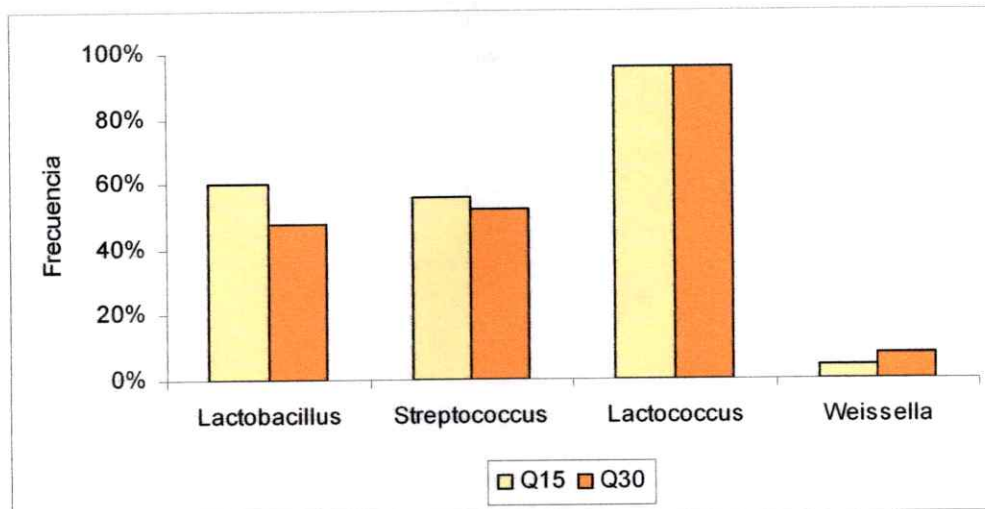


Fig. 8: Frecuencia de géneros bacterianos identificados con HDA1 en dos etapas de la maduración. Prueba X^2 no significativa.

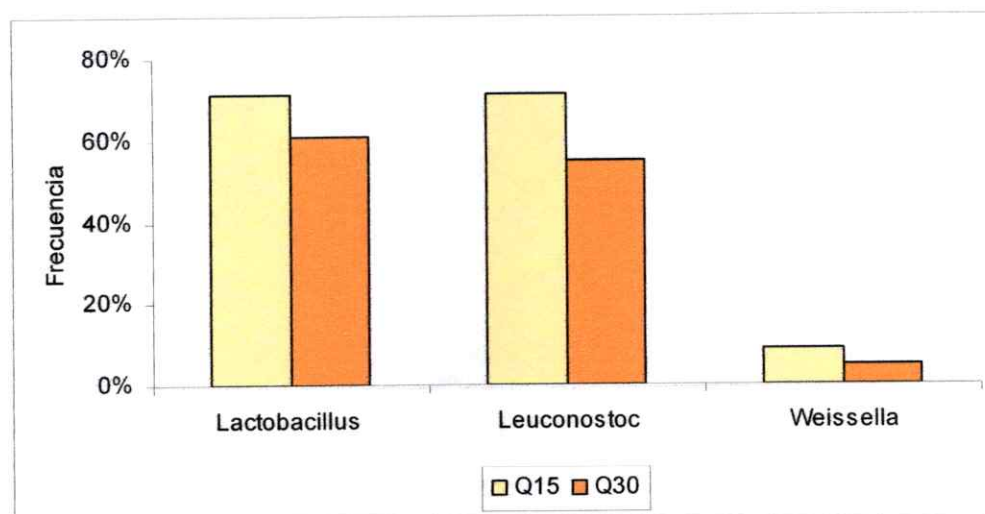


Fig. 9: Frecuencia de géneros bacterianos identificados con LAC1 en dos etapas de la maduración. Prueba X^2 no significativa.

2.5 Análisis de los perfiles observados en los TTGE.

2.5.1 Perfiles de TTGE de amplicones obtenidos con los partidores dirigidos a eubacterias.

Se evaluó la composición de la microbiota de los quesos según su estado de maduración y según la zona geográfica de producción a través de la frecuencia en que se presentó un determinado perfil sobre el total de las muestras. Se encontró que los perfiles I y IV son los más comunes (Tabla 3) observándose aproximadamente en el 40% de las muestras. Considerando muestras de un mismo productor, los perfiles a través de la maduración se mantuvieron en general sin cambios. Pequeñas variaciones se detectaron en algunos productores, como es mostrado en las Figuras 2 y 3.

Tabla 3: Perfiles observados en los TTGE con amplicones obtenidos con HDA

Perfil	Frecuencia (%)			
	zona geográfica		maduración	
	valle	cordillera	Q15	Q30
I <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i>	26	42	36	28
II <i>Lactobacillus</i> <i>Lactococcus</i>	23	16	24	17
III <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i>	3	0	0	3
IV <i>Lactococcus</i>	40	16	24	38
V <i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i>	8	10	12	7
VI <i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Weissella</i>	0	16	4	7

2.5.2 Perfiles de TTGE con los amplicones obtenidos con los partidores dirigidos a bacterias lácticas.

Los perfiles observados en estos TTGE muestran que la composición más frecuente corresponde al perfil VIII en que se encuentran bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (Tabla 4). Al igual que en los perfiles de TTGE con amplicones obtenidos de HDA estos no varían a través de la maduración exceptuando algunos casos, como los productores VI y VII (Fig. 6 y 7). Cabe señalar que en los perfiles de cordillera en que se observó *Weissella*, este era el único género bacteriano presente en el perfil, es decir, era un género dominante en esas muestras.

Tabla 4: Perfiles observados en los TTGE con amplicones obtenidos con LAC

Perfil	Frecuencia (%)			
	zona geográfica		maduración	
	valle	cordillera	Q15	Q30
VII <i>Lactobacillus</i>	24	21	17	30
VIII <i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i>	45	43	48	40
IX <i>Leuconostoc</i>	31	15	26	25
X <i>Weissella</i>	0	21	9	5

DISCUSION

El objetivo de este estudio fue analizar mediante PCR-TTGE y secuenciación la microbiota láctica dominante de quesos artesanales de cabra. Los resultados obtenidos muestran que dicha microbiota no varía significativamente según el origen geográfico de los quesos ni tampoco según los tiempos de maduración evaluados.

1. Géneros bacterianos identificados.

1.1 En las leches.

Las poblaciones bacterianas identificadas en las muestras de leche corresponden a poblaciones de *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* lo cual concuerda con lo descrito por Badis y col (2004) en leches de cabra de Argelia. No se detectaron poblaciones bacterianas de *Lactobacillus* y *Weissella* en estas muestras que también fueron reportadas previamente por Badis y col (2004).

El bajo porcentaje (35%) de ADN amplificable en las muestras de leche y la ausencia en ellas de bacterias previamente reportadas en leches de cabra puede deberse a que en las leches chilenas estas poblaciones bacterianas se encuentran en recuentos bajos y no son detectables mediante técnicas moleculares. Para lograr amplificar ADN directamente de una muestra se requiere como mínimo de 10.000 copias de molde (Grunenwald 2003), lo que corresponde a una concentración bacteriana cercana a los 10^2 bacterias/ml de leche. Es relevante señalar que a pesar de que los cultivos tienen la desventaja de que sólo una pequeña parte de la comunidad bacteriana crece en ellos, no se requiere de un alto recuento en la muestra inicial ya que el uso de medios selectivos facilita su crecimiento y por lo tanto, su detección.

1.2 En los quesos

Las poblaciones bacterianas identificadas en las muestras de quesos corresponden a *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*. Estos resultados concuerdan con aquellos de Alonso-Callejas y col (2002), de Buffa y col (2001) y de Hatzikamari y col (1999) obtenidos en quesos españoles y griegos a través de cultivos. El género *Weissella* sólo se identificó en los quesos de la cordillera. Este género no había sido reportado previamente en quesos de cabra o de otro origen, porque en la mayor parte de los estudios se han utilizado métodos de cultivo en agar selectivo, donde no es posible diferenciar bacterias pertenecientes a géneros filogenéticamente muy relacionados como *Leuconostoc* y *Weissella*. Hace un poco más de 10 años estudios filogenéticos comprobaron que *Leuconostoc paramesenteroides* y *Leuconostoc mesenteroides*, ambos pertenecientes a la familia Leuconostocaceae, eran genéticamente distintos por lo que se creó el género *Weissella* formado por *Weissella paramesenteroides* antiguamente denominada *Leuconostoc paramesenteroides*. (Collins y col, 1993).

Cabe destacar que en el análisis de la microbiota láctica que realizamos se utilizó sólo el centro del queso ya que en un análisis por TTGE y DDGE de la microbiota de quesos industriales de vaca (Ogier y col, 2004) se encontró que la microbiota del centro y de la corteza del queso difieren. En el centro se encontraron *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus* que probablemente provenían de los fermentos iniciadores utilizados en la fabricación de estos quesos comerciales mientras que en la corteza se encontró una mayor diversidad bacteriana de *Staphylococcus* y bacterias gram-negativas como *Moraxella*, *Pseudomonas* y *Corynebacterium* originadas probablemente del ambiente y de la manipulación de los productos. Las diferencias en la composición entre la superficie y el centro del queso

coincidían con diferencias en el pH entre ambas zonas, siendo el centro más ácido que la superficie del queso (Ogier y col, 2004).

Hasta el día de hoy no se había analizado la microbiota láctica de quesos artesanales de cabra con técnicas moleculares. Los escasos trabajos que existen se han enfocado en el análisis de una parte de la microbiota, por ejemplo la identificación genotípica de aislados bacterianos de *Lactococcus lactis* (Psoni y col, 2007), *Enterococcus* (Psoni y col, 2006) y *Lactobacillus* (Sanchez y col, 2005). Esto es un inconveniente al comparar nuestros resultados con los obtenidos por métodos cultivo-dependientes que permiten identificar sólo la fracción bacteriana cultivable con los medios selectivos utilizados que no necesariamente es la microbiota dominante de la muestra.

Los estudios moleculares de la microbiota del queso se han realizado fundamentalmente en quesos de vaca. En general, en estos estudios se reportan los mismos componentes encontrados en quesos de cabra (Randazzo y col, 2002; Duthoit y col, 2003; Ercolini y col, 2003; Ogier y col, 2004). A pesar de la similitud entre la leche de cabra y vaca, ambas presentan diferencias en la composición de grasas, proteínas y carbohidratos (Hadjipanayiotou 1995) y en la actividad de lipasas y proteasas (Chilliard y col, 2003). Entre los quesos de vaca y cabra se reportan diferencias en el tipo de ácidos grasos libres (de la Fuente y col, 1993). Estas diferencias podrían seleccionar o favorecer el establecimiento de distintas poblaciones dentro de los géneros descritos, es decir, diferencias a nivel de las cepas que están colonizando y creciendo durante el proceso de maduración del queso. Estas diferentes cepas sumadas a las características de la leche podrían aportar texturas y sabores que caracterizan al queso.

2. Bandas no consideradas en el análisis.

En los perfiles de TTGE correspondientes a los amplicones obtenidos con HDA y con LAC se obtuvieron bandas poco frecuentes y de difícil identificación. Es el caso de las bandas a1, a2, a3, a4, e1, x, x1, x2 y x3.

En los cromatogramas de algunas de las bandas "a" se observaron picos de baja altura los que pueden corresponder a lecturas de las hebras complementarias (positiva o negativa) de probables heterodupletes derivados de la presencia de ADNs filogenéticamente muy relacionados con A (Espejo y cols, 1998). La formación de heterodupletes entre secuencias similares de *Lactobacillus* sugiere que en los quesos se encuentran distintas poblaciones (especies o cepas) de este género que no pudieron resolverse mediante PCR-TTGE por su baja concentración en la muestra inicial. El hecho de que sólo en dos productores (1 de valle y 1 de cordillera) se hayan observado las bandas "a" evidencia que la diversidad de *Lactobacillus* en estas muestras es mayor.

Para *Leuconostoc* también se observaron diferentes poblaciones con variaciones intragénero. Estas poblaciones resultaron diferenciables en el TTGE. La ausencia de heterodupletes se podría deber a variaciones puntuales en las secuencias del ADNr 16S, a diferencia de *Lactobacillus* en que se observaron zonas variables.

3. Composición de la microbiota láctica según zona geográfica.

La composición de los quesos provenientes de zonas de valle o de cordillera no presentó diferencias significativas. Independientemente de la zona de producción la microbiota dominante estaba compuesta por los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*, siendo *Lactococcus* el género más frecuente y componiendo la microbiota láctica como único género en muestras de cordillera y

principalmente asociado a *Lactobacillus* y *Streptococcus* en valle. También fue común encontrar asociados a *Lactobacillus* y *Leuconostoc* en muestras de ambas zonas geográficas. La gran diferencia entre valle y cordillera fue la presencia de *Weissella* en algunos quesos de cordillera, género que se encuentra escasamente representado en otros tipos de alimentos fermentados (yuca fermentada, cebada fermentada, salame) (Kostinek y col, 2007; Booyensa y col, 2002; Samelis y col, 1994), en vegetales frescos y en las primeras etapas de la fermentación del forraje (Bjorkroth y col, 2002). La escasa presencia de *Weissella* en las muestras y el hecho de que se haya identificado como única banda en los perfiles de TTGE o sólo acompañada de *Streptococcus* o *Lactococcus* podría deberse a la capacidad de *Weissella* de producir una bacteriocina inhibidora de otras bacterias gram-positivas (Sriornual y col, 2007).

Las diferencias en la composición de la microbiota láctica entre zonas geográficas eran esperadas de acuerdo al tipo y calidad del alimento consumido por las cabras (Gómez y col, 1992) y por las distintas condiciones ambientales que prevalecen en las zonas de valle y cordillera (Buchin y col, 1999; Caridi y col, 2003; Mauriello y col, 2003). Es probable que las diferencias en la microbiota láctica sean a nivel de especie o cepa, aspectos que no podemos determinar en este estudio por las limitaciones del método.

4. Composición de la microbiota láctica en dos etapas de la maduración.

Las frecuencias de las poblaciones bacterianas identificadas no cambiaron a lo largo del proceso de maduración. Por ser la PCR-TTGE una metodología cualitativa, las variaciones en la abundancia bacteriana de las muestras se distinguen con una baja resolución. Al evaluar los perfiles más comunes obtenidos con ambos pares de partidores empleados, se observa que *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Lactococcus* (VI)

o también *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (IV) componen la microbiota láctica dominante en las muestras con quince días de maduración. Debido a que los partidores HDA no amplifican bacterias del género *Leuconostoc* y los partidores LAC no amplifican a *Streptococcus* y *Lactococcus* (discutido más adelante) no fue posible observar si estos cuatro géneros se encuentran generalmente asociados.

Al considerar las poblaciones bacterianas encontradas en la leche se observa que algunas poblaciones persisten durante la maduración del queso (*Lactococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*) las que podrían formar parte de la microbiota láctica que inicia la fermentación. Hay otras, como *Lactobacillus* y *Weissella*, que se incorporan o aumentan su recuento posteriormente.

5. Posibles sesgos de la técnica.

La detección de una población bacteriana mediante PCR-TTGE está limitada por la concentración de su ADN y por la cantidad de ADN de otras poblaciones presentes en la muestra debido a que se amplifica preferencialmente el ADN más abundante de la muestra (Ogier y col, 2002).

La extracción de ADN es un paso crítico de los estudios moleculares destinados a evaluar la diversidad genética de la comunidad estudiada. Las principales dificultades se relacionan con la reproducibilidad y la homogeneidad del proceso de lisis bacteriana, con la obtención de ácidos nucleicos intactos, y con la remoción de los compuestos que afectan la PCR (Sanchez y col, 2005).

Una fuente de interferencias es la PCR. Al amplificar mezclas de ADNs se forman heterodupletes, moléculas de ADN formadas por dos hebras no completamente complementarias. La formación de heterodupletes dificulta la interpretación de la comunidad bacteriana desde los perfiles de TTGE ya que sobreestima el número real

de bandas. La T_m es menor en los heterodupletes que en los homodupletes, debido al apareamiento incompleto de sus hebras, resultando en una menor migración de ellos en el TTGE. La formación de estos heterodupletes puede ser reducida con temperaturas de apareamiento más altas y disminuyendo el número de ciclos de amplificación de la PCR (Muyzer & Smalla, 1998).

Los partidores utilizados sesgan qué poblaciones bacterianas seremos capaces de identificar. Con los pares de partidores HDA y LAC fue posible identificar las poblaciones bacterianas de las muestras hasta nivel de género. Al buscar en la base de datos del RDPII (<http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>) cuántas bacterias podrían ser amplificadas con nuestros partidores encontramos que HDA1 y HDA2 amplificarían aproximadamente 220.000 de las 330.000 secuencias depositadas y 12.000 de las 16.000 secuencias de bacterias pertenecientes al orden Lactobacillales de las cuales 3.700 de 5.000 son de *Lactobacillus*, 200 de 290 de *Weissella*, 6.000 de 7.300 de *Streptococcus* y 340 de 420 de *Lactococcus*. Con estos partidores no se amplifica ninguna de las 297 secuencias de *Leuconostoc*. Los partidores LAC1 y LAC2 amplificarían aproximadamente 6.000 de las 330.000 secuencias depositadas en el RDPII y 4.800 de las 16.000 de los Lactobacillales, 4.300 secuencias de *Lactobacillus*, 6 de *Leuconostoc*, 210 de *Weissella*, 2 de *Streptococcus* y ninguna de *Lactococcus*. A pesar del bajo número de *Leuconostoc* sí se logró amplificar bacterias de este género con los partidores LAC, no así de los géneros *Streptococcus* y *Lactococcus*.

Las bandas obtenidas de TTGE con los partidores HDA (que amplifican la zona V3' del ADNr 16S de eubacterias, posiciones 339 a 539 de *E. coli* (Tannock y col, 1999)) resultaron en secuencias cortas (100 bases) en donde los géneros presentes poseían altas similitudes entre sí, es decir, secuencias bastante conservadas con pocos sitios variables que permitiesen una distinción por debajo del nivel de género.

Una manera de distinguir hasta especie es utilizar, posteriormente a los partidores HDA, partidores especie-específicos como lo hizo Walter y col (2000).

Con los partidores LAC (que amplifican la zona V3-V4 del ADNr 16S de bacterias lácticas, 364 a 707 de *E. coli* (Walter y col, 2001)) se obtuvieron secuencias de 200 a 250 bases que permitieron distinguir géneros bacterianos. Para resolver a nivel de especie y cepa otras zonas del ADNr 16S u otros genes debiesen ser amplificados.

La presencia de bandas con igual movilidad electroforética en el TTGE no asegura que dichas bandas tengan la misma secuencia. Esta limitación no impide el uso de la técnica en la caracterización de comunidades microbianas pero sí limita las conclusiones que se pueden obtener de la metodología por sí sola. La escisión y la secuenciación de las bandas con igual movilidad electroforética son necesarias para confirmar si son idénticas. Entonces, si las comunidades analizadas muestran distintos perfiles de migración sin lugar a dudas se trata de dos comunidades distintas, pero si el perfil es similar esto puede deberse o no a dos comunidades similares y por lo tanto, más análisis es requerido.

6. Relevancia de este trabajo:

La descripción de la microbiota láctica de los quesos artesanales de cabra de la IV Región de Chile es un aporte valioso al conocimiento de la microbiota láctica nativa, la cual otorga las cualidades organolépticas que caracterizan a estos quesos y permite diferenciarlos de otros quesos de cabra de otras regiones o países. Esta etapa de análisis molecular es útil porque facilita y dirige los esfuerzos destinados a aislar los componentes de esta microbiota. Esto porque permite establecer una estrategia de aislamiento selectivo de poblaciones bacterianas y permite identificar molecularmente

aquellas dominantes para proceder luego a su selección en función de sus propiedades tecnológicas. Esto permitirá elaborar fermentos utilizables a nivel nacional y mejorar la inocuidad de estos quesos conservando o mejorando sus cualidades organolépticas.

CONCLUSION

Los resultados obtenidos mediante el uso de métodos moleculares basados en la amplificación del ADNr 16S, TTGE y secuenciación muestran que la microbiota láctica dominante de los quesos artesanales de cabra de la IV Región de Chile está conformada por *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Weissella*. La presencia de *Weissella* en algunas muestras de cordillera hace la diferencia entre quesos de diferente origen geográfico. No se observaron cambios significativos de la composición de la microbiota láctica según el tiempo de maduración. Estos resultados pueden deberse a que los cambios de la microbiota pueden encontrarse a nivel de especie o cepa bacteriana, los cuales son revelados en algunas de estas muestras por la presencia de heterodupletes.

PCR-TTGE-secuenciación es una estrategia útil, rápida y confiable para caracterizar la comunidad bacteriana que habita el queso artesanal de cabra.

BIBLIOGRAFIA

- Alonso-Calleja, C., Carballo, J., Capita, R., Bernardo, A., García-Lopez, M.L. 2002. Changes in the microflora of Valdeteja raw goat's milk cheese throughout manufacturing and ripening. *Lebensm. Wiss. Technol.* **35**: 222-232
- Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169
- Andrighetto, C., Marcazzan, G., Lombardi, A. 2004. Use of RAPD-PCR and TTGE for the evaluation of biodiversity of whey cultures for Grana Padano cheese. *Letters in Applied Microbiology* **38**: 400-405
- Aquilanti, L., Dell'Aquila, L., Zannini, E., Zocchetti, A., Clementi, F. 2006. Resident lactic acid bacteria in raw milk Canestrato Pugliese cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**: 161-167
- Badis, A., Guetami, D., Moussa Boudjema, B., Henni, D.E., Kihal, M. 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiol.* **21**: 579-588
- Barrios, M., Medina, L., Lopez, M., Jordano, R. 1998. Fungal biota isolated from spanish cheeses. *J. Food. Saf.* **18**: 151-157
- Beuvier, E., Berhard, K., Cegarra, S., Dasen, A., Pochet, S., Buchin, S., Duboz, G. 1997. Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *Int. Dairy J.* **7**: 311-323
- Bjorkroth J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, R., Holzappel, W., Korkeala, H., Vandamme, P. 2002. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *IJSEM.* **52**: 141-148
- Booyensa C., Dicks L.M., Meijering I., Ackermann A. 2002. Isolation, identification and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barley cultivars. *Int. J. Food Microbiol.* **76**: 63-73
- Buchin, S., Delague, V., Duboz, G., Berdague, J., Beuvier, E., Pochet, S., Grappin, R. 1998. Influence of pasteurization and fat composition of milk on the volatile compounds and flavour characteristics of a semi-hard cheese. *J. Dairy Sci.* **81**: 3097-3108
- Buchin, S., Martin, B., Dupont, D., Bornard, A., Achilleos, C. 1999. Influence of the composition of Alpine highland pasture on the chemical, rheological and sensory properties of cheese. *J. Dairy Res.* **66**: 579-588

- Buffa, M., Guamis, B., Royo, C., Trujillo, A.J. 2001. Microbiological changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high-pressure-treated milk. *Food Microbiol.* **18**: 45-51
- Caridi, A., Micari, P., Foti, F., Ramondino, D., Sarullo, V. 2003. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. *Food Microbiol.* **20**: 201-209
- Chávarri, F., Bustamante, A., Santisteban, A., Virto, M., Albisu, M., Barrón, L., de Renovales, M. 2000. Effect of milk pasteurization on lipolysis during ripening of ovine cheese manufactured at different times of the year. *Lait* **80**: 433-444
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J., Lamberet, G. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* **86**:1751-1770
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., McGarrell, D.M., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **33**: 294-296
- Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., Wallbanks, S. 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 595-603.
- Coppola, S., Blaiotta, G., Ercolini, D., Moschetti, G. 2001. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 414-420
- de la Fuente, M.A., Fontecha, J., Juárez, M. 1993. Fatty acid composition of the triglyceride and free fatty acid fractions in different cows, ewes and goats-milk cheeses. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **196**:155-158
- Desmasures N., Opportune W., Gueguen M. 1997. Lactococcus spp., Yeasts and Pseudomonas spp. on teats and udders of milking cows as potential sources of milk contamination. *Int. Dairy J.* **4**: 643-646
- Doare-Lebrun, E., El Arbi, A., Charlet, M., Guerin, L., Pernelle, J.J., Ogier, J.C., Bouix, M. 2006. Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis: potentialities and limits of the method. *J Appl. Microbiol.* **101**:1340-1350
- Duthoit, F., Godon, J.-J., Montel, M.-C. 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3840-3848

- Endo, A., Okada, S. 2005. Monitoring the lactic acid bacterial diversity during Shochu fermentation by PCR-DGGE. *J. Biosci. Bioeng.* **99**: 216-221
- Ercolini, D., Hill, P., Dodd, C.E.R. 2003. Bacterial community structure and location in stilton cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3540-3548
- Espejo, R., Feijoó C.G., Romero, J., Vásquez, M. 1998. PAGE analysis of the heteroduplexes formed between PCR-amplified 16S rRNA genes: estimation of sequence similarity and rDNA complexity. *Microbiology* **144**: 1611-1617
- Fernández-García, E., Carbonell, M., Nuñez, M. 2002. Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese: Comparison of raw and pasteurized milk cheese. *J. Dairy Res.* **69**: 579-593
- Feurer, C., Irlinger, F., Spinnler, H. E., Glaser, P., Vallaey T. 2004. Assessment of the rind microbial diversity in a farm house-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 546-556
- Fitzsimons, A., Cogan, T.M., Condon, S., Beresford, T. 1999. Phenotypic and genotypic characterization of Non-Starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *App. Environ. Microbiol.* **65**: 3418-3426
- Fortina, M.G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A., Manachini, P.L. 2003. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiol.* **20**: 397-404
- Foschino, R., Picozzi, C., Borghi, M., Cerliani, M., Cresci, E. 2006. Investigation on the microflora of caprino lombardo cheese from raw goat milk. *Ital. J. Food Sci.* **18**: 33-49
- Fox, P., Wallace, J. 1997. Formation of flavour compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology* **45**: 17-85
- Godon, J-J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., Moletta, R. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2802-2813
- Gómez, A.G., Peinado, E., Sánchez, M., Mata, C., Doménech, V. 1992. Evolución de la selección de plantas leñosas por caprinos de aptitud lechera en pastoreo. *Arch. Zootec.* **41**: 607-618
- Grappin, R., Beuvier, E. 1997. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese-proteolytic enzymes and cheese ripening-proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *Int. Dairy J.* **7**: 751-761

- Grunenwald, H. 2003. PCR protocols. *En* Bartlett, J. M. S y Stirling, D. (eds.), *Methods in Molecular Biology*. pp 89-99. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Hadjipanayiotou, M. 1995. Composition of ewe, goat and cow milk and of colostrum of ewes and goats. *Small Ruminant Research* **18**:255-262
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 669-685
- Hatzikamari, M., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. 1999. Microbiological characteristics of Anevato: a traditional greek cheese. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 595-601
- Heilig, H., Zoetendal, E., Vaughan, E., Marteau, P., Akkermans, A., de Vos, W. 2002. Molecular Diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S rDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 114-123
- Khalid, N., Marth E. 1990. Lactobacilli - Their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: A Review. *J. Dairy Sci.* **73**: 2669-2684
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T., Yvon, M. 2003. Cooperation between *Lactococcus lactis* and non-starter Lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 734-739
- Klantschitsch, T., Bachmann, H-P., Puhani, Z. 2000. Influence of milk treatment and ripening conditions on quality of Raclette cheese. *Lait* **80**: 51-67
- Kostinek M., Specht I., Edward V.A., Pinto C., Egounlety M., Sossa C., Mbugua S., Dortu C., Thonart P., Taljaard L., Mengu M., Franz C.M., Holzapfel W.H. 2007. Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **20**: 342-351
- Lafarge, V., Ogier, J.C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.Y., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A. 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5644-5650
- Lopez, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Phister, T., Marshall, M., VanderGheynst, J., Mills, D.A. 2003. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6801-6807

- Macedo, A., Tavares, T., Malcata, X. 2004. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. *Food Microbiol.* **21**: 233-240
- Magne, F., Hachelaf, W., Suau, A., Boudraa, G., Mangin, I., Touhami, M., Bouziane-Nedjadi, K., Pochart, P. 2006. A longitudinal study of infant faecal microbiota during weaning. *FEMS Microbiol. Ecol.* **58**: 563-71
- Maoz, A., Mayr, R., Scherer, S. 2003. Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4012-4018
- Marshall, V.M., Cole, W.M. 1983. Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavour production in fermented milks. *J. Dairy R.* **50**: 375-379
- Mauriello, G., Moio, L., Genovese, A., Ercolini, D. 2003. Relationships between flavoring capabilities, bacterial composition and geographical origin of natural whey cultures used for traditional water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *J. Dairy Sci.* **86**: 486-497
- McSweeney, P., Sousa, M. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait* **80**: 293-324
- Menéndez, S., Godínez, R., Hermida, M., Centeno, J.A., Rodríguez-Otero, J.L. 2004. Characteristics of "Tetilla" pasteurized milk cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. *Food Microbiol.* **21**: 97-104
- Michel, V., Hauwuy, A., Chamba, J-F. 2001. La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Lait* **81**: 575-592
- Montagna, M., Santacroce, M., Spilotros, G., Napoli, C., Minervin, F., Papa, A., Dragoni, I. 2005. Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy. *Mycopathologia* **158**: 245-249
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700
- Muyzer, G., Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 127-141
- Nicholson, M., Evans, P., Joblin, K. 2007. Analysis of methanogen diversity in the rumen using temporal temperature gradient gel electrophoresis: identification of uncultured methanogens. *Microb. Ecol.* **13** [Epub ahead of print]

- Ogier, J., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A. 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3691-3701
- Ogier, J., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J., Delacroix-Buchet, A. 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5628-5643
- Oksuztepe, G., Patir, B., Calicioglu, M. 2005. Identification and distribution of lactic acid bacteria during the ripening of Savak Tulum cheese. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **29**: 873-879
- Poznanski, E., Cavazza, A., Cappa, F., Cocconcelli, P.S. 2004. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *Int. J. Food Microbiol.* **92**: 141-151
- Psoni, L., Kotzamanides, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. 2006. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **109**: 109-120
- Psoni, L., Kotzamanidis, C., Yiangou, M., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. 2007. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO raw goat milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **114**: 211-220
- Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A., de Vos, W., Vaughan, E. 2002. Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1882-1892
- Roberts, T.A., Pitt, J.I., Farkas, J., Grau, F.H. 1998. Microorganismos de los alimentos 6. Ecología Microbiana de los productos alimentarios. En Roberts, T.A., Pitt, J.I., Farkas, J., Grau, F.H (eds.), *Leche y productos lácteos*. pp 495-544. Acibia S.A., Zaragoza, España.
- Samelis J., Maurogenakis F., Metaxopoulos J. 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int. J. Food Microbiol.* **23**:179-196
- Sánchez, I., Seseña, S., Poveda, J.M., Cabezas, L., Palop, Ll. 2005. Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli isolated from spanish goat cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **102**: 355-362
- Srionnual, S., Yanagida, F., Lin L-H., Hsiao K-N., Chen Y-S. 2007. Weissellicin 110, a new bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from *plaa-som*, a fermented fish product from Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2247-2250

- Tannock, G. W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Ng, J., Munro, K., Alatossava, T. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4264-4267
- Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D.M., Munro, K., Alatossava, T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 297-303
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G.W., Lis, C.M., Munro, K., Hammes, W.P. 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2578-2585
- Zoetendal, E., Vaughan, E., de Vos, W. 2006. A microbial world within us. *Mol. Microbiol.* **6**: 1639-1650