



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO POLIFÁSICO DE LA DIVERSIDAD
MICROBIANA DE QUESOS ARTESANALES
ELABORADOS CON LECHE CRUDA DE CABRA**

Antonio Manuel Martín Platero

Granada

2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Antonio Manuel Martín Platero
D.L.: GR.2897-2008
ISBN: 978-84-691-8333-5



Universidad de Granada
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias

Memoria presentada por el Licenciado en
Biología Antonio Manuel Martín Platero para
optar al grado de Doctor

Granada, 2008

VºBº de los Directores de Trabajo

Fdo. Manuel Martínez Bueno
Profesor Titular de Microbiología
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

Fdo. Eva Valdivia Martínez
Catedrática de Microbiología
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

Fdo. Mercedes Maqueda Abreu
Catedrática de Microbiología
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

El Doctorando

Fdo. Antonio Manuel Martín Platero

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada durante los años 2003-2008, dentro del Grupo de Investigación “Estudio de sustancias antagonistas producidas por microorganismos” (CVI 160).

El Doctorando ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Docente e Investigador de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía dentro del Plan Andaluz de Investigación. Asimismo, ha sido beneficiario de una ayuda de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa para realizar una estancia breve de tres meses en el Istituto Sperimentale Lattiero-Casario (Lodi, Italia) en 2005.

La investigación ha sido financiada a través del proyecto “Caracterización de bacterias del ácido láctico en quesos de cabra de la comunidad andaluza. Identificación de cepas de *Enterococcus* y determinantes de virulencia de los mismos” (CAL02-078), financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) perteneciente al Ministerio de Educación y Ciencia.

De la presente Tesis Doctoral se han extraído las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Publicaciones:

- **Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Maqueda y M. Martínez-Bueno.** 2007. Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein “salting-out” procedure. *Annal. Biochem.* **366**: 102-104. (Capítulo III de la Memoria)
- **Abriouel, H., A.M. Martín-Platero, M. Maqueda, E. Valdivia y M. Martínez-Bueno.** 2008. Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* **127**: 200-208. (Capítulo IV de la Memoria)
- **Martín-Platero, A.M., M. Maqueda, E. Valdivia, J. Purswani y M. Martínez-Bueno.** Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats’ cheeses from Sierra de Aracena. En revisión. (Capítulo V de la Memoria)
- **Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Maqueda, I. Martín-Sánchez y M. Martínez-Bueno.** 2008. Polyphasic approach to bacterial dynamics during the ripening of Spanish farmhouse cheese by culture-dependent and culture independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 5662-5673. (Capítulo VI de la Memoria)
- **Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Maqueda y M. Martínez-Bueno.** Characterisation and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goat cheeses. En preparación. (Capítulo VII de la Memoria)

Comunicaciones a congresos:

- **Martín-Platero, A.M., I. Martín-Sánchez, A. Fernández-Vivas, M. Maqueda, E. Valdivia y M. Martínez-Bueno.** Estudio de la dinámica poblacional de las bacterias del ácido láctico en el queso Cueva de la Magahá

mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo. XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología (SEM). Cáceres, 2005.

- **Pelegrín, A., I. Martín-Sánchez, A. Fernández-Vivas, Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Maqueda y M. Martínez-Bueno.** Estudio de la diversidad genética de enterococos presentes en un queso elaborado con leche cruda de cabra. XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología (SEM). Cáceres, 2005.
- **Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Maqueda, I. Martín-Sánchez y M. Martínez-Bueno.** Estudio de la dinámica poblacional microbiana en un queso de cabra. 3ª Reunión de la Red Española de Bacterias Lácticas. Valencia, 2007.

Además, del periodo de investigación tutelada y la estancia realizada en el Istituto Sperimentale Lattiero-Caseario (Lodi, Italia) se han extraído las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Publicaciones:

- **Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Ruíz-Rodríguez, J.J. Soler, M. Martín-Vivaldi, M. Maqueda y M. Martínez-Bueno.** 2006. Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR10, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). Appl. Environ Microbiol. **72**: 4245-4249.
- **Zago, M., B. Bonvini, A. M. Martín-Platero, G. Mucchetti, D. Carminati and G. Giraffa.** 2007. Characterisation of *Escherichia coli* isolated from raw milk cheeses. Ann. Microbiol. **57**: 49-54.

Comunicaciones a congresos:

- **Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Ruíz-Rodríguez, J.J. Soler, M. Martín-Vivaldi, M. Maqueda y M. Martínez-Bueno.** Characterization of Antimicrobial Substances Produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, Isolated from the Uropygial Gland of the Hoopoe *Upupa epops*. 1st International Symposium of Food, Veterinary and Medical Applications of Antimicrobial Peptides. Nantes (Francia), 2006.

AGRADECIMIENTOS

Previamente al desarrollo de la Memoria, y sin ánimos de divagar, quisiera expresar mi gratitud a las personas que, en distinta medida, han contribuido a que haya desarrollado la presente Tesis Doctoral.

En primer lugar quiero dar las gracias a los dirigentes del grupo de investigación, los doctores Mercedes Maqueda, Eva Valdivia y Manuel Martínez-Bueno, por sus enseñanzas y consejos desde que comencé como alumno interno del departamento hasta el día de hoy en que culmina esta Tesis. Un especial agradecimiento merece el Dr. Manuel Martínez-Bueno, con quien he tenido el privilegio de trabajar codo a codo durante toda mi etapa predoctoral y de quien tanto he aprendido a nivel científico y humano.

Al resto de profesores del departamento por su permanente disposición y ayuda, bien en el trabajo de laboratorio bien en otros ámbitos departamentales.

Al Dr. Giorgio Giraffa, del Istituto Sperimentale Latterio-Casario (Lodi, Italia) por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, donde he vivido una gran experiencia profesional y personal. En esta etapa no puedo olvidar a Miriam Zago y Barbara Bonvini, quienes fueron de gran ayuda en mi formación y trabajo en Lodi.

A todos los compañeros con los que he trabajado estos años porque cada uno ha enriquecido, de diferente forma, mi labor. Desde que empecé se han producido numerosos cambios de personal, por lo que espero no dejarme a nadie en el tintero: Samir Ananou, Fouad Achemchem, Antonio Pedro Collado, Marina Sánchez, Matilde Fernández, Arantxa Muñoz, Samira Boutaleb, Fadwa Jroundi, Ester Lara, Ana Camats, Manolo Montalbán, Ana Pelegrín, Thierry Lematre, Fernando Morcillo, Teresa Pérez, Maria del Mar López, Magdalena

Ruíz, Alberto Baños, Juan Manuel Peralta, Lydia Mingorance, Rubén Cebrián, Ana María Fernández. En este ámbito también he de darle las gracias a María Carmen González y Concepción Millán por prestarme su ayuda siempre que las necesité.

Mención especial merece la Dra. Carmen María González-Domenech. Para no extenderme, simplemente darle mi más sincero agradecimiento, puesto que, en cierto modo, está implicada en que haya podido realizar mi Tesis Doctoral.

Finalmente, pero de mayor importancia, y aunque me aleje de la parte científico-laboral, he de dar mi más profundo agradecimiento a mis padres, Antonio Martín y Rita Platero, por su siempre incondicional apoyo ante las empresas que acomete su hijo. Y, por supuesto, a Jessica Purswani, quien ha soportado mis penas y alegrías a mi lado en este dinámico y acelerado mundo de la investigación científica.

“Imagination is more important than knowledge”

Albert Einstein

Índice de contenidos

CAPITULO I. Introducción y objetivos	1
1. Introducción	3
1.1. La fermentación en la conservación de los alimentos	3
1.2. Bacterias del ácido láctico	4
1.2.1. El género <i>Lactobacillus</i>	7
1.2.2. El género <i>Lactococcus</i>	11
1.2.3. El género <i>Enterococcus</i>	13
1.2.3.1. Enterococos en los alimentos	15
1.2.3.2. Virulencia de los enterococos	16
1.3. Quesos	20
1.3.1. Fabricación de los Quesos	22
1.4. Microbiología de los quesos	28
1.4.1. Cultivos iniciadores	29
1.4.2. BAL no iniciadoras	33
1.4.3. Otros microorganismos presentes en los quesos	34
1.4.4. Microorganismos patógenos en los quesos	36
1.5. Las bacteriocinas	39
1.5.1. Clasificación de las bacteriocinas de las BAL	42
1.6. Identificación de microorganismos de quesos y derivados lácteos	43
1.6.1. Técnicas dependientes de cultivo	45
1.6.1.1. Hibridación ADN-ADN	46
1.6.1.2. Métodos basados en la PCR	48
1.6.1.3. Métodos basados en la digestión enzimática	51
1.6.2. Técnicas independientes de cultivo	51
2. Objetivos	59
3. Bibliografía	61

CAPITULO II. Material y Métodos	85
1. Medios de cultivo	87
1.1. Medios de crecimiento	87
1.2. Medios empleados para el ensayo de la actividad antibacteriana	91
1.3. Medios empleados para la conservación de microorganismos	92
1.4. Tampones	92
2. Titulación y aislamiento de microorganismos	92
2.1. Titulación de microorganismos mediante recuentos en medios sólidos	93
2.2. Titulación de microorganismos mediante recuentos en medios líquidos	94
3. Métodos de detección de la actividad antimicrobiana	95
3.1. Técnica de la doble capa	95
4. Técnicas de aislamiento de ADN	96
4.1. Extracción de ADN genómico	96
4.2. Determinación de la concentración de ADN	97
5. Amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	97
5.1. Amplificación al azar de fragmentos de ADN polimórfico (RAPD)	98
5.2. Amplificación por PCR de secuencias intergénicas <i>consensus</i> y repetidas de enterobacterias (ERIC-PCR)	99
5.3. Amplificación y secuenciación del gen correspondiente al ADNr 16S	100
5.4. Amplificación del gen <i>rpoB</i>	104
5.5. PCR de tamaño variable (LH-PCR)	105
5.6. Identificación genética mediante PCR	106
5.7. Amplificación mediante PCR de genes de virulencia	106
5.8. Amplificación mediante PCR de genes para la producción de aminos biógenas	109

5.9. Amplificación mediante PCR de genes de bacteriocinas	110
6. Técnicas electroforéticas	111
6.1. Electroforesis en geles de agarosa	111
6.2. Electroforesis desnaturizante en gradiente temporal de temperatura (TTGE)	114
7. Análisis de grupos	117
8. Dot-Blot	117
8.1. Transferencia del ADN a membranas	117
8.2. Preparación de sondas no radioactivas marcadas con digoxigenina-11-dUTP mediante PCR	119
8.3. Prehibridación e hibridación ADN-ADN	119
8.4. Revelado inmunológico	120
9. Bibliografía	122
CAPITULO III. Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein “salting-out” procedure	127
1. Results and discussion	129
2. References	135
CAPITULO IV. Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods	139
1. Introduction	142
2. Material and Methods	143
3. Results	147
4. Discussion	153
5. References	158

CAPITULO V. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' cheeses from Sierra de Aracena	165
1. Introduction	167
2. Material and Methods	169
3. Results	174
4. Discussion	183
5. References	189
CAPITULO VI. Polyphasic approach to bacterial dynamics during the ripening of Spanish farmhouse cheese by culture-dependent and culture-independent methods	195
1. Introduction	197
2. Material and Methods	199
3. Results	204
4. Discussion	215
5. References	220
CAPITULO VII. Characterisation and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goat cheeses	227
1. Introduction	229
2. Material and Methods	231
3. Results	236
4. Discussion	242
5. References	249

CAPITULO VIII. Discusión general y conclusiones	257
1. Discusión	259
2. Conclusiones	282
3. Bibliografía	284

Acrónimos

ADNr	: ADN ribosómico
AFLP	: Adaptor Fragment Length Polymorphism
AN	: Ácido Nucleico
AP-PCR	: Arbitrarily Primed PCR
ARDRA	: Amplification Ribosomal DNA Restriction Analysis
ARNr	: ARN ribosómico
ATCC	: American Type Culture Collection
BAL	: Bacterias del Ácido Láctico
BAP	: Bacterias del Ácido Propiónico
CECT	: Colección Española de Cultivos Tipo
CEP	: Cell Envelope Proteinase
CMF	: Citometría de Flujo
CNRZ	: Centre Nationale de Recherche Zootechniques
DGGE	: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
D.O.P.	: Denominación de Origen Protegida
DSMZ	: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EPS	: Exopolisacarido
ERIC-PCR	: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR
FISH	: Fluorescent <i>in situ</i> Hybridisation
GC	: Guanosina y Citosina
GRAS	: Generally Recognized As Safe
I.G.P.	: Indicación Geográfica Protegida
ITS	: Internal Transcribed Spacer
LAB	: Lactic Acid Bacteria
LH-PCR	: Length Heterogeneity PCR
MIC	: Minimum Inhibitory Concentration
MLST	: Multi Locus Sequence Typing
MSOP	: Modification of the Protein Salting-Out Procedure
NCFB	: National Collection of Food Bacteria
NCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
NSLAB	: Non Starter Lactic Acid Bacteria
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
QPCR	: Quantitative PCR
QPCR-MPN	: Quantitative PCR Most-Probable-Number
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA
REA-PFGE	: Restriction Endonuclease Analysis-Pulsed Field Gel Electrophoresis
REP-PCR	: Repetitive Extragenic Palindromic PCR
rDNA	: Ribosomal DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RISA	: rRNA gene Internal Spacer Analysis
SD	: Standard deviation
SSCP	: Single Stranded Conformational Polymorphism
TGGE	: Temperature Gradient Gel Electrophoresis
T_m	: Temperatura de fusión
T-RFLP	: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
TTGE	: Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages
VBNC	: Viable But Non-Cultivable
VRE	: Vancomycin Resistant Enterococci

CAPÍTULO I

Introducción y Objetivos

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La fermentación en la conservación de los alimentos

La necesidad de conservar los alimentos surgió desde el momento en que la humanidad comenzó a desarrollar prácticas agrícolas y ganaderas. Los datos arqueológicos fechan este acontecimiento en torno a 18.300-17.000 años atrás para el cultivo de la cebada en el valle del Nilo, y en 8.000-10.000 años, para la cría del ganado vacuno y de aves de corral. Sin embargo, el afianzamiento de las sociedades humanas estables fue posterior, estando condicionado a su capacidad de almacenar alimentos en los periodos de abundancia para ser consumidos en épocas de escasez. La fermentación de los alimentos ha sido uno de los métodos más utilizados en la conservación de los mismos, y hoy día, existen una gran variedad de productos fermentados, entre los que cabe destacar, el pan, la cerveza, el vino, los derivados lácteos (queso, yogur), los encurtidos y los embutidos entre otros. Con la fermentación no sólo se consigue conservar y aumentar la vida media de los alimentos, sino también incrementar su seguridad. Durante la fermentación de los alimentos se reducen algunos componentes tóxicos como aflatoxinas y cianógenos; se facilita la inhibición y/o eliminación de microorganismos patógenos y alterantes mediante la producción de factores antibacterianos (bacteriocinas, ácidos láctico y acético, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno y etanol). A esto hay que añadir, que la fermentación puede aumentar el contenido de nutrientes en los alimentos (vitaminas, aminoácidos esenciales y proteínas), favorecer la digestibilidad de proteínas y de la fibra, aumentar la disponibilidad de los micronutrientes, y también favorecer la degradación de factores antinutricionales (Caplice y Fitzgerald, 1999). Además, se puede producir una fuente de calorías adicionales, al convertir sustratos no asimilables por el organismo en otros que sí lo son. También se producen una gran diversidad de nuevos sabores, aromas y texturas, lo que sin duda tiene un efecto enriquecedor del alimento (Giraffa, 2004).

La transformación mediante fermentación de los derivados lácteos es llevada a cabo fundamentalmente por las bacterias del ácido láctico (BAL). El papel de estos microorganismos es múltiple:

- Modifican la estructura, sabor y aroma de las materias primas, mediante sus actividades acidificante y aromatizante confiriéndoles un alto valor añadido.
- Ejercen una acción insustituible en el equilibrio de las poblaciones microbianas, siendo su capacidad inhibidora de microorganismos nocivos una herramienta biológica eficaz en la conservación de las cualidades higiénicas de los alimentos.
- También como probióticos se les ha atribuido diversas acciones beneficiosas: incrementar la calidad nutritiva de los alimentos, promover la síntesis de vitaminas del complejo B, facilitar la digestión de la lactosa, y controlar las infecciones intestinales al impedir la implantación de patógenos en la mucosa intestinal; además de otras supuestas, y no bien demostradas acciones, como la inhibición del desarrollo de algunos tipos de cánceres y la reducción del colesterol sanguíneo (Goldin y Gorbach, 1984; Gilliland *et al.*, 1985; Perdigón *et al.*, 1986; Gilliland, 1990).

Por todo ello, el conocimiento en profundidad de estos microorganismos puede favorecer el uso racional de los mismos en la fabricación de alimentos fermentados, lo que puede ser decisivo para la generación de un producto final satisfactorio (Caplice y Fitzgerald, 1999).

1.2. Bacterias del ácido láctico

Las BAL incluyen un grupo filogenéticamente diverso de géneros de bacterias Gram positivas de morfología cocoidea o bacilar, catalasa negativas, no esporulantes y anaerobios-aerotolerantes, que originan ácido láctico como producto final de la fermentación de azúcares (Fig. 1). Los miembros de este grupo carecen de porfirinas y citocromos, por ello no llevan a cabo la fosforilación mediante cadena de transporte de electrones, sino que obtienen la energía a través de fosforilación a nivel de sustrato. La mayoría de las BAL obtienen su energía del metabolismo de los azúcares y, por esta

razón, sus hábitats están restringidos a los lugares donde éstos están presentes. Suelen tener un metabolismo biosintético limitado, por lo que requieren medios de cultivos ricos, con aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. Fisiológicamente se diferencian dos grupos según los productos finales de fermentación que generan a partir de azúcares. Los fermentadores homolácticos utilizan la vía glucolítica y reducen directamente casi todo el piruvato a lactato gracias al enzima lactato deshidrogenasa. Los fermentadores heterolácticos utilizan la vía de la fosfoacetolasa convirtiendo la glucosa en lactato y etanol o acético y CO₂.

Desde el punto de vista taxonómico, las BAL constituyen un grupo polifilético (Makarova y Koonin, 2007), y se encuentran en la subdivisión de eubacterias Gram positivas de bajo contenido en G+C (< 53 mol% G+C), conocida como subdivisión Clostridial. Comprende más de 20 géneros, que se han definido sobre la base de su morfología celular, secuencia del ADNr 16S y tipo de fermentación, y entre los que destacan por su asociación con alimentos los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*,

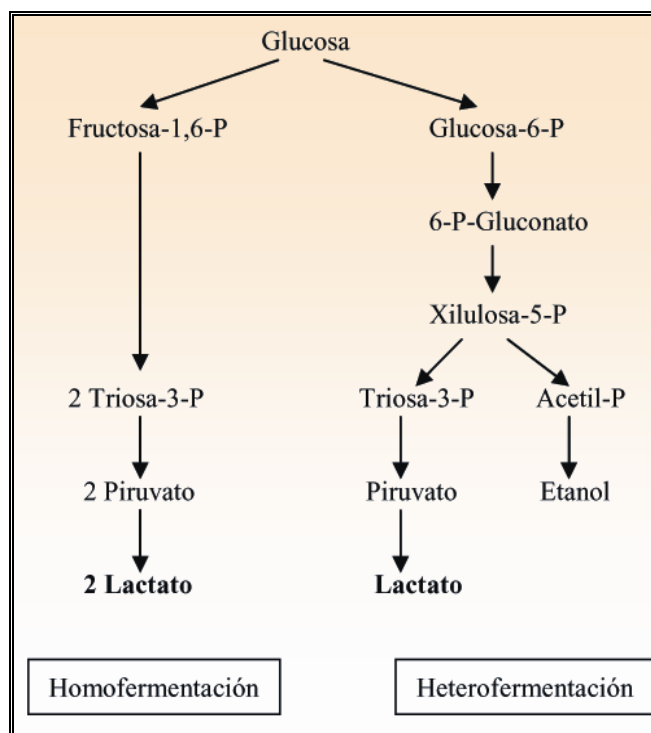


Fig. 1. Esquema de las principales vías de fermentación de glucosa en las BAL (Liu, 2003).

Streptococcus, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Los miembros de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, tienen un contenido en GC similar, existiendo poca variación entre especies. El género *Lactobacillus* en cambio, posee miembros con contenidos de GC muy diversos y por ello constituye un grupo muy heterogéneo. Por último, el género *Bifidobacterium*, que aunque también produce ácido láctico, junto con acetato, en la fermentación de azúcares, posee un porcentaje de GC que oscila de 42 a 67 mol%, y filogenéticamente se sitúa en la subdivisión Actinobacterial.

Las BAL se suelen encontrar tanto en suelos, aguas y, sobre todo, asociadas a plantas y animales. Muchas de ellas forman parte de la microbiota habitual del tracto gastro intestinal y genitourinario de humanos y animales, donde desempeñan un papel beneficioso en el mantenimiento de la integridad intestinal y en procesos de inmunomodulación y resistencia a patógenos (Klaenhammer *et al.*, 2005). También se suelen encontrar en multitud de alimentos, teniendo especial importancia en la producción de alimentos fermentados, cuyo extenso y continuo consumo a lo largo de la historia les ha otorgado el *status* de GRAS (Generally Recognized As Safe) (Klaenhammer *et al.*, 2005). Existe una amplia variedad de cepas de BAL que son empleadas rutinariamente como cultivos iniciadores en la fabricación de derivados lácteos, cárnicos y encurtidos. La contribución más importante de estos microorganismos en los alimentos es que, conservando sus cualidades nutritivas, aumentan por lo general la vida media de estos e inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos (O'Sullivan *et al.*, 2002). Esto se debe a la competencia por los nutrientes entre los distintos microorganismos del alimento y a la producción de sustancias inhibitoras por las BAL, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Ray, 1992; Budde *et al.*, 2003; Vermeiren *et al.*, 2004; Brillet *et al.*, 2005). No obstante, algunas BAL se han descrito como patógenos y patógenos oportunistas tanto en hombre como en animales, y entre ellas mencionar algunas especies de *Enterococcus* y *Streptococcus*, e incluso algunas especies de *Lactobacillus* (Gasser, 1994).

Los principales cambios evolutivos que se han producido en las BAL probablemente han estado dirigidos a la adaptación a ambientes ricos en nutrientes, lo que ha llevado a la pérdida de algunas rutas biosintéticas y la adquisición de diversos tipos de transportadores y peptidasas (Makarova y Koonin, 2007). Los análisis de los genomas disponibles de las BAL han revelado que en estos microorganismos existe

mayor proporción de sistemas de transporte que en otras bacterias, predominando sobre todo los implicados en la captación de aminoácidos, seguidos de los de azúcares y péptidos (Klaenhammer *et al.*, 2005).

Son muchos los aspectos biotecnológicos de interés en las BAL. Además de su papel en promover la salud mediante la producción de alimentos fermentados, se pueden emplear en la producción de polisacáridos de grado alimentario o en la producción de compuestos potenciadores del sabor, como diacetilo, acetaldehído o acetato. Uno de los aspectos más atractivos y prometedores lo constituye el desarrollo de vacunas mediante las BAL (Caplice y Fitzgeral, 1999; Mercenier *et al.*, 2000). Además, muchas especies de BAL son empleadas como probióticos (Tabla 1), microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, producen efectos beneficiosos en la salud del hospedador (Reid *et al.*, 2003). Los efectos beneficiosos de las BAL son numerosos como se ha comentado al iniciar este capítulo. Por todo ello, existe un gran interés industrial y biotecnológico en las aplicaciones de estas bacterias, sobre todo en lo referente a la selección de cepas con efectos beneficiosos específicos sobre la salud. La importancia de esta cuestión se deduce del hecho de que el mercado mundial de las BAL se situó en el año 2004, en torno a los 30.000 millones de euros (de Vos *et al.*, 2004).

Entre los microorganismos que con más frecuencia se aíslan de derivados lácteos, destacan lactobacilos y lactococos. Ambos tienen una gran capacidad acidificante y muchas especies son proteolíticas. Además, en los quesos elaborados en la cuenca Mediterránea, también es frecuente aislar enterococos, sobre todo en aquellos que han sido elaborados con leche cruda. Por ello, a continuación se describen con más detalle las características diferenciales de los principales géneros.

1.2.1. El género *Lactobacillus*

Los lactobacilos son bacilos Gram positivos no esporulantes y no móviles, aunque su morfología varía ampliamente desde largos bacilos o bacilos ligeramente curvados a cocobacilos corineformes. Son bacterias anaerobias-aerotolerantes, quimiorganotrofas, con metabolismo fermentativo y catalasa negativas aunque algunas

Tabla 1. Principales microorganismos empleados como probióticos (Holzapfel et al., 1998).

Lactobacilos	Bifidobacterias	Otras BAL	No BAL
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>Toyo</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain <i>nissle</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

cepas pueden presentar una pseudocatalasa (Felis y Dellaglio, 2007). Fermentan los hidratos de carbono produciendo ácido láctico como principal producto final. Tienen requerimientos nutricionales complejos, necesitando ser suplementadas con carbohidratos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, sales, derivados de ácidos nucleicos y vitaminas (Tannock, 2004), dependiendo de la especie. Actualmente el género *Lactobacillus* incluye más de 100 especies (Felis y Dellaglio, 2007). Filogenéticamente se encuentra próximo a los géneros *Leuconostoc* y *Pediococcus* y más alejado de los estreptococos, *Carnobacterium* y las especies aerobias de *Bacillus*. Taxonómicamente es un grupo muy heterogéneo, con un contenido variable de GC que oscila entre 32 y 54 % mol (Schleifer y Ludwig, 1995). Uno de los principales problemas en la taxonomía de este género es la ausencia de correlación entre las propiedades metabólicas y la posición filogenética (Schleifer y Ludwig, 1995). Las técnicas moleculares como la hibridación ADN-ADN o la secuenciación del gen ribosómico 16S ha llevado a la reclasificación de numerosas especies de las BAL. Así p.e. las especies de lactobacilos *Lb. delbrueckii*, *Lb. bulgaricus* y *Lb. lactis* se han reclasificado como

subespecies de *Lb. delbrueckii* (*Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*), mientras que en otros casos una especie se ha subdividido en varias, como es *Lb. casei* que se ha dividido en tres, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus*. Por otro lado hay especies que han cambiado de género, como p.e. *Lb. viridescens* ha pasado a llamarse *Weissella viridescens*. Sobre la base de la temperatura óptima de crecimiento y de las rutas de fermentación de hexosas los lactobacilos se han dividido en tres subgrupos (Kandler y Weiss, 1984): grupo I, homofermentativos obligados; grupo II, heterofermentativos facultativos; grupo III, heterofermentativos obligados (Tabla 2).

Los lactobacilos constituyen uno de los géneros más importantes dentro de las BAL. Se han aislado de una gran variedad de hábitats, el suelo, las aguas, la superficie de vegetales, y forman también parte de la microbiota de animales, incluido el hombre. En estos últimos aparecen asociados a la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y el tracto genital, donde la asociación de muchos lactobacilos con efectos beneficiosos ha conducido a su designación como probióticos (Claesson *et al.*, 2007). Además se aíslan y se emplean en numerosos alimentos fermentados: productos lácteos (yogures, quesos), encurtidos (aceitunas), carnes fermentadas (salami) y panes fermentados (Tannock, 2004). En estos alimentos suelen tener un efecto positivo sobre el producto final, aunque algunas especies pueden producir efectos negativos y ser alterantes de alimentos.

A pesar de su presencia tan extendida en los alimentos, son muy raros los casos documentados de infecciones causadas por lactobacilos, los cuales se han producido principalmente en pacientes con una enfermedad severa previa (Bernardeau *et al.*,

Tabla 2. Principales especies de lactobacilos asociados a productos lácteos, agrupados según el tipo de fermentación (Curry y Crow, 2002).

Homofermentativos	Heterofermentativos	
	Facultativos	Obligados
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. bif fermentans</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. coryneformis</i>	<i>Lb. brevis</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. buchneri</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. fermentum</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. kefir</i>
	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. reuteri</i>

2008). Entre las principales propiedades de seguridad asociadas a los lactobacilos y que podrían expresarse en el tubo digestivo se encuentran algunas actividades enzimáticas como, la decarboxilación de la tirosina, la actividad desconjugasa de las sales biliares, otras diversas actividades enzimáticas (p.e. azorreductasa, nitroreductasa, β -glucuronidasa y glicosidasa, que podrían tener efectos toxicológicos), la degradación de ácido hialurónico, la actividad de agregación del complemento y la producción de metabolitos tóxicos (Bernardeau *et al.*, 2006). Entre otros efectos negativos, se podría incluir la cariogénesis, habiéndose referido ciertas cepas de lactobacilos como responsables de algunos tipos de caries ligadas a su capacidad acidificante (Bernardeau *et al.*, 2006).

En los quesos, algunas especies de lactobacilos como *Lb. helveticus* y *Lb. delbrueckii* forman parte de algunos cultivos iniciadores industriales (Hébert *et al.*, 2000) contribuyendo a la acidificación (Eliskases-Lechner *et al.*, 1999) y a la proteólisis primaria (Chopard *et al.*, 2001). Aunque suelen estar presentes al inicio a niveles de 10^9 UFC/g, decrecen rápidamente durante la maduración. Otros lactobacilos están presentes de forma natural en la microbiota de productos lácteos formando parte de las llamadas BAL no iniciadoras. Este es el caso de *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. curvatus*, *Lb. acidophilus* o *Lb. pentosus* (López y Mayo, 1997; Coppola *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2001). Al contrario que las BAL de los cultivos iniciadores, estas especies suelen estar presentes al inicio de la fermentación en un número relativamente bajo (entre 10^2 y 10^3 UFC/g), incrementándose durante el periodo de maduración hasta alcanzar niveles de 10^7 a 10^8 UFC/g (Demarigny *et al.*, 1996; Fox *et al.*, 1998). Algunos estudios sobre la dinámica poblacional de quesos, indican que se van produciendo cambios en las secuencias de especies predominantes, con un claro predominio de *Lb. paracasei* conforme se alarga el tiempo de maduración (Beresford *et al.*, 2001). Además se ha descrito la aparición y desaparición, así como la recurrencia, de diferentes cepas de *Lb. paracasei* y *Lb. plantarum* a lo largo de la maduración (Fitzsimons *et al.*, 2001; Beresford *et al.*, 2001).

Los lactobacilos no iniciadores suelen influir en potenciar el sabor de los quesos a través de los diferentes productos metabólicos. Entre ellos, destacan los ácidos orgánicos como láctico y acético, etanol, acetaldehído y diacetilo, además pueden intervenir activamente en la degradación de proteínas, aminoácidos, grasas y ácidos grasos. Estos efectos suelen estar ligados a cepas concretas más que a la especie propiamente dicha. Por ello, en los últimos años se ha incrementando el uso de

diferentes especies y cepas de lactobacilos como cultivos adicionales que mejoren las características de un queso, bien porque proporcione propiedades específicas deseables, o bien porque reduzca los tiempos de maduración del queso, o incluso como método de conservar las características tradicionales de aquellos quesos que han sido elaborados con leche pasteurizada. En estos casos, se suelen añadir a la leche en bajas densidades, para que no contribuyan significativamente a la acidificación inicial, y posteriormente alcancen densidades elevadas durante la maduración del queso.

1.2.2. El género *Lactococcus*

Los lactococos son cocos Gram positivos anaerobios-aerotolerantes que se agrupan como células individuales en parejas o cadenas cortas. No presentan movilidad y no forman esporas. Su contenido en GC se sitúa entre 34 y 36 % mol. El principal producto de la fermentación de la glucosa es el ácido L-láctico (Teuber, 1995).

Los lactococos son los integrantes más habituales de los cultivos iniciadores mesófilos para la producción de ácido láctico. Se utilizan en la fabricación de numerosos productos lácteos, como leches fermentadas, mantequillas fermentadas y numerosas variedades de quesos. Se aíslan también con frecuencia de derivados lácteos y quesos artesanales (van Hylckama Vlieg *et al.*, 2006). De las 5 especies reconocidas actualmente, depositadas en la colección de cultivos tipo DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), *Lc. lactis*, *Lc. garviae*, *Lc. plantarum*, *Lc. piscium* y *Lc. raffinolactis*, es *Lc. lactis* la principal implicada en la fermentación de productos lácteos y la que suele estar presente en los cultivos iniciadores comerciales. Se han descrito dos subespecies de *Lc. lactis*, denominadas *Lc. lactis* subsp. *cremoris* y *Lc. lactis* subsp. *lactis*. De esta última hay distintas variedades, como por ejemplo *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* que se caracteriza por su capacidad de metabolizar el citrato y producir diacetilo, lo que proporciona un especial sabor mantecoso al producto acabado. El cultivo de este microorganismo con leche desnatada produce suero de leche cultivado y, si se utiliza crema completa, el resultado es la crema agria (Teuber, 1995). Aunque *Lc. lactis* se ha aislado de numerosos ambientes, dada su amplia asociación con los productos lácteos fermentados éstos son la principal fuente de aislamiento (van Hylckama Vlieg *et al.*, 2006).

A nivel industrial, *Lc. lactis* se ha utilizado como cultivo iniciador, natural o comercial, por su gran capacidad de acidificación, al producir ácido L-láctico como principal producto de la fermentación de la lactosa en la fermentación homoláctica. También contribuyen en imprimir sabor, dar textura y prevenir el crecimiento de microorganismos indeseables o alterantes de alimentos, incluyendo algunos patógenos, por el propio papel acidificador y por la capacidad de ciertas cepas de producir bacteriocinas, de las cuales la nisina es su mejor ejemplo. La producción de diacético a partir de citrato suele ser la característica más importante relacionada con el sabor y aroma, pero además durante el metabolismo del citrato se genera CO₂, lo que contribuye a la formación de los “ojos” de algunos quesos. Los lactococos intervienen de forma activa en la degradación de la caseína mediante una serin proteasa (PrtP) conocida como lactocepina o CEP (Cell Envelope Proteinase) que presentan algunas cepas. La degradación posterior de los péptidos hasta aminoácidos la llevan cabo algunas peptidasas intracelulares (Coolbear *et al.*, 1992). En lo que se refiere a la aportación de textura en los derivados lácteos fermentados, muchas cepas poseen la capacidad de producir exopolisacáridos (EPS) que aumenta la viscosidad de los productos finales derivados de la leche (Welman y Maddox, 2003).

La presencia de los lactococos en los quesos, principalmente *Lc. lactis*, va a estar determinada por su rol de cultivo iniciador. Así, en queso Cheddar los lactococos crecen rápidamente durante la acidificación de la leche hasta niveles de 10⁹ UFC/g para caer rápidamente por debajo de las 10⁷ UFC/g, pudiendo incluso hacerse indetectables en los primeros meses de maduración por técnicas dependientes de cultivo (Swearingen *et al.*, 2001; Østlie *et al.*, 2004). La sustitución de *Lc. lactis* por las BAL no iniciadoras, habitualmente *Lactobacillus*, se hace especialmente patente en los quesos elaborados con leche cruda y sin empleo de cultivos iniciadores, mientras que en quesos elaborados con leche pasteurizada y adicionados de cultivos iniciadores, estas bacterias si pueden llegar a formar parte de la microbiota predominante (Olarde *et al.*, 2000).

A la hora de seleccionar cepas como cultivos iniciadores van a ser criterios importantes, además de la capacidad de acidificación y temperatura de crecimiento, la sensibilidad a bacteriofagos (Coffey y Ross, 2002) y la capacidad de imprimir sabor al producto, en lo que puede jugar un papel importante la capacidad de autólisis por la consecuente liberación de enzimas intracelulares (El Soda *et al.*, 2000).

1.2.3. El género *Enterococcus*

Los enterococos son cocos Gram positivos de bajo contenido en GC (< 50 %), catalasa negativos (aunque algunas especies pueden presentar una pseudocatalasa) y que se agrupan como células individuales, en parejas o en cadenas cortas. No forman endosporas y algunas células pueden ser móviles. Algunas especies son pigmentadas como *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. sulfureus*. Son anaerobios aerotolerantes quimiorganotrofos, con un metabolismo fermentativo (homofermentativo). El principal producto de la fermentación es el ácido L-láctico y, además, pueden producir pequeñas cantidades de ácido acético, fórmico y etanol. No producen gas. El número de especies adscrito a este género no ha parado de aumentar en los últimos años, pasando de las 19 especies descritas en 2002 (Giraffa, 2002) a las 39 especies depositadas actualmente en la DSMZ.

El término enterococo fue utilizado por primera vez por Thiercelin (1899, 1903) para referirse a un diplococo Gram positivo encontrado en el intestino humano. La denominación de *Streptococcus faecalis* fue acuñada por Andrewes y Horder (1906), para designar a un microorganismo aislado de un paciente con endocarditis, aludiendo el nombre específico al hábitat de dicho microorganismo, el intestino. Posteriormente Schleifer y Kilpper-Bälz (1984) utilizaron hibridaciones ADN-ADN y ADN-ARN para demostrar que *S. faecalis* y *S. faecium* eran lo suficientemente distintos del resto de los estreptococos como para poder ser transferidos a un género separado, el género *Enterococcus*. De esta forma y basándose en la catalogación del gen ribosómico 16 S (Ludwing *et al.*, 1985, Willians *et al.*, 1991), hibridaciones ADN-ADN y ADN-ARN, y estudios serológicos con antisueros anti-superóxido dismutasa (Schleifer *et al.*, 1985), los estreptococos en sentido amplio fueron divididos en tres géneros: *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* y *Lactococcus* (Devriese *et al.*, 1993).

Los enterococos, junto con los otros géneros de las BAL, pertenecen a la subdivisión Clostridial de las eubacterias Gram positivas. Dentro de ésta, los enterococos se encuadran, junto con los géneros *Melissococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*, en la familia *Enterococcaceae* (Franz *et al.*, 2003).

La taxonomía clásica de enterococos es vaga y en muchos casos confusa, ya que no hay características fenotípicas inequívocas que permitan distinguirlos de otras bacterias cocoideas Gram positivas y catalasa negativas (Devriese *et al.*, 1993). La

mayoría de especies de enterococos pueden distinguirse de otros cocos Gram positivos catalasa negativos sobre la base del antígeno D de Lancefield, por su capacidad de crecer en un intervalo de temperatura entre 10° y 45°C en CINa al 6,5%, a pH 9,6 y sobrevivir a calentamientos a 60°C durante 30 min (Hardie y Whiley, 1997; Morrison *et al.*, 1997). Sin embargo, no todas las especies de enterococos poseen el antígeno D, como son los casos de *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus* o *E. sulfureus*, mientras que sí lo presentan algunos *Pediococcus* y ciertos *Leuconostoc* (Franz *et al.*, 1999; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Algunas cepas de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus* y *Leuconostoc*, pueden crecer en presencia de 6,5% de NaCl, pero otras especies de *Enterococcus*, como *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. avium* y *E. saccharominimus* no lo hacen (Devriese *et al.*, 1993; Vancanneyt *et al.*, 2004). Es más, *Pediococcus* y algunas especies de *Lactococcus* crecen a 45 °C, y sin embargo *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. malodoratus* y *E. moraviensis* no lo hacen (Devriese *et al.*, 1993; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). En algunos casos la distinción filogenética de especies o grupos de especies se ha hecho fundamentalmente por su diferencia en la composición de su pared celular, y sus características en cuanto a la fisiología, crecimiento y pruebas bioquímicas (Devriese *et al.*, 1993). Por todo ello, se ha hecho necesario la aplicación de técnicas moleculares y genéticas que permiten en algunos casos una identificación mucho más precisa de las especies de enterococos, no sólo desde el punto de vista taxonómico sino también en estudios clínicos, alimentarios y ambientales (Giraffa, 2002). Algunas de las técnicas aplicadas con éxito han sido las basadas en la secuenciación del ADNr 16S, o en la investigación de algunos genes funcionales como la D-alanina-D-alanina ligasa (*ddl*-ligasa) de la pared celular o la superóxido dismutasa (*sodA*), o bien técnicas de tipificación, entre las que se incluyen el RAPD, ARDRA, AFLP, PFGE o MLST (Ogier y Serror, 2008).

Aunque los enterococos son microorganismos ubicuos, su hábitat principal es el intestino de humanos y otros animales de sangre caliente, donde se comportan como comensales (Kayser, 2003) mostrando un grado variable de especificidad de hospedador. Las especies más frecuentes en el intestino humano son *E. faecalis* y, en menor medida, *E. faecium*. Incluso se ha aislado *E. faecalis* en heces de recién nacidos (Murray, 1990). También pueden aparecer en secreciones orofaríngeas, secreciones vaginales, en la piel (Kayser, 2003) y también en la secreción de la glándula uropigial de aves (Martín-Platero *et al.*, 2006; Soler *et al.*, 2008). Además se han aislado con frecuencia enterococos de insectos, de la superficie de plantas, suelos y aguas (Muller *et*

al., 2001; Giraffa, 2002; Giraffa, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Debido a su presencia en el intestino de animales, tradicionalmente se les consideraba como indicadores de contaminación fecal, pero Mundt (1986) mostró la falta de relación directa entre la presencia de enterococos en alimentos y la contaminación fecal de los mismos, e incluso se ha sugerido que pueden no tener gran valor como indicadores higiénicos en los procesos industriales alimentarios (Biorollo *et al.*, 2001).

1.2.3.1. Enterococos en los alimentos

Debido a la gran capacidad de los enterococos de sobrevivir a tratamientos térmicos y a condiciones ambientales adversas, se pueden encontrar en multitud de alimentos, tanto de origen animal como vegetal (Murray, 1990; Muller *et al.*, 2001; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Incluso se ha referido a *E. faecium* como uno de los microorganismos predominantes en la leche cruda (Franz *et al.*, 1999), con las consecuentes implicaciones para la industria láctea. Además juegan un papel importante en la fabricación de distintos productos vegetales, cárnicos y lácteos como las aceitunas, las salchichas o los quesos (Franz *et al.*, 2003; Hugas *et al.*, 2003; Giraffa, 2003). En estos últimos, los enterococos contribuyen de forma activa con el desarrollo del aroma y maduración de quesos, muy especialmente en aquellos que han sido elaborados a base de leche cruda de cabra y oveja (Centeno *et al.*, 1999; Sarantinopoulos *et al.*, 2002; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Adicionalmente los enterococos se pueden emplear para alargar la vida media de los alimentos por su capacidad para producir sustancias antimicrobianas como ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Incluso se pueden emplear como probióticos para humanos y animales (Franz *et al.*, 1999). Uno de los probióticos mejor estudiados es *E. faecium* SF68. Esta cepa ha sido considerada como una alternativa a los antibióticos en el tratamiento de la diarrea (Lewenstein *et al.*, 1979; Bellomo *et al.*, 1980). Entre las características ideales a la hora de considerar a una cepa de enterococo como probiótico o como cultivo iniciador se encuentran la ausencia de genes de virulencia y sensibilidad a los antibióticos (Franz *et al.*, 2003).

En el caso de los quesos, los enterococos se aíslan con frecuencia de quesos tradicionales mediterráneos, tanto de cabra como de oveja, vaca o búfala, sobre todo aquellos que han sido elaborados a partir de leche cruda. Incluso se suelen encontrar con

frecuencia en quesos elaborados con leche pasteurizada, lo que está relacionado con su gran termorresistencia. Pueden aparecer en órdenes de 10^4 a 10^6 UFC/g en la cuajada y en órdenes de 10^5 a 10^7 CFU/g en quesos maduros, con un claro predominio de las especies *E. faecalis* y *E. faecium*, y en menor medida *E. durans* y de forma ocasional *E. hirae* y *E. casseliflavus* (Giraffa, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Ogier y Serror, 2008). Las variaciones en los niveles de enterococos van a depender, principalmente, del tipo de queso y la estación del año en la que se elabora, así como de los niveles de contaminación de la leche (Franz *et al.*, 1999; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). El papel positivo que ejercen en el sabor y aroma de los quesos en los que aparecen, se debe principalmente a sus capacidades proteolítica y lipolíticas (Centeno *et al.*, 1999), así como al metabolismo del citrato que les permite formar diacetilo y otros compuestos volátiles (Sarantinopoulos *et al.*, 2001; Giraffa, 2003; Foulquie-Moreno *et al.*, 2006). Aún así, estas capacidades metabólicas son variables de unas cepas a otras, mostrándose *E. faecalis* como la especie más activa a este respecto (Giraffa, 2003). Este papel beneficioso en el sabor y aroma de ciertos quesos ha llevado a la inclusión de algunas cepas de enterococos para ser usadas en cultivos iniciadores de algunos alimentos fermentados (Franz *et al.*, 1999; Franz *et al.*, 2003).

La presencia de enterococos en numerosos alimentos artesanales es actualmente causa de gran debate, debido a su reciente aparición como patógenos emergentes (McBride *et al.*, 2007). Foulquié-Moreno y colaboradores (2006) señalan la división de los investigadores en pro y contra de los enterococos debido a la controversia que existe sobre la conveniencia o no de que este grupo de microorganismos estén presentes en los alimentos. Los enterococos han sido asociados con infecciones nosocomiales y pueden estar presentes en pacientes inmunodeprimidos, además de haberse detectado la presencia de cepas resistentes a vancomicina. Pero a pesar de todo, su incidencia en enfermedades humanas no se ha podido correlacionar con su presencia en alimentos (Franz *et al.*, 1999).

1.2.3.2. Virulencia de los enterococos

En las últimas décadas los enterococos se han convertido en importantes patógenos nosocomiales en pacientes inmunodeprimidos y en las unidades de cuidados

intensivos (Giraffa, 2002). Aunque no tienen potentes factores de virulencia ni poderosas toxinas como ocurre en otros patógenos, sin embargo presentan algunos rasgos estructurales y metabólicos que son considerados por algunos investigadores como determinantes de virulencia. Esto junto con la presencia de resistencias a numerosos agentes antimicrobianos, los convierten en patógenos oportunistas (Adams, 1999). Los enterococos, son la segunda causa de infección nosocomial tras *E. coli* en Estados Unidos (Schaberg y Gaynes, 1991). Aproximadamente el 90% de las infecciones enterocócicas están causadas por *E. faecalis* y el 10% restante por *E. faecium*, aunque en los últimos años ha aumentado la proporción de infecciones causadas por *E. faecium* en relación a las causadas por *E. faecalis* (Treitman *et al.*, 2005). Es rara la implicación de otras especies de enterococos en infecciones (Franz *et al.*, 1999), aunque ocasionalmente se han descrito algunas, y en estos casos están producidas fundamentalmente por cepas de *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus* y *E. hirae* (Kayser, 2003). A pesar de la natural convivencia de este grupo microbiano con el ser humano, parecen ser la cepas adquiridas exógenamente las implicadas en los casos de infección y no las cepas procedentes de la microbiota autóctona del hospedador (Kayser, 2003).

Los enterococos son la segunda causa de infecciones del tracto urinario tanto en Europa como en Estados Unidos (Huycke *et al.*, 1998; Bouza *et al.*, 2001a; Bouza *et al.*, 2001b). Los cultivos de orina constituyen la fuente más frecuente de enterococos en los laboratorios de microbiología clínica (Kayser, 2003). Es importante destacar que en varias ocasiones se han relacionado las infecciones del tracto urinario con otros procesos más graves como endocarditis y bacteremia enterocócica (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003). Además constituyen en torno al 12% de los patógenos bacterianos asociados a septicemia y entre el 5-15 % de los casos de endocarditis bacteriana (Schaberg and Gaynes, 1991). También se han relacionado con casos de bacteremia, infecciones del sistema nervioso central, infecciones intra-abdominales y pélvicas y en numerosos casos de resistencia múltiple a antibióticos (Giraffa, 2002; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Por otra parte, los enterococos pueden aparecer en infecciones polimicrobianas, donde basta con eliminar el principal agente infeccioso para eliminar las poblaciones de enterococos de dicha infección (Kayser, 2003).

Por último conviene tener en cuenta, que a pesar de todas estas evidencias, aún no se ha demostrado que sean responsables de infecciones o toxi-infecciones alimentarias, aún cuando en general, las cepas aisladas de alimentos presentan genes

asociados a virulencia. Además las cepas de origen alimentario son susceptibles a los antibióticos más relevantes para su tratamiento (Ogier y Serror, 2008). También en ocasiones se les ha relacionado con la intoxicación en alimentos por la producción de aminas biógenas por algunas cepas, ya que alimentos con altos niveles de aminas, también tenían un título elevado de enterococos. Sin embargo, tampoco se ha demostrado que el origen de las aminas esté ligado exclusivamente a la presencia de enterococos en alimentos (Giraffa, 2002).

Para que los enterococos causen una infección deben primero colonizar el tejido, resistir los mecanismos de defensa del hospedador y finalmente producir una serie de cambios patológicos en el hospedador (Franz *et al.*, 1999; Franz *et al.*, 2003). Para dicho fin se sirven de los factores de virulencia, que se definen como “moléculas efectoras capaces de potenciar la capacidad de un microorganismo de producir una enfermedad a través de las propiedades intrínsecas de la especie” (Mundy *et al.*, 2000). Los factores de virulencia de estos microorganismos incluyen varias adhesinas, como la proteína de superficie enterocócica (Esp), sustancias de agregación (AS), antígeno enterocócico de endocarditis (Efa) o adhesina del colágeno (Ace) (Franz *et al.*, 2003). Para la invasión y formación de abscesos pueden secretar gelatinasa, hialuronidasa y una citolisina (Witte *et al.*, 1999; Franz *et al.*, 2003). Además, Hancock y Gilmore (2002) demostraron que la producción de cápsula les confiere resistencia a los mecanismos de defensa del hospedador. La mayoría de estos factores puede ser transmitido por diversos mecanismos de transferencia génica (Giraffa, 2002), y han sido descritos principalmente en *E. faecalis* (Franz *et al.*, 2003). Sin embargo, tal como se ha comentado anteriormente, la presencia de estos determinantes no tiene por qué desempeñar un papel esencial en el desarrollo de una infección (Franz *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Por todo ello, se considera que realmente los enterococos poseen una baja patogenicidad intrínseca y un bajo potencial virulento (Kayser, 2003). Las condiciones particulares del hospedador (inmunosupresión, estado fisiológico, tratamiento previo con antibióticos, presencia de catéteres, etc.) podrían ser claves para que determinadas cepas de enterococos puedan llevar a cabo una infección en el ser humano (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003).

El potencial patogénico de estas bacterias se ha ido incrementado en los últimos años por la adquisición de resistencias a numerosos antibióticos, lo que los ha convertido en eficientes patógenos nosocomiales oportunistas capaces de sobrevivir en ambientes hospitalarios (Giraffa, 2002; Kayser, 2003). Los enterococos poseen

resistencia constitutiva a algunas cefalosporinas, β -lactámicos y sulfonamidas; resistencia a niveles bajos de clindamicinas y aminoglicósidos, lincosamidas y polimixinas. Además *E. gallinarum* presenta resistencia constitutiva a vancomicina (*vanC*). Pueden adquirir resistencias mediante la incorporación de plásmidos y transposones, como se ha demostrado para la resistencia a cloranfenicol, eritromicina, clindamicina y aminoglucósidos, tetraciclina, β -lactámicos, fluoroquinolonas, ampicilina, macrólidos, trimetoprim/sulfametoazol, quinolonas, estreptograminas y glucopéptidos (Murray, 1990; Leclercq, 1997; Franz *et al.*, 1999; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Ampicilina, gentamicina y especialmente vancomicina son los antibióticos de mayor importancia desde el punto de vista clínico en el tratamiento de enterococos multirresistentes a antibióticos (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Los enterococos resistentes a vancomicina representan el 28% de los enterococos que causan infecciones en las unidades de cuidados intensivos de EE.UU (Leavis *et al.*, 2006). La aparición de cepas resistentes a vancomicina ha generado infecciones enterocócicas que no se han podido tratar con los antibióticos habituales (Franz *et al.*, 2003). De los seis fenotipos diferentes de resistencias a vancomicina (VanA, B, C, D, E y G) son de especial importancia los fenotipos VanA y VanB, por su mayor presencia en *E. faecalis* y *E. faecium*. El operón *vanA* (Fig. 2) es el más frecuente y proporciona altos niveles de resistencia a vancomicina y teicoplanina, mientras que el operón *vanB* tan sólo proporciona resistencia a vancomicina. El operón *vanA* se puede adquirir a través del transposón Tn1546 o de elementos móviles relacionados (Arthur *et al.*, 1993). Estos genes de resistencia de los enterococos pueden ser también transmitidos a otras especies patógenas, como es el referido caso de la transmisión del transposón de resistencia a vancomicina a cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina, lo que origina una cepa de *S. aureus* multirresistente (vancomicina y meticilina) (Weigel *et al.*, 2003). Recientemente, mediante un estudio de tipado con MLST (Multi Locus Sequence Typing) en *E. faecium* de diversas procedencias, se ha puesto de manifiesto que la mayoría de los *E. faecium* resistentes a vancomicina aislados de hospital derivan de una misma línea clonal denominada complejo C17 (Willems *et al.*, 2005).

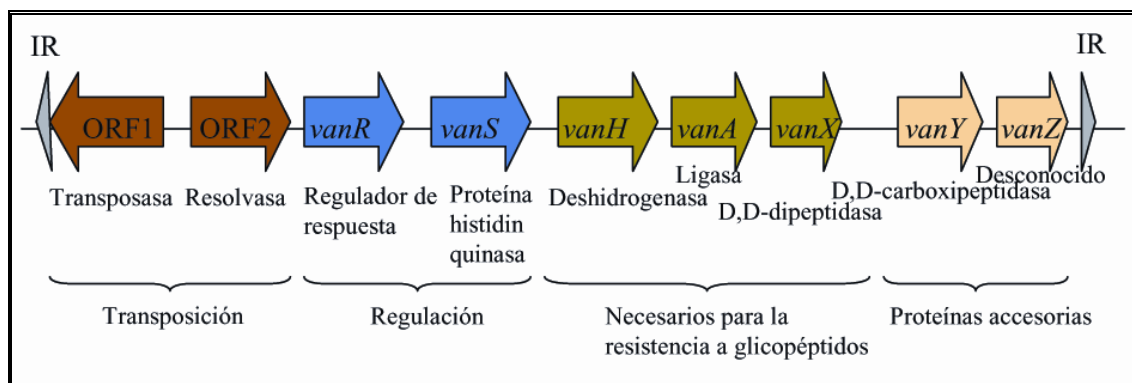


Fig. 2. Estructura del operón *vanA* (Walsh y Amyes, 2004).

Debido al problema de salud pública que supone la diseminación de resistencias a antibióticos en la biosfera (Fig. 3), incluida la cadena alimentaria, es de especial importancia asegurar que las cepas de enterococos que se empleen en alimentación, como cultivos iniciadores o cultivos adjuntos, carezcan de elementos genéticos móviles que puedan diseminar resistencia frente a algún antibiótico (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006).

1.3. Quesos

Las características nutricionales que hacen de la leche un alimento completo para la dieta de los seres humanos, también la hacen un medio de cultivo ideal para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. Ya en la antigüedad se aprovechaba la actividad de las bacterias para la elaboración de productos lácteos y para la conservación de la leche. Fue así como se inició la elaboración del yogurt y otras bebidas lácteas fermentadas, donde, como resultado del metabolismo fermentativo de la lactosa y la consecuente producción de ácido láctico, se conseguía modificar las características físico-químicas de la leche prolongando así su “vida útil” (Beresford *et al.*, 2001). El origen del queso se cree que surgió hace aproximadamente unos 8.000 años en Asia, entre el Tigris y el Éufrates durante la denominada “revolución agrícola” (Fox, 2002). Su fabricación se extendió por todo el mundo civilizado desde Egipto, Grecia y Roma, existiendo numerosas referencias respecto a su forma de elaboración y

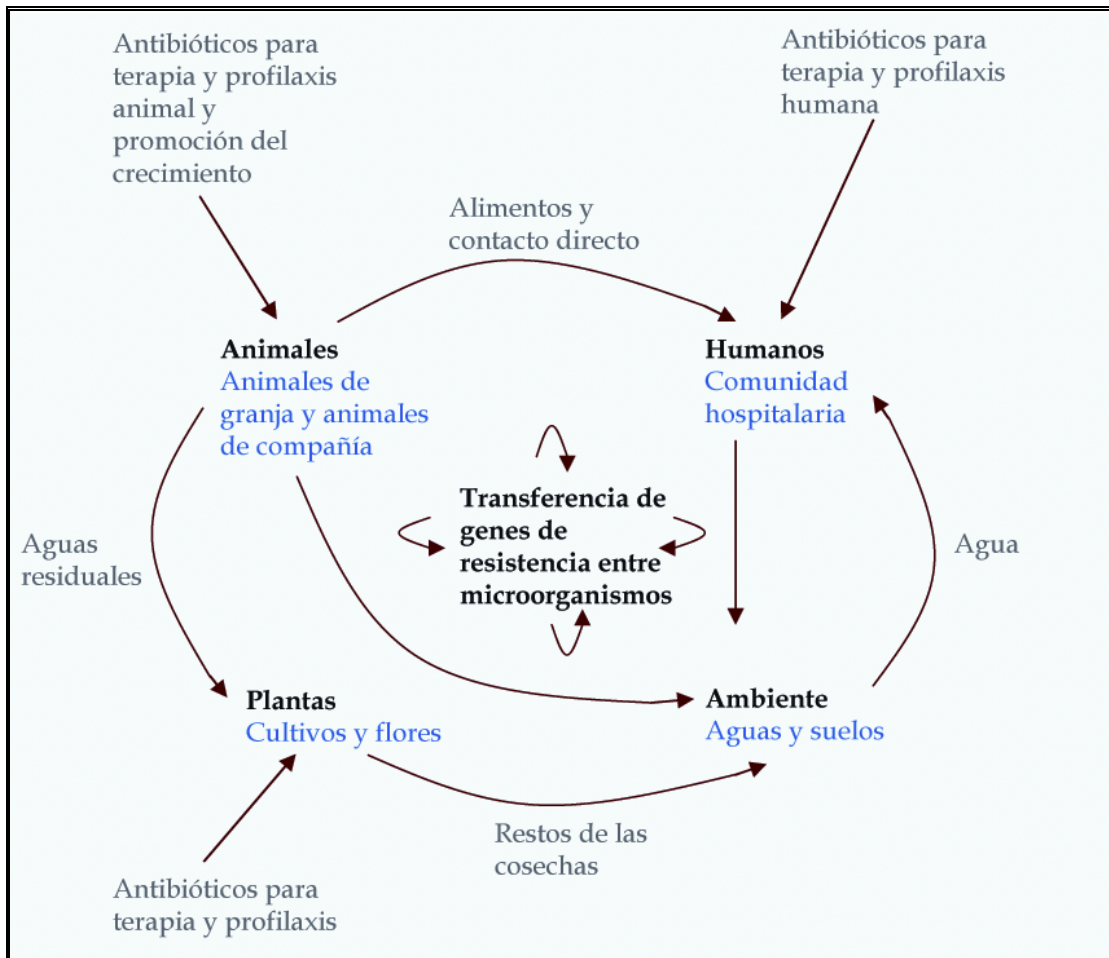


Fig. 3. Diseminación de los antibióticos y sus resistencias en la biosfera (Teuber, 2001).

conservación. En Europa, durante la Edad Media, probablemente se dieron las condiciones adecuadas para su elaboración, por la propia estructura feudal de las ciudades y también por la necesidad de autoabastecimiento de las mismas, ya que representaba la forma más conveniente de conservar y alargar la vida media de la leche (Fox, 2002). Los quesos hoy día, engloban a un conjunto de alimentos lácteos fermentados de los que existe una gran variedad en cuanto a texturas, sabores y formas. Gran parte de estas variedades se han producido de forma accidental, estando incluso ligadas a las condiciones particulares de cada región y de hecho en la actualidad, la producción local de muchos tipos de quesos se encuentra protegidas bajo el *status* de Denominación de Origen.

A pesar de la dificultades logísticas asociadas con la producción de quesos, la fabricación artesanal de los mismos ha experimentado un notablemente incremento en

los países europeos, y muy especialmente en nuestro país (Medina, 1996), donde ya hay descritos más de 100 tipos de quesos, aunque sólo unos pocos poseen la Denominación de Origen. Es en los últimos años cuando se han empezado a estudiar con cierto detalle los procesos microbianos que suceden durante la elaboración y maduración de los quesos. Gran parte de estos estudios se han centrado en conocer los microorganismos que producen cambios deseables en las características físico químicas de la leche durante la elaboración de quesos, y también en la seguridad de los mismos, ya que tanto la leche como los derivados lácteos pueden contaminarse con microorganismos patógenos o sus toxinas y provocar enfermedades en el consumidor. También los microorganismos pueden causar alteraciones de la leche y del queso haciéndolos inadecuados para su consumo (Freitas y Malcasa, 2000).

1.3.1. Fabricación de los quesos

La fabricación del queso tiene como principio la concentración de las proteínas y las grasas de la leche, y se consigue fundamentalmente coagulando la caseína a pH ácido. Este proceso genera un gel donde queda retenida la grasa. Cuando este gel se corta o se rompe y se contrae, se libera el lactosuero (sinéresis), que contiene proteínas solubles, azúcares (lactosa) y una fracción de componentes salinos de la leche. La sinéresis puede depender de factores físicos y químicos, como la temperatura, la concentración de proteínas de la leche, el pH, la presencia de iones de calcio y la agitación (Eck, 1990). La coagulación de la leche, se puede inducir por el uso de enzimas (proteasas ácidas), por acidificación, bien de forma química (pH aprox. 4,6) o bien de forma biológica (por bacterias lácticas), y por calentamiento a 80-90 °C a pH alrededor de 5,2 (Eck, 1990).

El factor que más contribuye a la elaboración de los distintos tipos de quesos es la composición de la leche, sobre todo en lo que respecta a su contenido en grasas, proteínas, iones (calcio) y pH. No sólo influye el tipo de animal del cual se obtiene la materia prima, sino también la raza y edad del animal, las condiciones ambientales particulares (clima) y su alimentación (Farkye, 2004). Los principales proveedores de leche para la fabricación de quesos son el ganado vacuno (85% del mercado), búfalos

(11%), el ovino (2%) y el caprino (2%), aunque en las regiones mediterráneas este porcentaje cambia ligeramente y aumenta el uso de leches de oveja y cabra (Fox, 2002).

Tradicionalmente se ha empleado leche cruda para la elaboración de quesos, aunque hoy día, la materia prima utilizada suele someterse a una serie de tratamientos previos destinados fundamentalmente a la limpieza física y microbiana de la leche, y a su normalización y estandarización. La primera operación consiste en la limpieza de posibles contaminantes físicos, como pueden ser pelos y otras partículas procedentes del animal. Para ello, se pueden emplear técnicas como la tamización, filtración y/o clarificación por centrifugación. La limpieza microbiana consiste en la eliminación de la mayor parte de los microorganismos presentes en la leche a través de tratamientos térmicos (pasteurización). La normalización de la leche se lleva a cabo fundamentalmente para facilitar las otras etapas de fabricación y para estandarizar los productos acabados. Se realiza mediante el desnatado o, en su defecto, la adición de nata a la leche para normalizar su contenido en grasa, por adición de caseína en polvo o por ultracentrifugación para concentrar la leche y la adición de cloruro cálcico para equilibrar el contenido en iones de calcio. Sin embargo, en pequeñas industrias y producciones locales se sigue empleando leche cruda, incluyendo algunas variedades de quesos famosas del sur de Europa, como son el Swiss Emmental, Gruyère Comte, Parmigiano Reggiano o Grana Padano.

La transformación de la leche en queso por parte de la industria ha sufrido pocos cambios a lo largo de las últimas décadas, y se divide fundamentalmente en tres etapas bien diferenciadas y que se detallan en la Figura 4: coagulación, deshidratación y maduración (Azarnia *et al.*, 2006).

La coagulación consiste habitualmente en la gelificación de la leche mediante la adición de enzimas (cuajo) en condiciones ácidas. Tradicionalmente la acidificación necesaria para que se produzca la coagulación se ha realizado por la microbiota autóctona de la leche. Sin embargo, desde hace unos 100 años se vienen empleando cultivos iniciadores de bacterias lácticas que permite conseguir una acidificación mucho más rápida y controlada. También se suele utilizar la acidificación química mediante el empleo de ácido láctico, clorhídrico o acidógeno (ácido glucónico- δ -lactona). Con este procedimiento se logra un control estricto de la acidificación y se evita el problema del ataque de bacteriófagos a las BAL. No obstante, las enzimas de las bacterias iniciadoras son fundamentales en la maduración posterior del queso (El Soda *et al.*, 2000).

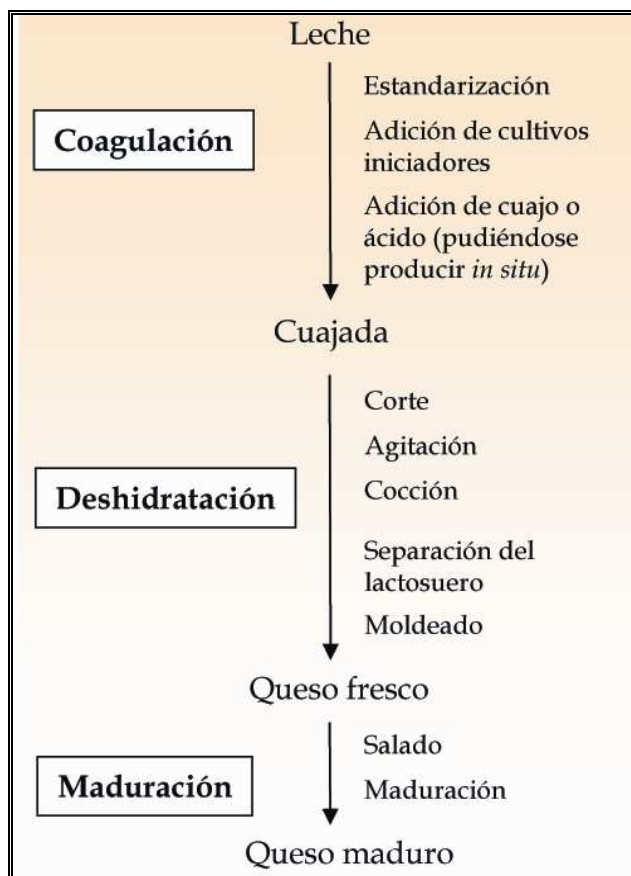


Fig. 4. Principales etapas que suceden en la elaboración del queso.

La coagulación suele ser el paso más importante en la fabricación de cualquier queso, y tal como se ha comentado anteriormente, implica que la caseína coagule pasando a formar un gel donde queda retenida la grasa. Este proceso, se realiza mayoritariamente por la adición de cuajo procedente del abomaso de los rumiantes, rico en proteasas ácidas como la quimosina (Andren, 2002). La coagulación también se puede realizar mediante acidificación hasta pH 4,6 o acidificación a pH 5,2 y calentamiento hasta 90 °C. Tras la coagulación, la cuajada se corta o se rompe, permitiendo de esta forma la salida del suero (desuerado). Durante esta etapa de fabricación sucede la sinéresis, con la separación de las fases sólida y líquida, que lleva a la obtención de la cuajada, y en la que se logra concentrar del orden de 6 a 12 veces el contenido en caseína y grasas. El suero extraído de la cuajada contiene aproximadamente un 98% del contenido inicial de lactosa de la leche, un 25% de proteínas y un 10% de grasas. Durante mucho tiempo este suero careció de valor y se

desechaba casi completamente, sin embargo hoy día se pueden obtener de él otros subproductos con aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica.

Tras esta etapa de coagulación y sinéresis, tienen lugar el moldeado y prensado de la cuajada. El moldeado consiste en llenar moldes con cuajada para así dar forma y tamaño a los quesos. En la etapa de prensado, la cuajada del interior de los moldes se somete a presión, lo que permite completar el desuerado de la misma y regular su humedad. Durante ambos procesos la microbiota láctica presente en el queso, sigue produciendo ácido láctico a partir de la lactosa, contribuyendo también a la acidificación de la cuajada.

La adición posterior de sal (NaCl) al queso recién obtenido se realiza por salado en seco o por inmersión en salmuera, y su contenido puede variar de un 2 a un 10%. El salado tiene un efecto conservante pues al disminuir la actividad del agua, regula la actividad microbiana y enzimática, y evita la proliferación de microorganismos indeseables (alterantes) y patógenos. También promueve cambios fisicoquímicos durante la maduración, favorece la formación de corteza y modifica el sabor de un modo directo (Sutherland, 2002).

Los quesos en los que la coagulación se ha realizado por acidificación química suelen estar listos para el consumo tras este paso. Los coagulados por la adición de cuajo pueden consumirse como queso fresco o, en la mayoría de los casos, como quesos madurados, tras un tiempo de maduración que puede oscilar entre 3 semanas y 2 años. La maduración se lleva a cabo en cámaras con temperatura y humedad relativa controladas. Es durante este periodo, dónde se van a producir los principales cambios de sabor y textura del queso como consecuencia de complejas interacciones bioquímicas que ocurren, fundamentalmente, por proteolisis, lipolisis y glucolisis. Los cambios bioquímicos se producen mayoritariamente por la acción de los siguientes factores (Fig. 5): (i) el agente coagulante, (ii) las enzimas autóctonas de la leche (como proteasas y lipasas), (iii) la actividad de los cultivos iniciadores y de microorganismos secundarios y de sus enzimas (Azarnia *et al.*, 2006).

Durante la glucolisis se produce la fermentación de la lactosa hasta ácido láctico por las bacterias lácticas, bien del cultivo iniciador o de la microbiota natural de la leche (McSweeney y Sousa, 2000). La lipolisis es un proceso bioquímico que consiste en la liberación de ácidos grasos a partir de la grasa del queso, compuestos que van a influir de forma notable en el desarrollo posterior de sabor y aroma (McSweeney y Sousa, 2000). La propia leche contiene una lipoproteína-lipasa muy potente, con una

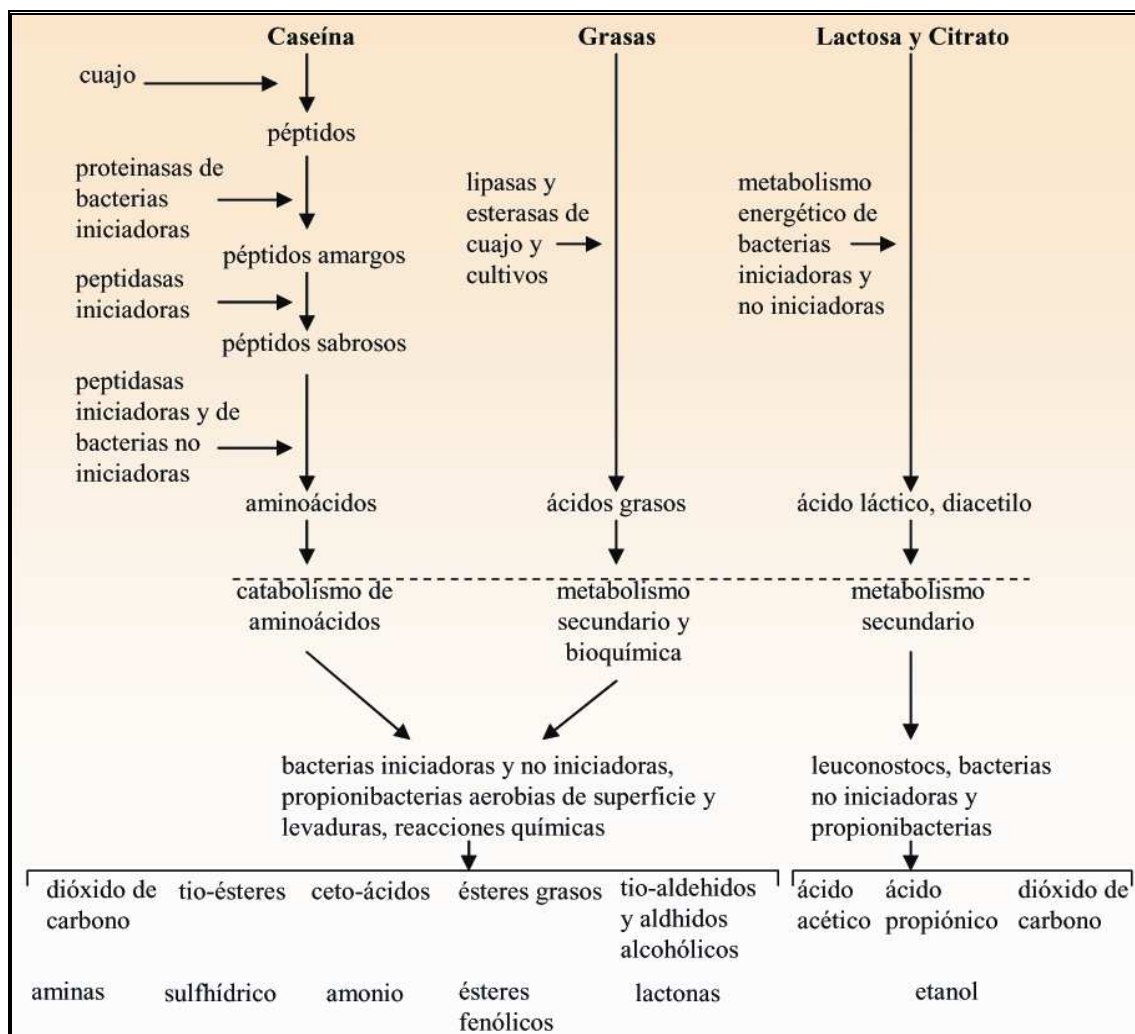


Fig. 5. Bioquímica básica de la maduración del queso (adaptado de Azarnia *et al.*, 2006).

estabilidad térmica de hasta 78 °C durante 15 seg. Por último la proteólisis es uno de los procesos bioquímicos más complejos durante la maduración del queso, y que más va a contribuir en las propiedades organolépticas del queso. En la mayoría de las variedades de queso, la hidrólisis inicial de la caseína se produce por las propias enzimas coagulantes, por la plasmina y probablemente también por la catepsina (McSweeney y Sousa, 2000). También son importantes las proteasas del fermento iniciador y de la propia microbiota de la leche. Estas hidrólisis originan péptidos grandes (insolubles en agua) y medianos (solubles en agua) que son posteriormente degradados por las enzimas coagulantes y las producidas por los microorganismos. La producción de

péptidos y aminoácidos libres es finalmente realizada por la acción de proteasas y peptidasas microbianas (Fig. 5) (McSweeney y Sousa, 2000; Azarnia *et al.*, 2006).

La Federación Láctea Internacional reconoce unas 500 variedades de quesos, que se clasifican sobre la base de una serie de criterios establecidos, y entre los más generalizados están los siguientes:

- Tipo de leche utilizada: vaca, oveja, cabra, búfala y mezcla.
- Tiempo de elaboración: frescos (menos de una semana), tiernos (más de una semana y menos de quince días), semicurados (más de quince días y menos de un mes), curados (más de dos meses).
- Por su contenido graso: desnatado (menos de 10% de materia grasa), semidesnatado (entre el 10% y el 25%), semigrasos (entre el 25% y 45%), grasos (entre el 45% y 60%), extragrasos (más del 60%).
- Por su consistencia: blando (humedad hasta el 80%), semiblando (45%-55%), semiduros (40%-50%), duros (25%-40% humedad).

Debido a la sencillez de estas clasificaciones, pueden quedar incluidos en una misma categoría quesos de propiedades muy diferentes (Anónimo, Ministerio de Agricultura, 2006; revisado por McSweeney, 2004).

La producción anual de queso en España se situó en torno a las 314.500 toneladas en el año 2006 (Anónimo, Ministerio de Agricultura, 2006). Europa junto con Norteamérica son las principales regiones productoras de queso, sumando en su conjunto más del 2/3 de la producción mundial (Fox, 2002; Farkye, 2004; Azarnia *et al.*, 2006). Atendiendo al tipo de leche utilizada, los quesos de mezcla junto con el de vaca constituyen más del 80% del mercado total, le sigue el de oveja con un 12,2% y por último el de cabra con un 5,4% al que, por otro lado, corresponde el mayor crecimiento. En España se han descrito más de 100 variedades de quesos tradicionales. De esta heterogeneidad conviene destacar aquellos productos que han logrado el reconocimiento de “Denominación de Origen Protegida“ (D.O.P.) o “Indicación Geográfica Protegida“ (I.G.P.), figuras de protección Comunitaria que se aplican a los productos agrícolas y alimenticios, y que, salvo pequeñas excepciones, identifica el lugar geográfico de procedencia.

Actualmente en nuestro país existen más de 20 D.O.P. y una I.G.P. (Anónimo, Ministerio de Agricultura, 2006). Entre los quesos de D.O.P. destacan los siguientes:

- Cantabria (queso de vaca- Cantabria)
- Ibores (queso de oveja- Extremadura)
- Idiazabal (queso de oveja- Álava, Guipúzcoa, Vizcaya y Navarra)
- L'Alt Urgell y la Cerdanya (Cataluña)
- Mahón-Menorca (queso de vaca- Menorca)
- Majorero (queso de cabra- Fuenteventura - Canarias)
- Manchego (queso de oveja - Castilla-La Mancha)
- Murcia (queso de cabra- Murcia)
- Murcia al Vino (queso de cabra- Murcia)
- Palmero (queso de cabra Palmera- Canarias)
- Picón-Bejes-Tresviso (queso azul de mezcla de leche de vaca, oveja y cabra- Cantabria)
- Quesucos de Liébana (queso de mezcla de leche vaca, oveja y cabra- Cantabria)
- Roncal (queso de oveja - Navarra)
- Tetilla (queso de vaca- Galicia)
- Torta del Casar (queso de oveja - Extremadura)
- Zamorano (queso de oveja- Castilla- León)

Por último, entre los quesos con I.G.P. se encuentra el queso Valdeón (queso de vaca Castilla-León).

1.4. Microbiología de los quesos

Como se ha descrito en los apartados anteriores, los microorganismos responsables de la fermentación láctica son fundamentalmente las BAL, aunque también se pueden encontrar otros microorganismos pertenecientes a otros grupos como micrococos, estafilococos, propionibacterias, bifidobacterias, mohos y levaduras. El crecimiento de estos microorganismos va a estar controlado por algunos factores físico-químicos, como la actividad del agua (a_w), concentración de sal, pH, ácidos orgánicos, temperatura de maduración, potencial de oxidación-reducción y presencia de nitratos, entre otros (Beresford, *et al.*, 2001). La importancia de cada uno de estos factores puede venir

determinada en muchos casos por el propio proceso de fabricación del queso. Se ha descrito también que la producción de algunas sustancias antagonistas específicas por parte de las bacterias lácticas, como por ejemplo bacteriocinas, podrían contribuir en el control de determinadas poblaciones microbianas (Cogan, 2002).

Los microorganismos mayoritarios que aparecen en los quesos se han dividido en dos grandes grupos: cultivos iniciadores y cultivos no iniciadores o microorganismos secundarios (Beresford *et al.*, 2001). Los cultivos iniciadores son aquellos microorganismos que intervienen fundamentalmente en la producción de ácido láctico durante la primera etapa de fabricación, la coagulación de la leche, pudiendo intervenir de forma secundaria en la maduración del queso. Estos cultivos iniciadores pueden estar presentes de forma natural en la leche o ser añadidos intencionadamente. Los cultivos no iniciadores o microorganismos secundarios son microorganismos que no van a intervenir en la acidificación (al menos de forma directa), pero en cambio van a desempeñar un papel muy importante durante la maduración del queso. En estos últimos se incluyen las BAL no iniciadoras, otras bacterias no pertenecientes al grupo de las BAL, levaduras y mohos. Además de los cultivos iniciadores que hemos comentado, a los que algunos autores llaman iniciadores primarios, existen los llamados cultivos iniciadores secundarios, que se añaden a algunas variedades de quesos y en los que se busca proporcionar unas características muy concretas, como por ejemplo *Penicillium roqueforti* en quesos tipo roquefort o *Propionibacterium shermanii* en quesos suizos.

1.4.1. Cultivos iniciadores

Fue en 1873 cuando Lister aisló un cultivo iniciador puro y confirmó el papel de los microorganismos en la fabricación de los quesos (Powell *et al.*, 2002), y es a partir de 1890 cuando comienza a desarrollarse la tecnología de los cultivos iniciadores. Tradicionalmente los cultivos iniciadores empleados eran los propios microorganismos presentes en la leche. Para ello, se inducía el crecimiento de estos microorganismos mediante el calentamiento de la leche (Powell *et al.*, 2002). El suero obtenido de un lote, servía de cultivo iniciador para el siguiente. Sin embargo, por la necesidad de obtener productos finales uniformes e incluso con la finalidad de generar productos libres de patógenos, la industria quesera se vio obligada a desarrollar cultivos

iniciadores específicos, bien artesanales y de composición no conocida (cuantitativa/cualitativamente) o cultivos más específicos constituidos por microorganismos bien definidos y caracterizados. Actualmente, la mayor parte de la producción de cultivos iniciadores está destinada a la industria láctea, situándose en 2002 la cuota de mercado en torno a los 250 millones de dólares/año (Hansen, 2002).

El principal papel de los cultivos iniciadores es la producción de ácido láctico a partir de la lactosa, con la consecuente bajada de pH. Beresford y colaboradores (2001) definieron a los cultivos iniciadores como aquellos aislados capaces de producir ácido hasta reducir el pH de la leche por debajo de 5,3 en 6 horas y a una temperatura de 30-37 °C. Esta bajada de pH va a afectar a la actividad enzimática y a la solubilidad de diferentes minerales (especialmente calcio y fosfatos). Los cultivos iniciadores también pueden tener un papel importante durante la maduración, debido fundamentalmente a la producción de compuestos aromáticos a partir de la lactosa, el citrato y las proteínas y péptidos de la leche, además de contribuir a cambios en la textura, como consecuencia de la degradación de proteínas y grasas. Así, los aminoácidos originados por la hidrólisis de las proteínas, servirán como precursores para la formación de compuestos volátiles responsables en gran parte de las propiedades organolépticas del queso. El L-lactato, procedente de la fermentación de la lactosa, puede convertirse en acetato, un agente que también contribuye al sabor. Algunas bacterias no iniciadoras pueden además racemizar el L-lactato a D-lactato, cuya sal cálcica puede precipitar y formar manchas blancas.

Algunas de las propiedades tecnológicas de estos cultivos iniciadores en ocasiones residen en plásmidos, como es el caso de las relacionadas con el transporte y metabolismo de la lactosa, proteinasas de superficie, transporte de citrato, producción y resistencia de bacteriocinas o resistencia a bacteriófagos. Por ello, las bacterias que se suelen utilizar con frecuencia en la fermentación de alimentos han sido seleccionadas previamente a nivel de cepa, ya que estas características no siempre se encuentran distribuidas entre todos los miembros de una especie, o incluso no se encuentran igualmente adaptados al mismo tipo de sustrato alimentario (Giraffa, 2004).

Los cultivos iniciadores crecen desde el comienzo de la coagulación, hasta alcanzar rápidamente densidades celulares muy altas en las primeras horas de fermentación (en torno a las 10^8 - 10^9 UFC/g). Posteriormente, hay una disminución gradual a lo largo de la maduración del queso. Entre las cepas empleadas como cultivos iniciadores destacan las especies de *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus* en el

caso de los cultivos mesófilos (crecimiento óptimo a 30-37 °C), y *Streptococcus thermophilus* y especies termófilas de *Lactobacillus* como son *Lb. delbrueckii* o *Lb. helveticus* en el caso de los cultivos termófilos (crecimiento óptimo a 42 °C) (Beresford *et al.*, 2001). En el caso de los quesos artesanales, como ocurre con numerosas variedades españolas y mediterráneas como el queso Majorero español o el Pecorino sardo italiano, que se suelen elaborar sin la adición de cultivos iniciadores, los lactococos presentes en la leche son los microorganismos que suelen predominar al inicio de la maduración. El género *Enterococcus* suele aparecer también en aquellos quesos elaborados con leche cruda, aunque actualmente se está incrementando el uso de cultivos iniciadores definidos también en los quesos de elaboración artesanal (Beresford *et al.*, 2001; Cogan, 2002).

Otro de los efectos positivos del empleo de cultivos iniciadores en la fabricación de quesos es la aceleración de los tiempos de maduración, lo que se ha traducido en una reducción de costes considerables para la industria (Azarnia *et al.*, 2006). Estos cultivos pueden estar formados por células atenuadas o por células viables, existiendo además la posibilidad de una combinación de ambas (El Soda *et al.*, 2000). Además de para el desarrollo de sabores en los quesos o acelerar los periodos de maduración, los cultivos adjuntos también se han empleado con éxito para introducir cepas probióticas en alimentos y derivados lácteos (Gardnier *et al.*, 1998).

Sin embargo hay que tener en cuenta, que el empleo de cultivos iniciadores definidos puede conllevar una pérdida de sabor y aroma de los quesos, por lo que los productores están incrementando cada vez con más frecuencia el uso de cultivos adicionales con el objetivo de potenciar el sabor y el aroma de los mismos. Entre los criterios más importantes que se han utilizado a la hora de seleccionar los cultivos iniciadores se encuentran los siguientes (El Soda *et al.*, 2000):

- La actividad enzimática.
- Capacidad autolítica.
- Producción y sensibilidad al ácido láctico.
- Sensibilidad a fagos.
- Ausencia de patogenicidad y de capacidad de producir ningún tipo de sustancia que *per se* o tras su metabolismo sea tóxica o potencialmente tóxica.
- Estabilidad genética.
- Aplicación estandarizada y reproducible.

Es crucial seleccionar adecuadamente la cepa o cepas que se vayan a utilizar, ya que en ocasiones se pueden introducir sabores indeseados, incluso utilizando bacterias de la misma especie (Beresford *et al.*, 2001). Por otra parte, la selección puede resultar aún más complicada pues, además, hay que tener en cuenta las interacciones bioquímicas que pueden suceder entre las diferentes especies de la comunidad, y que pueden alterar el producto final resultante (Beresford *et al.*, 2001; Wouters *et al.*, 2002).

Los cultivos iniciadores se pueden clasificar de diferentes formas, pero en general se suele hablar de cultivos definidos o indefinidos en función del conocimiento que se tenga de la microbiota constituyente del preparado empleado (Beresford *et al.*, 2001). Así, mientras que los primeros están compuestos por un número de especies conocidas, los segundos suelen estar compuestos por una mezcla de cepas de los que se desconoce su composición exacta. Estos cultivos se pueden suministrar de dos formas: mediante la producción de grandes volúmenes de cultivo fresco o, preferentemente, mediante la preparación de cultivos concentrados (congelados o liofilizados) suministrados por diferentes proveedores (Giraffa, 2004).

Además de los cultivos iniciadores primarios, como ya se ha mencionado anteriormente, se diferencian los llamados cultivos iniciadores secundarios. Éstos se definen como aquellos cultivos empleados en la producción del queso destinados a desarrollar y controlar el aroma, color y textura del queso (Rattray, 2002). Los cultivos secundarios están constituidos por diferentes especies de levaduras, mohos y bacterias. Se emplean principalmente debido a las propiedades fisiológicas y bioquímicas únicas que poseen y que suelen estar ausentes en los cultivos primarios, como son halotolerancia, crecimiento a bajo pH, utilización del lactato, formación de dióxido de carbono o propiedades particulares de proteólisis y lipólisis. Entre estos cultivos destacan: *Geotrichum candidum*, que suele encontrarse en quesos con maduración de superficie tanto bacteriana como por levaduras; *Penicillium camemberti*, empleado en quesos como el Brie, el Camembert y el Coulommier; *Penicillium roqueforti*, empleado en quesos como el Danablu, el Gorgonzola, Stilton y el Roquefort; *Brevibacterium linens*, suele aparecer en quesos con maduración de superficie bacteriana como el Saint Paulin, el Limburger y el Münster; levaduras, entre las que destacan *Kluyveromyces*, *Debaryomyces* y *Saccharomyces*; propionibacterias, como *Propionibacterium freudenreichii*, *Prop. thoenii*, *Prop. jensenii* y *Prop. acidipropionici*, responsables de la formación de ojos en los quesos suizos como el Emmental, el Gruyère y el Appenzeller.

1.4.2. BAL no iniciadoras

La microbiota láctica secundaria o adventicia, llamada NSLAB según sus siglas en inglés (non starter lactic acid bacteria), se desarrolla espontáneamente en todos los quesos, ya sea en aquellos obtenidos en ambientes industriales con leche pasteurizada y cumpliendo estrictas normas de seguridad y calidad, como en los productos artesanales preparados con leche cruda. Esta microbiota se compone fundamentalmente de lactobacilos mesófilos heterofermentadores facultativos y obligados, como son *Lactobacillus casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis* y *Lb. plantarum*, aunque también incluye otros lactobacilos homofermentadores, pediococos, micrococos y *Leuconostoc* (Bhowmik y Marth, 1990; Beresford *et al.*, 2001; De Angelis *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 1998).

Aunque la existencia de estos microorganismos en el queso es conocida desde hace tiempo, sin embargo su impacto en la calidad del producto final es un tema de investigación reciente, por lo que su presencia ha generado un creciente interés por parte de la industria quesera (Banks y Williams, 2004). En efecto, en los quesos obtenidos industrialmente se utiliza leche estandarizada, de calidad controlada y pasteurizada, y tanto el cuajo como el fermento son de características claramente definidas y constantes en el tiempo. La tecnología de fabricación también sigue un patrón sumamente reproducible, de manera que las NSLAB constituyen el único factor importante que aún no se ha controlado. Algunos autores atribuyen hasta el 80 % de los defectos detectados en quesos a las NSLAB, mientras que otros han señalado que tienen una importancia menor, y finalmente otros consideran que esta flora adventicia puede jugar un rol positivo en la generación de sabor y aroma, por lo que se pueden considerar en estos casos una contaminación deseable (Crow *et al.*, 2001).

Hoy día no existen estrategias económicamente viables para mantener a los quesos libres de NSLAB, y, aunque no está clara su procedencia, las principales fuentes de contaminación parecen ser la propia leche y también la planta láctea. Lo cierto es que se encuentran tanto en quesos elaborados con leche cruda como en los elaborados con leche pasteurizada y de hecho se ha demostrado la supervivencia a la pasteurización de algunas BAL no iniciadoras (Jordan y Cogan, 1999).

Estos microorganismos se pueden desarrollar aún en las condiciones de higiene más estrictas, especialmente después de que el fermento primario comienza a disminuir

y los lactobacilos se recuperan del estrés térmico, alcanzando entonces valores superiores a 10^6 UFC/g, y convirtiéndose en la microbiota láctica dominante en las etapas finales de la maduración (Beresford *et al.*, 2001). A pesar de que estos microorganismos no crecen bien en la leche (Cogan *et al.*, 1997) y no contribuyen significativamente a la producción de ácido láctico al comienzo de la fabricación (coagulación), y además están presentes en bajo número al inicio de la fermentación, sin embargo suelen ser microorganismos tolerantes a la sal y al pH ácido, por lo que pueden crecer bien durante la maduración del queso. En el queso Cheddar, las BAL no iniciadoras se suelen encontrar en órdenes de 10^2 - 10^3 UFC/g tras el prensado, para alcanzar niveles de 10^7 - 10^8 UFC/g tras unos tres meses de maduración (Fox *et al.*, 1998). En la calidad de un queso, tanto o más importante que la cantidad de BAL no iniciadoras es la diversidad de las cepas de BAL que aparecen (Azarnia *et al.*, 2006). Algunos autores como Lynch y colaboradores (1996; 1997) han estudiado su papel durante la maduración, observando un incremento en los niveles de aminoácidos y péptidos pequeños, así como un mejor sabor de los quesos cuando se emplean determinadas poblaciones de lactobacilos como cultivos adicionales en la producción de queso.

1.4.3. Otros microorganismos presentes en los quesos

Además de los grupos microbianos que se acaban de describir, conviene destacar la presencia de otros microorganismos que pueden participar de forma activa en la elaboración de los quesos, como son las bacterias del ácido propiónico (BAP), bacterias de superficie, levaduras y mohos.

Las BAP aparecen en muchas variedades de quesos al final de la maduración. Son las principales responsables de la formación de los típicos ojos de los quesos suizos como el Emmental o el Gruyère, que aparecen como consecuencia de la acumulación de gas durante la fermentación de azúcares y lactato a propionato, acetato, agua y dióxido de carbono. Se dividen en dos grupos principales, BAP cutáneas y BAP clásicas. Las BAP clásicas son las más importantes en la microbiología de los quesos, con las siguientes especies: *Propionibacterium freudenreichii*, *Prop. thoenii*, *Prop. jensenii* y *Prop. acidipropionici*. En quesos elaborados con leche cruda pueden aparecer de forma

natural, pero aquellos en los que la elaboración se realiza con leche pasteurizada, las propionibacterias se añaden durante la elaboración del queso para asegurar una población inicial de 10^3 UFC/g (Beresford *et al.*, 2001).

Se han descrito efectos antagónicos entre distintas poblaciones de BAL y BAP no ligadas a la presencia de bacteriocinas. Estas interacciones son importantes pues permiten seleccionar determinados grupos de microorganismos, lo que afecta en gran medida a la calidad del producto final (Beresford *et al.*, 2001).

Los quesos madurados en superficie suelen estar inoculados con una o una combinación de *Brevibacterium linens*, *Geotrichum candidum* o *Debaryomyces hansenii*, tras el salado. En estos quesos, la inoculación con bacterias de superficie se realiza mediante salmueras con las que se han lavado previamente quesos ya madurados. La microbiología de la superficie no está muy clara pero parece necesario el crecimiento previo de levaduras que permiten la desaminación de los aminoácidos a sus correspondientes cetoácidos y amonio con la consecuente subida de pH, de tal forma que se favorece el crecimiento de estos microorganismos de superficie (Beresford *et al.*, 2001).

Aunque se suele considerar a *Brevibacterium linens* como la principal especie presente en la superficie de los quesos madurados, también se han descrito micrococcos, como *M. luteus* o *Kocuria kristinae*, estafilococos, como *S. equorum*, *S. saprophyticus* o *S. sciuri*, y bacterias corineformes, como *Arthrobacter citreus* o *Corynebacterium variabilis*. A pesar de que aún no está claro su papel, parecen intervenir en el desarrollo de un sabor característico que presentan estos quesos debido a la producción por parte de estos microorganismos de proteasas y lipasas específicas (Beresford *et al.*, 2001).

Finalmente, otro grupo de microorganismos importantes en los quesos son las levaduras y los mohos. Las levaduras están presentes en la superficie de una amplia variedad de quesos, aunque se desconoce el papel exacto que desempeñan en lo que respecta a la maduración de los quesos. Las levaduras que con mayor frecuencia se aíslan de la superficie de los quesos son, entre otras, las especies *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* y *Trichospora beigeli* (Beresford *et al.*, 2001).

Los mohos son de especial importancia en dos grupos de quesos, los madurados en presencia de *Penicillium roqueforti* (p.e. Roquefort, Gorgonzola), responsable de las venas azules de estos quesos, y aquellos madurados con la presencia de *Pen.*

camemberti (p.e. Camembert, Brie), que crecen en la superficie de los mismos (Beresford *et al.*, 2001).

1.4.4. Microorganismos patógenos en los quesos

Las infecciones debidas al consumo de quesos son bastante raras, como muestra el hecho que desde 1970 hasta 1997 sólo se han descrito 30 casos confirmados en Europa Occidental, Canadá y EEUU periodo en el cual se consumieron unas 235.000.000 de toneladas de queso (Cogan *et al.*, 2002). Los brotes infecciosos producidos por el consumo de productos lácteos representan entre el 2-6% de las infecciones alimentarias, aunque su documentación se ve dificultada al no existir protocolos comunes en los diferentes países que permitan el seguimiento correcto de dichos brotes (De Buyser *et al.*, 2001). En los quesos frescos, las infecciones suelen estar asociadas con enterobacterias patógenas como *Salmonella* o *E. coli* (De Buyser *et al.*, 2001; Haeghebaert *et al.*, 2003; Verzoy-Rozand *et al.*, 2005), mientras que en quesos semicurados o curados el principal patógeno es *S. aureus*. *Listeria monocytogenes* también se ha relacionado con el consumo de queso fresco, y aunque su incidencia es bastante baja sin embargo es responsable de las infecciones más severas que pueden transmitir los productos lácteos (De Buyser *et al.*, 2001). Las malas prácticas higiénicas que van desde, el ordeño del animal hasta los diferentes puntos de fabricación, pueden favorecer la contaminación no sólo de la leche sino también del equipo de producción (Espíe *et al.*, 2005), incluyendo la contaminación a través del propio personal de producción (De Buyser *et al.*, 2001).

Además de los ya mencionados *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* y *L. monocytogenes*, también se han implicado otros microorganismos como *Bacillus sp.*, *Clostridium botulinum*, *Shigella*, y *Brucella sp.* La brucelosis, hasta hace poco tiempo, era la zoonosis más común en España, con especial incidencia en Extremadura y Andalucía. Estas infecciones son producidas por el consumo de queso fresco contaminado con *Brucella melitensis* (Méndez-Martínez *et al.*, 2003).

En relación con la presencia de patógenos en los derivados lácteos, es de especial importancia la formación de biopelículas en la propia maquinaria de la fábrica,

puesto que en este estado los microorganismos patógenos resultan mucho más resistentes a los tratamientos desinfectantes y antibacterianos (Wong, 1998).

El principal método destinado al control de patógenos es la pasteurización de la leche, aunque por sí sólo no asegura un producto libre de patógenos. Son además factores muy importantes el tiempo y temperatura de cocción del cuajo, así como la tasa de acidificación (De Buyser *et al.*, 2001). Algunos patógenos pueden ser eliminados durante la fase de cocción (Arocha *et al.*, 1992), mientras que una tasa de acidificación lenta puede llegar a inducir una respuesta adaptativa al pH ácido y favorecer así su resistencia al pH ácido estomacal (Verzoy-Rozand *et al.*, 2005). El empleo de cepas bacterianas productoras de bacteriocinas podría ayudar al control de patógenos, aunque podría plantear otros problemas, como por ejemplo la inhibición de las propias bacterias iniciadoras. Otros factores que intervienen en el control de patógenos son la concentración de sal, el pH y el potencial de oxido-reducción. Actualmente los únicos microorganismos que limita la legislación en los quesos son *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y estafilococos coagulasa positivos (CE 2073/2005). En el caso de *E. coli* los máximos permitidos son de 10^3 UFC/g en quesos elaborados con leche tratada térmicamente (temperatura inferior a la pasteurización), en el caso de los estafilococos coagulasa positivos los máximos permitidos son de 10^2 UFC/g en quesos frescos elaborados con leche pasteurizada y 10^5 UFC/g en quesos elaborados con leche cruda. *Salmonella* debe estar ausente en 25 g de queso elaborados con leche no pasteurizada, y finalmente *L. monocytogenes*, debe estar ausente en 25 g de queso durante la producción y en valores inferiores a 10^2 UFC/g durante la vida útil del producto (CE 2073/2005).

La presencia de aminas biógenas en los quesos también se ha descrito como un potencial factor de riesgo para el consumidor, y en gran parte es responsable de algunas intoxicaciones alimentarias, lo que ha dado lugar al término de “reacción al queso” (Ten Brick *et al.*, 1990). Su presencia en los alimentos se halla íntimamente relacionada con su estado de conservación y/o contaminación microbiana. Algunos alimentos crudos experimentan descarboxilaciones autolíticas de sus aminoácidos constituyentes, mientras que en la mayoría de los casos las descarboxilaciones son llevadas a cabo por las bacterias presentes en los alimentos (Bardócz, 1995). Tras el pescado, el queso curado es el siguiente alimento con mayor incidencia en casos de intoxicación por histamina, detectándose el primer caso en los Países Bajos por consumo de queso Gouda (Stratton *et al.*, 1991). Las intoxicaciones con aminas biógenas suelen producir

sarpullidos, diarrea, sofocos, sudoración, palpitaciones del corazón, dolores de cabeza, hipertensión e hipotensión, síntomas derivados de sus efectos sobre el sistema nervioso y sobre el control de la presión sanguínea (Silla Santos, 1996). Entre los microorganismos responsables de la producción de estos compuestos se incluyen algunas bacterias Gram negativas como, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium* y Gram positivas como *Bacillus*, *Clostridium* y las BAL, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. Todas ellas tienen la capacidad de descarboxilar uno o más aminoácidos (Silla Santos, 1996), produciendo la respectiva amina biógena. La actividad descarboxilasa no es dependiente de la especie sino de la cepa e incluso de las condiciones ambientales (Coton *et al.*, 1998; Veciana-Nogués *et al.*, 2004). Novella-Rodríguez y colaboradores (2004) relacionaron la aparición de tiramina en los quesos con las poblaciones de enterococos y lactobacilos, mientras que la aparición de cadaverina y putrescina con las poblaciones de enterobacterias y lactobacilos. El pH ácido del queso y la proteólisis que se produce durante la maduración, con la consecuente liberación de aminoácidos, puede favorecer la actividad de estas amino descarboxilasas (Fernández *et al.*, 2007). Por otro lado, existen algunas bacterias, como los lactococos y algunos hongos, como *Aspergillus niger*, capaces de asimilar algunas aminas biógenas debido a sus monoamino y diaminoxidasas (Silla Santos, 1996).

Entre las aminas biógenas de mayor importancia se encuentran las aminas aromáticas triptamina (procedente de la descarboxilación del triptofano) y feniletilamina (de la fenilalanina), las diaminas cadaverina (de la lisina) y putrescina (de la ornitina), y, las más importantes, la histamina (de la histidina) y la tiramina (de la tirosina), también aromáticas (Silla Santos, 1996; Novella-Rodríguez *et al.*, 2004). Las más frecuentes en los quesos son la tiramina, histamina, putrescina y cadaverina (Fernández *et al.*, 2007). De todas las amino descarboxilasas, la tirosina descarboxilasa es la que con más frecuencia se detecta entre las BAL, y muy especialmente entre las poblaciones de enterococos (Bover-Cid y Holzapfel, 1999).

El nivel de estas aminas es variable entre variedades de queso e incluso dentro de una misma variedad (Stratton *et al.*, 1991), aunque su efecto tóxico va a depender no sólo de su concentración, sino también de la presencia de otros compuestos que la acompañen y por supuesto de la propia sensibilidad intestinal de cada individuo (Silla Santos, 1996). La cadaverina y putrescina pueden además reaccionar con otros compuestos nitrogenados como los nitritos, para formar nitrosaminas y producir

compuestos cancerígenos (Silla Santos, 1996). Actualmente la legislación europea limita la cantidad de histamina en pescado, entre 100-200 mg/Kg para pescado fresco y 400 mg/Kg para productos fermentados (directiva 91/493/EEC). Por todo ello, entre los criterios de selección de las BAL para ser usadas como cultivos iniciadores se incluye también el análisis de la producción de aminas biógenas.

1.5. Las bacteriocinas

Existen procesos inespecíficos de interferencia microbiana común a todos los ecosistemas microbianos, incluidos los alimentos. Dichos mecanismos incluyen la competición por los nutrientes, la formación de ambientes inadecuados o la competencia por los sitios de adhesión o colonización. Pero además existen procesos de amensalismo mediado por la producción de sustancias antagonistas tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, antibióticos y bacteriocinas (Caplice y Fitzgerald, 1999). Actualmente, la producción de bacteriocinas por parte de las BAL ha despertado un gran interés biotecnológico y es un factor a tener en cuenta en sistemas alimentarios, con el objetivo de desarrollar cultivos iniciadores o cultivos adicionales que permitan el control y/o eliminación de poblaciones de bacterias indeseables, alterantes o incluso patógenas (Cogan, 2002; Johnson y Lucey, 2006).

La bacteriocinas son péptidos antibacterianos de síntesis ribosómica producidos por bacterias, no activos frente a la estirpe productora, que son secretados extracelularmente y que presentan un espectro de acción bactericida relativamente estrecho (Diep y Nes, 2002). Además se caracterizan frecuentemente por su pequeño tamaño, naturaleza anfifílica/hidrófoba y por presentar carga positiva a pH fisiológico (Cleveland *et al.*, 2001). La producción de péptidos antibacterianos sintetizados ribosómicamente es un fenómeno común en todos los organismos vivos (Nissen-Meyer y Nes, 1997), pudiendo existir cientos de bacteriocinas diferentes dentro de una misma especie e incluso varias dentro de una misma cepa (De Vuyst *et al.*, 2003; Nes *et al.*, 2007). Según Klaenhammer (1988) el 99% de las bacterias producen al menos una bacteriocina, aunque los investigadores no las hayan descrito. Es precisamente la detección de bacteriocinas en todos los grupos procariotas lo que hace pensar que podrían desempeñar funciones importantes en las comunidades microbianas, aunque

aún no se conoce con precisión su rol exacto. Las bacteriocinas podrían actuar en la eliminación de competidores, permitiendo a una cepa invadir una comunidad microbiana establecida. También podrían jugar un papel defensivo y actuar impidiendo la invasión por otras especies o cepas de un nicho ocupado, o incluso impedir el avance de células vecinas. Además, en el caso de las bacterias Gram positivas, se ha propuesto que intervienen en el mecanismo sensor de *quorum* (Riley y Wertz, 2002).

Según el modelo de Czárán y colaboradores (2002), las bacterias letales (productoras de bacteriocinas, resistentes), sensibles (no productoras, no resistentes) y resistentes (no productoras de bacteriocinas, resistentes) (Tabla 3) podrían coexistir en los diferentes ambientes, en proporciones que fluctuarían cíclicamente en ambientes desestructurados y en proporciones globales casi constantes en ambientes estructurados. Las proporciones de la productora de bacteriocina y de resistentes y sensibles a la misma dependerían en gran parte de las condiciones iniciales en las que se formó ese ecosistema microbiano. Hay que asumir que, en ausencia de presión selectiva debida a la presencia de bacteriocina en el medio, la expresión de la resistencia significa un coste que no paga la sensible. Así mismo la producción de la bacteriocina representa un alto coste que no paga la resistente, que, además, no es afectada por el antagonista.

Las bacteriocinas suelen aparecer con frecuencia en bacterias Gram negativas, entre las cuales, las colicinas de *E. coli* son los mejores ejemplos (Lazdunski, 1988). En bacterias Gram positivas la producción de este tipo de sustancias está también ampliamente extendida (Jack *et al.*, 1995), si bien en los últimos años las investigaciones se han centrado en las bacteriocinas producidas por las BAL, dado su potencial uso como bioconservantes alimentarios y su producción por bacterias con *status* GRAS (Nes y Johnsborg, 2004). Dada la frecuencia con la que se aíslan estas BAL productoras de bacteriocinas de los diferentes alimentos, parece claro que las

Tabla 3. Guerra química entre microorganismos, según la estrategia “piedra-papel-tijera” (Riley y Wertz, 2002). Es una relación no transitiva entre pares con tres elementos en juego.

Cepa	Gana frente a	Pierde frente a
Letal	Sensible	Resistente
Sensible	Resistente	Letal
Resistente	Letal	Sensible

mismas han sido consumidas durante décadas sin representar riesgos para la salud por lo que su introducción como cultivos iniciadores no debería suponer problema alguno para los consumidores (O'Sullivan *et al.*, 2002). Además, debido a su naturaleza proteica, se inactivan por los enzimas proteolíticos del tracto gastrointestinal y no parecen ser tóxicas ni inmunógenas en animales de experimentación, lo que las convierte en candidatos adecuados como bioconservadores de los alimentos. También, en el caso de los quesos, la presencia de cepas bacteriocinogénicas podría producir la lisis de otras cepas sensibles, con la consecuente liberación de enzimas a la matriz del queso lo que contribuiría a la maduración y desarrollo del sabor (Morgan *et al.*, 1997; O'Sullivan *et al.*, 2002). Actualmente la nisina (aditivo E-234), es la única bacteriocina aprobada para su uso alimentario en mas de 50 países (Guinane *et al.*, 2005). El otro gran campo de aplicación de las bacteriocinas lo constituye su posible uso médico y veterinario, como se ha puesto de manifiesto en el tratamiento y prevención de la mastitis mediante la lactocina 3147 (Guinane *et al.*, 2005). Además, su empleo en el ganado podría erigirse en una alternativa al uso de antibióticos en ganadería (Diez-González, 2007).

Las estrategias seguidas para la aplicación de las bacteriocinas de las BAL en la conservación de alimentos son diversas:

- Inoculación del alimento con las BAL (como cultivos iniciadores o adjuntos a éstos) para que produzcan las bacteriocinas *in situ*.
- Utilización del medio previamente fermentado por la cepa productora de la bacteriocina, como ingrediente en el procesado de alimentos. Dichos preparados tienen la ventaja de que pueden ser reconocidos como seguros (GRAS) más fácilmente que otros aditivos, para su uso directo en alimentos (NisaplinTM, MicrogardTM, AltaTM 2341).
- Adición de las bacteriocinas purificadas o semipurificadas. Este método permite aplicar dosis más exactas de la bacteriocina, y por tanto predecir mejor los resultados. Como contrapartida, las bacteriocinas purificadas son consideradas como aditivos, requiriendo autorización expresa para su uso (Fields, 1996).

1.5.1. Clasificación de las bacteriocinas de las BAL

Atendiendo a las características estructurales y de actividad biológica, Klaenhammer (1993), estableció cuatro clases dentro de las bacteriocinas de las BAL, de las que actualmente se mantienen tres. La existencia de la cuarta clase de bacteriocinas, moléculas complejas, compuestas de proteína más otros componentes (lípidos, carbohidratos), fue descartada con posterioridad, ya que se ha demostrado que muchas bacteriocinas tienden a formar agregados con componentes celulares así como del medio (Nes *et al.*, 1996). El descubrimiento y la caracterización de nuevas bacteriocinas ha impuesto modificaciones notables en la clasificación de Klaenhammer (Nes *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1999; van Belkum y Stiles, 2000; Cleveland *et al.*, 2001; Diep y Nes, 2002; Ross *et al.*, 2002; Nes *et al.*, 2007; Franz *et al.*, 2007; Heng *et al.*, 2007). Actualmente se aceptan cuatro grupos o clases de bacteriocinas, con varias subclases, siendo sin lugar a dudas la más variada y conflictiva la clase II.

Clase I: Lantibióticos. Formada por pequeños péptidos hidrófobos (<5 kDa), que presentan en su composición aminoácidos modificados como lantionina, metil-lantionina, didehidroalanina y didehidrobutirina (Sahl *et al.*, 1995). Son altamente termoestables y actúan a nivel de membrana celular. Los lantibióticos han sido encontrados exclusivamente en bacterias Gram positivas (McAuliffe *et al.*, 2001). El prototipo de lantibiótico es la nisina, producida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Rogers, 1928; Mattick y Hurst, 1944).

Clase II: Pequeños péptidos termoestables no-lantibióticos (<10 kDa). En esta categoría se incluye una serie de péptidos termoestables anfipáticos que carecen de residuos modificados. Muchos de ellos se caracterizan también por presentar un sitio de procesamiento Gly-Gly⁻¹-Xaa⁺¹ en el péptido inmaduro que ha de ser escindido para liberar el péptido líder y dar lugar a la bacteriocina madura. Aparecen tanto en bacterias Gram positivas como en algunas Gram negativas como *E. coli* (colicina V y microcina 24) (Fath *et al.*, 1994; Havarstein *et al.*, 1994). Presentan características genéticas y químicas variadas, por lo que su clasificación ha sido especialmente problemática. En la última clasificación propuesta por Franz y colaboradores (2007) se distinguen 3 subclases: subclase IIa, o familia de las pediocinas, que incluye bacteriocinas que poseen el motivo YGNGVXC como la pediocina PA-1/AcH; subclase IIb, bacteriocinas sintetizadas sin péptido líder, no poseen el motivo YGNGVXC como las bacteriocinas

L50A y B (Cintas *et al.*, 1998) y MR10A y MR10B (Martín-Platero *et al.*, 2006); subclase IIc, péptidos lineales no relacionados con las pediocinas, incluye un grupo heterogeneo de bacteriocinas sintetizadas con péptido líder.

Clase III: Péptidos cíclicos antibacterianos. Las bacteriocinas pertenecientes esta subclase se agrupan sobre la base de presentar la unión covalente de sus extremos carboxilo y amino (unión cabeza-cola), dando lugar a una estructura cíclica. Se han descrito en diversas especies (revisado por Maqueda *et al.*, 2008), como la enterocina AS-48 de *E. faecalis*, la circularina A de *Clostridium beijerinckii*, la gasericina A de *Lb. gasseri* (Kawai *et al.*, 2004), la reutericina 6 de *Lactobacillus reuteri*, uberolisina de *Streptococcus uberis* o la butirvibriocina AR10 de *Butyrivibrio fibrisolvens*.

Clase IV: Grandes proteínas termolábiles (>30 kDa). Se trata de bacteriocinas complejas en cuanto a su actividad bactericida y/o su estructura proteica. Como ejemplo cabe citar la helveticina J producida por una cepa de *Lb. helveticus* (Joerger y Klaenhammer, 1986), la bacteriocina Bc-48 producida por *E. faecalis* (López-Lara *et al.*, 1991) y enterolisina A de *E. faecalis* (Nilsen *et al.*, 2003).

1.6. Identificación de microorganismos de quesos y derivados lácteos

El análisis e identificación de los microorganismos presentes en derivados lácteos, quesos y otros alimentos fermentados, ha experimentado un notable avance en los últimos años, sin duda ligado al desarrollo de las técnicas de biología molecular. La sencillez y reproducibilidad de estas técnicas, ha permitido sustituir o completar las tradicionales de la microbiología clásica (basadas fundamentalmente en el aislamiento de microorganismos en medios de cultivo y posterior identificación mediante pruebas bioquímicas), por otras que se basan fundamentalmente en el análisis de algunas de las macromoléculas (ADN, ARN, proteínas) de los microorganismos o de las propias comunidades microbianas. Un esquema simplificado de las principales estrategias en la identificación de microorganismos y comunidades microbianas se representa en la Figura 6.

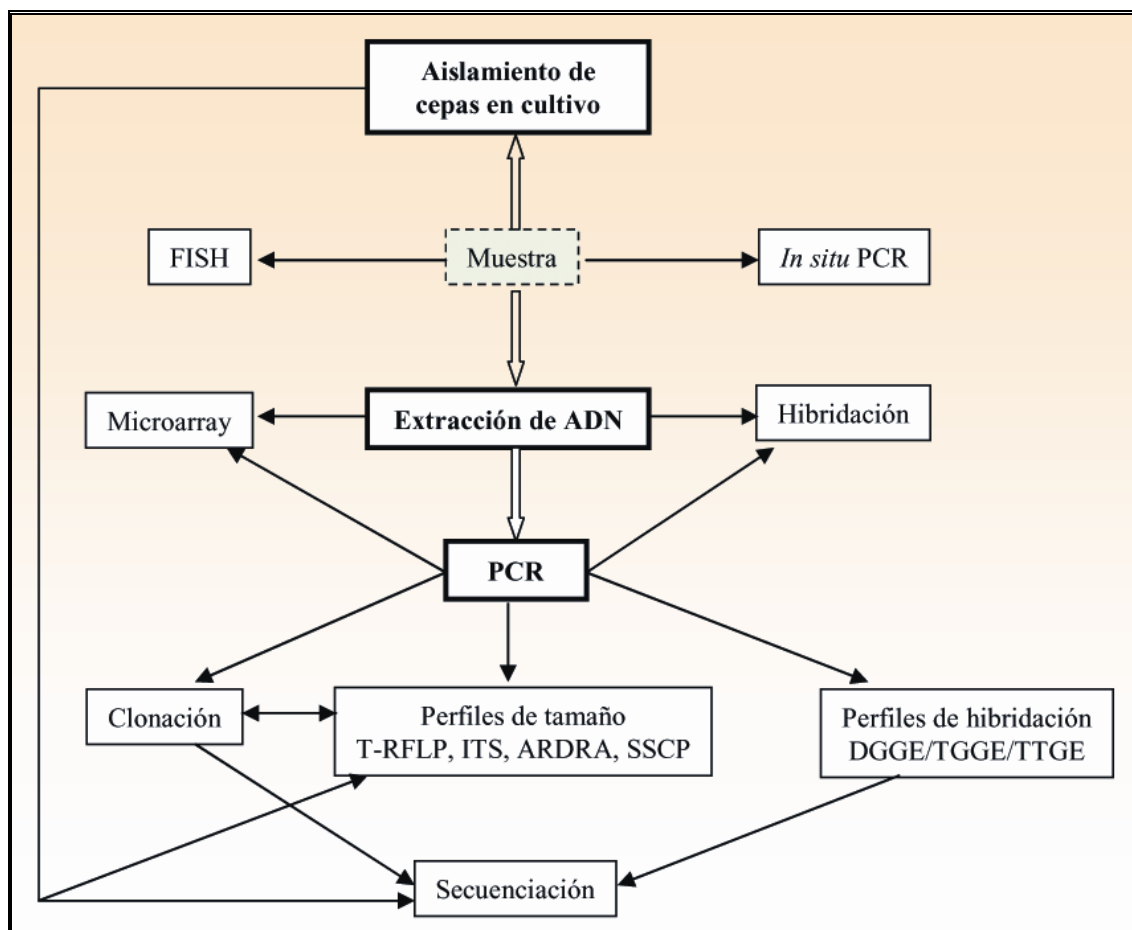


Figura 6. Principales estrategias en el estudio de la diversidad microbiana (Dahllöf, 2002). En negrita se muestran los pasos preparatorios previos a las técnicas de detección.

Aunque las pruebas bioquímicas siguen siendo hoy día muy importantes en la identificación de los microorganismos, sin embargo tienen serios inconvenientes. Algunos se enumeran a continuación:

- Las técnicas fenotípicas no siempre son reproducibles.
- Tampoco permiten obtener información sobre la diversidad genética de los distintos aislados ni por supuesto diversidad genética de la comunidad de la cual se han aislado.
- La cuantificación en algunos casos puede resultar laboriosa y engorrosa.
- Sólo se pueden aplicar en aquellos microorganismos cultivables. En este sentido, conviene diferenciar entre bacterias viables no cultivables y bacterias en situación de estrés o dañadas. Mientras las primeras no pueden crecer en medios selectivos ni en medios no selectivos, las segundas no suelen crecer en medios selectivos pero si pueden hacerlo a veces en medios y/o condiciones determinadas (Giraffa y Neviani, 2001). Los sistemas de identificación y

tipificación tradicionales han estado basados fundamentalmente en el estudio de cepas cultivables, las cuales pueden representar sólo una pequeña proporción de la diversidad microbiana existente.

En los últimos años se han desarrollado numerosos métodos moleculares que permiten conocer a fondo la microbiología de los alimentos fermentados. El empleo de uno u otro, suele estar a menudo condicionado con el nivel de información requerido: detección, identificación, cuantificación y tipificación. Las tres primeras se pueden llevar a cabo tanto mediante la utilización de técnicas dependientes o independientes de cultivo, mientras que el análisis del tipado de microorganismos sólo puede aplicarse a métodos dependientes de cultivo.

Sin embargo, a pesar de la gran variedad metodológica existente, hoy día no existe una técnica que por sí sola permita conocer la diversidad microbiana completa de un ecosistema. Por ello, se hace necesario combinar varias metodologías, incluyendo las tradicionales técnicas dependientes de cultivo con las técnicas independientes de cultivo para que podamos generar una imagen más realista del conjunto de microorganismos que se encuentran en un ecosistema (Dahllöf, 2002; Giraffa, 2004). Es lo que hoy día se conoce como taxonomía polifásica, que engloba información fenotípica, genotípica y filogenética.

1.6.1. Técnicas dependientes de cultivo

Las técnicas de identificación de los microorganismos dependientes de cultivo incluyen tanto las tradicionales técnicas microbiológicas, basadas en caracteres fenotípicos, como las genotípicas y filogenéticas. Entre las primeras podemos destacar el empleo de galerías API, BIO-LOGTM o el sistema Phene PlateTM, entre otras (Dahllöf, 2002; Giraffa, 2004). También existen métodos moleculares fenotípicos de caracterización como el perfil de proteínas o el perfil de lípidos. Los principales inconvenientes que tienen es que pueden resultar muy laboriosas, requerir largo tiempo de trabajo, costes excesivos, y no siempre aseguran reproducibilidad. Además sólo se pueden aplicar a aquellos microorganismos cultivables. De ahí que en los últimos años se haya hecho un esfuerzo considerable en el desarrollo de una metodología complementaria, que combine reproducibilidad, velocidad, sencillez y bajos costes, en

la identificación microbiana. La principal ventaja de las técnicas de identificación basadas en el estudio del ADN o ARN, es que éstas se han centrado en la detección de secuencias diana específicas de determinados microorganismos en lugar de la expresión fenotípica de los productos codificados por los genes. En la Tabla 4 se resumen algunas de las estrategias que se han utilizado con éxito en la detección, identificación y tipificación de microorganismos aislados de productos lácteos fermentados. Gracias al desarrollo de estas herramientas, a lo largo de 2006 se han descrito nuevas especies dentro de las BAL o bien algunas de las especies descritas, se han reclasificado en los géneros *Lactobacillus* (Aslam, *et al.*, 2006; Dellagio *et al.*, 2006; Felis *et al.* 2006; Konstantinov *et al.*, 2006; Naser *et al.*, 2006a; Naser *et al.*, 2006b; Naser *et al.*, 2006c; Osawa *et al.*, 2006; Rodas *et al.*, 2006; Vancanneyt *et al.*, 2006a;), *Enterococcus* (Carvalho *et al.*, 2006; Svec *et al.*, 2006), *Leuconostoc* (Chambel *et al.*, 2006; Vancanneyt *et al.*, 2006b), y *Pediococcus* (Franz *et al.*, 2006).

1.6.1.1. Hibridación ADN-ADN

El uso de sondas específicas de ADN que hibridan con los genes responsables del ARNr ha sido una de las herramientas que con más frecuencia se ha usado en la identificación microbiana. Existen algunas plataformas *on line*, en las que se puede disponer de esta información. Un ejemplo, es proBase, que dispone de un amplio catálogo de cebadores correspondientes al ARNr (Loy *et al.*, 2003). El sitio web www.microbial-ecology.net/probase, contiene información necesaria sobre sondas y protocolos que se usan normalmente en aplicaciones como la hibridación *in situ*.

La identificación microbiana mediante hibridación se puede realizar tanto sobre células aisladas en cultivo puro como sobre comunidades microbianas. En los experimentos clásicos de *dot blot*, los ácidos nucleicos (AN) son extraídos a partir de las células (o bien de comunidades) y posteriormente inmovilizados en una membrana. Las sondas son marcadas posteriormente e hibridadas sobre este AN inmovilizado en la membrana. La detección posterior varía dependiendo del tipo de marcaje de la sonda: radiactiva, quimioluminiscencia, fluorescencia, etc. Entre las ventajas de esta técnica, están la diferenciación y cuantificación de poblaciones microbianas específicas sin

Tabla 4. Ventajas y limitaciones de algunas técnicas moleculares usadas en la identificación y tipificación de microorganismos de alimentos lácteos fermentados.

	Ventajas	Limitaciones
A) Identificación		
• Hibridación ADN-ADN	Alto nivel de discriminación; fácil interpretación; alta reproducibilidad	Laboriosa, larga, cara.
• Métodos basados en la PCR (ARDRA-PCR, ITS o RISA, amplificación de genes metabólicos...)	Rapidez; alta reproducibilidad; sencillez; costes bajos o moderados	Nivel de discriminación moderado
• Secuenciación del ADN	Alto nivel de discriminación y reproducibilidad; plataformas automáticas disponibles; bases de datos disponibles	Alto nivel técnico; cara
B) Tipado (Métodos basados en RFLP)		
• Ribotipado	Alto nivel de discriminación; fácil interpretación y reproducibilidad; plataformas automáticas disponibles	Laboriosa, larga, cara.
• REA-PFGE	Nivel de discriminación excelente; alta reproducibilidad y facilidad de interpretación; bases de datos disponibles	Laboriosa y difícil de usar, larga hasta obtener resultados; costes moderadamente altos.
C) Tipado (Métodos basados en la PCR)		
• RAPD; Rep-PCR	Nivel de discriminación moderado; sencillez; interpretación fácil; costes bajos	Reproducibilidad moderada; no hay bases de datos públicas
• ITS o RISA	Nivel de discriminación moderado; rapidez; fácil interpretación; costes bajos; alta reproducibilidad; bases de datos disponibles	Nivel de discriminación moderado
• AFLP	Moderadamente fácil de usar e interpretar; alto nivel de discriminación y reproducibilidad; plataformas automáticas disponibles	Costes elevados; laboriosa; no hay bases de datos públicas

Acrónimos: ARDRA, Amplification Ribosomal DNA Restriction Analysis; ITS, Internal Transcribed Spacer; RISA, rRNA gene Internal Spacer Analysis; RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism; REA-PFGE, Restriction Endonuclease Analysis-Pulsed Field Gel Electrophoresis; RAPD, Randomly Amplified Polymorphic DNA; Rep-PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR; AFLP, Adaptor Fragment Length Polymorphism.

necesidad de su aislamiento ni del posterior subcultivo. Actualmente existe un amplio catálogo de sondas correspondientes a la mayoría de las BAL aisladas de alimentos y que se han utilizado con éxito en experimentos de hibridación (Schleifer *et al.*, 1995), en el estudio de la dinámica de las poblaciones microbianas presentes en el queso Grana Padano (Giraffa *et al.*, 1998), o en la detección de BAL del yogurt a partir de ADN total (Del Campo *et al.*, 2005). Sin embargo, aunque estas metodologías suelen ofrecer un alto nivel de discriminación y reproducibilidad, han sido abandonadas sobre todo por ser excesivamente caras y laboriosas en el laboratorio, además de los falsos positivos que en ocasiones pueden aparecer.

1.6.1.2. Métodos basados en la PCR

La disponibilidad hoy día de secuencias de ADN prácticamente de la mayoría de las especies descritas, junto con la presencia de catálogos de cebadores específicos de determinados taxones, ha permitido el desarrollo de numerosas técnicas basadas en la amplificación del ADN que permiten la identificación exacta a nivel de género y especie, con una enorme reducción de costes y tiempo. Estos métodos están basados en la amplificación de secuencias diana específicas, secuencias de ADN repetidas, amplificación al azar, o la propia secuenciación de los productos amplificados. A continuación se describen algunos de los métodos que con más éxito se vienen utilizando en la identificación y/o caracterización de BAL aisladas de productos lácteos.

- a) **Técnicas tipo *fingerprinting*.** El objetivo de estas técnicas es la generación de “huellas genéticas” específicas de cada microorganismo o incluso de cada cepa microbiana, que pueden ser interpretadas como un “código de barras” y que por lo tanto permite la identificación y tipificación de los microorganismos aislados (Vandamme *et al.*, 1996). Un ejemplo es la amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD-PCR o AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR)). Estas técnicas no requieren conocimiento previo de la secuencia de ADN que se va a amplificar. En la reacción de amplificación, se emplean uno o más cebadores de secuencias aleatorias y longitud corta, y condiciones poco restrictivas (baja temperatura de anillamiento). Los productos obtenidos se separan mediante

electroforesis en gel de agarosa o acrilamida, originando de esta forma un patrón de bandas característico de cada individuo/cepa (Williams *et al.*, 1990; Power, 1996; Rossetti y Giraffa, 2005). Las ventajas de estas técnicas son la sencillez y los bajos costes y entre los inconvenientes la reproducibilidad, ya que es necesario estandarizar las condiciones de amplificación, tales como concentración de ADN entre otros factores.

Una técnica similar y basada en los principios del RAPD, pero en la cual se utilizan condiciones más restrictivas en lo que a temperatura de anillamiento se refiere, es el análisis de secuencias repetidas mediante PCR (Versalovic *et al.*, 1991): REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic) y ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus). En ambos casos, la amplificación se realiza con un solo oligonucleótido.

Otras técnicas también orientadas a generar una huella genética, pero combinando amplificación del ADN por PCR y digestión con endonucleasas de restricción, son el ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), RISA-PCR (rRNA gene Internal Spacer Analysis) y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). En el primer caso se amplifican algunos de los genes correspondientes al ADNr (por ejemplo el ADNr 16S o la secuencia intergénica entre el ADNr 16S y el ADNr 23S), digiriéndose posteriormente el producto amplificado (Vanechoutte *et al.*, 1992). En el caso de las BAL, se han descrito numerosos protocolos basados en este procedimiento que permiten la identificación de prácticamente todas las especies de lactobacilos asociados con alimentos (Giraffa y Neviani, 2000), de leuconostoc (Ward *et al.*, 1995; Moschetti *et al.*, 2000) y de pediococcus (Mora *et al.*, 1997).

En el AFLP, el ADN de un aislado microbiano se digiere primero con 1-2 endonucleasas de restricción, posteriormente se anilla con adaptadores complementarios a los extremos cohesivos, y por último se amplifica con oligonucleótidos complementarios a los adaptadores (Vos *et al.*, 1995). Normalmente se utiliza algún tipo de sesgo en la secuencia de los cebadores utilizados para amplificación en el extremo 3'.

b) PCR específica. El objetivo de esta técnica es la amplificación de secuencias dianas correspondientes a un taxón concreto (Matsuki *et al.*, 2003), lo que resulta muy útil en la detección de un microorganismo y también en la

identificación. Las secuencias específicas no tienen porque restringirse a los genes del ADNr. Así, por ejemplo, en la detección e identificación de enterococos se ha empleado con éxito el gen *tuf* (Factor de elongación Tu) o el gen *ddl* (D-alanina/D-alanina ligasa) (Domig *et al.*, 2003); el operón responsable de la biosíntesis de la histidina permite la identificación y diferenciación entre *Lc. lactis* subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (Corroler *et al.*, 1998); los genes *pepIP* y *lacZ* se han usado para diferenciar *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* de *Lb. delbrueckii* subsp. *cremoris* (Torriani *et al.*, 1999) y para identificar *St. thermophilus* (Corroler *et al.*, 1998) respectivamente.

- c) Secuenciación.** Uno de los métodos que más se ha extendido en la clasificación e identificación de microorganismos ha sido la secuenciación del ADNr 16S. Las extensas bases de datos disponibles permiten el diseño de cebadores universales con los que amplificar el ADNr 16S de una bacteria, sin conocimiento de su afiliación, y su posterior identificación mediante secuenciación y comparación con bases de datos (Weisburg *et al.*, 1991; Maidak *et al.*, 1996). Esta metodología de identificación se está extendiendo a otros genes para solventar algunos problemas asociados al ADNr 16S, como por ejemplo el gen *recA* (Felis *et al.*, 2001; Torriani *et al.*, 2001) y el gen *rpoB* (Rantsiou *et al.*, 2004; Renouf *et al.*, 2006). Sin embargo, el número de secuencias disponibles de estos genes es aún escasa si la comparamos con las del ARNr 16S (Dahllöf, 2002).
- d) Tipificación de secuencias multilocus (MLST).** El MLST se basa en la secuenciación de varios genes constitutivos (*housekeeping genes*) para el posterior análisis de similitud entre los aislados objeto de estudio (Maiden *et al.*, 1998). Este MLST produce resultados altamente reproducibles, sin ambigüedades y de gran utilidad en estudios de relaciones genéticas. Es especialmente útil en el estudio de relaciones taxonómicas (Gevers *et al.*, 2005). Por el contrario, MLST consume más tiempo y los costes suelen ser más elevados que los anteriores (Leavis *et al.*, 2006).

1.6.1.3. Métodos basados en la digestión enzimática

En este caso, el ADN genómico de la cepa objeto de estudio se digiere previamente mediante enzimas de restricción de baja frecuencia de corte (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism). Posteriormente los fragmentos obtenidos se separan mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE; Pulse Field Gel Electrophoresis), pulsos de campos eléctricos orientados perpendicularmente de manera alternativa y no uniforme (Poh y Yeo, 1993; Bustamante *et al.*, 1993). Con el fin de evitar el fraccionamiento del DNA que ocurre en el proceso de extracción, las células son incluidas en bloques de agarosa donde posteriormente son lisadas y digeridas. El perfil de bandas obtenido mediante este procedimiento es característico de cada cepa. La electroforesis en campo pulsante se ha usado de forma satisfactoria en la identificación y tipificación de numerosas BAL aisladas de alimentos (Klein *et al.*, 1998; Giraffa y Neviani, 2000; Domig *et al.*, 2003; Coppola *et al.*, 2006).

El ribotipado es una técnica que permite estudiar polimorfismos del ADNr de los diferentes aislados. En este caso el ADN total se digiere con endonucleasas de restricción, y una vez transferido e inmovilizado a membranas, se hibrida con una sonda derivada del correspondiente ARNr. El patrón de bandas resultante permite la diferenciación de especies e incluso de cepas según la diferencia en los polimorfismos de los genes ribosómicos.

Tanto el ribotipado como la electroforesis en campo pulsante son altamente reproducibles, discriminativas, y fáciles de interpretar; sin embargo, entre los principales inconvenientes destacan el tiempo de realización de la misma y los costes elevados. Existen algunas plataformas automáticas, como por ejemplo el RipoPrinter, que contiene más de 10.000 *fingerprinting* de microorganismos conocidos y en la que un aislado puede ser identificado en un tiempo aproximado de 8 horas (Dawson, 2001).

1.6.2. Técnicas independientes de cultivo

Las técnicas independientes de cultivo tratan de resolver algunos de los problemas asociados con la identificación bacteriana que ya se han expuesto en el apartado 1.6.1. Fundamentalmente tratan de determinar la diversidad microbiana en los

ecosistemas, tanto en el espacio como en el tiempo, sin necesidad de recurrir a su aislamiento. Las limitaciones de estos procedimientos suelen estar asociados con aspectos técnicos, por ejemplo en la extracción de ADN/ARN de la muestra, los errores propios de la amplificación del ADN (falta de anillamiento con los cebadores, anillamientos erróneos, competencia entre los cebadores, preferencias del cebador, etc.) (Forney *et al.*, 2004; Giraffa y Neviani, 2001; Ercolini, 2004; Ogier *et al.*, 2002; Stach *et al.*, 2001), entre otros. El gen más utilizado en el análisis de comunidades microbianas es el ADN_r 16S, que a pesar de sus numerosas ventajas también presenta algunos inconvenientes, como por ejemplo la heterogeneidad intra-específica o la escasa discriminación entre especies muy próximas. El empleo de otros genes, como p.e. la ARN polimerasa B (*rpoB*), las familia del gen *recA*, girasa B (*gyrB*), factor de elongación Tu (*tuf*), el gen *dnaK*, además de otros genes funcionales, podría solventar algunos de estos problemas, sin embargo la ausencia de secuencias disponibles en algunos casos, junto con la ausencia de sitios conservados en estos genes, limita en ocasiones el uso de otros genes alternativos (Dahllöf, 2002).

La amplificación del ARN (RT-PCR) en lugar del ADN se suele utilizar para la diferenciación entre las células activa metabólicamente y las células muertas.

En la Tabla 5 se detallan algunas de las estrategias que se han utilizado con éxito en la detección e identificación de microorganismos aislados de productos lácteos fermentados. A continuación se describen las más importantes.

- a) **Técnicas tipo *fingerprinting*.** Estos procedimientos se suelen utilizar para generar la “huella genética” que refleje la diversidad microbiana de un determinado hábitat. En primer lugar destacan las electroforesis en gradientes desnaturalizantes. La primera descrita fue la denominada electroforesis en gradiente denaturalizante o DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer *et al.*, 1993) y posteriormente aparecieron otras variantes como la electroforesis en gradiente de temperatura o TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) (Heuer *et al.*, 1997) y electroforesis en gradiente temporal de temperatura o TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) (Bosshard *et al.*, 2000), que se han usado con éxito en el estudio de la composición y dinámica de comunidades microbianas asociadas con alimentos. Estas técnicas se basan en la amplificación de las regiones variables de los genes correspondientes al ARN_r 16S a partir del ADN

Tabla 5. Resumen de las técnicas independientes de cultivo empleadas en la identificación de los microorganismos presentes en alimentos lácteos fermentados.

	Resolución	Aplicaciones
Métodos basados en la PCR		
PCR-DGGE/TTGE/TGGE	Miembros de una comunidad (género/especie)	Fingerprinting de una comunidad; dinámica de poblaciones; análisis de mutaciones
SSCP	Miembros de una comunidad (género/especie)	Fingerprinting de una comunidad; dinámica de poblaciones; análisis de mutaciones
T-RFLP	Miembros de una comunidad (género/especie)	Fingerprinting de una comunidad; dinámica de poblaciones microbianas
LH-PCR	Miembros de una comunidad (género/especie)	Fingerprinting de una comunidad; dinámica de poblaciones microbianas
PCR-ARDRA	Miembros de una comunidad (especie)	Fingerprinting de una comunidad; dinámica de poblaciones microbianas
RISA/ITS-PCR	Miembros de una comunidad (especie)	Fingerprinting de una comunidad; dinámica de poblaciones microbianas
Métodos in situ		
- FISH	Miembros de una comunidad (especie)	Detección de células viables (cultivables y no cultivables) de comunidades microbianas; distribución espacial de microorganismos en los ecosistemas
FISH Múltiple	Miembros de una comunidad (especie)	Igual que el FISH
PCR in situ	Miembros de una comunidad (especie)	Detección de células viables y células que crecen de forma lenta; detección de secuencias diana presentes en un número bajo de copias
Otros métodos		
Citometría de flujo	Miembros de una comunidad (especie)	Enumeración selectiva de poblaciones y subpoblaciones microbianas de una comunidad; análisis del estado fisiológico celular
PCR competitiva	Miembros de una comunidad (especie)	Detección de células en estado VNC
Hibridación cuantitativa	Miembros de una comunidad (especie)	Dinámicas semicuantitativa de grupos microbianos de una población microbiana

Acrónimos: DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; TGGE, Temperature Gradient Gel Electrophoresis; TTGE, Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis; SSCP, Single-Stranded Conformational Polymorphism; LH-PCR, Length Heterogeneity-PCR; ARDRA, Amplification Ribosomal DNA Restriction Analysis; ITS, Internal Transcribed Spacer; RISA, rRNA gene Internal Spacer Analysis; RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism; FISH (Fluorescent *in situ* Hybridisation).

extraído de una muestra compleja, y la posterior separación de los fragmentos de ADN amplificados. Los cebadores utilizados, corresponden a regiones conservadas del ADN_r, uno de los cuales lleva un pinza en el extremo 5' con un alto contenido en GC. La separación de los productos amplificados se realiza sobre la base de la reducción de la movilidad electroforética de una cadena de ADN doble cuando está parcialmente desnaturalizada. Puesto que las diferentes fragmentos amplificados se van a desnaturalizar de acuerdo con su T_m (directamente relacionada con su porcentaje de GC), migrarán de forma distinta en una electroforesis en gel de acrilamida sometido a un gradiente desnaturalizante. Se puede establecer un gradiente lineal químico (DGGE), un gradiente lineal de temperatura (TGGE) o un gradiente temporal de temperatura (TTGE). Estas técnicas han sido empleadas con éxito en la identificación de los cultivos iniciadores de quesos de tipo Mozzarella (Ercolini *et al.*, 2001), o en el estudio de la dinámica de las poblaciones microbianas de numerosos quesos artesanales europeos (Ercolini *et al.*, 2001, 2003a, 2004; Ercolini, 2004; Lafarge *et al.*, 2004; Ogier *et al.*, 2002; Ogier *et al.*, 2004; Parayre *et al.*, 2007; Randazzo *et al.*, 2002; Randazzo *et al.*, 2006).

El análisis de SSCP (Single-Stranded Conformational Polymorphism) se basa también en la amplificación parcial del gen del ARN_r 16S y la posterior separación electroforética de los fragmentos amplificados, sobre la base de la diferente movilidad de las moléculas de ADN de cadena sencilla (Schwieger y Tebbe, 1998). El retardo en la movilidad de estas moléculas se produce por las diferencias en el plegamiento de las mismas, y que lógicamente es dependiente de su secuencia. Esta técnica se ha combinado con la electroforesis capilar al emplear cebadores marcados por fluorescencia para posteriormente separar las cadenas sencillas de conformación polimórfica de forma semiautomática (Widjoatmodjo *et al.*, 1996). El análisis mediante SSCP-PCR ha sido empleado con éxito para evaluar la diversidad, sucesión y actividades de las poblaciones bacterianas de quesos elaborados con leche cruda (Duthoit *et al.*, 2003; Duthoit *et al.*, 2005a; Duthoit *et al.*, 2005b; Callon *et al.*, 2004), y también en la caracterización de la microbiota presente en la superficie de algunos quesos artesanales (Feurer *et al.*, 2004).

También se ha desarrollado una extensa metodología al combinar la amplificación por PCR con los sistemas automáticos de detección de

fragmentos de ADN fluorescentes por electroforesis capilar (Liu *et al.*, 1997). Un ejemplo es el denominado T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), y LH-PCR (Length heterogeneity-PCR) que analiza polimorfismos de los genes variables como por ejemplo el ARNr 16S. En el caso del T-RFLP, se amplifica el gen diana de la comunidad (ADN o ARN) con cebadores marcados en 5' con una sustancia fluorescente. Posteriormente los productos amplificados se digieren con 2-3 endonucleasas de restricción y se separan mediante electroforesis capilar, donde se detectan los extremos marcados. Dependiendo de la composición en especies, se obtienen diferentes tipos de perfiles. Técnicas similares basadas en los mismos principios y que reciben diferente nomenclatura dependiendo del gen diana utilizado, son ARDRA-PCR (Amplification Ribosomal DNA Restriction Analysis) y RISA-PCR (rRNA gene Internal Spacer Analysis), comentadas anteriormente.

En la LH-PCR los microorganismos se detectan por las variaciones naturales de la longitud del ARNr 16S (o bien de otro gen variable). Para ello, se utilizan igualmente cebadores fluorescentes (Suzuki *et al.*, 1998). Estas técnicas se han aplicado recientemente para analizar de forma semicuantitativa los microorganismos presentes en los cultivos iniciadores (Sánchez *et al.*, 2006), la dinámica de las poblaciones microbianas durante la maduración de quesos (Lazzi *et al.*, 2004; Fornasari *et al.*, 2006; Rademaker *et al.*, 2006) o la microbiota presente en la superficie de quesos (Rademaker *et al.*, 2005).

Entre las principales limitaciones de estas técnicas destacan la imposibilidad de evaluar el tamaño de las poblaciones en una comunidad microbiana, además de los problemas derivados de la propia amplificación comentados anteriormente.

Aunque estos análisis utilizan principalmente como gen diana el ARNr 16S, sobre todo por el número de secuencias disponibles en bases de datos, sin embargo este análisis no tiene porque limitarse a este gen (Giraffa y Neviani, 2001). Así, la acumulación de nuevas secuencias de otros genes menos conservados podría permitir en un futuro próximo la comparación con otros perfiles genéticos (Giraffa y Neviani, 2001).

b) Técnicas *in situ*. Uno de los principales inconvenientes de las técnicas basadas en la amplificación del ADN o ARN es que suelen proporcionar escasa información sobre el número y la distribución espacial de los microorganismos

en un determinado hábitat. Para solventar este inconveniente están las denominadas técnicas *in situ*. El rasgo común de estos métodos es que permiten identificar y contar directamente las células intactas (tanto cultivables como no cultivables) de su microhábitat natural. El mejor ejemplo es la hibridación fluorescente *in situ* (FISH; Fluorescent *in situ* Hybridisation), donde las células se fijan y se permeabilizan a una sonda marcada por fluorescencia para su posterior detección mediante microscopía o citometría de flujo (Moter y Göbel, 2000). Las sondas empleadas suelen basarse en secuencias derivadas del ARNr 16S, o bien de algún gen funcional concreto, lo que permite la detección desde phyla completos hasta especies individuales (Amann *et al.*, 2001). El FISH no sólo aporta información sobre la estructura de la comunidad, sino que además permite conocer la distribución espacial de los microorganismos en una comunidad, sobre todo cuando se combina con la microscopía de barrido laser confocal. El FISH se ha usado por ejemplo para evaluar la estructura de la comunidad microbiana en el queso Stilton (Ercoloni *et al.*, 2003a; Ercoloni *et al.*, 2003b), para detectar brevibacterias en la superficie del queso Gruyère (Kolloffel *et al.*, 1999), o determinar la viabilidad de bifidobacterias probióticas en alimentos fermentados (Lahtinen *et al.*, 2006), entre otros.

Cuando se combina con la PCR, como es el caso de la PCR *in situ*, se puede aumentar la sensibilidad, lo cual puede resultar útil en la detección de ARNr que esté presente en una concentración muy baja. En este caso se realiza una PCR previa a su detección por hibridación *in situ* (Fredricks y Relman, 1996).

c) Otros métodos: Microarrays y citometría de flujo. Los *microarrays* derivan de los southern blots, pasando por los filtros de colonias y los dot blots, donde la miniaturización y la automatización han permitido la hibridación de miles de sondas en un soporte sólido (Ehrenreich, 2006). En un primer momento los *microarrays* se desarrollaron para analizar los patrones de expresión génica en cultivos puros, pero en los últimos años se han realizado numerosos avances para facilitar su aplicación a muestras ambientales (Gentry *et al.*, 2006). Con los *microarrays* se puede caracterizar la mayor parte de la diversidad de un ecosistema, pero presenta el gran inconveniente de que no detecta especies inesperadas, por lo que se suele aplicar preferentemente para evaluar los

cambios de poblaciones microbianas en muestras previamente caracterizadas (Dahllöf, 2002).

Por último, la citometría de flujo (CMF) es una técnica rápida y sencilla que permite contar de forma individualizada las células de una población microbiana heterogénea, incluso detectar microorganismos que estén presentes en una concentración minoritaria (1/1.000.000). Para ello, se suele combinar junto con tinciones fluorescentes y el FISH (Amann *et al.*, 2001). Además se pueden usar sondas correspondientes a actividades metabólicas, y de esta forma poder analizar el estado fisiológico celular (integridad de la membrana, actividades enzimáticas, susceptibilidad a antibióticos, etc.). La CMF se ha aplicado con éxito en productos prebióticos para la caracterización de subpoblaciones de bacterias viables o dañadas (Ben Amor *et al.*, 2002), en el recuento de BAL de los cultivos iniciadores de productos lácteos y quesos (Friedrich y Lenke, 2006) y detección de dobles mutantes de una cepa de *S. thermophilus* (resistente a fagos y excelente productor de ácido a partir de lactosa) (Viscardi *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, se puede concluir de forma generalizada que, aunque actualmente se dispone de una amplia metodología que permite analizar no sólo la composición microbiana de un ecosistema, sino también la dinámica de la misma, aún no existe una técnica que *per se*, sea capaz de aportar toda esta información, lo cual exige que haya que aplicar varias metodologías complementarias. Este tipo de estudios ya se han empezado a aplicar a los alimentos fermentados, como son los quesos, donde las tradicionales técnicas de cultivo se van complementando con otras para conocer de forma más completa la microbiología de los mismos. Pero además, pueden presentar multitud de aplicaciones:

- Estudiar el impacto de las nuevas metodologías o ingredientes en la producción de alimentos.
- Detectar patógenos o cepas concretas en situación de estrés o dañadas.
- Detectar BAL atenuadas empleadas como cultivos adicionales.
- Estudiar la autólisis de las BAL durante la fermentación, especialmente de los cultivos iniciadores.
- Estudiar la heterogeneidad intraespecífica o los cambios transitorios de las cepas en respuesta a las condiciones de crecimiento.

- Estudiar la biogeografía bacteriana, lo que puede ser de especial interés en evaluar la importancia de la microbiota específica de cada región en la producción de queso bajo Denominación de Origen, etc.

2. OBJETIVOS.

Los procesos de fermentación destinados a la elaboración de productos lácteos permiten obtener alimentos de alto valor añadido, de gran importancia en la industria alimentaria siendo los quesos uno de los sectores más importantes. Entre los quesos hay que diferenciar aquellos que han sido producidos a escala industrial, mediante la utilización de leche pasteurizada, previamente estandarizada y mediante el empleo de cultivos iniciadores de composición conocida y aquellos que han sido producidos de una forma más artesanal, a escala más reducida. Probablemente, y debido al propio proceso de producción industrial, se han ido perdiendo algunas de las características de aroma y sabor que tradicionalmente han estado ligados a los productos artesanales, que, además, suelen ser muy apreciados por los consumidores. Conseguir una producción industrial sin pérdida de las cualidades organolépticas típicas requiere un profundo conocimiento de la microbiología del queso. Este conocimiento permite, además, obtener en un futuro nuevos productos, con propiedades y características exclusivas, además de optimizar su producción.

Hasta ahora, en nuestro país, gran parte del conocimiento microbiológico que se tiene sobre la producción de quesos, se ha generado mediante el empleo de las técnicas clásicas de cultivo. Así, la descripción de las poblaciones microbianas se ha hecho de acuerdo con las características culturales de los principales grupos microbianos que se aislaban, lactobacilos, lactococos, enterococos, coliformes, micrococos, etc., pero, por las dificultades inherentes a ello, no se analizaban especies particulares ni por supuesto cepas. Esto último, puede resultar de gran utilidad para comprender algunas de las propiedades microbiológicas del producto final, teniendo en cuenta que parte de las propiedades funcionales y tecnológicas pueden estar asociadas a cepas más que a especies. Las técnicas de cultivo, aún siendo una potente herramienta, suelen presentar varias deficiencias, ya comentadas en la Introducción de esta Memoria, que pueden ser solventadas mediante su complementación con técnicas moleculares. Estas técnicas, que permiten detectar y caracterizar microorganismos específicos sin necesidad de recurrir a su aislamiento en cultivo puro, y también identificar los aislados de manera inequívoca, han supuesto una solución rápida y segura para resolver algunos de los problemas microbiológicos asociados a las industrias alimentarias.

Además, debido a que ciertos microorganismos pueden representar un factor de riesgo para los consumidores, los productos obtenidos deben estar libre de patógenos y toxinas. En este sentido los enterococos son un grupo microbiano de gran controversia, puesto que mientras está documentado su importante papel en la producción de ciertos tipos de quesos, su aparición en los últimos años como patógenos nosocomiales hace dudar de la seguridad de los mismos en los alimentos. En este sentido hay que tener en cuenta que el género *Enterococcus* aparece de forma abundante en los quesos artesanales de la cuenca Mediterránea.

Por ello, el objetivo general de este trabajo se ha centrado en la realización de un estudio polifásico, mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo, de la microbiología de quesos artesanales elaborados con leche cruda de cabra en la comunidad andaluza, así como en caracterizar y estudiar los enterococos presentes en los mismos. Para alcanzar estos objetivos generales se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la diversidad microbiana de los quesos mediante:
 - 1a. Técnicas microbiológicas clásicas, aislando en los medios de cultivos adecuados y posterior identificación y tipificación de los aislados mediante RAPD-PCR, secuenciación del gen responsable del ARNr 16S y PCR específica.
 - 1b. Técnicas independientes de cultivo por medio de TTGE y LH-PCR.
2. Estudio en profundidad de los enterococos aislados de los quesos:
 - 2a. Identificación y tipificación de las cepas aisladas mediante RAPD-PCR y ERIC-PCR.
 - 2b. Detección de algunos rasgos de interés tecnológico, como es la producción de bacteriocinas y la presencia de posibles determinantes de virulencia.

3. BIBLIOGRAFÍA.

- Adams, M.R.** 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* **68**: 171-178.
- Amann, R., B.M. Fuchs y S. Behrens.** 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 231-236.
- Andren, A.** 2002. Rennets and coagulants. En *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H. Roginsky, J. Fuquay y P.F. Fox (eds). Vol. 1: pp. 381-286. Academic Press, London.
- Andrewes E.W., y T. J. Horder.** 1906. A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet* **11**: 708-713.
- Anónimo.** 1996. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Arocha, M.M., M. Mc Vey, S.D. Loder, J.H. Rupnow y L. Bullerman.** 1992. Behaviour of enterohaemorrhagic *E. coli* O157:H7 during manufacture of cottage cheese. *J. Food Prot.* **55**: 379-381.
- Arthur, M., C. Molinas, F. Depardieu y P. Courvalin.** 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* **175**: 117-127.
- Aslam, Z., W.T. Im, L.N. Ten, M.J. Lee, K.H. Kim y S.T. Lee.** 2006. *Lactobacillus siliginis* sp. nov., isolated from wheat sourdough in South Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 2209-2213.
- Azarnia, S., N. Robert y B. Lee.** 2006. Biotechnological Methods to Accelerate Cheddar Cheese Ripening. *Crit. Rev. Biotechnol.* **26**: 121-143.
- Banks, J. y A.G. Williams.** 2004. The role of the nonstarter lactic acid bacteria in Cheddar cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* **57**: 145-150.
- Bardócz, S.** 1995. The role of dietary polyamines. *Eur. J. Clin. Nutr.* **47**: 683-690.
- Bellomo, G., A. Mangiagle, L. Nicastro y G. Frigerio.** 1980. A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. *Curr. Ther. Res.* **28**: 927-934.
- Ben Amor, K., Breeuwer, P., Verbaarschot, P., Rombouts, F. M., Akkermans, A. D. L., de Vos y W. M., Abee, T.** 2002. Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead bifidobacterium cells during bile salt stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5209-5216.

- Beresford, T.P., N.A. Fitzsimons, N.L. Brennan y T.M. Cogan.** 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* **11**: 259-274.
- Bernardeau, M., J.P. Vernoux, S. Henri-Dubernet y M. Guéguen.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**: 278-285.
- Bernardeau, M., M. Guéguen y J.P. Vernoux.** 2006. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 487513.
- Bhowmik, T. y E. Marth.** 1990. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening. *J. Dairy Sci.* **73**: 859-866.
- Birollo, G.A., J.A. Reinheimer y C.G. Vinderola.** 2001. Enterococci vs. nonlactic acid microflora as hygiene indicators for sweetened yoghurt. *Food Microbiol.* **18**: 597-604.
- Bosshard, P.P., Y. Santini, D. Grüter, R. Stettler y R. Bachofen.** 2000. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 173-182.
- Bouza, E., R. San Juan, P. Munoz, A. Voss y J. Kluytmans.** 2001a. A European perspective on nosocomial urinary tract infections I. Report on the microbiology workload, etiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-003 study) European Study Group on Nosocomial Infections. *Clin. Microbiol and Infec.* **7**: 523-531.
- Bouza, E., R. San Juan, P. Munoz, A. Voss y J. Kluytmans.** 2001b. A European perspective on nosocomial urinary tract infections II. Report on incidence, clinical characteristics and outcome (ESGNI-004 study). European Study Group on Nosocomial Infection. *Clin. Microbiol. Infec.* **7**: 532-542.
- Bover-Cid, S. y W.H. Holzappel.** 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **53**: 33-41.
- Brillet, A., M.F. Pilet, H. Prevost, M. Cardinal y F. Leroi.** 2005. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* **104**: 309-324.
- Budde, B.B., T. Hornbaek, T. Jacobsen, V. Barkholt y A.G. Koch.** 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for

- vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *Int. J. Food Microbiol.* **83**: 171-184.
- Bustamante, C., S. Gurrieri y S.B. Smith.** 1993. Towards a molecular description of pulsed-field gel electrophoresis. *Trends Biotechnol.* **11**: 23-30.
- Callon, C., L. Millet y M.C. Montel.** 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J. Dairy Res.* **71**, 231-244.
- Caplice, E. y G.F. Fitzgerald.** 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **50**: 131-149.
- Carvalho, M.G.S., P.L. Shewmaker, A.G. Steigerwalt, R.E. Morey, A.J. Sampson, K. Joyce, T.J. Barrett, L.M. Teixeira y R.R. Facklam.** 2006. *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1505-1508.
- Centeno J.A., S. Menéndez, M. Hermida y J.L. Rodríguez-Otero.** 1999. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* **48**:97-111.
- Chambel, L., I.M. Chelo, L. Zé-zé, L.G. Pedro, M.A.Santos y R. Tenreiro.** 2006. *Leuconostoc pseudoficulneum* sp. nov., isolated from a ripe fig. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1375-1381.
- Chopard, M.A., M. Schmitt, E. Perreard y J.F. Chamba.** 2001. Qualitative aspect of proteolytic activity of thermophilic lactobacilli using in Swiss cheeses. *Lait.* **81**: 183-194.
- Cintas, L.M., P. Casaus, H. Holo, P.E. Hernandez, I.F. Nes y L.S. Havarstein.** 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* **180**: 1988-1994.
- Claesson, M.J., D. van Sinderen y P.W. O'Toole.** 2007. The genus *Lactobacillus*-a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol. Lett.* **269**: 22-28.
- Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes y M.L. Chikindas.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**: 1-20.
- Coffey, A., y R.P. Ross.** 2002. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **82**: 303-321.
- Cogan, T.M.** 2002. Public Health Aspects. En *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H. Roginsky, J. Fuquay y P.F. Fox (eds). Vol. 1: pp. 314-320. Academic Press, London.

- Cogan, T.M., M. Barbosa, E. Beuquier, B. Bianchi-Salvadori, P.S. Cocconcelli, I. Fernandes, J. Gomez, R. Gomez, G. Kalantzopoulos, A. Ledda, M. Medina, M.C. Rea y E. Rodriguez.** 1997. Characterisation of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* **64**: 409-421.
- Coolbear, T., J.R. Reid, y G.G. Pritchard.** 1992. Stability and specificity of the cell wall-associated proteinase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H2 released by treatment with lysozyme in the presence of calcium ions. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3263-3270.
- Coppola, R., M. Nanni, M. Succi, A. Sorrentino, M. Iorizzo, C. Chiavari y L. Grazia.** 2000. Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheese making and the first months of the ripening. *Lait.* **80**: 479-490.
- Coppola, S., V. Fusco, R. Andolfi, M. Aponte, G. Blaiotta, D. Ercolini y G. Moschetti.** 2006. Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata cheese of the Naples area. *J. Dairy Res.* **73**: 264-272.
- Corroler, D., I. Mangin, N. Desmaures y M. Gueguen.** 1998. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4729-4735.
- Coton, E., G. Rollan, A. Bertrand y A. Lonvaud-Funel.** 1998. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency, and distribution. *Am. J. Enol. Vitic.* **49**: 199-204.
- Crow, V.L., B. Curry, y M. Hayes.** 2001. The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *Int. Dairy J.* **11**: 275-283.
- Curry, B. y V. Crow.** 2002. *Lactobacillus spp.* General Characteristics. En *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H. Roginsky, J. Fuquay y P.F. Fox (eds). Vol. 3: pp. 1479-1484. Academic Press, London.
- Czárán T.L., R.F. Hoekstra y L. Pagie.** 2002. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 786-790.
- Dahllöf, I.** 2002. Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr. Opin. Biotech.* **13**: 213-217.
- Dawson, D.** 2001. Molecular typing and identification of bacterial isolates. *New Food* **4**: 63-65.

- De Angelis, M., A. Corsetti, N. Tosti, J. Rossi, M.R. Corbo, y M. Gobbetti.** 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic and cell wall protein analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2011-2020.
- De Buyser, M.L., B. Dufour, M. Maire y V. Lafarge.** 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* **67**: 1-17.
- De Vuyst, L., M.R. Foulquié y H. Revets.** 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* **84**: 299-318.
- Del Campo, R., D. Bravo, R. Cantón, P. Ruiz-Garbajosa, R. García-Albiach, A. Montesi-Libois, F.J. Yuste, V. Abraira y F. Baquero.** 2005. Scarce evidence of yogurt lactic acid bacteria in human feces after daily yogurt consumption by healthy volunteers. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 547-549.
- Dellaglio, F., M. Vancanneyt, A. Endo, P. Vandamme, G.E. Felis, A. Castioni, F. Fujimoto, K. Watanabe y S. Okada.** 2006. *Lactobacillus durianis* Leisner *et al.* 2002 is a later heterotypic synonym of *Lactobacillus vaccinoferus* Kozaki and Okada 1983. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1721-1724.
- Demarigny Y., E. Beuquier, A. Dasen y G. Duboz.** 1996. Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. I. Evolution of microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative lactobacilli. *Lait* **76**: 371-387.
- DeVos, W.M., P.A. Bron y M. Kleerebezem.** 2004. Postgenomics of lactic acid bacteria and other food-grade bacteria to discover gut functionality. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 86-93.
- Devriese, L.A., B. Por y M.D. Collins.** 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. App. Bacteriol.* **75**: 399-408.
- Diep, D.B. e I.F. Nes.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets.* **3**: 107-122.
- Diez-Gonzalez, F.** 2007. Applications of Bacteriocins in Livestock. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* **8**: 15-24.

- Domig, K. J., H.K. Mayer y W. Kneifel.** 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 165-188.
- Duthoit, F., C. Callon, L. Tessier y M.-C. Montel.** 2005a. Relationships between sensorial characteristics and microbial dynamics in “Registered Designation Origin” Salers cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **103**: 259-270.
- Duthoit, F., J.J. Godon y M.C. Montel.** 2003. Bacterial community dynamics during production of Registered Designation Origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene by single strand conformation polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3840-3848.
- Duthoit, F., L. Tessier y M.-C. Montel.** 2005b. Diversity dynamics and activity of bacterial populations in “Registered Designation Origin” Salers cheese by single-strand conformation polymorphism analysis of 16S rRNA genes. *J. Appl. Microbiol.* **98**: 1198-1208.
- Eck, A.** 1990. *El Queso*. Omega, Barcelona.
- Ehrenreich, A.** 2006. DNA microarray technology for the microbiologist: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**: 255-273.
- El Soda, M., S.A. Madkor y P.S. Tong.** 2000. Adjunct Cultures: Recent Developments and Potential Significance to the Cheese Industry. *J. Dairy Sci.* **83**: 609-619.
- Eliskases-Lechner F., W. Ginzinger, H. Rohm y E. Tschager.** 1999. Raw milk flora affects composition and quality of Bergkase. 1. Microbiology and fermentation compounds. *Lait* **79**: 385-396.
- Ercolini, D.** 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Meth.* **56**: 297-314.
- Ercolini, D., G. Mauriello, G. Blaiotta, G. Moschetti y S. Coppola.** 2004. PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo Mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 263-270.
- Ercolini, D., G. Moschetti, G. Blaiotta y S. Coppola.** 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**: 610-617.
- Ercolini, D., P.J. Hill y C.E.R. Dodd.** 2003a. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3540-3548.

- Ercolini, D., P.J. Hill y C.E.R. Dodd.** 2003b. Development of a fluorescence in situ hybridisation method for cheese using a 16S rRNA probe. *J. Microbiol. Meth.* **52**: 267-271.
- Espié, V., V. Vaillant, P. Mariani-Kurkdjian, F. Grimont, R. Martin-Schaller, H. de Valk y C. Vernozy-Rozand.** 2005. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol. Infect.* **000**: 1-4.
- Farkye, N.** 2004. Cheese technology. *Int. J. Dairy Technol.* **57**: 91-98.
- Fath, M.J., L.H. Zhang, J. Rush y R. Kolter.** 1994. Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants. *Biochemistry.* **33**: 6911-6917.
- Felis, G.E. y F. Dellaglio.** 2007. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* **8**: 44-61.
- Felis, G.E., F. Dellaglio, L. Mizzi y S. Torriani.** 2001. Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a change in the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 2113-2117.
- Felis, G.E., M. Vancanneyt, C. Snauwaert, J. Swings, S. Torriani, A. Castioni y F. Dellaglio.** 2006. Reclassification of *Lactobacillus thermotolerans* Niamsup *et al.* 2003 as a later synonym of *Lactobacillus ingluviei* Baele *et al.* 2003. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 793-795.
- Fernández, M., D.M. Linares, B. del Río, V. Ladero y M.A. Alvarez.** 2007. HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *J. Dairy Res.* **74**: 276-282.
- Feurer, C., F. Irlinger, H.E. Spinnler, P. Glaser, y T. Vallaëys.** 2004. Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 546-56.
- Fields, F.O.** 1996. Use of bacteriocins in food: regulatory considerations. *J. Food Protect S:* 72-77.
- Fitzsimons, N.A., T.M. Cogan, S. Condon y T. Beresford.** 2001. Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 600-608.
- Fornasari, M. E., L. Rossetti, D. Carminati y G. Giraffa.** 2006. Cultivability of *Streptococcus thermophilus* in Grana Padano cheese whey starters. *FEMS Microbiol. Lett.* **257**: 139-144.

- Forney, L. J., X. Zhou y C.J. Brown.** 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 210-220.
- Foulquié-Moreno, M.R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou y L. De Vuyst.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 1-24.
- Fox, P.F.** 2002. Cheese overview. En *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H. Roginsky, J. Fuquay y P.F. Fox (eds). Vol. 1: pp. 252-261. Academic Press, London.
- Fox, P.F., P.L.H. Mc Sweeney y C.M. Lynch.** 1998. Significance on nonstarter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* **53**: 83-89.
- Franz C.M., M.E. Stiles, K.H. Schleifer y W.H. Holzappel.** 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* **88**:105-22.
- Franz, C.M., M.J. van Belkum, W.H. Holzappel, H. Abriouel y Antonio Gálvez.** 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**: 293-310.
- Franz, C.M., W.H. Holzappel y M.E. Stiles.** 1999. Enterococci at the crossroads of food safety?. *Int J Food Microbiol.* **47**: 1-24.
- Franz, C.M.A.P., M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, M. De Wachter, I. Cleenwerck, B. Hoste, U. Schillinger, W.H. Holzappel y J. Swings.** 2006. *Pediococcus stilesii* sp. nov., isolated from maize grains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 329-333.
- Friedrich, U., y J. Lenke.** 2006. Improved enumeration of lactic acid bacteria in mesophilic dairy starter cultures by using multiplex quantitative real-time PCR and flow cytometry-fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol.* **72**: 4163-4171.
- Fredricks, D.N. y D.A. Relman.** 1996. Sequence-Based Identification of Microbial Pathogens: a Reconsideration of Koch's Postulates. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**: 1833.
- Freitas, C. y F.X. Malcata.** 2000. Microbiology and Biochemistry of Cheeses with Appellation d'Origine Protégée and Manufactured in the Iberian Peninsula from Ovine and Caprine Milks. *J. Dairy Sci.* **83**: 584-602.
- Gardinier, G., R.P. Ross, J.K. Collins, G. Fitzgerald y C. Stanton.** 1998. Development of a probiotic Cheddar cheese containing human derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2192-2199.
- Gasser, F.** 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infection. *Bull. Inst. Pasteur* **92**: 45-67.

- Gentry, T.J., G.S. Wickham, C.W. Schadt, Z. He y J. Zhou.** 2006. Microarray applications in microbial ecology research. *Microb. Ecol.* **52**: 159-175.
- Gevers, D., F.M. Cohan, J.G. Lawrence, B.G. Spratt, T. Coenye, E.J. Feil, E. Stackebrandt, Y. Van de Peer, P. Vandamme, F.L. Thompson y J. Swings.** 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Rev. Microbiol.* **3**: 733-739.
- Gilliland, S.E.** 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 175-188.
- Gilliland, S.E., C.R. Nelson y C. Maxwell.** 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 377-380.
- Giraffa, G.** 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 163-171.
- Giraffa, G.** 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **88**:215-222.
- Giraffa, G.** 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 251-260.
- Giraffa, G. y E. Neviani, E.,** 2000. Molecular identification and characterisation of food-associated lactobacilli. *It. J. Food Sci.* **12**: 403-423.
- Giraffa, G. y E. Neviani.** 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* **67**: 19-34.
- Giraffa, G., L. Rossetti, G. Mucchetti, F. Addeo y E. Neviani.** 1998. Influence of the temperature gradient on the growth of thermophilic lactobacilli used as natural starters in Grana cheese. *J. Dairy Sci.* **81**: 31-36.
- Goldin, B.R. y S.L. Gorbach.** 1984. Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics, and *Lactobacillus*: decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes, and glucuronides. *J. Natl. Cancer Inst.* **73**: 689-695.
- Guinane, C.M., P.D. Cotter, C. Hill y R.P. Ross.** 2005. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J. Appl. Microbiol.* **98**: 1316-1325.
- Haeghebaert, S., P. Sulem, L. Deroudille, E. Vanneroy-Adenot, O. Bagnis, P. Bouvet, F. Grimont, A. Brisabois, F. Le Querrec, C. Hervy, E. Espié, H. de Valk y V. Vaillant.** 2003. Two outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 8 linked to the consumption of Cantal cheese made with raw milk, France, 2001. *Eurosurveillance* **8**: 151-156.

- Hancock, L.E. y M.S. Gilmore.** 2002. The capsular polysaccharide of *Enterococcus faecalis* and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **99**: 1574-1579.
- Hansen, E.B.** 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. Int. J. Food Microbiol. **78**: 119-131.
- Hardie, J.M. y R.A. Whiley.** 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. J. App. Microbiol. Symposium Supplement. **83**: 1S-11S.
- Havarstein, L.S., H. Holo e I.F. Nes.** 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. Microbiol. **140**: 2383-2389.
- Hébert, E.M., R.R. Raya, P. Tailliez y G.S. de Giori.** 2000. Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. Int. J. Food Microbiol. **59**: 19-27.
- Heng, N.C.K., P.A., Wescombe, J.P., Burton, R.W., Jack, y J.R., Tagg.** 2007. The diversity of bacteriocins produced by gram-positive bacteria. En Bacteriocins-ecology and evolution. M.A. Riley and M.A. Chavan (Eds.). pp. 45-92. Springer, Heidelberg, Germany.
- Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla y E.M.H. Wellington.** 1997. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 3233-3241.
- Holzappel, W.H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger y J.H.J. Huis in't Veld.** 1998. Overview of gut flora and probiotics. Int. J. Food Microbiol. **41**: 85-101.
- Hugas, M., M. Garriga y M.T. Aymerich.** 2003. Functionality of enterococci in meat products. Int. J. Food Microbiol. **88**: 223-233.
- Huycke, M.M., D.F. Sahn y M.S. Gilmore.** 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerg. Infect. Dis. **4**: 239-249.
- Jack, R.W. J.R. Tagg y B. Ray.** 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. **59**: 171-200.
- Joerger, M.C. y T.R. Klaenhammer.** 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol. **167**: 439-446.

- Johnson, M.E. y J.A. Lucey.** 2006. Major Technological Advances and Trends in Cheese. *J. Dairy Sci.* **89**: 1174-1178.
- Jordan, K.N. y T.M. Cogan.** 1999. Heat resistnace of *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**: 136-140.
- Kandler, O. y Weiss, N.** Genus *Lactobacillus*. En Sneath P.H.A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Hold, J. E. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore M. D. USA, 1984, pp. 1209-1234.
- Kawai, Y., Y. Ishii, K. Arakawa, K. Uemura, B. Saitoh, J. Nishimura, H. Kitazawa, Y. Yamazaki, Y. Tateno, T. Itoh y T. Saito.** 2004. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2906-2911.
- Kayser, F.H.** 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 255-262.
- Klaenhammer, T.R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**: 337-349.
- Klaenhammer, T.R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **12**: 39-85.
- Klaenhammer, T.R., R. Barrangou, B.L. Buck, M.A. Azcarate-Peril y E. Altermann.** 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 393409.
- Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte, y G. Reuter.** 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 103-125.
- Kolloffel, B., L. Meile y M. Teuber.** 1999. Analysis of brevibacteria on the surface of Gruyère cheese detected by *in situ* hybridization and by colony hybridization. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**: 317-322.
- Konstantinov, S.R., E. Poznanski, S. Fuentes, A.D.L. Akkermans, H. Smidt y W.M. de Vos.** 2006. *Lactobacillus sobrius* sp. nov., abundant in the intestine of weaning piglets. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **56**: 29-32.
- Lafarge, V., J.C. Ogier, V. Girard, V. Maladen, J.-Y. Leveau, A. Gruss y A. Delacroix-Buchet.** 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5644-5650.
- Lahtinen, S. J., A.C. Ouwehand, J.P. Reinikainen, J.M. Korpela, J. Sandholm y S. J. Salminen.** 2006. Intrinsic properties of so-called dormant probiotic bacteria, determined by flow cytometric viability assays. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5132-5134.

- Lazdunski, C.J.** 1988. Pore-forming colicins: synthesis, extracellular release, mode of action, immunity. *Biochimie*. **70**: 1291-1296.
- Lazzi, C., L. Rossetti, M. Zago, E. Neviani y G. Giraffa.** 2004. Evaluation of bacterial communities belonging to natural whey starters for Grana Padano cheese by length heterogeneity-PCR. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 481-490.
- Leavis, H.L., M.J.M. Bonten y R.J.L. Willems.** 2006. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 454-460.
- Leclercq, R.** 1997. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin. Infect. Dis.* **24**: S80-S84.
- Lewenstein, A., G. Frigerio y M. Moroni.** 1979. Biological properties of SF68, a new approach for the treatment of diarrhoeal diseases. *Curr. Ther. Res.* **26**: 967-981.
- Liu, S.Q.** 2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **83**: 115-131.
- Liu, W.T., T.L. Marsh, H. Cheng y L.J. Forney.** 1997. Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. **63**: 4516-4522.
- López S. y B. Mayo.** 1997. Identification and characterization of homofermentative mesophilic *Lactobacillus* strains isolated from artisan starter-free cheeses. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**: 233-238.
- Lopez-Lara, I., A. Galvez, M. Martinez-Bueno, M. Maqueda y E. Valdivia.** 1991. Purification, characterization, and biological effects of a second bacteriocin from *Enterococcus faecalis* ssp. *liquefaciens* S-48 and its mutant strain B-48-28. *Can. J. Microbiol.* **37**: 769-774.
- Loy, A., M. Horn y M. Wagner.** 2003. probeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucl. Acids Res.* **31**: 514-516.
- Ludwing, W., E. Seewaldt, R. Kilpper-Bälz, K.H. Schleifer, L. Magrum, C.R. Woese, G.E. Fox y G. Stackebrandt.** 1985. The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Gen Microbiol.* **131**: 543-551.
- Lynch, C.M., P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, T.M. Cogan y F.B. Drinan.** 1996. Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *Int. Dairy J.* **6**: 851-867.

- Lynch, C.M., P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, T.M. Cogan y F.D. Drinan.** 1997. Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait* **77**: 441-459.
- Maidak, B.L., G.J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M.J. McCaughey y C.R. Woese.** 1996. The Ribosomal Database Project (RDP). *Nucleic Acids Res.* **24**: 82-85.
- Maiden, M.C., J.A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J.E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feavers, M. Achtman y B.G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**: 3140-3145.
- Makarova, K.S. y E.V. Koonin.** 2007. Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria. *J. Bacteriol.* **189**: 1199-1208.
- Maqueda, M., M. Sánchez-Hidalgo, M. Fernández, M. Montalbán-López, E. Valdivia, y M. Martínez-Bueno.** 2008. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **32**: 2-22.
- Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Ruíz-Rodríguez, J.J. Soler, M. Martín-Vivaldi, M. Maqueda y M. Martínez-Bueno.** 2006 Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe *Upupa epops*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4245-4249.
- Matsuki, T., K. Watanabe y R. Tanaka.** 2003. Genus- and species-specific PCR primers for the detection and identification of Bifidobacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **4**: 61-69.
- Mattick, A.T.R y A. Hurst.** 1944. A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature.* **154**: 551.
- McAuliffe, O., R.P. Ross y C. Hill.** 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 285-308.
- McBride, S.M., V.A. Fischetti, D.J. Leblanc, R.C. Jr. Moellering, y M.S. Gilmore.** 2007. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS ONE.* **7**: e582, 1-22.
- McSweeney, P.H.L., y M.J. Sousa.** 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* **80**: 293-324.
- Medina R., M. Katz, S. González y G. Oliver.** 2001. Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from northwest Argentina. *J. Food Prot.* **64**: 559-563.

- Medina, M.** 1996. Spanish artisanal cheeses. Pages 14 *in* Artisanal European Cheeses-Studies. T. M. Cogan and M. C. Rea, ed. EUR 16788 EN. European Commission, Brussels, Belgium.
- Méndez Martínez, C., A. Páez Jiménez, M. Cortés Blanco, E. Salmoral Chamizo, E. Mohedano Mohedano, C. Plata, A. Varo Baena y F. Martínez Navarro.** 2003. Brucellosis outbreak due to unpasteurized raw goat cheese in Andalusia (Spain), January - March 2002. *Eurosurveillance* **8**: 164-168.
- Mercenier, A., H. Müller-Alouf y C. Grangette.** 2000. Lactic Acid Bacteria As Live Vaccines. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2**: 17-25.
- Mora, D., M.G. Fortina, C. Parini y P.L. Manichini.** 1997. Identification of *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* based on 16S rRNA and *ldhD* gene-targeted multiplex PCR analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**: 231-236.
- Morgan, S., R.P. Ross y C. Hill.** 1997. Increasing starter cell lysis in Cheddar cheese using a bacteriocin-producing agent. *J. Dairy Sci.* **80**:110.
- Morrison, D., N. Woodford y B. Cookson.** 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. *J. App. Microbiol. Symposium Supplement.* **83**: 89S-99S.
- Moschetti, G., G. Blaiotta, F. Villani y S. Coppola.** 2000. Specific detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* with DNA primers identified by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 422-424.
- Moter, A. y U.B. Göbel.** 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods.* **41**: 85-112.
- Muller T., A. Ulrich, E.M. Ott y M. Muller.** 2001. Identification of plant-associated enterococci. *J. Appl. Microbiol.* **91**:268-278.
- Mundt, O.J.** 1986. Enterococci. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Volumen 2: pp. 1063-1065. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Mundy, L.M., D.F. Sahm y M. Gilmore.** 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 513 522.
- Murray, B.E.** 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 46-65.
- Muyzer, G.A., E.C. de Waal y A.G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695700.

- Naser, S.M., K.E. Hagen, M. Vancanneyt, I. Cleenwerck, J. Swings y T.A. Tompkins. 2006a.** *Lactobacillus suntoryeus* Cachat and Priest 2005 is a later synonym of *Lactobacillus helveticus* (Orla-Jensen 1919) Bergey *et al.* 1925 (Approved Lists 1980). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 355-360.
- Naser, S.M., M. Vancanneyt, B. Hoste, C. Snauwaert y J. Swings. 2006b.** *Lactobacillus cypricasei* Lawson *et al.* 2001 is a later heterotypic synonym of *Lactobacillus acidipiscis* Tanasupawat *et al.* 2000. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1681-1683.
- Naser, S.M., M. Vancanneyt, B. Hoste, C. Snauwaert, K. Vandemeulebroecke y J. Swings. 2006c.** Reclassification of *Enterococcus flavescens* Pompei *et al.* 1992 as a later synonym of *Enterococcus casseliflavus* (ex Vaughan *et al.* 1979) Collins *et al.* 1984 and *Enterococcus saccharominimus* Vancanneyt *et al.* 2004 as a later synonym of *Enterococcus italicus* Fortina *et al.* 2004. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 413-416.
- Nes, I.F., D.B. Diep y H. Holo, H. 2007.** Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* **189**: 1189-1198.
- Nes, I.F., D.B. Diep, L.S. Havarstein, M.B. Brurberg, V. Eijsink y H. Holo. 1996.** Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **70**: 113-128.
- Nes, I.F. y O. Johnsberg. 2004.** Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 100104.
- Nilsen, T., I.F. Nes y H. Holo, H. 2003.** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2975-2984.
- Nissen-Meyer, J. e I.F. Nes. 1997.** Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: Their function, structure, biogenesis and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* **167**: 67-77.
- Novella-Rodríguez, S., M.T. Veciana-Nogués, A.X. Roig-Sagués, A.J. Trujillo-Mesa y M.C. Vidal-Carou. 2004.** Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. *J. Dairy Res.* **71**: 245-252.
- Ogier, J.C. y P. Serror. 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**: 291-301.

- Ogier, J.C., O. Son, A. Gruss, P. Tailliez y A. Delacroix-Buchet.** 2002. Identification of the Bacterial Microflora in Dairy Products by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3691-3701.
- Ogier, J.C., V. Lafarge, V. Girard, A. Rault, V. Maladen, A. Gruss, J.-Y. Leveau y A. Delacroix-Buchet.** 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5628-5643.
- Olarte, C., S. Sanz, E. González-Fandos, y P. Torre.** 2000. The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goat's cheese (Cameros cheese).
- Osawa, R., T. Fujisawa y R. Pukall.** 2006. *Lactobacillus apodemi* sp. nov., a tannase-producing species isolated from wild mouse faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1693-1696.
- Østlie, H.M., L. Eliassen, A. Florvaag, y S. Skeie.** 2004. Phenotypic and PCR-based characterization of the microflora in Norvegia cheese during ripening. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 287-299.
- O'Sullivan, L., R.P. Ross y C. Hill.** 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* **84**: 593-604.
- Parayre, S., H. Falentin, M.-N. Madec, K. Sivieri, A.S. Le Dizes, D. Shoier y S. Lortal.** 2007. Easy DNA extraction method and optimization of PCR-Temporal temperature gradient gel electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. *J. Microbiol. Meth.* **69**: 431-441.
- Perdigón, G., M.E. Nader de Macias, S. Alvarez, G. Oliver y A.A. Pesce de Ruiz Holgado.** 1986. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect. Immun.* **53**: 404-410.
- Poh, C.L. y C.C. Yeo.** 1993. Recent advances in typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infect.* **24**: 175-181.
- Powell, I.B., M.C. Broome y G.K.I. Limsowtin.** 2002. Starter cultures: General aspects. En *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H. Roginsky, J. Fuquay y P.F. Fox (eds). Vol. 1: pp. 261-268. Academic Press, London.
- Power, E.G.M.** 1996. RAPD typing in microbiology-a technical review. *J. Hosp. Infect.* **34**: 247-265.
- Rademaker, J.L.W., J.D. Hoolwerf, A.A. Wagendorp y M.C. te Giffel.** 2006. Assessment of microbial population dynamics during yogurt and hard cheese

- fermentation and ripening by DNA population fingerprinting. *Int. Dairy J.* **16**: 457-466.
- Rademaker, J.L.W., M. Peinhopf, L. Rijnen, W. Bockelmann y W.H. Noordman.** 2005. The surface microflora dynamics of bacterial smear-ripened Tilsit cheese determined by T-RFLP DNA population fingerprint analysis. *Int. Dairy J.* **15**: 785-794.
- Randazzo, C.L., E.E. Vaughan y C. Caggia.** 2006. Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *Int. J. Food Microbiol.* **109**: 18.
- Randazzo, C.L., S. Torriani, A.D.L. Akkermans, W.M. de Vos y E.E. Vaughan.** 2002. Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1882-1892.
- Rantsiou, K., G. Comi y L. Cocolin.** 2004. The *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamics during food fermentations. *Food Microbiol.* **21**: 481-487.
- Ratray, F.P.** 2002. Secondary cultures. En *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H. Roginsky, J. Fuquay y P.F. Fox (eds). Vol. 1: pp. 275-281. Academic Press, London.
- Ray, B.** 1992. Bacteriocins of starter culture bacteria as biopreservatives: an overview. pp. 177-205. En *Food biopreservatives of microbial origin*. B. Ray y M. A. Daeschel (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Reid, G., M.E. Sanders, H.R. Gaskins, G.R. Gibson, A. Mercenier, R. Rastall, M. Roberfroid, I. Rowland, C. Cherbut y T.R. Klaenhammer.** 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* **37**: 105-118.
- Renouf, V., O. Claisse y A. Lonvaud-Funel.** 2006. *rpoB* gene: A target for identification of LAB cocci by PCR-DGGE and melting curves analysis in real-time PCR. *J. Microbiol. Meth.* **67**: 162-170.
- Riley, M.A. y J.E. Wertz.** 2002. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie.* **84**: 357-364.
- Rodas, A.M., E. Chenoll, M.C. Macián, S. Ferrer, I. Pardo y R. Aznar.** 2006. *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 513-517.

- Rogers, L.A.** 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* **16**: 321-325.
- Ross, R.P., S. Morgan y C. Hill.** 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int J Food Microbiol.* **79**: 3-16.
- Rossetti, L., y G. Giraffa.** 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *J. Microbiol. Methods.* **63**: 135-44.
- Sahl, H.G., R.W. Jack y G. Bierbaum.** 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur J Biochem.* **230**: 827-853.
- Sánchez, J. I., L. Rossetti, B. Martínez, A. Rodríguez y G. Giraffa, G.** 2006. Application of reverse transcriptase PCR-based T-RFLP to perform semi-quantitative analysis of metabolically active bacteria in dairy fermentations. *J. Microbiol. Meth.* **65**: 268-277.
- Sarantinopoulos, P., C. Andrighetto, M.D. Georgalaki, M.C. Rea, A. Lombardi, T.M. Cogan, G. Kalantzopoulos y E. Tsakalidou.** 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int. Dairy J.* **11**: 621-647.
- Sarantinopoulos P., G. Kalantzopoulos y E. Tsakalidou.** 2002. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **76**: 93-105.
- Schaberg, D.R. y R.P. Gaynes.** 1991. Major trends in microbial etiology of nosocomial infection. *Am. J. Med.* **91**: 72-75.
- Schleifer, K.H., J. Kraus, C. Dvorak, R. Kilpper-Balz, M.D. Collins y W. Fischer.** 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst Appl Microbiol.* **6**: 183-195.
- Schleifer, K.H., M. Ehrmann, C. Beimfohr, E. Brockmann, W. Ludwig y R. Amann.** 1995. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **5**: 1081-1094.
- Schleifer, K.H. y R. Kilpper-Balz.** 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 31-34.
- Schleifer, K.H. y W. Ludwig.** 1995. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System. Appl. Microbiol.* **18**: 461-467.

- Schwieger, F. y C.C. Tebbe.** 1998. A New Approach To Utilize PCR Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 4870-4876.
- Silla-Santos, M.H.** 1996. Biogenic amines: their importance in foods. Int. J. Food Microbiol. **29**: 213-231.
- Soler, J.J., M. Martín-Vivaldi, M. Ruiz-Rodríguez, E. Valdivia, A.M. Martín-Platero, M. Martínez-Bueno, J.M. Peralta-Sánchez y M. Méndez.** 2008. Symbiotic association between hoopoes and antibiotic-producing bacteria that live in their uropygial gland. Funct. Ecol. **22**: 864-871.
- Stach, J.E.M., S. Bathe, J.P. Clapp y R.G. Burns.** 2001. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. FEMS Microbiol. Ecol. **36**: 139-151.
- Stratton, J.E., R.W. Hutkins y S.L. Taylor.** 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods. J. Food Prot. **54**: 460-470.
- Sutherland, B.J.** 2002. Salting of cheese. En Encyclopaedia of Dairy Sciences. H. Roginsky, J. Fuquay y P.F. Fox (eds). Vol. 1: pp. 314-320. Academic Press, London.
- Suzuki, M., M.S. Rappé y S.J. Giovannoni.** 1998. Kinetic Bias in Estimates of Coastal Picoplankton Community Structure Obtained by Measurements of Small-Subunit rRNA Gene PCR Amplicon Length Heterogeneity. **64**: 4522-4529.
- Svec, P., M. Vancanneyt, I. Sedláček, S.M. Naser, C. Snauwaert, K. Lefebvre, B. Hoste y J. Swings.** 2006. *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: 577-581.
- Swearingen, P.A., D.J. O'Sullivan, J.J. Warthesen.** 2001. Isolation, characterization, and influence of native, nonstarter lactic acid bacteria on Cheddar cheese quality. J. Dairy Sci. **84**: 50-59.
- Tannock, G.W.** 2004. A Special Fondness for Lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 3189-3194.
- Ten Brick B., C. Damink, H.M.L.J. Joosten y J.H.J. Huis in't Veld.** 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. Int. J. Food Microbiol. **11**: 73-84.
- Teuber, M.** 1995. The genus *Lactococcus*. En The Lactic Acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria. B.J.B. Wood y W.H. Holzapfel (eds). pp. 173-234. Blackie Academic, Glasgow, Scotland.

- Teuber, M.** 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 493-499.
- Thiercelin, M.E.** 1899. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. *C. R. Séances Société Biologie.* **5**: 269-271.
- Thiercelin, M.E y L. Jouhaud.** 1903. Reproduction de l'entérocoque; taches centrales; granulations périphériques et microblastes. *C. R. Séances Société Biologie.* **55**: 686-688.
- Torriani, S., G. Zapparoli, y F. Dellaglio.** 1999. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 4351-4356.
- Torriani, S., G.E. Felis y F. Dellaglio.** 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3450-3454.
- Treitman, A.N., P.R. Yarnold, J. Warren y G.A. Noskin.** 2005 Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). *J. Clin. Microbiol.* **43**: 462-463.
- van Belkum, M.J. y M.E. Stiles.** 2000. Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **4**: 323-335.
- Vancanneyt, M., M. Zamfir, L.A. Devriese, K. Lefebvre, K. Engelbeen, K. Vandemeulebroecke, M. Amar, L. de Vuyst, F. Haesebrouck y J. Swings.** 2004. *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 2175-2179.
- Vancanneyt, M., M. Zamfir, M. de Wachter, I. Cleenwerck, B. Hoste, F. Rossi, F. Dellaglio, L. de Vuyst y J. Swings.** 2006b. Reclassification of *Leuconostoc argentinum* as a later synonym of *Leuconostoc lactis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 213-216.
- Vancanneyt, M., S.M. Naser, K. Engelbeen, M. De Wachter, R. van der Meulen, I. Cleenwerck, B. Hoste, L. de Vuyst y J. Swings.** 2006a. Reclassification of *Lactobacillus brevis* strains LMG 11494 and LMG 11984 as *Lactobacillus parabrevis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1553-1557.
- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters y J. Swings.** 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiol. Rev.* **60**: 407-438.

- Vanechoutte, M., R. Rossau, P. De Vos, M. Gillis, D. Janssens, N. Paepe, A. De Rouck, T. Fiers, G. Claeys y K. Kersters.** 1992. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* **72**: 227-233.
- van Hylckama Vlieg, J., J. Rademaker, H. Bachmann, D. Molenaar, W. Kelly, y R.J. Siezen.** 2006. Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis* *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**: 1-8.
- Veciana-Nogués, M.T., S. Bover-Cid, A. Mariné-Font y M.C. Vidal-Carou.** 2004. Biogenic amine production by *Morganella morganii* and *Klebsiella oxytoca* in tuna. *Eur. Food Res. Technol.* **218**: 284-288.
- Vermeiren, L., F. Devlieghere y J. Debevere.** 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **96**: 149-164.
- Vernozy-Rozand, C., C. Mazuy-Cruchaudet, C. Bavai, M.P. Montet, V. Bonin, A. Dernburg e Y. Richard.** 2005. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **105**: 83-88.
- Versalovic, J., T. Koeuth y J.R. Lupski.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Acid Res.* **19**: 6823-6831.
- Viscardi, M., R. Capparelli, R. di Matteo, D. Carminati, G. Giraffa y D. Iannelli.** 2003. Selection of bacteriophage-resistant mutants of *Streptococcus thermophilus*. *J. Microbiol. Meth.* **55**: 109-119.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. Zabeau.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acid Res.* **23**: 4407-4414.
- Walsh, F.M. y S.G.B. Amyes.** 2004. Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 439-444.
- Ward, L. J. H., J.C.S. Brown y G.P. Davey.** 1995. Detection of dairy *Leuconostoc* strains using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**: 204-208.
- Ward, L.J.H., J.C.S. Brown, y G.P. Davey.** 1995 Detection of dairy *Leuconostoc* strains using the polymerase chain reaction *Lett. Appl. Microbiol.* **20**: 204-208.
- Weigel, L.M., D.B. Clewell, S.R. Gill, N.C. Clark, L.K. McDougal, S.E. Flannagan, J.F. Kolonay, J. Shetty, G.E. Killgore y F.C. Tenover FC.** 2003. Genetic

- analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science 302: 1569-1571.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier y D.J. Lane.** 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. J. Bacteriol. **173**: 697-703.
- Welman, A.D., e I.S. Maddox.** 2003. Fermentation performance of an exopolysaccharide-producing strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **30**: 661-668.
- Widjoatmodjo, M.N., A.C. Fluit y J. Verhoef.** 1996. Molecular identification of bacteria by fluorescence-based PCR-singlestrand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. J. Clin. Microbiol. **33**: 2601-2606.
- Willems, R.J., J. Top, M. van Santen, D.A. Robinson, T.M. Coque, F. Baquero, H. Grundmann y M.J. Bonten.** 2005. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. Emerg. Infect. Dis. **11**: 821-828.
- Williams A.M., U.M. Rodrigues y M.D. Collins.** 1991. Intra-generic relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small sub-unit rRNA. Res Microbiol. **142**: 677-684.
- Williams, G., A. Kibelik, K. Libak, A. Rafalski y S. Tingey.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. Nucleic Acids Res. **18**: 6531-6535.
- Witte, W., R. Wirth e I. Klare.** 1999. Enterococci. Chemother. **45**: 135-145.
- Wong, A.C.L.** 1998. Biofilms in Food Processing Environments. J. Dairy Sci. **81**: 2765-2770.
- Wouters, J.T.M., E.H.E. Ayad, J. Hugenholtz y S. Smit.** 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. Int. Dairy J. **12**: 91-109.

CAPÍTULO II

Material y Métodos

1. MEDIOS DE CULTIVO

La composición de los medios utilizados, a menos que se indique lo contrario, se expresa en gramos por litro de agua o tampón. Cuando fue preciso el uso de medios sólidos se adicionó agar al 1,5 % (p/v). Los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, siguiendo las indicaciones de las casas comerciales, excepto el medio M-17 adicionado de glucosa al 1 % que se esterilizó en autoclave a 110 °C durante 15 minutos.

1.1. Medios de crecimiento

Medio Man Rogosa Sharpe (MRS, Scharlau):

Proteosa-peptona	10
Extracto de carne	8
Extracto de levadura	4
D-glucosa	20
Acetato sódico	5
Citrato triamónico	2
Sulfato magnésico	0,2
Sulfato de manganeso	0,05
Fosfato dipotásico	2
Polisorbato 80	1

Medio de Infusión de Cerebro Corazón (BHI, Scharlau):

Extracto de cerebro	12,5
Extracto de corazón	5
Peptona	10
Cloruro sódico	5
Fosfato disódico	2,5
Dextrosa	2

Medio M-17 (Scharlau):

Triptona	2,5
Peptona de carne.	2,5
Peptona de soja	5
Extracto de levadura	2,5
Extracto de carne	5
Glicerofosfato sódico	19
Sulfato magnésico	0,25
Ácido ascórbico	0,5
Lactosa	5

Medio GM-17:

Se preparó adicionando glucosa al 1 % al medio M-17.

Medio APT (Scharlau):

Peptona de caseína	10
Extracto de levadura	7,5
Cloruro sódico	5
Fosfato potásico	5
Citrato sódico	5
Dextrosa	10
Sulfato magnésico	0,8
Cloruro de manganeso	0,14
Sulfato férrico	0,04
Tiamina-HCl	0,001
Carbonato sódico	1,25

Medio de medio de tripticaseína y soja (TSB, Scharlau):

Peptona de caseína	17
Peptona de soja	3
Cloruro sódico	5
Fosfato dipotásico	2,5
Dextrosa	2,5

Medio Kenner Fecal (KF, Scharlau):

Proteosa-peptona	10
Extracto de levadura	10
Cloruro sódico	5
Glicerofosfato sódico	10
Maltosa	20
Lactosa	1
Azida sódica	0,4
Púrpura de bromocresol	0,015

Medio Rothe (Scharlau):

Peptona de carne	10
Peptona de caseína	10
Dextrosa	5
Cloruro sódico	5
Fosfato dipotásico hidratado	2,7
Fosfato potásico dihidratado	2,7
Azida sódica	0,2

Medio Voguel-Johnson (Scharlau):

Peptona de caseína	10
Extracto de levadura	5
Manitol	10
Fosfato dipotásico	5
Cloruro de litio	5
Glicina	10
Rojo fenol	0,025

Medio Baird Parker (Scharlau):

Extracto de carne	5
Extracto de levadura	1
Glicina	12
Cloruro de litio	5
Peptona de caseína	10
Piruvato sódico	10

Medio MacConkey (Scharlau):

Peptona	20
Lactosa	10
Sales biliares	5
Cloruro sódico	5
Rojo neutro	0,025

1.2. Medios empleados para el ensayo de la actividad antibacteriana**Medio GM-17 tamponado (GM-17-T):**

Se utilizó para los ensayos de producción en medio sólido.

M-17 caldo	42
Glucosa	10
Agar	15
Tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7	1000 ml

Medio BHA blando:

Se empleó en las sobrecapas utilizadas para cubrir la capa base una vez inoculado con la bacteria indicadora.

BHI	18,5
Agar	8
Tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7	1000 ml

1.3. Medios empleados para la conservación de microorganismos

Las cepas empleadas en este trabajo se conservaron congeladas en glicerol al 35 % a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y/o $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, partiendo para ello de cultivos en medio líquido en fase logarítmica de crecimiento. De esta forma se evita la pérdida de caracteres genéticos que pueden ocurrir debido a las sucesivas resiembras.

1.4. Tampones

Tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M (Solución X)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 M (Solución Y)

Se mezclan 30,5 ml de solución X con 19,5 ml de solución Y completando con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml (Gomori, 1955).

2. TITULACIÓN Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

En este trabajo se analizaron 4 variedades distintas de quesos, elaborados con leche cruda de cabra. Estos quesos fueron suministrados por diferentes industrias locales: Cueva de la Magahá (Jayena, Granada), Quesaila Arochena (Aracena, Huelva), Torta Arochena (Aracena, Huelva), y Alberquilla (Alpujarra, Granada). Sólo el queso de la Alberquilla, además de leche de cabra contiene leche cruda de oveja. En la Figura 1 se muestra la estrategia llevada a cabo para el estudio de la diversidad microbiana de los diferentes quesos estudiados.

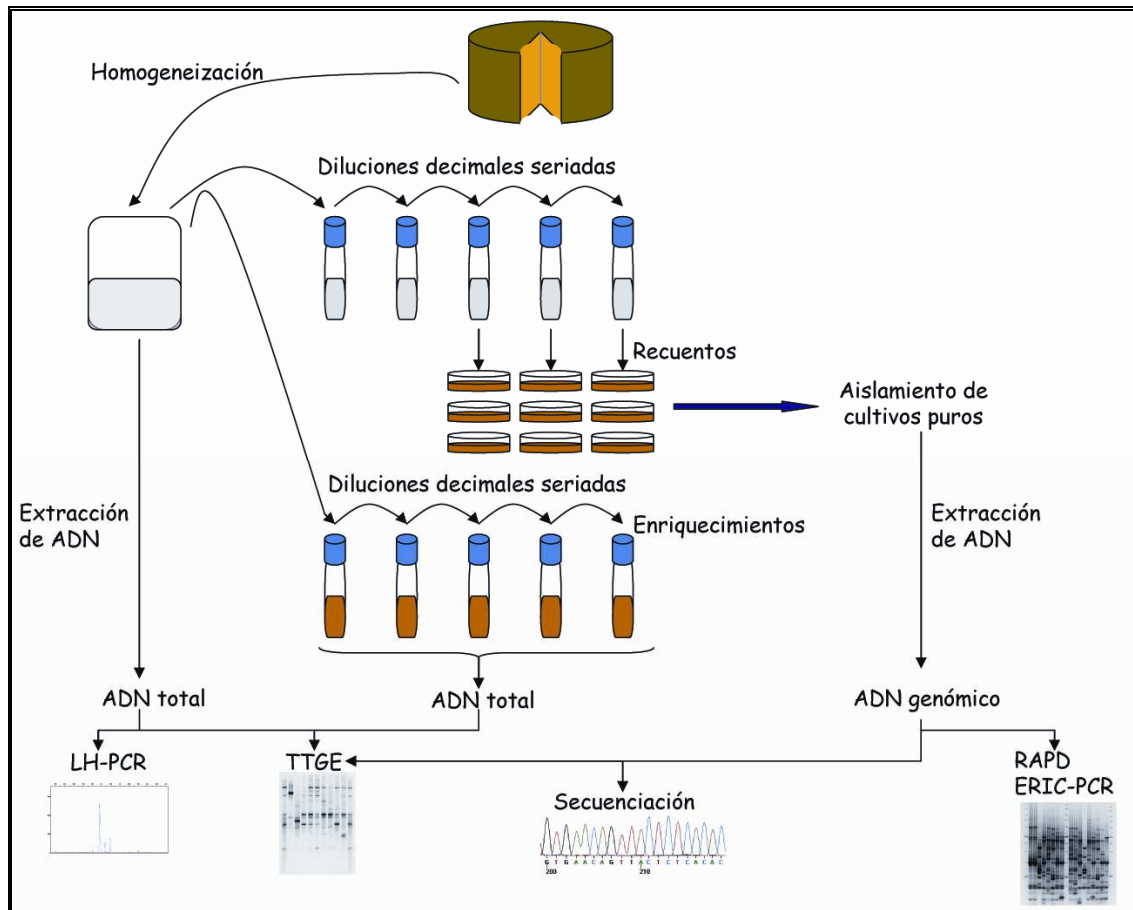


Fig. 1. Estrategia empleada en el estudio de la diversidad microbiana de los quesos.

2.1. Titulación de microorganismos mediante recuentos en medios sólidos

Para el análisis microbiológico se tomaron en condiciones asépticas 10 g de queso que posteriormente se homogeneizaron en un masticador (IUL Instruments, Barcelona) con 90 ml de citrato sódico 2% precalentado a 37 °C durante 2 minutos en una bolsa estéril de plástico con filtro lateral. Del homogeneizado resultante se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina (NaCl 0,8%) hasta la 10^{-8} . De estas diluciones se sembraron por triplicado alícuotas de 100 μ l en medios sólidos para el recuento bacteriano. Las placas se incubaron en aerobiosis a 28 °C entre 4 y 7 días.

Medios de cultivo utilizados para el recuento y aislamiento de microorganismos:

- APT-agar, M-17 agar y BHA para la estimación de microorganismos mesófilos totales.
- MRS-agar para el recuento de bacterias del ácido láctico (BAL).
- Kenner Fecal-agar (KFA) para el recuento de enterococos.
- Voguel-Johnson agar y Baird Parker para la estimación de estafilococos.
- MacConkey agar para enterobacterias.

En todos los casos, se analizaron tres lotes y se calculó la media y la desviación estándar de los correspondientes recuentos.

De los diferentes medios de cultivo, se aislaron al azar entre 10 y 20 colonias para su caracterización inicial mediante la tinción de Gram y la prueba de la catalasa.

En el caso del queso Cueva de la Magahá, se tomaron muestras correspondientes a tres periodos de maduración distintos: 1, 17 y 34 semanas respectivamente. En el resto de los quesos estudiados, sólo se analizaron muestras de los quesos maduros, listos para su consumo.

2.2. Titulación de microorganismos mediante recuentos en medios líquidos

En algunos casos, como cuando no fue posible titular los microorganismos mediante su recuento en placa, la titulación se realizó de forma semicuantitativa, mediante el enriquecimiento en caldo (Rothe, MRS) de cada una de las diferentes diluciones. Estos medios se incubaron 48 h a 28 °C, y posteriormente se recogieron fracciones de 1 ml para su análisis mediante amplificación por PCR o electroforesis en gradiente temporal de temperatura (TTGE).

3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

3.1. Técnica de la doble capa

Para detectar la producción de bacteriocinas se empleó la técnica de la doble capa (Gratia y Fredericq, 1946), utilizando como medio base el agar GM-17 tamponado. Sobre esta base se sembraron las estirpes a ensayar y se incubó a 37 °C durante 16-24 horas. A continuación se cubrieron con 6 ml de una sobrecapa de BHA blando inoculada al 2 % con un cultivo de una noche de la bacteria indicadora. Una vez solidificada la sobrecapa se volvió a incubar para permitir el crecimiento de la bacteria indicadora, observando entonces la posible aparición de zonas de inhibición del crecimiento en torno a las bacterias crecidas en la placa base (Fig. 2).

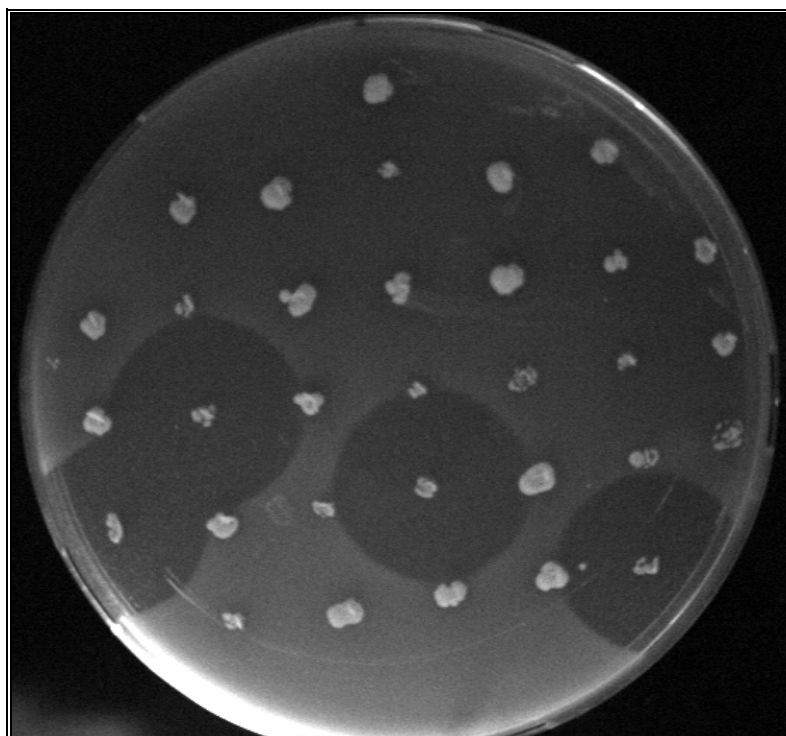


Fig. 2. Halos de inhibición obtenidos mediante la técnica de la doble capa.

4. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE ADN

4.1. Extracción de ADN genómico

El método de extracción de ADN utilizado, tanto para los aislados bacterianos como para las comunidades microbianas, se desarrolló específicamente en esta Memoria, por lo que ocupa un capítulo de resultados en la presente tesis (capítulo III). No obstante el procedimiento se resume a continuación.

- Las células procedentes de un cultivo de 5 ml en fase estacionaria se resuspendieron en 100 μ l de solución I (adicionada de lisozima 10 mg/ml, mutanolisina 100 U/ml y ARNasa 40 μ g/ml), y se incubaron durante 30 min a 37 °C.
- A continuación se añadieron 600 μ l de solución II, dejando actuar 5-10 min y agitando por inversión suave. Se puede tratar el lisado celular con 10 μ l de pronasa o proteinasa K (10 mg/ml) e incubar durante 15 min a 37 °C para aumentar la pureza del ADN, aunque este tratamiento no es imprescindible y se puede omitir.
- Posteriormente se incubaron durante 5 min. a 80 °C y de 5 a 10 min. a temperatura ambiente para potenciar la lisis celular, aumentar el rendimiento en ADN e inactivar los enzimas líticas (lisozima-mutanolisina o proteasa) presentes.
- Seguidamente, se adicionaron 200 μ l de solución III, agitándose en vortex durante 10-15 seg, e incubándose en hielo durante 10-15 min.
- Después de centrifugar 15 min a 14.000 rpm, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga, y el ADN se precipitó con un volumen de isopropanol (aprox. 600 μ l), agitándose por inversión repetidas veces.
- Tras centrifugar, el precipitado se lavó con etanol al 70 % y, una vez seco, se resuspendió en 200 μ l de agua milliQ o 0,5 \times TE (Tris-ClH 10 mM pH 8, EDTA 1 mM).
- Las muestras (5-7 μ l) se pueden analizar mediante electroforesis en gel de agarosa o determinar su concentración mediante absorción a 260 nm.

4.2. Determinación de la concentración de ADN

La determinación de la concentración de ADN de una solución se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico descrito por Sambrook y colaboradores (1989). Se determinó la absorbancia de la solución de ADN a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Pharmacia LKB Ultraespec III utilizando como blanco agua destilada o TE, dependiendo del vehículo utilizado en la disolución del ácido nucleico. La concentración de la muestra se calculó respecto al valor estándar de $A_{260}=1$ para soluciones que contienen 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de cadena doble. La relación A_{260}/A_{280} sirvió para comprobar la pureza de la preparación, considerándose que valores por debajo de 1,8 son indicadores de contaminación por proteínas.

Para estimaciones menos precisas o con muestras de baja concentración, se empleó el método de la comparación de la fluorescencia emitida bajo luz ultravioleta de la muestra desarrollada en un gel de agarosa y teñida con bromuro de etidio con la del ADN del fago lambda digerido con *Hind* III, empleado como marcador de tamaño y concentración conocidos.

5. AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador iCycler 170-8720 (Biorad) o Mastercycler (Eppendorf). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de PCR se describen en la Tabla 1. Todos ellos fueron suministrados por Pharmacia Biotech o Thermo. Las ADN polimerasas utilizadas fueron la MasterTaq (Eppendorf) o Taq polimerasa (MBL), según los propósitos.

A continuación se describen las condiciones utilizadas en cada caso.

Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los cebadores generales empleados.

Cebador	Secuencia	Prueba
M13	5'- GAGGGTGGCGTTCT -3'.	RAPD (Williams <i>et al.</i> , 1990; Huey and Hall, 1989)
ERIC-1R	5'- ATGTAAGCTCCTGGGATTAC -3'	ERIC-PCR (Versalovic <i>et al.</i> , 1991)
27f	5'- AGAGTTTGATCM* TGGCTCAG -3'	ADNr 16 S
1492R	5'- TACGGY† TACCTTGTTACGACTT -3'	(Manero y Blanch, 2002)
WO1	5'- AGAGTTTGATCM* TGGCTC -3'	ADNr 16S
WO12	5'- TACGCATTTACCK‡ CTACA -3'	(Ogier <i>et al.</i> , 2002)
338f-GC	5'- CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGG CACGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG -3'	TTGE (Ben Omar y Ampe, 2000)
518r	5'- ATTACCGCGGCTGCTGG -3'	
HDA1-GC	5'- CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT -3'	TTGE (Ogier <i>et al.</i> , 2002)
HDA2	5'- GTATTACCGCGGCTGCTGGCA -3'	
rpoB1698f-GC	5'- CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCCCCGCGG CCCCCGCCCCAACATCGGTTTGATCAAC -3'	TTGE (<i>rpoB</i>) (Dahllöf <i>et al.</i> , 2000)
rpoB2041r	5'- CGTTGCATGTTGGTACCCAT -3'	
R16-1F:	5'- CTTGTACACACCGCCCGT CA -3'	LH-PCR
LbLMA1-R(6-FAM)	5'- CTCAAAACATAAACAAAGTTTC -3'	(Dubernet <i>et al.</i> , 2002)

5.1. Amplificación al azar de fragmentos de ADN polimórfico (RAPD)

Con el fin de tipificar genéticamente los diferentes aislados bacterianos se aplicó la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) (Randomly Amplified Polymorphic DNA) descrita por Williams *et al.*, (1990), que permite generar un patrón de bandas característico de cada cepa.

La composición general de la mezcla de amplificación fue la siguiente:

* M= A + C

† Y= C + T

‡ K= G + T

Compuesto	Concentración
ADN molde	100 ng
Cebador M13	1 μ M
dNTPs	400 μ M
Tampón de la Taq polimerasa	1 \times
Cloruro magnésico	3 mM
Taq polimerasa	1 U
Volumen final	50 μ l

Condiciones de amplificación:

C₀) Desnaturalización inicial: 94 °C, 1 min.

C₁) Desnaturalización: 94 °C, 1 min.

C₂) Hibridación: 40 °C 20 seg (bajada hasta los 40 °C y subida hasta los 72 °C en rampa a 0,6 °C/seg.)

C₃) Extensión: 72 °C, 1 min. y 20 seg.

El número de ciclos fue de 35 (incluidos C₁ a C₃).

C₄) Terminación: 72 °C, 5 min.

5.2. Amplificación por PCR de secuencias intergénicas *consensus* y repetidas de enterobacterias (ERIC-PCR)

En el caso de enterococos, la tipificación genética se completó mediante ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR) (Versalovic *et al.*, 1991), técnica que igualmente proporciona un patrón de bandas característico de cada cepa. En este caso, las condiciones de amplificación son mucho más restrictivas.

La composición general de la mezcla de amplificación fue la siguiente:

Compuesto	Concentración
ADN molde	50 ng
Cebador ERIC1-R	1 μ M
dNTPs	400 μ M
Tampón de la Taq polimerasa	1 \times
Cloruro magnésico	3 mM
Taq polimerasa	1 U
Volumen final	25 μ l

Condiciones de amplificación:

C₀) Desnaturalización inicial: 94 °C, 3 min.

C₁) Desnaturalización: 94 °C, 30 seg.

C₂) Hibridación: 48 °C, 1 min.

C₃) Extensión: 72 °C, 5 min.

El número de ciclos fue de 35 (incluidos C₁ a C₃).

C₄) Terminación: 72 °C, 7 min.

5.3. Amplificación y secuenciación del gen correspondiente del gen responsable del ARNr 16S

La identificación de las diferentes cepas se realizó mediante la amplificación de los genes ADNr 16S correspondientes. Para ello se emplearon las parejas de cebadores WO1-WO12, que incluyen las regiones variables V1-V4 o bien las parejas 27f-1492r. Los productos de PCR obtenidos, de aproximadamente 700 o 1.500 pb respectivamente, se purificaron mediante el “Accuprep PCR Purification kit” (Bionner) según las instrucciones del fabricante. La secuenciación de los mismos se realizó en el servicio de secuenciación del Departamento de Genética de la Universidad de Granada, en un analizador genético “ABI Prism 310 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems).

Todas las secuencias obtenidas fueron analizadas en la base de datos del NCBI o EMBL mediante la herramienta BLAST o FASTA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>;

<http://www.ebi.ac.uk>) (Altschul *et al.*, 1997), cuyos resultados de similaridad entre secuencias se basan en los alineamientos locales de las mismas.

Esta técnica también se utilizó para la amplificación de los ADNr 16S de las comunidades microbianas del queso. En este caso, el producto de la PCR resultante, se usó después como molde para una segunda PCR (PCR anidada) (Fig. 3), al objeto de amplificar exclusivamente la región variable V3 para su análisis posterior mediante electroforesis desnaturizante en gradiente temporal de temperatura (TTGE).

En la primera PCR la composición general de la mezcla de amplificación fue la siguiente:

Compuesto	Concentración
ADN molde	100 ng
Oligonucleótido WO1	1 μ M
Oligonucleótido WO12	1 μ M
dNTPs	400 μ M
Tampón de la Taq polimerasa	1 \times
Cloruro magnésico	2 mM
Taq polimerasa:	1,5 U
Volumen final	50 μ l

Las condiciones de PCR para la amplificación con los oligonucleótidos WO1 y WO12 fueron:

C₀) Desnaturalización inicial: 94 °C, 4 min.

C₁) Desnaturalización: 94 °C, 30 seg.

C₂) Hibridación: 50 °C, 30 seg.

C₃) Extensión: 72 °C, 1 min.

El número de ciclos fue de 30 (incluidos C₁ a C₃).

C₄) Terminación: 72 °C, 2 min.

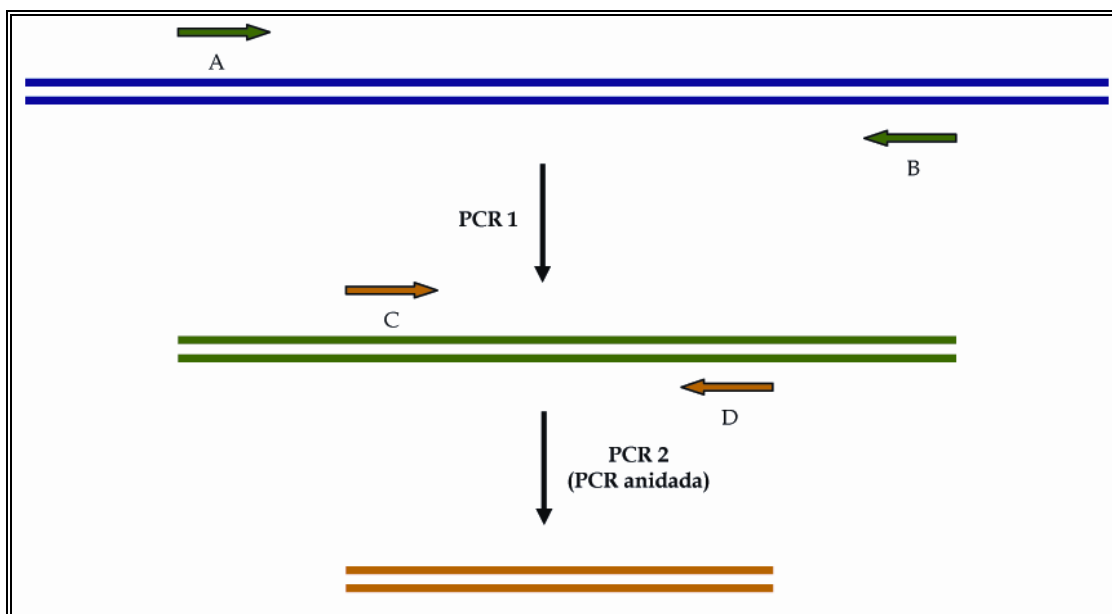


Fig. 3. Representación esquemática de una PCR anidada.

Tras esta primera PCR se realizaron dos PCR anidadas diferentes, ambas para amplificar la región variable V3 del gen 16S. En la primera de ellas la composición general de la mezcla de amplificación fue la siguiente:

Compuesto	Concentración
ADN molde de la PCR 1	1 μ l
Oligonucleótido 338f-GC	1 μ M
Oligonucleótido 518r	1 μ M
dNTPs	400 μ M
Tampón de la Taq polimerasa	1 \times
Cloruro magnésico	2,5 mM
Taq polimerasa	1,5 U
Volumen final:	50 μ l

Las condiciones de PCR para la amplificación con los oligonucleótidos 338f-GC y 518r fueron:

- C₀) Desnaturalización inicial: 94 °C, 3 min.
 C₁) Desnaturalización: 94 °C, 1 min.
 C₂) Hibridación: 55 °C, 1 min.
 C₃) Extensión: 72 °C, 3 min.
 El número de ciclos fue de 30 (incluidos C₁ a C₃).
 C₄) Terminación: 72 °C, 10 min.

En la segunda PCR anidada realizada la composición general de la mezcla de amplificación fue la siguiente:

Compuesto	Concentración
ADN molde de la PCR 1	1 µl
Oligonucleótido HDA1-GC	1 µM
Oligonucleótido HDA2	1 µM
dNTPs	400 µM
Tampón de la Taq polimerasa	1×
Cloruro magnésico	2 mM
Taq polimerasa	1,5 U
Volumen final:	50 µl

Las condiciones de PCR para la amplificación con los oligonucleótidos HDA1-GC y HDA2 fueron:

- C₀) Desnaturalización inicial: 94 °C, 1 min.
 C₁) Desnaturalización: 94 °C, 30 seg.
 C₂) Hibridación: 52 °C, 30 seg.
 C₃) Extensión: 72 °C, 30 seg.
 El número de ciclos fue de 30 (incluidos C₁ a C₃).
 C₄) Terminación: 72 °C, 5 min.

5.4. Amplificación del gen *rpoB*

Sobre la base de los alineamientos múltiples realizados con las secuencias del gen *rpoB* y las secuencias disponibles en la base de datos GenBank, se seleccionaron cebadores específicos para el estudio de la biodiversidad microbiana de comunidades de queso mediante TTGE (Dahllöf *et al.*, 2000).

La composición general de la mezcla de amplificación fue la siguiente:

Compuesto	Concentración
ADN molde	100 ng
Oligonucleótido rpoB1698f-GC	1 μ M
Oligonucleótido rpoB2041r	1 μ M
dNTPs	400 μ M
Tampón de la Taq polimerasa	1 \times
Cloruro de magnesio	2 mM
Taq polimerasa	1,5 U
Volumen final:	50 μ l

Las condiciones de PCR para la amplificación con los oligonucleótidos fueron las siguientes:

C₀) Desnaturalización inicial: 94 °C, 2 min.

C₁) Desnaturalización: 94 °C, 1 min.

C₂) Hibridación: 46 °C, 1 min.

C₃) Extensión: 72 °C, 30 seg.

El número de ciclos fue de 30 (incluidos C₁ a C₃).

C₄) Terminación: 72 °C, 5 min.

5.5. PCR de tamaño variable (LH-PCR)

Sobre la base de los alineamientos múltiples de las secuencias intergénicas de los genes ribosomales del género *Lactobacillus* (Dubernet *et al.*, 2002), se utilizó una pareja de cebadores correspondientes al extremo 3' del ADNr 16S (directo) y de la región intergénica entre el ADNr 16S y 23S (reverso) en una reacción de amplificación. Si además, uno de estos cebadores se marca en 5' con 6-FAM, se pueden diferenciar poblaciones de lactobacilos en una mezcla compleja mediante LH-PCR (Length Heterogeneity PCR). Los productos de PCR obtenidos se desnaturalizaron calentando en presencia de formamida y su tamaño fue determinado mediante electroforesis capilar en un analizador genético ABI Prism 310 (Applied Biosystems), en el servicio de secuenciación del departamento de Genética de la Universidad de Granada. El tamaño de los picos obtenidos (tamaño de los fragmentos) se calculó mediante interpolación con un marcador interno.

Composición general de la mezcla de amplificación para la LH-PCR:

Compuesto	Concentración
ADN molde	50 ng
Oligonucleótido R16-1F	0,5 μ M
Oligonucleótido LbLMA1-R	0,5 μ M
dNTPs	400 μ M
Tampón de la Taq polimerasa	1 \times
Cloruro de magnesio	2 mM
Taq polimerasa	1 U
Volumen final:	25 μ l

Las condiciones de PCR para la amplificación con los oligonucleótidos R16-1F y LbLMA1-R(6-FAM) fueron las siguientes:

- C₀) Desnaturalización inicial: 94 °C, 3 min.
- C₁) Desnaturalización: 94 °C, 30 seg.
- C₂) Hibridación: 55 °C, 30 seg.

C₃) Extensión: 72 °C, 30 seg.

El número de ciclos fue de 30 (incluidos C₁ a C₃).

C₄) Terminación: 72 °C, 5 min.

5.6. Identificación genética mediante PCR

La identificación genética mediante PCR específica se realizó sobre cada una de las cepas que formaban los distintos grupos generados por RAPD o ERIC-PCR. Previamente cada grupo o genotipo había sido identificado por secuenciación del ADNr 16S.

La composición general de estas mezclas de amplificación fue la siguiente:

Compuesto	Concentración
ADN molde	50 ng
Oligonucleótido específico 1	0,5 µM
Oligonucleótido específico 2	0,5 µM
dNTPs	400 µM
Tampón de la Taq polimerasa (10x)	1×
Cloruro de magnesio	2 mM
Taq polimerasa	1 U
Volumen final:	25 µl

Los oligonucleótidos empleados así como las condiciones de PCR para la identificación de las diferentes especies se muestran en la Tabla 2.

5.7. Amplificación mediante PCR de genes de virulencia

La presencia de algunos genes de virulencia descritos en el género *Enterococcus* (Tabla 3) (Lemcke y Bülte, 2000; Ben Omar *et al.*, 2004; Creti *et al.*, 2004; Vankerckhoven *et al.*, 2004) se estudiaron mediante amplificación de los mismos por

Tabla 2. PCRs específicas empleadas para la identificación de microorganismos.

OLIGONUCLEÓTIDOS	ESPECIFICIDAD	TAMAÑO DEL PRODUCTO	CONDICIONES DE PCR	REFERENCIA
WO1_for: 5'-AGAGTTTGATC(AC)TGGCTC-3' WO12_rev: 5'-TACGCATTTACC(GT)CTACA-3'	Gen 16 S	700 pb	94°C 4 min, (94°C 30 seg, 50°C 30 seg, 72°C 1 min)x30, 72°C 2 min	Ogier <i>et al.</i> , 2002
Lacto1; 5'-GTAACACTACGAGAAAGGG-3' Lacto2; 5'-ATCTCTAGGAATAGCAC-3'	<i>Lactococcus</i>	533 pb	94°C 1 min, (94°C 1 min, 49°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Deasy <i>et al.</i> , 2000
Entero1; 5'-CCCGGCTCAACCGGG-3' Entero2; 5'-CTCTAGAGTGGTCAA-3'	<i>Enterococcus</i>	404 pb	94°C 1 min, (94°C 1 min, 47°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Deasy <i>et al.</i> , 2000
R16-1F; 5'-CTTGTACACACCGCCCGTCA-3' LbLMA1-R; 5'-CTCAAAACTAAACAAAGTTTC-3'	<i>Lactobacillus</i>	200-250 pb	94°C 3 min, (94°C 30 seg, 55°C 30seg, 72°C 30 seg)x30, 72°C 5 min	Dubenert <i>et al.</i> , 2002
ddl-E1; 5'-ATCAAGTACAGTTAGTCTT-3' ddl-E2; 5'-ACGATTCAAAGCTAACTG-3'	<i>E. faecalis</i>	940 pb	94°C 1 min, (94°C 1 min, 47°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Dutka-Malen <i>et al.</i> , 1995
FAC1-1; 5'-GAGTAAATCACTGAACGA-3' FAC2-1; 5'-CGCTGATGGTATCGATTCAT-3'	<i>E. faecium</i>	1091 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Depardieu <i>et al.</i> , 2004
DuHiF; 5'-TTATGTCCCTGTTTTGAAAAATCAA-3' HiR; 5'-TTTTGTAGACCTCTTCCGGA-3'	<i>E. hirae</i>	377 pb	94°C 2 min, (94°C 45 seg, 50°C 30 seg, 72°C 45 seg)x30, 72°C 5 min	Knijff <i>et al.</i> , 2001
DuHiF; 5'-TTATGTCCCTGTTTTGAAAAATCAA-3' DuR; 5'-TGAATCATATTGGTATGCAGTCCG-3'	<i>E. durans</i>	186 pb	94°C 2 min, (94°C 45 seg, 50°C 30 seg, 72°C 45 seg)x30, 72°C 5 min	Knijff <i>et al.</i> , 2001
St1; 5'-CACTATGCTCAGAATACA-3' St2; 5'-CGAACAGCATTGATGTTA-3'	<i>S. thermophilus</i>	968 pb	94°C 1 min, (94°C 30 seg, 55°C 1 min, 72°C 30 seg)x30, 72°C 3 min	Lick <i>et al.</i> , 2001
His1; 5'-CTTCGTTATGATTTTACA-3' His2; 5'-CAATATCAACAATCCAT-3'	<i>L. lactis</i>	933 pb / 1130 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 45°C 2 min, 72°C 2 min)x30, 72°C 5 min	Corroler <i>et al.</i> , 1999
casei; 5'-TGCACTGAGATTCGACTTAA-3' Y2; 5'-CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	<i>Lb. casei</i>	290 pb	94°C 3 min, (94°C 45 seg, 45°C 45 seg, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Ward y Timmins, 1999
para; 5'-CACCGAGATTCAACATGG-3' Y2; 5'-CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	<i>Lb. paracasei</i>	290 pb	94°C 3 min, (94°C 45 seg, 45°C 45 seg, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Ward y Timmins, 1999
rham; 5'-TGCATCTTGATTTAATTTG-3' Y2; 5'-CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	<i>Lb. rhamnosus</i>	290 pb	94°C 3 min, (94°C 45 seg, 45°C 45 seg, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Ward y Timmins, 1999
16; 5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3' Lc; 5'-TTGGTACTATTTAATTCTTAG-3'	<i>Lb. curvatus</i>	222 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 53°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Berthier y Ehrlich, 1998
brevF; 5'-CTTGCCTGATTTTAAACA-3' brevR; 5'-GGGCGGTGTGTACAAGGC-3'	<i>Lb. brevis</i>	1340 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 40°C 30 seg, 72°C 1 min)x30, 72°C 10 min	Guarneri <i>et al.</i> , 2001

Tabla 3. Factores de virulencia y resistencia a antibióticos estudiados.

GEN	FACTOR DE VIRULENCIA
<i>gelE</i>	Metaloendopeptidasa extracelular; hidroliza gelatina, colágeno, hemoglobina y otros componentes bioactivos.
<i>hyl</i>	Enzima degradadora de ácido hialurónico.
<i>asa1</i>	Proteína de adhesión a células hospedadoras (sustancia de agregación). Puede estar asociada con genes <i>cyl</i> .
<i>esp</i>	Proteína asociada a la pared celular involucrada en la adherencia y evasión del sistema inmune. También interviene en la formación de biopelículas. Puede estar asociada con genes <i>cyl</i> .
<i>cylA</i>	Serín proteasa activadora de la citolisina.
<i>efaA</i>	Adhesina de la pared celular expresada en suero.
<i>ace</i>	Adhesina para el colágeno.
<i>vanA</i>	Operón implicado en la resistencia a vancomicina. También proporciona resistencia a teicoplanina.
<i>vanB</i>	Operón implicado en la resistencia a vancomicina.

Tabla 4. PCRs múltiples empleadas para la detección de genes de virulencia asociados a enterococos.

PCR MULTIPLE	CONJUNTO DE OLIGONUCLEÓTIDOS	CONCENTRACIÓN DE CADA OLIGONUCLEÓTIDO	PRODUCTO DE PCR (TAMAÑO)	CONDICIONES DE PCR	REFERENCIA
Detección de genes de virulencia	GEL11; 5'-TATGACAATGCTTTTTGGGAT-3' GEL12; 5'-AGATGCACCCGAAATAATATA-3' HYL n1; 5'-ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG-3' HYL n2; 5'-GACTGACGTCCAAGTTTCCAA-3' ASA11; 5'-GCACGCTATTACGAACTATGA-3' ASA12; 5'-TAAGAAAAGAACATCACCACGA-3' ESP 14F; 5'-AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG-3' ESP 12R; 5'-AATTGATTCTTTAGCATCTGG-3' CYT I; 5'-ACTCGGGGATTGATAGGC-3' CYT IIb; 5'-GCTGCTAAAGCTGCGCTT-3'	0,14 µM 0,14 µM 0,14 µM 0,14 µM 0,14 µM 0,14 µM 0,28 µM 0,28 µM 0,28 µM 0,28 µM	<i>gelE</i> (213 pb) <i>hyl</i> (276 pb) <i>asa1</i> (375 pb) <i>esp</i> (510 pb) <i>cylA</i> (688 pb)	94°C 1 min, (94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min) x30, 72°C 7 min	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
Detección de genes de virulencia	EFA-F; 5'-GCCAATTGGGACAGACCCTC-3' EFA-R; 5'-CGCCTTCTGTTCTTCTTTGGC-3' ACE-F; 5'-GAATTGAGCAAAAAGTTCAATCG-3' ACE-R; 5'-GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC-3'	0,10 µM 0,10 µM 0,10 µM 0,10 µM	<i>efaA</i> (688 pb) <i>ace</i> (1008 pb)	94°C 3 min, (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min) x30, 72°C 5 min	Presente Tesis
Detección de genes de resistencia a vancomicina	VAN-AF; 5'-TCTGCAATAGAGATAGCCGC-3' VAN-AR; 5'-GGAGTAGCTATCCCAGCATT-3' VAN-BF; 5'-GCTCCGCAGCCTGCATGGACA-3' VAN-BR; 5'-ACGATGCCGCCATCCTCCTGC-3'	0,10 µM 0,10 µM 0,10 µM 0,10 µM	<i>vanA</i> (377 pb) <i>vanB</i> (529 pb)	94°C 1 min, (94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) x30, 72°C 5 min	Presente Tesis

PCR, bien de forma individualizada o por PCR múltiples. Los cebadores utilizados y condiciones ensayadas se describen en la Tabla 4. Estas amplificaciones se realizaron utilizando como ADN molde el ADN de las cepas individuales o bien el ADN purificado de las comunidades estudiadas.

La composición general de la mezcla de amplificación fue la siguiente:

Compuesto	Concentración
ADN molde	50 ng
Mezcla de cebadores	Ver Tabla 4
dNTPs	400 μ M
Tampón de la Taq polimerasa	1 \times
Cloruro de magnesio	3 mM
Taq polimerasa	1 U
Volumen final:	25 μ l

5.8. Amplificación mediante PCR de genes para la producción de aminas biógenas

La producción de aminas biógenas (actividad aminodescarboxilasa) se estudió mediante la técnica descrita por De la Rivas y colaboradores (2005) que utiliza la amplificación por PCR múltiple de los genes responsables de la producción de histamina (*hdc*), tiramina (*tdc*) y putrescina (*odc*). Estas amplificaciones se realizaron utilizando como ADN molde, tanto el de cepas individuales como el ADN purificado de las comunidades estudiadas. Las condiciones de amplificación y las secuencias de los cebadores utilizados se describen en la Tabla 5.

La composición general de la mezcla de amplificación fue la siguiente:

Tabla 5. Detalles de la PCR múltiple utilizada para la detección de aminodescarboxilasas.

OLIGONUCLEÓTIDOS	CONCENTRACIÓN DE CADA OLIGO-NUCLEÓTIDO	PRODUCTO DE PCR (TAMAÑO)	CONDICIONES DE LA REACCIÓN
JV16HC; 5'-AGATGGTATTGTTTCTTATG-3'	0,30 μ M	<i>hdc</i> (367 pb)	94°C- 3 min
JV17HC; 5'-AGACCATACACCATAACCTT-3'	0,30 μ M		(94°C 30 seg, 52°C 30 seg, 72°C 2 min)x30
P2-for; 5'-GAY [§] ATN ^{**} ATNNGGNATNNGNY	2,00 μ M	<i>tdc</i> (924 pb)	
TNGAYCAR ^{††} G-3'	2,00 μ M		72 °C -10 min
P1-rev; 5'-CCRTARTCNGGNATAGCRAAR			
TCNGTRTG-3'			
odc3; 5'-GTNTTYAAYGCNGAYAARACN	1,00 μ M	<i>odc</i> (1446 pb)	
TAYTTYGT-3'	1,00 μ M		
odc16; 5'-ATNGARTTNAGTTCRCAYTTY			
TCNGG-3'			

Compuesto	Concentración
ADN molde	50 ng
Mezcla de cebadores	Ver Tabla 5
dNTPs	400 μ M
Tampón de la Taq polimerasa	1 \times
Cloruro de magnesio	2,5 mM
Taq polimerasa	1 U
Volumen final:	25 μ l

5.9. Amplificación mediante PCR de genes de bacteriocinas

Con el fin de detectar los principales genes de bacteriocinas se emplearon diversas PCR, bien para detectar directamente su presencia por PCR o bien para la construcción de sondas marcadas con digoxigenina para su posterior hibridación con los ADNs genómicos.

[§] Y= C + T

^{**} N= A + G + C + T

^{††} R= A + G

La composición general de la mezcla de amplificación fue la siguiente:

Compuesto	Concentración
ADN molde	100 ng
Oligonucleótido 1	1 μ M
Oligonucleótido 2	1 μ M
dNTPs	400 μ M
Tampón de la Taq polimerasa	1 \times
Cloruro de magnesio	2 mM
Taq polimerasa	1 U
Volumen final:	50 μ l

Los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 6.

Las condiciones de PCR para la amplificación con los oligonucleótidos fueron:

C₀) Desnaturalización inicial: 94 °C, 2 min.

C₁) Desnaturalización: 94 °C, 1 min.

C₂) Hibridación: T_m específica de cada primer (Tabla 6), 1 min.

C₃) Extensión: 72 °C, 1 min.

El número de ciclos fue de 30 (incluidos C₁ a C₃).

C₄) Terminación: 72 °C, 5 min.

6. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

6.1. Electroforesis en geles de agarosa

La separación y visualización del ADN genómico y de los productos de PCR, se realizó mediante electroforesis sumergida horizontal en gel de agarosa de baja

Tabla 6. Características de las PCRs empleadas en la detección de genes de bacteriocinas.

OLIGONUCLEÓTIDOS	BACTERIOCINA	TAMAÑO (pb)	CONDICIONES DE LA PCR	REFERENCIA
As48-1: 5'-AATAAACTACATGGGT-3' As-48-5: 5'-CCAAGCAATAACTGCTCTTT-3'	AS-48	377 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 47°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Martínez-Bueno <i>et al.</i> , 1998
E21-4; 5'-GCAGCTAAGCTAACGACT-3' E21-9; 5'-AGGGGAATTTGAACAGA-3'	EJ97	279 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 49°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Sánchez-Hidalgo <i>et al.</i> , 2003.
P9; 5'-GAGATTTATCTCCATAATCT-3' P10; 5'-GTACCACTCATAGTGGAA-3'	Enterocina A	452 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 49°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Aymerich <i>et al.</i> , 1996
EntB(f); 5'-GAAAATGATCACAGAATGCCTA-3' EntB(r); 5'-GTTGCATTTAGAGTATACATTTG-3'	Enterocina B	159 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Du Toit <i>et al.</i> , 2000
EntP1; 5'-ATGAGAAAAAATTTATTTAGTTT-3' EntP2; 5'-TTAATGTCCCATACCTGCCAAACC-3'	Enterocina P	216 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2002
LICIJ1; 5'-ATGGGAGCAATCGCAAAA-3' LICJ2A; 5'-TTAAATATGTTTTTAAATCCA-3'	MR10A	135 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 43°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Cintas <i>et al.</i> , 1998
LeuAf; 5'-TTGGATAATAGTGCTCTCG-3' LeuAr; 5'-AAGGCTTCTCCCCAGTTTA-3'	Leucocina A	101 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Presente tesis
LeuATa33f; 5'-AACCTATTATCACGAGAGC-3' LeuATa33r; 5'-TTCCGAAGAGGGGTCAAA-3'	Leucocina Ata33	101 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Presente tesis
LeuBTa11af; 5'-TTGGATAATAATGCTCTCG-3' LeuBTa11ar; 5'-AAGGCTTCTCCCCAGTTT-3'	Leucocina Bta11a	101 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Presente tesis
LeuKf; 5'-TCAAAGAATAAAAGAAAATG-3' LeuKr; 5'-TTGTTAATGGTTGAAGAGTG-3'	Leucocina K	145 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Presente tesis
MesB105f; 5'-ATGCAAGATAAAACAAAT-3' MesB105r; 5'-TGCTAGCCAAGGAGAAT-3'	Mesenterocina B 105	141 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 44°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Presente tesis
MesY105f; 5'-AAGTTGTTGGTGGAAAGTATTATG-3' MesY105r; 5'-ATTGGCCAAACGATGTATGC-3'	Mesenterocina Y 105	107 pb	94°C 2 min, (94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min)x30, 72°C 5 min	Presente tesis

electroendósmosis (Molecular Biology Grade, Bio-Rad), a la concentración apropiada (0,7-1,5%) según el tamaño de los ADNs a resolver. El tampón de la electroforesis fue TAE 1×.

Las muestras fueron mezcladas con solución de carga (1/10 de su volumen) y se depositaron en los pocillos del gel, aplicando a continuación un voltaje constante de 5-10 V/cm o alternativamente a corriente constante de 75 V hasta que el indicador de frente llegó al borde del gel.

En el caso de los RAPD y ERIC-PCR, los geles de agarosa se prepararon siempre al 1,2%, y se cargaron 10 µl de la muestra de PCR. Las electroforesis se desarrollaron durante 16 horas a voltaje constante de 30 voltios.

Una vez terminada la electroforesis, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) (0,5 µg/ml en agua destilada) durante 15 min. Tras lavar en agua durante 20 minutos para eliminar el exceso de bromuro de etidio, el ADN se visualizó por exposición a la luz ultravioleta (302 nm) en un transiluminador (Vilber Lourmat, Francia).

Para conocer el tamaño aproximado de los ADNs presentes en las muestras sometidas a electroforesis, se utilizaron como patrones los fragmentos de restricción *Hind*III del fago λ (BioRad), o los marcadores 100 bp ladder y 1 kbp ladder (Biotools).

Los geles fueron fotografiados con una videocámara UVP ImageStore 5000, digitalizando las imágenes en formato TIFF.

Tampón TAE (50×)	
Tris base	242,0 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA-Na ₂ 0,5 M, pH 8	100 ml
Agua destilada	Completar hasta 1 L

Solución de carga (10×)	
Glicerol	50% (v/v)
TE (10 mM Tris-HCl pH 8; EDTA 1 mM pH 8)	49,75% (v/v)
Azul de bromofenol	0,25%

6.2. Electroforesis desnaturalizante en gradiente temporal de temperatura (TTGE)

Esta técnica se basa en la temperatura de fusión del ADN (T_m). La T_m de una secuencia de ADN depende de su contenido en guanidina y citosina (GC), propiedad que va a permitir separar gradualmente moléculas de ADN de distinta secuencia (diferente T_m) en un gradiente desnaturalizante. Cuando el punto de fusión se alcanza, la doble hebra se separa parcialmente, creando una molécula ramificada con movilidad reducida en un gel de poliacrilamida. El ambiente desnaturalizante se crea mediante una concentración alta de urea (6-8 M) y un gradiente temporal de temperatura. La separación total de las hebras de ADN se evita mediante una cola rica de G y C que se acopla al extremo del oligonucleótido usado en la reacción de PCR (Fig. 4). Si los fragmentos obtenidos poseen una secuencia rica en GC, la desnaturalización será más difícil y por lo tanto migrarán más rápido en la electroforesis. La posición final va a depender de numerosas variables: tamaño, secuencia nucleotídica, tiempo de electroforesis, concentración de urea, concentración de acrilamida, concentración de TAE, rango de temperatura de electroforesis, rampa de incremento de temperatura de electroforesis y voltaje de electroforesis. De esta forma, es posible diferenciar amplicones que poseen un sólo nucleótido de diferencia en su secuencia nucleotídica.

La electroforesis en gradiente temporal de temperatura (TTGE) se realizó mediante un equipo Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad). Se emplearon dos condiciones distintas en función de la diana estudiada, ADN_r 16S y subunidad β de la ARN polimerasa (*rpoB*). Las reacciones de PCR se realizaron bien sobre las cepas individuales o bien sobre el ADN purificado extraído de las comunidades del queso, según se indican en los apartados 5.3 y 5.4 de esta sección. En todos los casos se emplearon geles de 16 cm x 16 cm x 1 mm. Para el llenado del tanque se utilizaron 7 litros de tampón TAE precalentado a 50 °C. Se cargaron 10 μ l de muestra obtenida mezclando 5 μ l del producto de PCR y 5 μ l de solución de carga 2 \times (glicerol 70%, azul de bromofenol 0,05%, xilencianol 0,05%).

Los geles empleados para resolver los fragmentos de PCR correspondientes al ADN_r se prepararon con la siguiente composición:

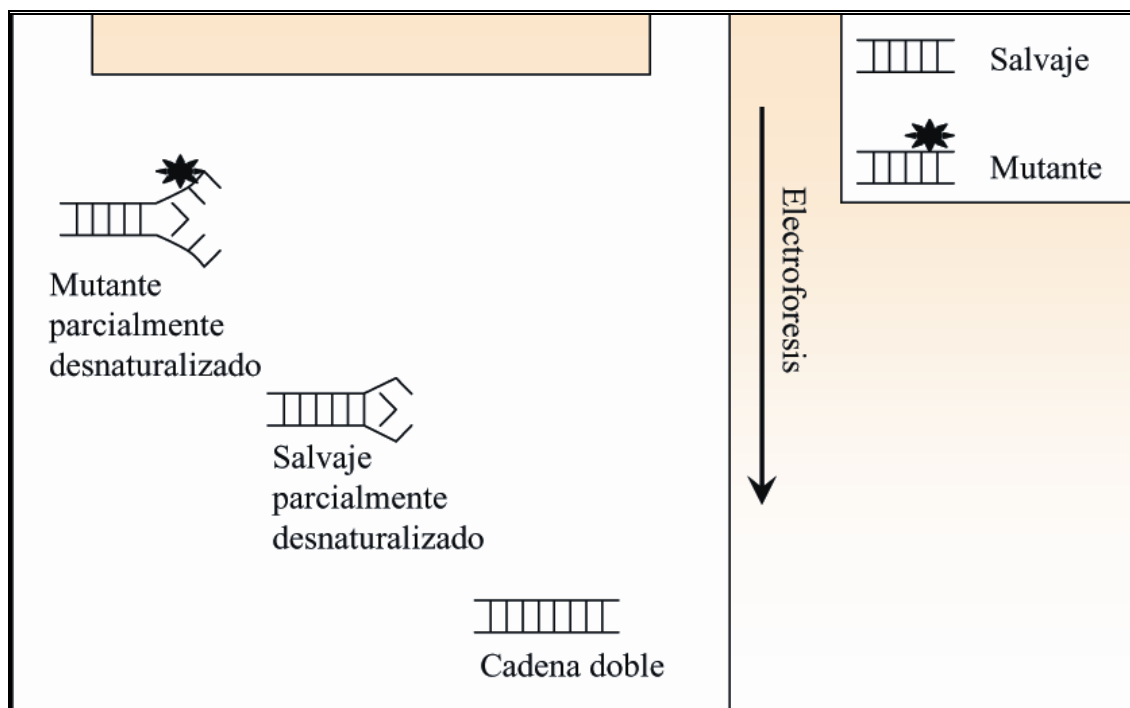


Fig. 4. Separación electroforética específica de secuencia de fragmentos de ADN mediante TTGE.

Gel 8% acr./bis; 1,25 x TAE; 7 M Urea	
TAE 50x	0,75 ml
40 % Acrilamida:Bisacrilamida (37,5:1)	6 ml
Urea	12,6 g
TEMED	30 µl
Persulfato amónico 10%	300µl
Volumen final	30 ml

En este caso se aplicaron las condiciones de electroforesis descritas por Ogier y colaboradores (2002). La electroforesis se desarrolló a 40 V durante 16 horas, con una temperatura inicial de 63 °C y una temperatura final de 70 °C y una rampa de 0,4 °C/h.

Los geles empleados para resolver los fragmentos de PCR correspondientes al gen *rpoB* se prepararon con la siguiente composición:

CAPÍTULO II

Gel 6% acr./bis; 1,25 x TAE; 7 M Urea	
TAE 50x	0,75 ml
40% Acrilamida:Bisacrilamida (37,5:1)	4,5 ml
Urea	12,6 g
TEMED	30 μ l
Persulfato amónico 10%	300 μ l
Volumen final	30 ml

En este caso la electroforesis se desarrolló a 50 V durante 16 horas, con una temperatura inicial de 58 °C y una temperatura final de 65 °C, con una rampa de 0,4 °C/h.

Los geles se revelaron mediante tinción en bromuro de etidio. Para ello los geles se sumergieron en una solución de bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) durante 15 minutos y a continuación se lavaron mediante inmersión en agua milliQ durante 20 minutos. Posteriormente se visualizaron con la luz ultravioleta en un transiluminador (Vilber Lourmat, Francia) y se fotografiaron en videocámara UVP ImageStore 5000 para digitalizar las imágenes en formato TIFF.

Los fragmentos separados mediante TTGE se cortaron con un escalpelo estéril. El ADN de cada fragmento se eluyó durante toda la noche a 4 °C, con 20 μ l de agua Milli-Q estéril. Dos microlitros del ADN eluido de cada banda de TTGE fue reamplificado con los mismos cebadores utilizados según las condiciones de PCR descritas en los apartados 5.3 y 5.4. La calidad de los productos reamplificados se confirmó sometiendo estos productos reamplificados nuevamente a TTGE. Una vez confirmada la pureza de la banda, se secuenció en un analizador genético “ABI Prism 310 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems).

Todas las secuencias obtenidas fueron analizadas en la base de datos del NCBI o EMBL mediante las herramientas BLAST y/o FASTA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://www.ebi.ac.uk>) (Altschul et al., 1997).

Los geles de TTGE se analizaron mediante el programa informático Fingerprinting II Informatix software (Bio-Rad). Para compensar las diferencias entre los geles o bien las distorsiones que se puedan originar durante el proceso de electroforesis, los geles se alinearon y normalizaron mediante un patrón de referencia externo. En el análisis molecular a través del gen 16S dicho patrón consistió en una

mezcla a partes iguales de los genes correspondientes a las especies *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *L. lactis*, *S. thermophilus*, *Lb. paracasei* y *Kocuria* sp. En el análisis molecular a través del gen *rpoB* dicho patrón consistió en una mezcla a partes iguales de los genes correspondientes a las especies *Lb. curvatus*, *Lc. lactis*, *E. avium* y *Lb. pentosus*.

7. ANÁLISIS DE GRUPOS

Las huellas genéticas obtenidas mediante RAPD y ERIC-PCR fueron analizadas mediante el programa informático Fingerprinting II Informatrix software (Bio-Rad). Los índices de similitud de los diferentes perfiles se calcularon mediante el coeficiente de correlación de Pearson y se construyeron los correspondientes dendogramas mediante el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages). La reproducibilidad de estas técnicas se determinó tras el análisis por triplicado de al menos 3 cepas diferentes. El valor de similitud obtenido en los 3 ensayos realizados con las mismas cepas fue el considerado como índice de identidad; cepas que dan índices de similitud por debajo de éste se consideraron genotipos diferentes; cepas que dan índices de similitud por encima se incluyen en el mismo grupo o genotipo. La identidad de las cepas de cada grupo se confirmó bien mediante secuenciación nucleotídica o bien mediante PCR específica.

8. DOT-BLOT

8.1. Transferencia del ADN a membranas

Esta técnica se utilizó como alternativa a las reacciones de amplificación, para poner de manifiesto la presencia de genes responsables de bacteriocinas en bacterias (Fig. 5). El proceso de transferencia se realizó siguiendo las instrucciones del sistema de microfiltración (Bio-Dot Microfiltration Apparatus Instruction Manual, Bio-Rad) de revelado. Para ello, 10 µl del ADN purificado (200 ng) se desnaturalizó adicionando NaOH-EDTA hasta una concentración final de NaOH 0,4 M-EDTA 10 mM durante 10 min. Posteriormente se ensambló en un aparato de microfiltración (Bio-Dot

CAPÍTULO II

Microfiltration Apparatus, Bio-Rad) una membrana de nylon (HyBond N+, Amersham Biosciences) del tamaño del casete y humedecida previamente en agua. A continuación se depositaron las muestras desnaturalizadas y se aplicó un vacío suave, para posteriormente añadir 500 μ l de NaOH 0,4 M y volver a aplicar vacío. Finalizada la transferencia, se marcó la membrana haciendo un corte en el extremo superior izquierdo y se cubrió con $2 \times$ SSC, tras lo cual se dejó secar al aire y se fijó el ADN mediante calentamiento en horno a 80 °C durante 2 horas.

$20 \times$ SSC	Concentración
Citrato sódico	0,3 M
NaCl	3 M
Ajustar a pH 7	

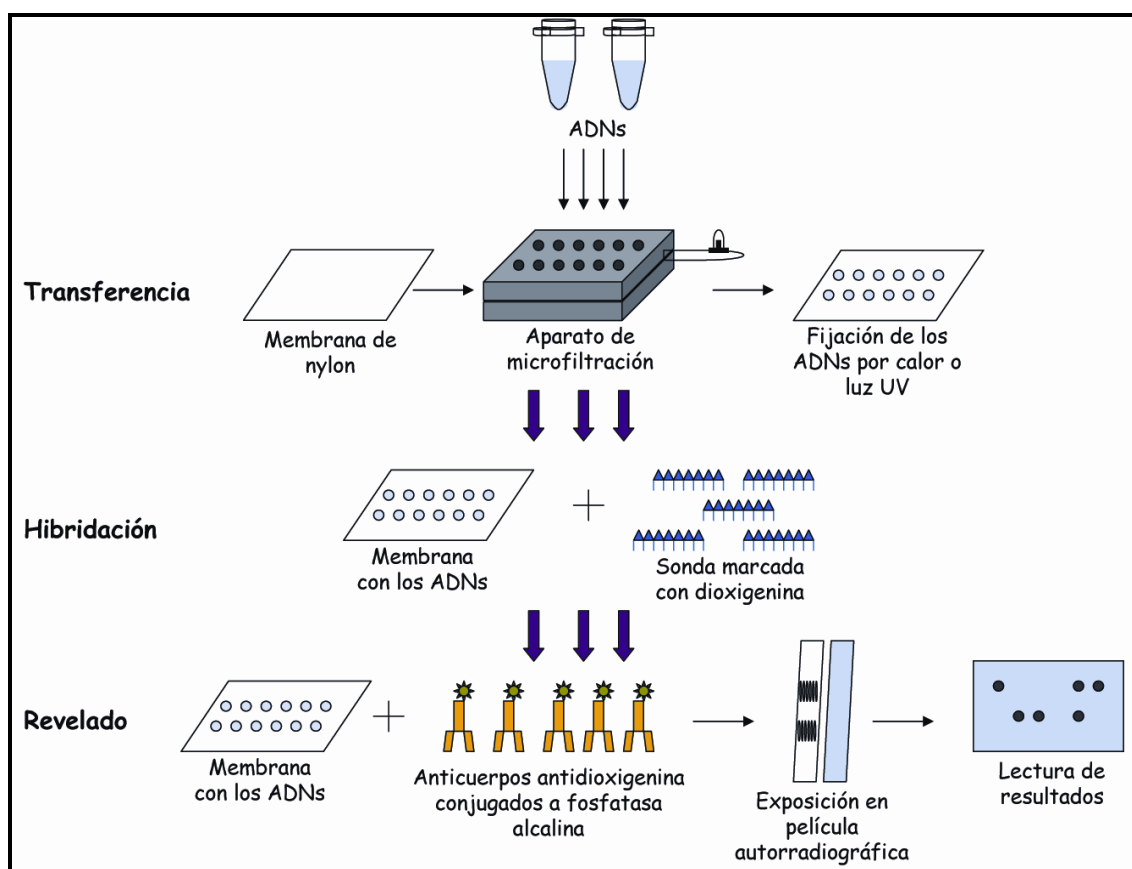


Fig. 5. Representación de la hibridación Dot-Blot de ADN.

8.2. Preparación de sondas no radioactivas marcadas con digoxigenina-11-dUTP mediante PCR

Las sondas se prepararon mediante amplificación por PCR, usando los cebadores y condiciones descritos en el apartado 5.9. La mezcla general de la reacción fue la siguiente:

Compuesto	Concentración
ADN molde	100 ng
Oligonucleótido 1	1 μ M
Oligonucleótido 2	1 μ M
dNTPs-Dig (2 mM)	0,4 mM
Tampón de la Taq polimerasa	1 \times
Cloruro de magnesio	2 mM
Taq polimerasa	1 U
Volumen final	50 μ l

Los dNTPs-Dig fueron suministrados por Roche Applied Science. Finalizada la reacción de marcaje, las sondas fueron purificadas mediante el Accuprep PCR Purification kit (Bioneer).

8.3. Prehibridación e hibridación ADN-ADN

La membrana de nylon se incubó a 50 °C en un horno de hibridación (Shel Lab, mod. 1004) con 10 ml de solución de hibridación DIG Easy Hyb Granules (Roche Applied Science) en una bolsa sellada, durante al menos 2 h. Posteriormente, esta solución fue sustituida por 2 ml de una solución de hibridación nueva conteniendo 100 ng de la sonda marcada y desnaturalizada mediante calentamiento a 95 °C 10 minutos, incubándose a 50 °C durante toda la noche. Esta solución puede ser congelada a -20 °C y reutilizarse posteriormente.

Finalizada la hibridación, y para eliminar la sonda no unida, la membrana se lavó dos veces durante 5 min a temperatura ambiente con 2 \times SSC-SDS 0,1%, y otras dos veces a 68 °C con solución de lavado (0,1 \times SSC-SDS 0,1%) durante 15 minutos.

8.4. Revelado inmunológico

Todo el proceso de revelado inmunológico se realizó siguiendo las instrucciones del sistema de revelado DIG Luminiscent detection (Roche Applied Science). La membrana se saturó previamente con 50 ml de tampón I durante 5 min en agitación. Posteriormente fue incubada con 20 ml de tampón II (tampon I + agente de bloqueo) durante 30 min en agitación. Transcurrido este tiempo se adicionaron 15 ml del tampón II con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche Applied Science) (dilución 1:10.000) en agitación durante 30 min. El exceso de anticuerpos no incorporados fue eliminado mediante 2 lavados con 100 ml de tampón I durante 15 min en agitación.

Finalmente, la membrana se equilibró con 20 ml de tampón III durante 5 min, y después se adicionó 1 ml de tampón III con 10 µl de CSPD (Roche Applied Science) en una bolsa sellada, manteniéndolos durante 5 min a 37 °C en la oscuridad. Una vez seca la membrana con papel de filtro, se situó entre dos láminas de plástico y se dejó 10-15 min en oscuridad. Tras ese tiempo, se impresionó por contacto una película autorradiográfica Kodak X-OMAT durante 30 min-4 h, revelándose posteriormente. Para el revelado la película se dejó 1 min en revelador (Tmax, Kodak Profesional), 4 min en fijador (Superfix plus, Tetenal) y se lavó con agua abundante.

Tampón I

Ácido maléico pH 7,5 (ajustado con NaOH sólido)	0,1 M
NaCl	0,15 M
Tween-20	0,1 % (v/v)

Tampón II

Ácido maléico pH 7,5	0,1 M
NaCl	0,15 M
Tween-20	0,1 % (v/v)
Reactivo de bloqueo (Roche)	1 %

Tampón III	
Tris-HCl, pH 9	0,1 M
NaCl	0,1 M

9. BIBLIOGRAFÍA

- Altschul S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffe, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D.J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Aymerich, T., H. Holo, L.S. Havarstein, M. Hugas, M. Garriga e I.F. Nes.** 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1676-1682.
- Ben Omar, N., A. Castro, R. Lucas, H. Abriouel, N.M.K. Yousif, C.M.A.P. Franz, W.H. Holzapfel, R. Pérez-Pulido, M. Martínez-Cañamero, and A. Gálvez.** 2004. Functional and Safety Aspects of Enterococci Isolated from Different Spanish Foods. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**: 118-130.
- Ben Omar, N., y F. Ampe.** 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3664-3673.
- Berthier, F. y S.D. Ehrlich.** 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**: 97-106.
- Cintas, L.M., P. Casaus, H. Holo, P.E. Hernández, I.F. Nes y L.S. Havarstein.** 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* **180**: 1988-1994.
- Corroler, D., N. Desmaures y M. Gueguen,** 1999. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 91-99.
- Creti, R., M. Imperi, L. Bertuccini, F. Fabretti, G. Orefici, R. Di Rosa y L. Baldassarri.** 2004. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different Sources. *J. Med. Microbiol.* **53**: 13-20.
- Dahllöf, I., H. Baillie y S. Kjelleberg.** 2000. *rpoB*-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3376-3380.

- De las Rivas, B., A. Marcobal y R. Muñoz.** 2005. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS Microbiol Lett.* **244**: 367-372.
- Deasy, B.M., M.C. Rea, G.F. Fitzgerald, T.M. Cogan y T.P. Beresford.** 2000. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**: 510-522.
- Depardieu, F., B. Perichon y P. Courvalin.** 2004. Detection of *van* alphabet and indentification of Enterococci and Staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 5857-5860.
- Dubernet, S., N. Desmasures y M. Gueguen.** 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol. Lett.* **214**: 271-275.
- Dutka-Malen, S., S. Evers y P. Courvalin.** 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 24-27.
- Du Toit, M., C.M.A.P. Franz, L.M.T. Dicks y W.H. Holzapel.** 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 482-494.
- Gomori.** 1955. After Sorensen, *Meth. Enzymol.* **1**: 145.
- Gratia, J. y P. Fredericq.** 1946. *Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille.* *C. R. Soc. Biol.* **93**: 1040-1041.
- Guarneri, T., L. Rossetti y G. Giraffa.** 2001. Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**: 377-381.
- Gutiérrez, J., R. Criado, A. Olivera, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, M.F. Fernández, L.M. Cintas y P.E. Hernández.** 2002. Cloning, production, secretion and purification of the bacteriocin enterocin P in *Escherichia coli*. International Symposium on Enterococci in Foods: Functional and Safety Aspects. Berlín. Abstract P.16.
- Huey, B., y J. Hall.** 1989. Hypervariable DNA fingerprinting in *E. coli* minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.* **171**: 2528-2532.
- Knijff, E., F. Dellaglio, A. Lombardi, C. Andrighetto y S. Torriani.** 2001. Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *ddl* genes. *J. Microbiol. Methods.* **47**: 35-40.

- Lemcke, R. y M. Bülte.** 2000. Occurrence of the vancomycin-resistant genes *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2* and *vanC3* in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork. *Int. J. Food Microbiol.* **60**: 85-194.
- Lick, S., K. Drescher y K.J. Heller.** 2001. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated göttingen minipigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4137-4143.
- Manero, A. y A.R. Blanch.** 2002. Identification of *Enterococcus* spp. based on specific hybridisation with 16S rDNA probes. *J. Microbiol. Methods* **50**: 115-121.
- Martínez-Bueno, M., E. Valdivia, A. Gálvez, J. Coyette y M. Maqueda.** 1998. Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **27**: 347-58.
- Ogier, J.C., O. Son, A. Gruss, P. Tailliez y A. Delacroix-Buchet.** 2002. Identification of the Bacterial Microflora in Dairy Products by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3691-3701.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez-Hidalgo, M., M. Maqueda, A. Galvez, H. Abriouel, E. Valdivia y M. Martínez-Bueno.** 2003. The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1633-1641.
- Vankerckhoven, V., T. Van Autgaerden, C. Vael, C. Lammens, S. Chapelle, R. Rossi, D. Jabes, and H. Goznes.** 2004. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 4473-4479.
- Versalovic, J., T. Koeuth y J.R. Lupski.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**: 6823-6831.
- Ward, L.J.H., y M.J. Timmins.** 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**: 90-92.

Williams, G., A. Kibelik, K. Libak, A. Rafalski y S. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18:** 6531-6535.

CAPÍTULO III

Fast, Convenient and Economical Method for Isolating Genomic DNA from Lactic-Acid Bacteria Using a Modification of the “Protein Salting-Out” Procedure

1. RESULTS AND DISCUSSION.

Lactic acid bacteria (LAB) are a group of gram-positive, nonsporulating, aerotolerant cocci or rods that produce lactic acid as a major end product during the fermentation of carbohydrates. LAB have long been known to be involved in the production of fermented foodstuffs and are used nowadays as starter cultures in the production of fermented dairy, meat, and plant products. An important beneficial aspect of fermenting foodstuffs with LAB is that they impede the growth of pathogenic and spoiling bacteria due to competition for nutrients and the presence of starter-derived inhibitor compounds such as lactic acid, hydrogen peroxide, and bacteriocins (Stiles and Holzapfel, 1997).

Because LAB are the most extensively used microbial group in the food industry, certain technologically interesting aspects of their behavior are being investigated so as to be able to control their use as starter cultures and, thus, improve the manufacture of fermented foodstuffs. For this reason, their genetics is coming under particular scrutiny, and with that the molecular techniques used in the analysis of their DNA are also coming under scrutiny. The molecular analysis of DNA requires an extraction method that produces high-molecular weight DNA that is free of inhibitors. Nevertheless, the isolation of genomic DNA from LAB and other gram-positive bacteria may present problems due to their compact cell wall structure and sometimes due to exopolysaccharide material that interferes with cell lysis, the first step in DNA extraction. Several authors have described methods for isolating from small cultures genomic DNA suitable for PCR amplification, DNA sequencing, mapping purposes, and endonuclease digestion (Pitcher *et al.*, 1989; Ezaki *et al.*, 1990; Veyrat *et al.*, 1999; Ulrich and Hughes, 2001; Ruíz-Barba *et al.*, 2005). Because each method has its advantages and disadvantages, the appropriate extraction method should be chosen according to the purpose in mind. One of the simplest and most effective methods involves transferring a colony directly from a plate into the reaction mix and, after the DNA is released by disrupting the cells, raising the temperature to 95 °C for 4 to 5 min (Güssow and Clackson, 1989). This procedure has been shown to be effective for

isolated colonies of gram-negative bacteria as well as some gram-positive bacteria such as *Enterococcus*, *Lactococcus*, and even *Lactobacillus* species. This method is not equally effective with all strains, however, and in many cases the results cannot be reproduced easily. In addition, when complex samples are used (e.g., microbial communities), the yield and quality of DNA extracted usually are low. With some bacteria that produce large quantities of dense exopolysaccharide material, the yield is also very poor. Moreover, when a large number of samples must be screened, simple and rapid methods are needed to eliminate time-consuming steps, multiple pipettings, extractions with organic solvents, and changes of microfuge tubes.

We describe here a fast, economical, simple, and smallscale method to obtain preparations of very pure genomic DNA from several types of prokaryotic cells. The method is based on a Modification of a ‘‘Salting-Out’’ Procedure (MSOP) described by Miller and coworkers (1988) and consists of only three steps prior to DNA analysis: (i) resuspension of the cells in enzymatic buffer solution, (ii) direct lysis of the treated bacteria by mixing with lysis buffer and denaturing the proteins by incubating at 80 °C for 5 min, and (iii) precipitation of the proteins with high salt concentrations. MSOP has many advantages. It is simple, rapid, and cheap, and it requires neither specialized equipment nor complicated extractions with organic solvents (e.g., phenol, chloroform) or denaturing agents (e.g., guanidinium isocyanate) because the protein released from the cells is precipitated by sodium dodecyl sulfate (SDS)–salting out, thereby leaving deproteinized DNA in solution. Furthermore, apart from the usual chemicals and enzymes involved, it consumes only a few tips and two microfuge tubes per sample. The quality of the DNA obtained by this procedure is similar to that obtained by other common laboratory and commercial techniques and is suitable for both PCR amplification and digestion (MacOrist *et al.*, 2002). Typically, for gram-positive bacteria such as LAB, this procedure may yield between 4 and 20 µg per 1.0 to 1.5 ml of overnight culture.

The MSOP is as follows. The cells from 1.0 to 1.5 ml of a stationary phase bacterial culture are centrifuged at maximum speed (20,000g) in a microfuge tube for 30 to 60 s, resuspended in 100 µl of TES buffer (10% sucrose, 25 mM Tris–HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA, 10 mg/ml freshly made lysozyme, 100 U/ml mutanolysin, and 40 µg/ml RNase), and incubated for 30 min at 37 °C. Then the protoplasted cells are immediately lysed by adding 600 µl of lysis buffer (100 mM Tris–HCl [pH 8.0], 100 mM EDTA, 10 mM NaCl, and 1% SDS), with the tube being gently inverted to mix thoroughly, and are

incubated for 10 to 15 min at room temperature. To increase the purity of the DNA, the lysate can be treated with 10 μ l of pronase or proteinase K (10 mg/ml) and incubated for 15 min at 37 °C, although this treatment is not essential and may be omitted. An incubation step at 80 °C for 5 min followed by cooling to room temperature for 5 to 10 min is included to improve cell lysis and DNA yields and also to inactivate any lytic enzymes (lysozyme–mutanolysin or protease) that may be present. Subsequently, 200 μ l of sodium acetate (3 M, pH 5.2) is added and the solution is vortex-mixed for 10 to 15 s, chilled on ice for 10 to 15 min, and then centrifuged at 20,000g for 10 min to precipitate the proteins. This salting-out step precipitates the proteins and cell debris leaving the DNA in solution. Finally, the nucleic acids are precipitated with an equal volume of isopropanol (~600 μ l) in a clean microfuge tube. The tube is gently inverted several times, and then the genomic DNA is pelleted by centrifugation at 20,000g for 5 min. The DNA pellet is washed once with 1 ml of 70% ethanol and dried at room temperature. The DNA is resuspended in 200 μ l of 0.5 \times TE buffer (10 mM Tris–HCl [pH 8.0] and 1 mM EDTA). Samples (5–7 μ l) can then be analyzed by agarose gel electrophoresis.

The quality of genomic DNA isolated by MSOP is high, as demonstrated by the absorbance ratio values (260/280 nm) of the preparations, which are between 1.6 and 1.8. The DNA concentrations of the samples are 20 to 100 ng/ μ l, and the size of the DNA obtained is approximately 20 to 23 kb without extensive shearing (Fig. 1).

We validated our method by extracting genomic DNA from more than 500 LAB strains belonging to the genera *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, and *Leuconostoc* isolated from fermented dairy products, as well as other gram-positive bacteria (*Micrococcus*, *Kocuria*, and *Corynebacterium*), obtaining excellent yields in all cases (Fig. 1). Good yields, although slightly lower, were also obtained from *Staphylococcus*, a gram-positive bacterium resistant to lysozyme digestion. DNA from gram-negative bacteria such as *Serratia liquefaciens*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Brevundimonas vesicularis* was also extracted efficiently by this method. Other bacteria from which it was possible to purify genomic DNA efficiently included several members of the genera *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Rhizobium*, *Hafnia*, *Shigella*, and *Pseudomonas* (data not shown).

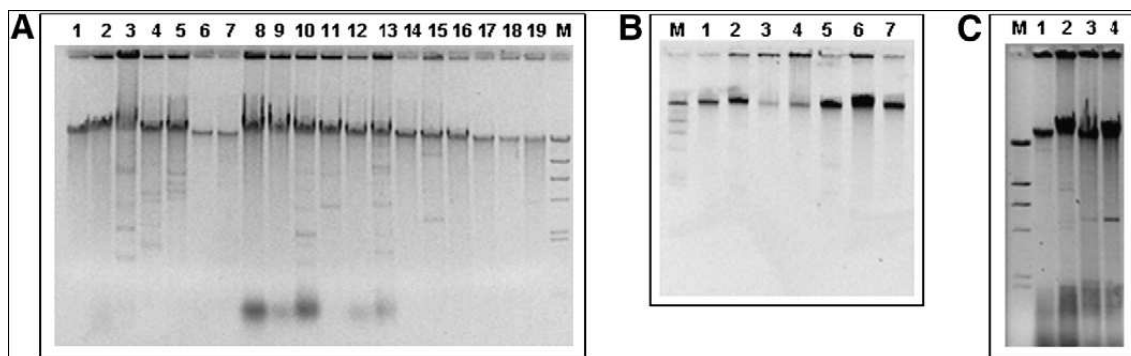


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted by MSOP from LAB isolated from traditional hard goat cheeses or deposited in collection cultures (NCFB, ATCC, CECT, CNRZ). Here 7 μ l of DNA was analyzed on a 0.7% agarose gel in 1 \times TAE buffer. (A) Lane 1: *Streptococcus thermophilus* Y1S; lane 2: *Lactobacillus farciminis* Mb8; lane 3: *Lactobacillus plantarum* Mb37; lane 4: *Lactobacillus brevis* Mb 34; lane 5: *Lactobacillus paracasei* Mb6; lane 6: *Lactobacillus parabuchneri* C3-58; lane 7: *Lactobacillus rhamnosus* C3-109B; lane 8: *Lactobacillus pentosus* CECT 4023; lane 9: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; lane 10: *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 11842; lane 11: *Lactobacillus sake* NCFB 2714; lane 12: *Lactobacillus curvatus* NCFB 2739; lane 13: *Lactobacillus paraplantarum* CNRZ 1885; lane 14: *Enterococcus hirae* KE1; lane 15: *Enterococcus faecalis* P51; lane 16: *Enterococcus avium* P56, lane 17: *Lactococcus lactis* P26; lane 18: *Vagococcus carnophilus* P6; lane 19: *Leuconostoc mesenteroides* P67; lane M: lambda *Hind*III. (B) Lane 1: *Staphylococcus epidermidis* C3-99; lane 2: *Staphylococcus equorum* C3-77; lane 3: *Staphylococcus sciuri* O43n; lane 4: *Staphylococcus saprophyticus* O47n; lane 5: *Kocuria* spp. C3-100; lane 6: *Leucobacter aridicollis* P100; lane 7: *Corynebacterium variabile* C3-111RB; lane M: lambda *Hind*III. (C) Genomic DNA isolated directly from four hard goat cheeses.

To test the quality of the DNA and reproducibility of the method, we used molecular typing methods to identify these bacteria, including ribotyping and the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of 16S (Lane, 1991; Weisburg *et al.*, 1991) and 16S/23S Ribosomal DNA (rDNA) spacer regions (Jensen *et al.*, 1993), Random Amplification Polymorphism DNA (RAPD) analysis (Huey and Hall, 1989), phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences (Weisburg *et al.*, 1991), and specific and multiple PCR for LAB (Fig. 2). Duplicate DNA purification and PCR done for an individual sample gave the same banding pattern (data not shown).

We also tested the suitability of the method for obtaining genomic DNA from complex food matrices, such as cheeses and fermented milk, by making a few simple modifications. To this end, we suspended 10 g of cheese in 90 ml of warmed sodium citrate (2%, w/v) at 37 °C and homogenized it in a blender (Masticator, IUL

Instruments, Barcelona, Spain) for 2 min. The bacterial cells were then separated from the food components by centrifuging at 4,200g for 15 min at room temperature and were washed three times. Finally, the pellet was resuspended in 10 ml of TE buffer and a 1 ml fraction of the resuspended cells was treated with lysozyme-mutanolysin as described above. The results of genomic DNA extractions from four different hard goat cheeses are shown in Fig. 1. Duplicate extractions of the same sample were tested to examine possible variations in the results of the DNA obtained, and identical PCR patterns were generated when a temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) analysis (Ogier *et al.*, 2002) was made (Fig. 2).

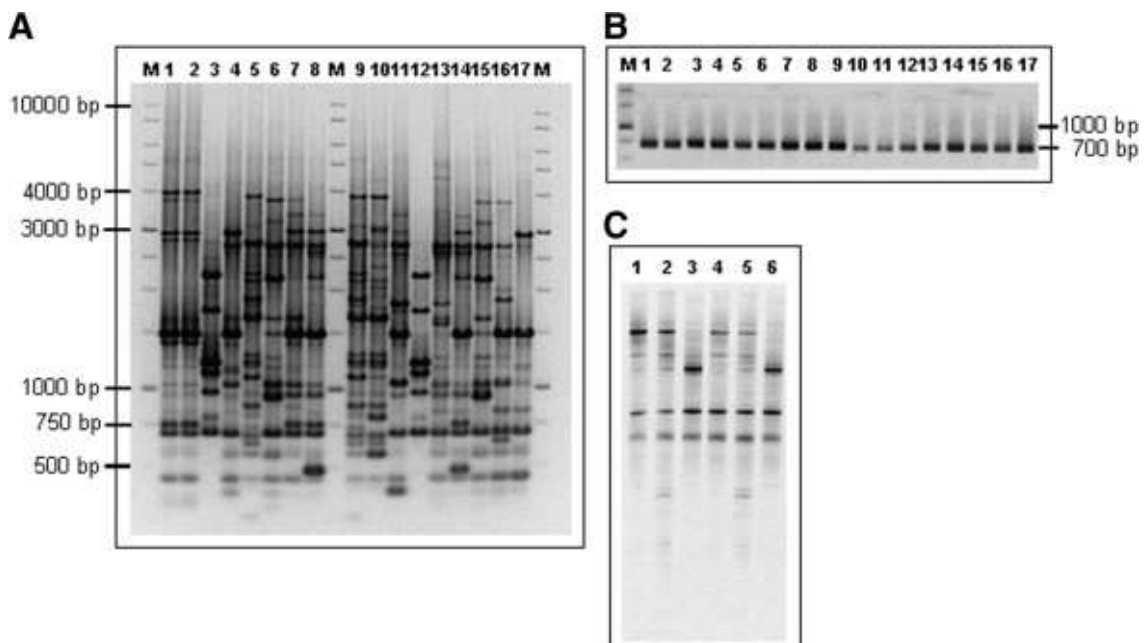


Fig. 2. Validation of DNA extracted by MSOP for molecular analysis. (A) RAPD fingerprint profiles of LAB isolated from fermented dairy products obtained using the primer M13 [5'-gagggtggcggttct-3' (Huey and Hall, 1989)]. Lane M: 1 Kbp ladder (Biotools, Madrid, Spain); lane 1: *L. paracasei* C3-60; lane 2: *L. paracasei* C3-61; lane 3: *L. parabuchneri* C3-62; lane 4: *L. paracasei* C3-63; lane 5: *L. brevis* C3-64; lane 6: *L. paracasei* C3-65; lane 7: *L. paracasei* C3-66; lane 8: *L. paracasei* C3-67; lane 9: *L. brevis* C3-68; lane 10: *L. brevis* C3-69; lane 11: *L. paracasei* C3-70; lane 12: *L. parabuchneri* C3-71; lane 13: *L. paracasei* C3-72; lane 14: *L. paracasei* C3-73; lane 15: *L. paracasei* C3-74; lane 16: *L. paracasei* C3-75; lane 17: *L. paracasei* C3-76. (B) Eubacterial 16S ribosomal RNA (rRNA) gene amplification from genomic DNA of bacteria from panel A using bacterial primers WO1_for 5'-agagtttgatc(ac)tggtctc-3' and WO12_rev: 5'-tacgcatttcacc(gt)ctaca-3' (Ogier *et al.*, 2002). (C) TTGE profiles of V3 16S rDNA fragments from three traditional hard goat cheeses. Lanes 1–3: genomic DNA isolated by FastDNA SPIN Kit (Qbiogene, Irvine, CA, USA); lanes 4–6: genomic DNA isolated by MSOP.

In conclusion, this method has proved to be particularly useful in situations where large numbers of samples are to be tested, and it has many advantages. It is simple, rapid, and cheap, and it does not require specialized equipment or the use of toxic organic solvents. It may be used with a broad spectrum of gram-positive and gram-negative bacteria from different sources.

2. REFERENCES.

- Ezaki, T., S.M. Saidi, S.L. Liu, Y. Hashimoto, H. Yamamoto and E. Yabuuchi.** 1990. Rapid procedure to determine the DNA base composition from small amounts of gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **55**: 127–130.
- Güssow, D. and T. Clackson.** 1989. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17**: 4000.
- Huey, B. and J. Hall.** 1989. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: Minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.* **171**: 2528–2532.
- Jensen, M.A., J.A. Webster and N. Straus.** 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (1993) 945–952.
- Lane, D.J.** 16S/23S rRNA sequencing. In: E. Stackebrandt, M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley, New York, 1991, pp. 115–175.
- McOrist, A.L., M. Jackson and A.R. Bird.** 2002. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *J. Microbiol. Methods* **50**: 131–139.
- Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky.** 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**: 1215.
- Ogier, J.C., O. Son, A. Gruss, P. Tailliez and A. Delacroix-Buchet.** 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3691–3701.
- Pitcher, D.G., N.A. Saunders and R.J. Owen.** 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* **8**: 151–156.
- Ruiz-Barba, J.L., A. Maldonado and R. Jiménez-Díaz.** 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Anal. Biochem.* **347**: 333–335.
- Stiles, M.E. and W.H. Holzapfel.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *Int. J. Food Microbiol.* **36**: 1-29.

- Ulrich, R.L. and T.A. Hughes.** 2001. A rapid procedure for isolating chromosomal DNA from *Lactobacillus* species and other gram-positive bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**: 52–56.
- Veyrat, A., M.C. Miralles and G. Pérez-Martínez.** 1999. A fast method for monitoring the colonization rate of *Lactobacilli* in a meat model system. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 49–61.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697–703.

CAPÍTULO IV

Biodiversity of the Microbial Community in a Spanish Farmhouse Cheese as Revealed by Culture-Dependent and Culture-Independent Methods

ABSTRACT

The microbial diversity within Alberquilla cheese, made from a spontaneously fermented mixture of raw goats' and sheep's milk in the Alpujarra mountains (Granada, south-east Spain), has been studied by the classical culturing method and also by molecular analysis of community DNA. A collection of 206 isolates was obtained from the cheese on different selective/differential media, which were then re-grouped to 52 after randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR analyses. Isolates on Man-Rogosa and Sharpe-agar (MRS), M17-glucose agar and Kenner Fecal (KF)-agar medium were identified by specific PCR or 16S rRNA gene sequencing and belonged mainly to the lactic-acid bacteria group. The predominant genus was *Lactobacillus*, which accounted for more than 50% of the isolates, the most abundant species being *Lactobacillus paracasei*, followed by considerably less quantities of *Lb. plantarum* and *Lb. brevis*. Other lactic-acid bacteria identified were *Pediococcus urinaequi*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuc. mesenteroides*, *Lactococcus lactis* and even the enterococci *Enterococcus faecium* and *E. devriesei*. Cluster analyses of RAPD-PCR patterns revealed a high degree of diversity among the lactobacilli. The Gram-negative bacterial strains belonged mainly to *Hafnia alvei* species. The microbes occurring in Alberquilla cheese were also studied by PCR temporal temperature-gradient gel electrophoresis (TTGE) of the 16S rRNA V3 region and partial 16S rRNA sequencing of the TTGE bands. The results showed a major presence of lactic-acid bacteria closely related to *Lc. lactis*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. acidophilus* and *Enterococcus* sp. The non-lactic-acid bacterium detected was identified as *Escherichia coli*. All the *Enterococcus* strains showed great susceptibility to the most clinically relevant antibiotics, harbouring only the virulence gene *efaAfm*. On the basis of their antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* we chose two strains of *Ln. mesenteroides* that produced mesenterocin B105 and mesenterocin Y105, as revealed by PCR techniques.

1. INTRODUCTION.

Cheese making involves milk fermentation by lactic-acid bacteria (LAB), which are either added deliberately as starter cultures or are adventitious microbiota naturally selected by the conditions of the fermentation process (Boylston *et al.*, 2004; Kieronczyk *et al.*, 2003; Kourkoutas *et al.*, 2006; Litopoulou-Tzanetaki *et al.*, 1993; O'Sullivan *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 1996; Saňko *et al.*, 2001). LAB occur naturally as indigenous microbiota in raw milk and the diversity in the microbial flora contributes to the great differences in the organoleptic characteristics found in raw-milk cheeses. In addition, the presence of LAB in fermented foods improves the health safety and shelf-life of food through the production of several antimicrobial compounds, organic acids (lactic, acetic etc.), hydrogen peroxide, diacetyl and antimicrobial peptides (bacteriocins) (Topisirovic *et al.*, 2006). The different styles and flavours of cheeses are the result of using milk from various mammals and/or with different butterfat contents, employing particular species of bacteria and molds and varying the length of aging and other processing treatments.

The Spanish region of Andalucia is well known for the many varieties of cheese it produces, amongst which is “Alberquilla”, made in the mountainous region of “Alpujarra”, in the province of Granada. It is produced by the spontaneous fermentation of a mixture of raw goats' and sheep's milk, an empirical process that relies upon bacteria present in the raw material and processing environment. We have investigated the microbial community of Alberquilla cheese by both “culture-dependent” and “culture-independent” methods, combining microbial enumerations in different selective culture media, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE), the fingerprinting of total community DNA and partial sequencing of their 16S rRNA genes. We have also looked into the production of bacteriocin-like substances and the incidence of enterococcal virulence factors in Alberquilla cheese to check its safety to health.

2. MATERIAL AND METHODS.

Microbial enumeration and culture conditions. Samples analysed in this study were obtained from three different batches of Alberquilla cheese, a hard cheese made from a mixture of raw goats' and sheep's milk by local industry in the Alpujarra mountains in the province of Granada (south-east Spain). Samples (10 g) of commercially bought cheese were homogenized in 90 ml of a prewarmed (37 °C), sterile, 2% sodium citrate solution in sterile plastic bags with lateral filters using a stomacher lab blender (IUL Instruments, Barcelona, Spain) for 2 min. One millilitre of the resulting mixture was taken from the filter side and tenfold serial dilutions were prepared in sterile saline solution (0.85% w/v NaCl) up to 10^{-7} . A 100 µl aliquot was spread in triplicate on agar plates for bacterial enumeration: Man-Rogosa and Sharpe (MRS)-agar (Scharlau, Barcelona, Spain) and M17-1% glucose (Scharlau) agar for total LAB, Kenner Fecal agar (KF, Scharlau) for enterococci and McConkey agar (Scharlau) for enterobacteria. Viable counts were obtained after 48 h and 3 days' incubation at 28 °C. Results were calculated as the means of the three determinations. Colonies grown on different media were chosen randomly and transferred into 5 ml of brain-heart infusion broth (BHI, Scharlau). Isolates were purified by successive streaking onto the same solid media. Pure cultures were stored in 20% glycerol at -80 °C.

DNA isolation from LAB. Total genomic DNA was extracted from each isolate according to the method of De los Reyes-Gavilán *et al.* (1992).

DNA isolation from cheese. A combination of mutanolysin, lysozyme, proteinase K, guanidium thiocyanate (Sigma) and chloroform-2-pentanol (Sigma) was used to extract DNA from cell pellets obtained from 1 g of cheese by differential centrifugation according to the protocol described by Abriouel *et al.* (2006). DNA samples were spectrophotometrically quantified and adjusted to $10 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$. The integrity of the DNA was assessed by electrophoresis of 2 µl of each sample through a 1.2% agarose-TBE gel (Sambrook *et al.*, 1989).

RAPD-PCR typing. RAPD-PCR analysis, which involves PCR with an arbitrary primer, was done once as described elsewhere (Ben Omar *et al.*, 2004), using the primer M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3'). DNA was amplified in 35 cycles (94 °C for 1 min; 40 °C for 20 s, raised gradually to 72 °C at 0.6 °C/s for 2 min; 72 °C for 2 min) and the amplicons were analysed in agarose gels. The gels were stained with

ethidium bromide (Sigma) and photographed under UV light. Photo-positives were scanned into a computer and subsequently analysed using the Bionumerics software version 2.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). RAPD-PCR patterns were grouped by means of the Pearson product moment correlation coefficient and the unweighted-pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) cluster analysis. The identity level for strain discrimination between different genotypes was set at 86% similarity.

16S rRNA sequencing. Molecular identification was carried out by PCR. The isolates were identified via 16S-rRNA gene sequencing, as described by Abriouel *et al.* (2005). Genomic DNA of selected isolates from each RAPD cluster was used to amplify the almost complete 16S rRNA gene in a CEQ 2000 XLDNA Analysis System (Beckman Coulter, California, USA). The partial sequence of the 16S rRNA was determined by using CEQ 2000 dye terminator cycle sequencing with a Quick Start kit (Beckman Coulter, California, USA) according to the manufacturer's instructions. The sequence data were analysed with a CEQ DNA analysis system (version 4.0). The overlapping sequences obtained were merged using the Lasergene program, version 5.05 (DNASTAR, Inc., Madison, WI). A search for homology of the DNA sequence was made using the BLAST algorithm available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA).

Species specific PCR. To identify enterococcal isolates, total DNAs were used as templates for species-specific PCR amplification. The amplification procedure was conducted as described by Dutka-Malen *et al.* (1995) for *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* identification assays, using *E. faecium* CECT 410 and *E. faecalis* CECT 481 as positive controls.

PCR amplification of the microbial community 16S rRNA gene. TTGE samples were prepared by performing two successive PCR amplifications (nested PCR) by using the primer pairs described elsewhere (Ogier *et al.*, 2002). Firstly, a 700-bp fragment of the 16S rRNA gene including the V3 region was amplified. The reaction mixture (100 µl) contained reaction buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50mM KCl [final concentrations]), each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 200 µM, 60 pmol of primer WO1 (5'-AGA GTT TGA TC [A/C] TGG CTC-3'), 60 pmol of primer WO12 (5'-TAC GCA TTT CAC C[G/T]C TAC A-3'), 50 ng of total DNA and 2.5 U of Taq DNA polymerase (Amersham Biosciences). The amplification program was 96 °C for 2 min; 30 cycles at 96 °C for 1 min, 50 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min; and finally, 72 °C for 2 min. The 700-bp fragment was then used to amplify

the V3 region with the following primers [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' (the GC clamp sequence is in bold)] and HDA2 (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA-3') (Ogier *et al.*, 2002). The reaction mixture (100 μ l) consisted of reaction buffer [10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50mM KCl (final concentrations)], each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 200 μ M, 60 pmol of each primer, 1 μ l of the amplified 700-bp fragment and 2.5 U of Taq DNA polymerase. The amplification program was 94 °C for 2min; 30 cycles of 94 °C for 1 min, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min; and finally, 72 °C for 7 min. The sizes and quantities of PCR products were determined by 2% agarose gel electrophoresis.

TTGE analysis. PCR products obtained from the amplification of the V3 region as described above were subject to TTGE analysis. TTGE was performed by using the Dcode universal mutation detection system (Bio-Rad). Polyacrylamide gels were prepared and run with 1 \times TAE buffer [40 mM Tris base, 20 mM glacial acetic acid, 1 mM EDTA (pH 8.3)] diluted from 50 \times TAE buffer. Gels were prepared with 8% acrylamide stock solutions (acrylamide-bisacrylamide, 37.5:1) and a final urea concentration of 7 M. The final electrophoresis conditions were 70 V for 16 h with an initial temperature of 63 °C and a final temperature of 70 °C (the temperature was increased by 0.4 °C per h). Samples (40 μ l) of PCR products were deposited in wells. A magnetic stirrer was used to mix the buffers and improve the homogeneity of the temperature gradient. After runs, gels were stained for 30 min with ethidium bromide (0.5 μ g ml⁻¹ of 1 \times TAE buffer), rinsed for 20 min in 1 \times TAE buffer and photographed under UV transillumination.

DNA sequencing and analysis of sequence data. TTGE fragments were excised with a sterile scalpel. The DNA of each fragment was eluted in 20 μ l of sterile water overnight at 4 °C. One microliter of the eluted DNA of each TTGE band was re-amplified using DNA primers HDA1 and HDA2. To determine the closest known relatives of the partial 16S rRNA gene sequences obtained, public data libraries (RDP and GenBank) were searched using the BLAST and RDP programs. DNA sequencing was carried out on a CEQ 2000 XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, CA).

Detection of bacteriocin activity. Production of antimicrobial substances by strains randomly picked on MRS agar, M17-glucose agar and KF agar was tested by the spot-on-a-lawn method as described by Gálvez *et al.* (1989), using two indicator strains: *E. faecalis* S-47 and *Listeria monocytogenes* CECT 4032. To test the proteinaceous

nature of the inhibitory substances, 10 µl of a trypsin (Sigma, Madrid, Spain) solution (10 mg/ml in distilled water) was deposited on each spot of bacterial growth. The absence of growth-inhibition zones in the trypsin-treated zone indicated the inhibitor's susceptibility to protease.

Detection of mesenterocin by PCR reactions. PCR amplification was undertaken with chromosomal DNA of *Leuconostoc mesenteroides* isolates as the template and with the primers designed in this study from the bacteriocin sequences available in the database (Table 1) under the following conditions: an initial denaturation step at 94 °C for 2 min, 30 cycles at 94 °C for 45 s, specific-primer annealing temperature (see Table 1) for 30 s, 72 °C for 30 s, followed by a final extension at 72 °C for 2 min. PCR amplifications were performed in 50 µl volume containing 100 ng of template DNA, 200 µM deoxynucleoside triphosphates, 25 pmol of the respective primers, 1.5 U Taq DNA polymerase (Amersham Biosciences, Barcelona, Spain) and 1× Taq polymerase buffer. The PCR primers and other specific conditions used in this work are described in Table 1. PCR products were subject to electrophoresis using a 2% agarose gel in 1× TBE buffer (Sambrook *et al.*, 1989).

Determination of *Enterococcus* virulence factors in the Alberquilla community and in isolated enterococci. The presence of virulence determinants was investigated by PCR amplification of known virulence genes such as those involved in the expression of cytolysin (*cylA*, *cylB* and *cylM*), the aggregation substance (*agg*), gelatinase (*gelE*), enterococcal surface protein (*esp*), cell-wall adhesins (*efaAfs* and *efaAfm*) and sex pheromones (*cpd*, *cob* and *ccf*) according to Eaton and Gasson (2001), the collagen adhesion (*ace*) as described by Duprè *et al.* (2003) and the cad sex pheromone gene (Abriouel *et al.*, 2005). Total DNAs of Alberquilla cheese and *Enterococcus* isolates were used as target in PCR reactions. DNA from strain *E. faecalis* FI 9190 was used as positive control in the corresponding PCR reactions.

Antibiotic resistance of enterococci. ATB ENTEROC 5 (BioMérieux, Montalieu Vercie, France) was used to determine the susceptibility of the strains to penicillin, ampicillin, erythromycin, tetracyclin, chloramphenicol, rifampicin, ciprofloxacin, levofloxacin, vancomycin, teicoplanin, nitrofurantoin, gentamicin, streptomycin, and quinupristin-dalfopristin. The test was done following the manufacturer's instructions, and the results were recorded after 24 hours' incubation at 37 °C, following the interpretative criteria of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCLS) (2001).

Table 1. PCR conditions and primers used to amplify the structural genes of bacteriocins produced by *Leuconostoc mesenteroides*.

Bacteriocin	PCR primers (5' → 3')	T ^a (*)	Size (bp)
Leucocin A	F: 5'- TTGGATAATAGTGCTCTCG-3' R: 5'- AAGGCTTCTCCCCAGTTTA-3'	52	101
Leucocin ATa33	F: 5'- AACCTATTATCACGAGAGC-3' R: 5'- TTCCGAAGAGGGGTCAA-3'	52	101
Leucocin Bta11a	F: 5'- TTGGATAATAATGCTCTCG-3' R: 5'- AAGGCTTCTCCCCAGTTT-3'	52	101
Leucocin K	F: 5'- TCAAAGAATAAAAAGAAAATG-3' R: 5'- TTGTTAATGGTTGAAGAGTG-3'	52	145
Mesenterocin B 105	F: 5'- ATGCAAGATAAAAACAAAT-3' R: 5'- TGCTAGCCAAGGAGAAT-3'	44	141
Mesenterocin Y 105	F: 5'-AAGTTGTTGGTGGAAAGTATTATG-3' R: 5'- ATTGGCCAAACGATGTATGC-3'	58	107

(*) Annealing temperature . F: forward; R: reverse

3. RESULTS.

Enumeration of the cheese microbial community using the classical culture approach. The results of the conventional microbiological analyses carried out on different culture media allowed us to obtain quantitative data about the microbiological composition of Alberquilla cheese. The number of LAB obtained on MRS agar and M17-glucose was 6.7×10^8 CFU g⁻¹ and 6.3×10^8 CFU g⁻¹ respectively. The population of enterococci was estimated to be 6.3×10^5 CFU g⁻¹. The presence of enterobacteria was determined as being 1.1×10^5 CFU g⁻¹.

Colonies were chosen randomly from each plate and used in further studies. We selected 176 LAB strains from MRS agar, M17-G agar and KF agar and 30 from McConkey agar.

Fingerprinting of the cultivable community of Alberquilla cheese by RAPD analysis and identification of isolates by 16S rRNA analysis. The RAPD method was used to generate DNA fingerprints for each of the 206 isolates. All the isolates obtained generated DNA fingerprints that were clustered in separate dendrograms, one for each isolation medium (Fig. 1A, B, C and D). Isolates that showed very similar RAPD patterns (similarity coefficient >86%) were considered as belonging to the same strain.

In this way the 30 Gram-negative isolates selected from McConkey agar were reduced to 3 clusters and 5 isolates which were clustered into two major groups: G1-A, with 5 strains, and G2-A, with 3 strains. The analysis of their 16S rRNA gene sequences revealed the presence of 8 strains of *Hafnia alvei* distributed between the two groups. Furthermore, different species were clustered together with the *H. alvei* E13 genotype such as the E1 (*Escherichia coli*) and E28 (*Obesumbacterium proteus*) strains. Another genotype was also identified by rRNA gene sequencing as *Shigella flexneri* (E7), which was similarly clustered together with *H. alvei* E8 (Fig. 1A). Thus it seems evident that genotyping based on RAPD using M13 as primer was inefficient in distinguishing between these genotypes.

The 176 isolates obtained from MRS agar, M17-G and KF agar were reduced to 14, 26 and 4 clusters respectively by RAPD analysis (Fig. 1B, C, D), which were identified by partial 16S rRNA gene sequencing. The microbiological counts and the corresponding percentages of the different species in the community revealed a high degree of diversity, although dominated by LAB, especially by *Lactobacillus* strains. *Lactobacillus paracasei* was the most dominant bacterium (59.2% on MRS agar and 66.6% on M17-agar), followed by *Pediococcus urinaequi* (29.6% on MRS agar), *Lb. plantarum* (17.4% on M17-agar), *Lb. brevis* (6.2% on M17-agar), *Lactococcus lactis* (4.4% on M17-agar), *Leuc. mesenteroides* (3.7% on MRS against 5.3% on M17-agar) and finally *Leuc. pseudomesenteroides* (7.4% on MRS against 0.9% on M17-agar). Enterococci, isolated from KF agar, were also present (*E. faecium*, 96.2% and *E. devriesei*, 3.8% on KF agar). The highest diversity within a single species was found in *Lb. paracasei*, with 10 different genotypes on MRS agar (the E35 cluster being the most numerous) and 11 genotypes on M17-agar (the most numerous clusters being M98, M43, M9 and M69). The strains belonging to *P. urinaequi* were grouped into 2 clusters, followed by *Lb. plantarum* (3 clusters and 2 isolates), *Lb. brevis* (2 clusters and 2 isolates), *Leuc. mesenteroides* (one isolate on M17-agar, and 2 clusters + 1 isolate on M17-agar), *Leuc. pseudomesenteroides* (1 cluster on MRS agar and one isolate on M17-agar), *E. faecium* (3 clusters) and *E. devriesei* (1 isolate) (Fig. 1).

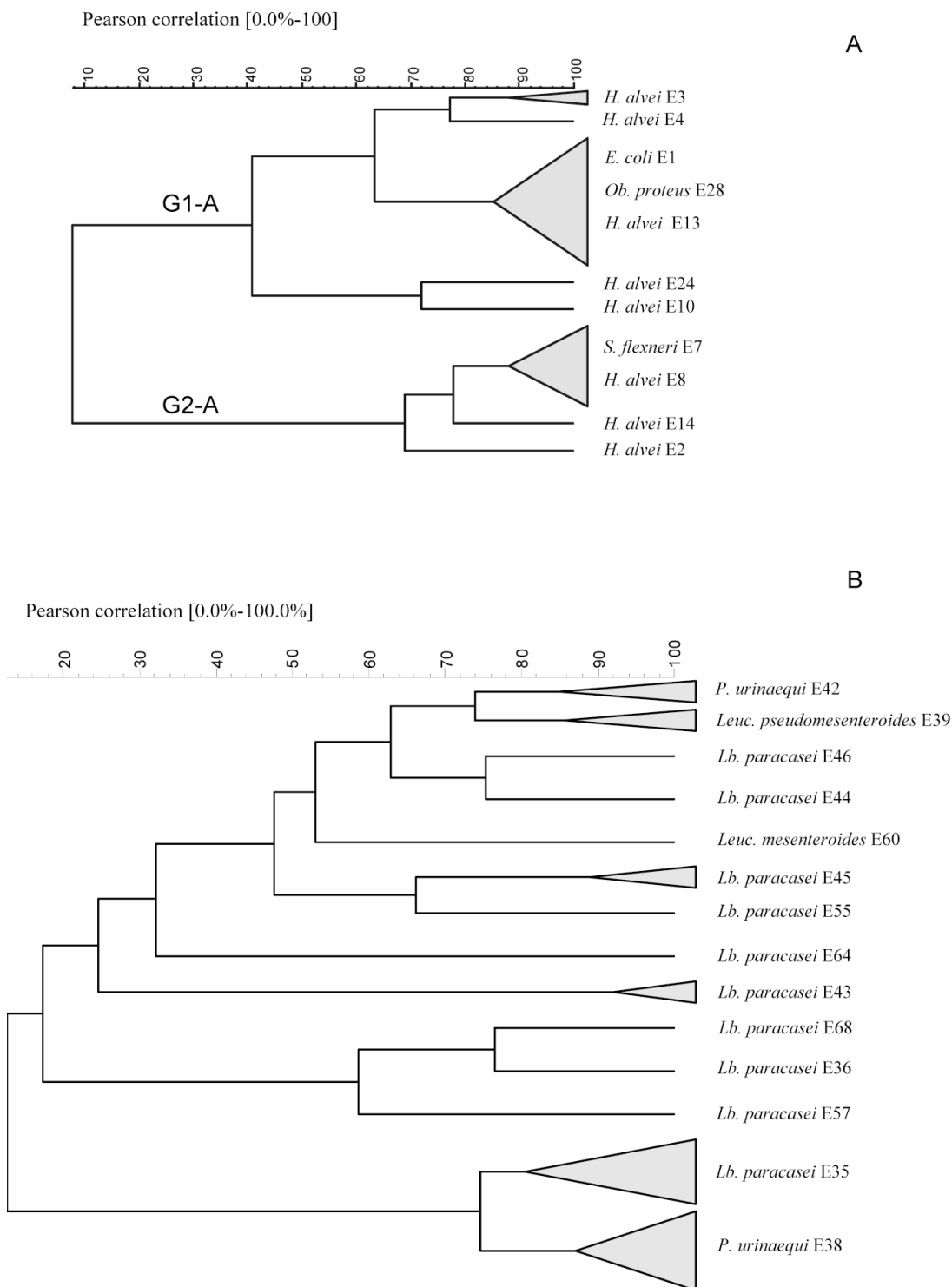


Figure 1. RAPD-PCR analysis of bacteria isolated from Alberquilla cheese in different media. Gram-negative bacteria (A); lactic-acid bacteria isolated on MRS agar (B), M17-glucose agar (C) and KF-agar (D). RAPD-PCR patterns obtained after amplification with primer M13 were clustered according to the Pearson product moment correlation coefficient and the unweighted-pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) cluster analysis.

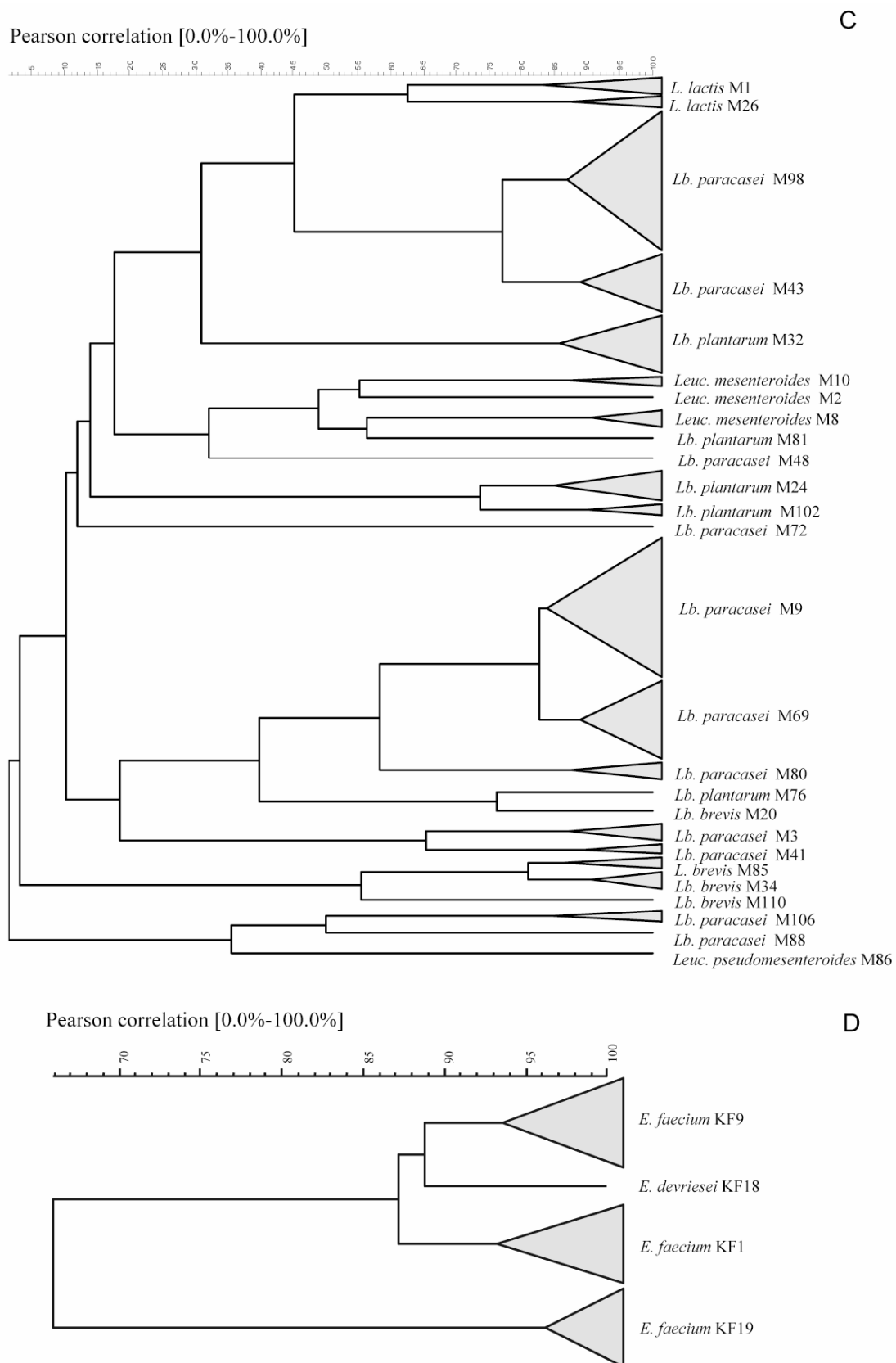


Figure 1. (continued).

TTGE analysis of Alberquilla cheese microbial diversity. 16S rRNA gene fingerprints of the cultured and uncultured bacteria were obtained by PCR-TTGE analyses of the variable V3 regions undertaken with DNA extracted directly from the cheese. The TTGE profile thus obtained showed 10 bands (Fig. 2), with a predominance of *Lc. lactis* (band 9), followed by *Enterococcus* (band 4), *E. coli* (band 8), *Lb. plantarum* (bands 1 and 2). We also detected *Lb. brevis* (band 3), *Lb. paracasei* (band 10), band 6 corresponding to a nitrogen-fixing bacteria, *Lc. lactis* (band 7) and finally band 5, corresponding to *Lb. acidophilus*.

RAPD analysis of bacteriocinogenic strains and screening for genes involved in bacteriocin production. A total of 20 strains were isolated on the basis of their antimicrobial activity against *E. faecalis* S-47 and *L. monocytogenes* CECT 4032 and these were reduced to two (Fig. 3) after RAPD analysis. They were identified as *Ln. mesenteroides* and divided into two genomic groups by 16S rRNA gene sequencing (Fig. 3), G1 (17 strains) and G2 (3 strains).

In an attempt to determine whether these *Leuc. mesenteroides* strains carried genes for the production of known bacteriocins we made a PCR analysis using the specific primers designed in this study for each bacteriocin structural gene. Genes encoding mesenterocin B105 (141 bp) and mesenterocin Y105 (107 bp) were found in all the strains tested (B5, B19, B30, B31, C14 and D31). The genes coding leucocins LeucA, LeucATa33, LeucBta11a and LeucK were not however present in any of the bacteriocinogenic strains.

Detection of virulence determinants in the microbial community of the cheese. PCR amplifications with specific primers for virulence genes revealed that neither the total cheese DNA nor that of the *Enterococcus* strains isolated in this study harboured any genetic determinants for the production of aggregation substance (*agg*), collagen adhesion (*ace*), enterococcal surface protein (*esp*), cell-wall adhesins (*efaAfs*), cytolysin (*cylA*, *cylB* and *cylM*), gelatinase (*gelE*), and sex pheromones (*cpd*, *cob* and *ccf*). In fact, in the total cheese DNA we only found the gene responsible for producing the endocarditis antigen EfaAfm, and only two of the *E. faecium* strains isolated, the KF-9 and KF-10, (KF-9 cluster), harboured this gene.

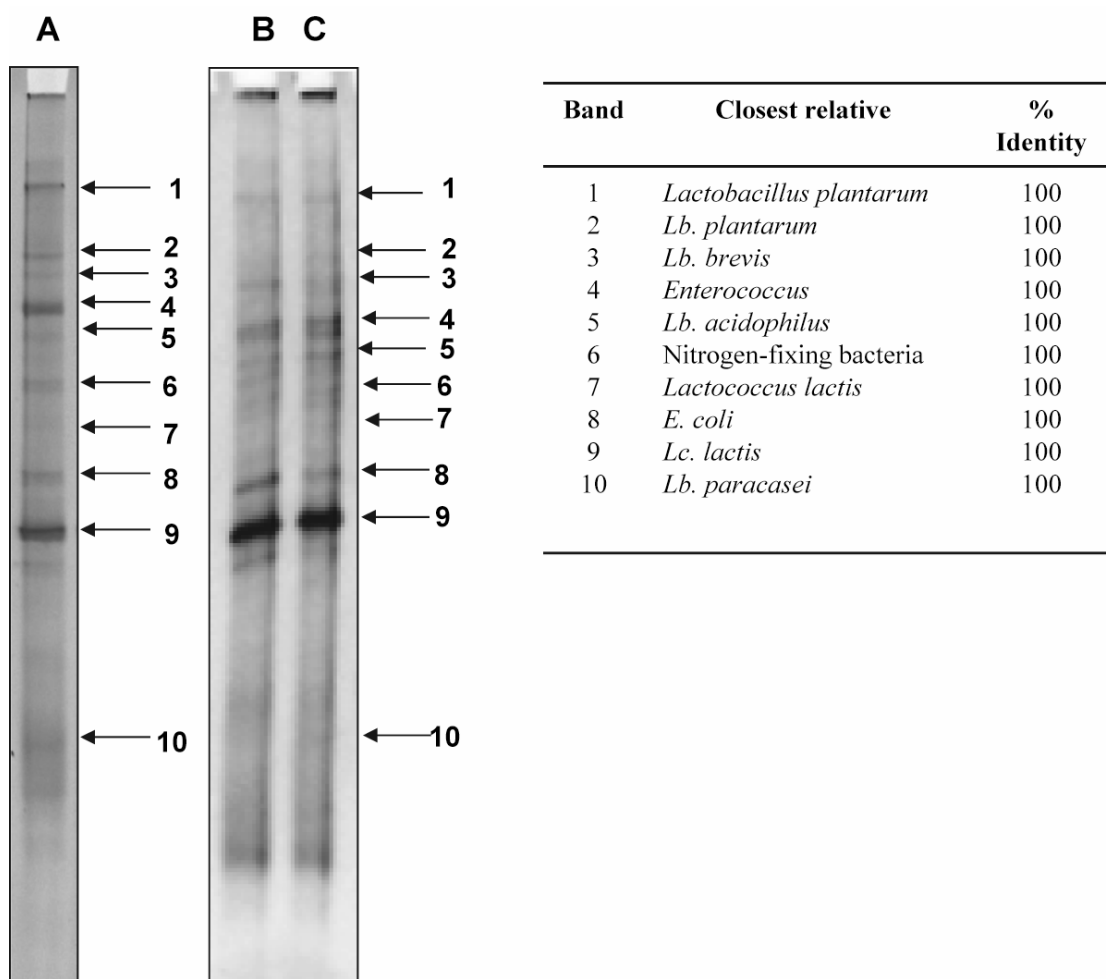


Figure 2. PCR-TTGE profile of the 16S V3 amplicons from microbial DNA extracted directly from Alberquilla cheese (A, B, and C corresponding to different batches). The numbers indicate the sequence bands: 1, *Lactobacillus plantarum*; 2, *Lactobacillus plantarum*; 3, *Lb. brevis*; 4, *Enterococcus* sp.; 5, *Lb. acidophilus*; 6, Nitrogen-fixing bacteria; 7, *Lactococcus lactis*; 8, *E. coli*; 9, *Lc. lactis*; 10, *Lb. paracasei*.

Antibiotic resistance in enterococci strains. All the enterococci isolates, identified as *E. faecium* or *E. devriesei*, were susceptible to penicillin (MIC \leq 8 $\mu\text{g/ml}$), ampicillin (MIC \leq 8 $\mu\text{g/ml}$), gentamicin (MIC \leq 500 $\mu\text{g/ml}$), streptomycin (MIC \leq 1000 $\mu\text{g/ml}$), chloramphenicol (MIC \leq 8 $\mu\text{g/ml}$), vancomycin (MIC \leq 4 $\mu\text{g/ml}$), rifampicin (MIC \leq 1 $\mu\text{g/ml}$), teicoplanin (MIC \leq 8 $\mu\text{g/ml}$) and quinupristin-dalfopristin (MIC \leq 8 $\mu\text{g/ml}$). At low concentrations, erythromycin, ciprofloxacin, levofloxacin, tetracycline and nitrofurantoin exerted a slight inhibitory effect on the growth of some strains but all of the strains were inhibited at higher concentrations (results not shown).

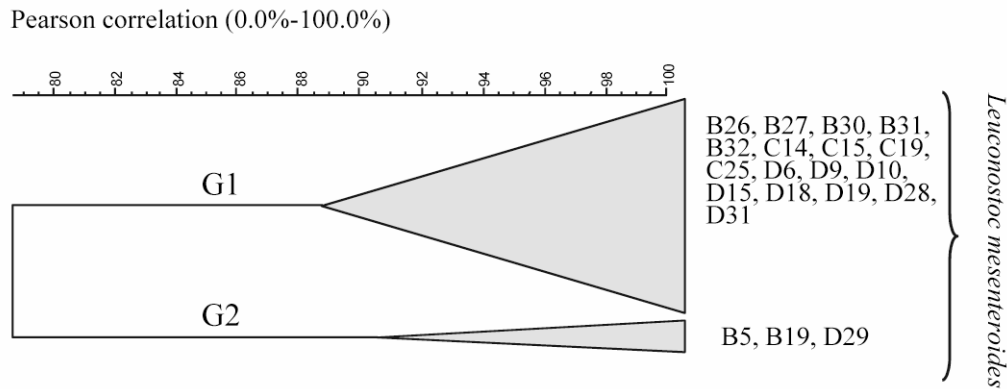


Figure 3. RAPD-PCR analysis of bacteriocinogenic *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from Alberquilla cheese. RAPD-PCR patterns obtained after DNA amplification with primer M13 were clustered according to the Pearson product moment correlation coefficient and the unweighted-pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) cluster analysis.

4. DISCUSSION.

Alberquilla cheese is a traditional cheese made in the Alpujarra mountains (Granada, south-east Spain) from raw milk fermented spontaneously without a starter culture. The microbiological characteristics of this cheese were hitherto unknown. This situation is very common with farmhouse cheeses and consequently could raise doubts about their safety to health. We have investigated the microbial diversity of Alberquilla cheese for the first time by using a polyphasic approach, combining microbial enumeration in selective culture media, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of isolates and temporal temperature-gradient gel electrophoresis (TTGE) fingerprinting of the cheese's total DNA. Classical and molecular approaches led to the identification of 206 isolates from the cheese, belonging to different groups of bacteria, although the microbial flora was dominated by lactic-acid bacteria. Enterobacteria were also present as secondary or adventitious microbiota. When RAPD analysis was applied to type the 206 isolates they were reduced to 52. Subsequent 16S rRNA analysis of the strains revealed that they belonged mainly to the LAB group and secondarily to enterobacteria, especially members of the species *H. alvei*. Various genera of *Enterobacteriaceae* are commonly found in raw-milk cheeses (De Boer and Kuik, 1987; Gaya *et al.*, 1987; Nooitgedagt and Hartog, 1988; Zago *et al.*, 2007), which are

occasionally involved in both intestinal and extraintestinal infections in humans. *Hafnia*, for example, causes a variety of systemic infections, including septicemia and pneumonia (Janda and Abbott, 2006). Nevertheless, the presence of non-pathogenic enterobacteria is considered to be necessary for certain growth and metabolic activities linked to the formation of gas and aroma in some types of cheese (Addeo and Coppola, 1983), and some strains possess proteolytic systems active in all casein fractions under cheese manufacturing and ripening conditions (Morales *et al.*, 2003). In this study we isolated 8 *H. alvei* strains clustered with RAPD analysis into two genomic groups, suggesting a diversity within *H. alvei* that involves the percentage in G+C content of *Hafniae* (Izard *et al.*, 1978). Two very different G+C contents for *Hafnia* have been published, the more common being 48.7 mol%, although a higher value of 52.6 to 57.7 mol% has also been reported (Greipsson and Priest, 1983). The remaining enterobacteria were members of *E. coli*, *S. flexneri* and *Ob. proteus* (<0.001%). The presence of enterobacteria in Alberquilla cheese could constitute a health risk and may reflect poor standards of hygiene during handling (Araujo *et al.*, 2002; Coia *et al.*, 2001; De Buyser *et al.*, 2001; Albert *et al.*, 1991, 1992).

With regard to LAB, it is noteworthy that different results were obtained depending upon whether MRS or M17 medium was used, although in both cases the isolates belonged to LAB group. Thus the relative quantities of isolated species and genotypes were different and furthermore most of the isolated strains were specific to each culture medium. Nevertheless, in either case the isolates could be assigned mainly to the genus *Lactobacillus* (59.2% in MRS and 90.2% in M17), *Lb. plantarum* (17.4%) and *Lb. brevis* (6.2%) were also isolated in M17 agar. Other LAB were identified as *Leuc. mesenteroides* and *Leuc. pseudomesenteroides*, *P. urinaequi*, *Lc. lactis*, *E. faecium* (96.2% from total enterococci) and *E. devriesei* (3.8% from total enterococci). It is interesting note that *P. urinaequi* (29.6% in MRS agar) was not isolated from M17 agar in spite of the greater number of strains isolated from this medium. According to RAPD analysis these strains were distributed throughout dendrograms that revealed the great genetic diversity among the isolates. This diversity in certain species, such as *Lb. paracasei* (genotypes E35, M9, M98, M43 and M69), might be the result of the higher number of strains used for comparison and, therefore, of the increased probability of encountering more distantly related taxonomic units. The predominance of facultative heterofermentative lactobacilli in cheese has also been described in Cheddar cheese (Fitzsimons *et al.*, 1999; Lynch *et al.*, 1996; Peterson and Marshall, 1990), Swiss-type

cheese (Demarigny *et al.*, 1996) and ripe cooked cheese (Eliskases-Lechner *et al.*, 1999) and these may well play a role in the fermentation and enhancement of the flavour of Alberquilla cheese. All the isolated *Leuc. mesenteroides* strains produced mesenterocin B105 and mesenterocin Y105, which were active against the pathogen *L. monocytogenes* and *E. faecalis* S-47. The production of mesenterocin has also been reported by Daba *et al.* (1991) in Cheddar cheese, and may prove to protect cheese against colonisation by *L. monocytogenes*.

Within the LAB group *Enterococcus* is the most controversial genus. The natural habitat of enterococci is the mammalian intestinal tract (Franz *et al.*, 1999; Devriese *et al.*, 1992; Gelsomino *et al.*, 2002) and their presence in foodstuffs has usually been related to poor standards of hygiene during manufacture (López-Díaz *et al.*, 1995). In addition, enterococci have been related to several virulence factors associated with a number of human infections. In recent years, however, some studies into the microbiota of many traditional cheeses in Mediterranean countries have indicated that they may well play an important role in the ripening of these cheeses, probably through proteolysis, lipolysis, and the breaking down of citrate, hence contributing to their typical taste and flavour (Foulquié Moreno *et al.*, 2006). Thus, enterococci are found in a variety of farmhouse cheeses made from raw or pasteurised milk from goats, sheep, water buffaloes and cows (Cogan *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 1999). *E. faecalis* and *E. faecium* being the most common enterococcal species in cheese (Arizcún *et al.*, 1997; Centeno *et al.*, 1995; Cogan *et al.*, 1997). In this study we isolated three *E. faecium* strains and only one strain of *E. devriesei*. Our search for virulence traits among the enterococci isolated revealed that they were almost absent, except for the endocarditis antigen EfaAfm in two *E. faecium* strains. The *efaAfm* virulence determinant was also detected in cheese samples. The presence of *efaAfm* in *E. faecium* isolated from cheese is common among *E. faecium* starter strains in milk and cheese (Eaton and Gasson, 2001) but, as suggested by Nallapareddy *et al.* (2006), other virulence factors may possibly be required in conjunction with EfaA to express pathogenic genes such as *esp*, *hyl* and *acm*. This is a very interesting result in that it suggests that enough information can be obtained about food safety via the direct screening of virulence determinants in food samples rather than going through all the steps of strain isolation and screening. All the enterococci isolates in this study were susceptible to the most clinically relevant antibiotics, vancomycin included.

From these results it can be concluded that conventional culture-dependent methods combined with molecular techniques such as RAPD can afford a significant insight into specific isolates and microbial populations occurring in cheese. Nevertheless, cultivation may either over- or underestimate microbial diversity if the media used are not sufficiently selective for monitoring populations. The application of molecular methods to total community DNA, such as PCR amplification of the 16S rRNA gene in combination with temperature-gradient gel electrophoresis, may overcome this drawback in part and is in fact a technique commonly used to this end in microbial ecology (Ampe *et al.*, 1999; Ercolini *et al.*, 2001; Ercolini, 2004; Pérez-Pulido *et al.*, 2005). TTGE fingerprinting of the microbial population from DNA extracted directly from Alberquilla cheese and amplified by using the primers targeting the V3 16S rRNA region allowed us to obtain an overview of microbial diversity without the limitation of cultivation methods, which have been widely discussed by different researchers (Amann *et al.*, 1995; Ampe *et al.*, 1999; Muyzer, 1999). The results obtained with culture-independent methods showed that the predominant species was *Lc. lactis*, whilst *Lb. paracasei*, the predominant species as determined by culture-dependent methods, was represented by a faint band in the TTGE analysis. The profiles obtained by TTGE allowed us to divide the bacterial population of Alberquilla cheese into two groups according to band intensity: the first made up of the dominant species, *Lc. lactis* and *Enterococcus* sp. and the second comprising LAB (*Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *L. brevis*, and *Lb. acidophilus*) and non-LAB species such as *E. coli*. A comparison of the results from molecular and culture-dependent studies revealed a similar qualitative species composition for Alberquilla cheese, and all the species of *Lactobacillus* were similarly identified in both cases, except for *Lb. acidophilus* and an unidentified nitrogen-fixing bacterium, which was only detected by culture-independent methods. Furthermore, *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. pseudomesenteroides*, and *P. urinaequi* were only identified by culture-dependent methods, possibly due to the fact that DNA extraction and amplification may vary considerably according to the bacterial species and food matrices in question (Abriouel *et al.*, 2006). Moreover, Muyzer *et al.* (1999) reported that species representing less than 1% of the total community could not be visible in fingerprinting profiles of a microbial community. Our results demonstrate the great microbial diversity of Alberquilla cheese, a cheese made by spontaneously fermenting a mixture of raw goats' and sheep's milk. The identified bacteria include species of technological interest such as different LAB species, which confer

organoleptic and nutritional properties upon the cheese, and also enterobacterial strains, which might compromise the safety of the food in health terms. This latter problem could be addressed by introducing stricter hygienic measures during the manufacturing process and also by using the appropriate starter cultures, which, in addition, could yield a more homogenous product. Biodiversity studies such as this may also serve to select the appropriate starter cultures to solve any potential health risks involved in the manufacture of traditional fermented food without causing any alteration to their organoleptic peculiarities.

5. REFERENCES.

- Abriouel, H., N. Ben Omar, R. Lucas, M. Martínez-Cañamero, S. Keleke, and A. Gálvez.** 2006. Culture-independent analysis of the microbial composition of the African traditional fermented foods *poto poto* and *dégué* by using three different DNA extraction methods. *Int. J. Food Microbiol.* **111**: 228-233.
- Abriouel, H., R. Lucas, N. Ben Omar, E. Valdivia, M. Maqueda, M. Martínez-Cañamero, and A. Gálvez.** 2005. Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**: 383-397.
- Addeo, F., and S. Coppola.** 1983. Aspetti tecnologici e microbiologici della trasformazione del latte di bufala in mozzarella e ricotta. *Il Latte* **8**: 706-723.
- Albert, M.J., K. Alam, M. Islam, J. Montanaro, A.S.M.H. Rahman, K. Haider, M.A. Hossain, A.K.M.G. Kibriya, and S. Tzipori.** 1991. *Hafnia alvei*, a probable cause of diarrhea in humans. *Infect. Immun.* **59**: 1507-1513.
- Albert, M.J., S.M. Faruque, M. Ansaruzzaman, M.M. Islam, K. Haider, K. Alam, I. Kabir, and R. Robins-Browne.** 1992. Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. *J. Med. Microbiol.* **37**: 310-314.
- Amann, R.I., W. Ludwig, and K.H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Ampe, F., N. Ben Omar, C. Moizan, C. Wacher, and J.P. Guyot.** 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5464-5473.
- Araujo, V.S., V.A. Pagliares, M.L. Queiroz, and A.C. Freitas-Almeida.** 2002. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Appl. Microbiol.* **92**: 1172-1177.

- Arizcún, C., Y. Barcina, and P. Torre.** 1997. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* ssp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **38**: 17-24.
- Ben Omar, N., A. Castro, R. Lucas, H. Abriouel, N.M.K. Yousif, C.M.A.P. Franz, W.H. Holzappel, R. Pérez-Pulido, M. Martínez-Cañamero, and A. Gálvez.** 2004. Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**: 118-130.
- Boylston, T.D., C.G. Vinderola, H.B. Ghoddusi, and J.A. Reinheimer.** 2004. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *Int. Dairy J.* **14**: 375-387.
- Centeno, J.A., A. Cepeda, and J.L. Rodríguez-Otero.** 1995. Identification and preliminary characterization of strains of enterococci and micrococci isolated from Arzúa raw cows'-milk cheese. *Nahrung* **1**: 55-62.
- Cogan, T.M., M. Barbosa, E. Beuquier, B. Bianchi-Salvadoris, P.S. Cocconcelli, I. Fernández, J. Gómez, R. Gómez, G. Kalantzopoulos, A. Ledda, M. Medina, M.C. Rea, and E. Rodríguez.** 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J.Dairy Res.* **64**: 409-421.
- Coia, J.E., Y. Johnston, N.J. Steers, M.F. Hanson.** 2001. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. *Int. J. Food Microbiol.* **66**: 63-69.
- Daba, H., S. Pandian, J.F. Gosselin, R.E. Simard, J. Huang, and C. Lacroix.** 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3450-3455.
- De Boer, E., and D. Kuik.** 1987. A survey of the microbiological quality of blue-veined cheese. *Neth. Milk. Dairy J.* **41**: 227-237.
- De Buyser, M.L., B. Dufour, M. Maire, and V. Lafarge.** 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* **67**: 1-17.
- De los Reyes-Gavilán, C.G., G.K.Y. Limsowtin, P. Tailliez, L. Séchaud, and J.P. Accolas.** 1992. A *Lactobacillus helveticus*-specific DNA probe detects restriction fragment length polymorphisms in this species. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3429-3432.
- Demarigny, Y., E. Beuquier, A. Dasen, and G. Duboz.** 1996. Influence of the raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. I. Evolution of

- microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative lactobacilli. *Lait*. **76**: 371-387.
- Devriese, L.A., L. Laurier, P. De Herdt, and F. Haesebrouck.** 1992. Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. *J. Appl. Bacteriol.* **72**: 29-31.
- Duprè, I., S. Zanetti, A.M. Schito, G. Fadda, and L.A. Sechi.** 2003. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J. Med. Microbiol.* **52**: 491-498.
- Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin, P.** 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1628-1635.
- Eaton, T.J., and M.J. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 1628-1635.
- Eliskases-Lechner, F., W. Ginzinger, H. Rohm, and E. Tschager.** 1999. Raw milk flora significantly affects composition and quality of Bergkäse. 1. Microbiology and fermentation compounds. *Lait*. **79**: 385-396.
- Ercolini, D.** 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods* **56**: 297-314.
- Ercolini, D., G. Moschetti, G. Blaiotta, and S. Coppola.** 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. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**: 610-617.
- Fitzsimons, N.A., T.M. Cogan, S. Condon, and T. Beresford.** 1999. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3418-3426.
- Foulquié Moreno, M.R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, and L. De Vuyst.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 1-24.
- Franz, C.M.A.P., W.H. Holzapfel, and M.E. Stiles.** 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* **47**: 1-24.
- Gálvez, A., E. Valdivia, M. Martínez-Bueno, and M. Maqueda.** 1989. Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by

- Streptococcus (Enterococcus) faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. Antimicrob. Agents Chemother. **33**: 437-441.
- Gaya, P., M. Medina, and M. Núñez.** 1987. Enterobacteriaceae, coliforms, faecal coliforms and salmonellas in raw ewes' milk. J. Appl. Bacteriol. **62**: 321-326.
- Gelsomino, R., M. Vancanneyt, T.M. Cogan, S. Condon, and J. Swings.** 2002. Source of Enterococci in a Farmhouse Raw-Milk Cheese. Appl. Environ. Microbiol. **68**: 3560-3565.
- Greipsson, S., and F.G. Priest.** 1983 . Numerical taxonomy of *Hafnia alvei*. Int. J. Syst. Bacteriol. **33**: 470-475.
- Izard, D., C. Ferragut, F. Gavini, and H. Leclerc.** 1978 . Variations of the moles percent guanine plus cytosine within a group of *Enterobacteriaceae* belonging or related to the genus *Enterobacter*. Int. J. Syst. Bacteriol. **28**: 449-452.
- Janda, J.M., and S.L. Abbott.** 2006. The Genus *Hafnia*: from Soup to Nuts. Clin. Microbiol. Rev. **19**: 12-28.
- Kieronczyk, A., S. Skeie, T. Langsrud, and M. Yvon.** 2003. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 734-739.
- Kourkoutas, Y., L. Bosnea, S. Taboukos, C. Baras, D. Lambrou, M. Kanellaki.** 2006. Probiotic cheese production using *Lactobacillus casei* cells immobilized on fruit pieces. J. Dairy Sci. **89**: 1439-1451.
- Litopoulou-Tzanetaki, E., N. Tzanetakis, and A. Vafopoulou-Mastrojiannaki.** 1993. Effect of the type of lactic starter on microbiological, chemical and sensory characteristics of feta cheese. Food Microbiol. **10**: 31-41.
- López-Díaz, T.M., J.A. Santos, C.J. González, B. Moreno, and M.L. García.** 1995. Bacteriological quality of a traditional Spanish blue cheese. Milchwiss **50**: 503-504.
- Lynch, C.M., P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, T.M. Cogan, and F.D. Drinan.** 1996. Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. Int. Dairy J. **6**: 851-867.
- Morales, P., E. Fernández-García, and M. Núñez.** 2003. Caseinolysis in cheese by Enterobacteriaceae strains of dairy origin. Lett. Appl. Microbiol. **37**: 410-414.
- Muyzer, G.** 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Curr. Opin. Microbiol. **2**: 317-322.

- Nallapareddy, S.R., K.V. Singh, and B.E. Murray.** 2006. Construction of improved temperature-sensitive and mobilizable vectors and their use for constructing mutations in the adhesin-encoding *acm* gene of poorly transformable clinical *Enterococcus faecium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 334-345.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh informational supplement. NCCLS document M100–S11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa.
- Nooitgedagt, A.J., and B.J. Hartog.** 1988. A survey of the microbiological quality of Brie and Camembert cheese. *Neth. Milk. Dairy J.* **42**, 57-72.
- O’Sullivan, L., R.P. Ross, and C. Hill.** 2003. A lacticin 481-producing adjunct culture increases starter lysis while inhibiting nonstarter lactic acid bacteria proliferation during Cheddar cheese ripening. *J. Appl. Microbiol.* **95**: 1235-41.
- Ogier, J.-C., O. Son, A. Gruss, P. Tailliez, and A. Delacroix-Buchet.** 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature-gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3691-3701.
- Pérez-Pulido, R., N. Ben Omar, H. Abriouel, R. Lucas-López, M. Martínez-Cañamero, and A. Gálvez.** 2005. Microbiological Study of Lactic Acid Fermentation of Caper Berries by Molecular and Culture-dependent Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7872-7879.
- Peterson, S.D., and R.T. Marshall.** 1990. Nonstarter lactobacilli in Cheddar cheese: a review. *J. Dairy Sci.* **73**: 1395-1410.
- Ryan, M.P., M.C. Rea, C. Hill, and R.P. Ross.** 1996. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 612-619.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York.
- Sańko, B., M. Kujawski, E. Podhajna, G. Cichosz, and J. Butler.** 2001. Synergistic and antagonistic properties of selected cultures of lactic acid and propionic acid bacteria. Part I. Fermentation activity **66**: 621-625.

- Topisirovic, L., M. Kojic, D. Fira, N. Golic, I. Strahinic, and J. Lozo.** 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **112**: 230-235.
- Zago, A., B. Bonvini, A.M. Martín-Platero, G. Mucchetti, D. Carminati, and G. Giraffa.** 2007. Characterization of *Escherichia coli* isolated from raw milk cheeses. *Ann. Microbiol.* **57**: 49-54.

CAPÍTULO V

**Polyphasic Study of Microbial Communities of
Two Spanish Farmhouse Goats' Cheeses from
Sierra de Aracena**

ABSTRACT

The microbial communities present in two types of farmhouse goats' cheese from the Aracena mountains in Spain, Quesaila Arochena (hard cheese) and Torta Arochena (soft cheese), have been studied using both culture-dependent and culture-independent techniques. A total of 26 different species were isolated, the majority belonging to the lactic-acid bacteria (LAB), mainly represented by *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus* species, together with a significant proportion of enterococci. The most abundant non-LAB organisms were the enterobacteria. RAPD characterisation of the isolates revealed that most of the genotypes were cheese-specific, although a few common ones existed.

The culture-independent study carried out by temporal-temperature-gradient gel electrophoresis (TTGE) revealed less species diversity, with a predominance of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum*. Nevertheless, TTGE also detected some non-isolated organisms such as *Leuconostoc lactis* and *Mycoplasma agalactiae* in Quesaila Arochena. Apart from this, the fingerprinting of lactobacilli populations by length-heterogeneity PCR showed the predominance of *Lactobacillus plantarum*/*Lactobacillus paraplantarum*.

1. INTRODUCTION.

The microbiota present in raw milk contribute to cheese aroma and flavour, thus increasing its attraction to consumers and ultimately its commercial value (Albenzio *et al.*, 2001; Beuvier *et al.*, 1997). Consequently the intrinsic microbial biodiversity in farmhouse cheeses is an essential part of their make-up. Many of these cheeses, especially those manufactured with goats' milk, are traditionally manufactured on a small-scale and little is known about their microbiology (Cogan *et al.*, 1997; López and Mayo, 1997). In contrast, large-scale, industrial cheese production using pasteurized milk and well established starter cultures that overgrow the indigenous microorganisms

has led to a reduction in the biodiversity of microbiota and hence to a predictable sameness in their organoleptic qualities. Thus the isolation and characterization of the microbial strains involved in the natural fermentation of traditional cheeses could be useful when designing new starter or adjunct cultures for the dairy industry to produce such cheeses in a more controlled way (Beresford *et al.*, 2001; Marino *et al.*, 2003).

The traditional approach to studying microbial ecosystems consists of isolating and enumerating microbial groups by growing them on various selective culture media and identifying the predominant populations phenotypically. Nevertheless, the time involved in phenotypic identification and possible inaccuracy in the results has led in recent years to the use of molecular methods (Callon *et al.*, 2004) such as species-specific PCR (Marino *et al.*, 2003) and 16S rDNA sequencing (Poznanski *et al.*, 2004). Furthermore, different molecular techniques such as restriction-fragment-length polymorphism (RFLP), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR), and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) are being applied to the intraspecific typification of different LAB strains (Bulut *et al.*, 2005; Callon *et al.*, 2004; Giraffa and Rossetti, 2004; Klein *et al.*, 1998; Poznanski *et al.*, 2004; Randazzo *et al.*, 2002).

Bearing in mind that only a fraction of microorganisms can be isolated by culture-dependent methods (Randazzo *et al.*, 2002; Ward and Timmins., 1990), it seems evident that isolated strains do not reflect the real composition of the whole microbial ecosystem (Giraffa and Neviani, 2001). Several culture-independent methods have been used to overcome this problem, including terminal restriction-fragment-length polymorphism (T-RFLP), length heterogeneity PCR (LH-PCR), single-strand conformation polymorphism (SSCP), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), temperature-gradient gel electrophoresis (TGGE), and temporal-temperature-gradient gel electrophoresis (TTGE). All these techniques have been applied specifically to fermented foods and dairy ecosystems (Andrighetto *et al.*, 2004; Cocolin *et al.*, 2000; Duthoit *et al.*, 2003; Lazzi *et al.*, 2004; Randazzo *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2006b). The general result arising from these studies is the need to use a polyphasic approach that combines culture-dependent and independent methods to obtain more complete and realistic information about the microbial communities in natural environments (Duthoit *et al.*, 2003; Ercolini *et al.*, 2001). Due to the heterogeneity and complexity of natural environments it would be reasonable to suppose that all of these methods are not

equally applicable to all cases. Nowadays great efforts are being made to establish the most suitable method or combination of methods to be applied to any particular environment.

The aim of this study was to obtain the most complete description of the microbial communities of Quesaila Arochena and Torta Arochena, two highly distinctive farmhouse cheeses made with raw goats' milk in the Sierra de Aracena in south-western Spain, by the application of culture-dependent methods and two culture-independent methods (TGGE and LH-PCR).

2. MATERIAL AND METHODS.

Sampling procedures and microbiological analysis. Two highly appreciated farmhouse cheeses, Quesaila Arochena (60 days old) and Torta Arochena (120 days old), made in different factories within the Sierra de Aracena nature reserve, were chosen for this analysis. Both cheeses are made with raw goats' milk without the addition of starter cultures. They were ripened at the dairy under traditional conditions and transported under refrigeration (4 °C) to the laboratory for analysis. Three individual batches of each cheese were analysed.

The cheese samples (10 g) were homogenized in 90 mL of a prewarmed (37 °C), sterile, 2% sodium-citrate solution in sterile plastic bags with lateral filters using a masticator lab blender (IUL Instruments, Barcelona, Spain) for 2 min. One millilitre of the resulting mixture was taken from the filter side and tenfold serial dilutions were prepared in sterile saline solution (0.85% w/v NaCl) up to 10^{-7} . A 100 µL aliquot was spread in triplicate on agar plates for bacterial enumeration: Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS, Scharlau, Barcelona, Spain) and M17-1% glucose (M17-G, Scharlau) agar for total LAB, Kenner Fecal agar (KF, Scharlau) for enterococci, Voguel-Johnson (VJ, Scharlau) for staphylococci and McConkey agar (Scharlau) for enterobacteria. Viable counts were obtained after 48 hours' and 3 days' incubation at 28 °C. Results were calculated as the mean values of the three determinations. The average and standard deviations of the counts were calculated. Subsequently ten to twenty strains (corresponding to the square roots of total colonies) were isolated at random from different media plates. The isolates were further re-isolated to check their purity, and

were later examined morphologically (Gram stain and catalase test). Pure cultures were stored in 35% glycerol at -80 °C.

Another strategy for this study was based on the quantitative PCR most-probable-number (QPCR-MPN) assay for detection of LAB growth in enrichment cultures. To this end 10 g replicates of cheese were homogenized as described above and the suspensions were serially diluted ten-fold in triplicate in tubes containing MRS broth and Rothe broth (Scharlau, Barcelona, Spain) and incubated without agitation at 28 °C for 48 h. The most probable number was determined from the more diluted tubes showing turbidity. Tubes showing turbidity were selected for TTGE analysis or species-specific PCR.

DNA extraction. DNA for PCR amplification was extracted according to the method of Martín-Platero *et al.*, (2007).

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). All strains were genotyped using the RAPD-PCR procedure. PCR reactions were carried out in a total volume of 50 µl containing 5 µL of 10 × Taq reaction buffer, 3 mM of MgCl₂, 400 µM of dNTPs, 1 µM of M13 primer (5'- GAGGGTGGCGTTCT-3'), 1 U of Taq DNA polymerase (MBL, Córdoba, Spain) and 2 µL of template DNA. Amplifications were done in an iCycler 170-8720 thermocycler (Biorad, Hercules, Calif.) with a cycling programme consisting of an initial denaturing step at 94 °C for 60 s, 35 cycles of 94 °C for 60 s, 40 °C for 20 s (with 0.6 °C/s ramp) and 72 °C for 80 s (with 0.6 °C/s ramp) and a final extension of 72 °C for 5 minutes.

Products were analysed by electrophoresis through 1.5% agarose gels at 30 V for 16 h in a 1 × TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 2.5 mM EDTA, pH 8) and revealed in ethidium bromide (0.5 µg mL⁻¹). Gels were photographed on a UV transillumination table (Vilber Lourmat, France) and analysed by Fingerprinting II Informatix software (Bio-Rad). Similarity matrix was based on the Pearson product moment correlation coefficient and the corresponding dendrogram was deduced using the unweighted-pair-group method with arithmetic averages (UPGMA). The reproducibility of RAPD was established by carrying out three independent PCRs of each strain and then analysing the band pattern.

16S rDNA gene sequencing. A 700 bp fragment of the 16S ribosomal DNA gene containing the V1 to V4 variable regions was amplified in a representative strain of each genotype and subsequently sequenced. PCR reactions were carried out in a total volume of 50 µL containing 5 µL of 10 × Taq reaction buffer, 1.5 mM of MgCl₂, 400

μM of dNTPs, $0.4 \mu\text{M}$ of the primers WO1 (5'-AGA GTT TGA TC(AC) TGG CTC-3') and WO12 (5'-TAC GCA TTT CAC C(GT) C TAC A-3'), 1 U of Taq DNA polymerase (MBL) and $1 \mu\text{L}$ of template DNA. The amplification programme consisted of an initial denaturing step at $94 \text{ }^\circ\text{C}$ for 4 min followed by 30 cycles at $94 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 s, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 s and $72 \text{ }^\circ\text{C}$ for 60 s, and a final extension of $72 \text{ }^\circ\text{C}$ for 2 min. The PCR products were purified with a Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendorf, Hamburg, Germany) and sequenced using an ABI PRISM dye-terminator cycle-sequencing ready-reaction automated sequencer (ABI 3100, Applied Biosystems, Madrid, Spain). Homologies were searched for in the BLASTN database (National Center for Biotechnology Information) using BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

Species-specific PCR. The identity of the strains belonging to the same genotype, in which the 16S rDNA gene was not sequenced, was confirmed by species-specific PCR. PCR reactions were carried out in a total volume of $50 \mu\text{L}$ containing $5 \mu\text{L}$ of $10 \times$ Taq reaction buffer, 1.5 mM of MgCl_2 , $400 \mu\text{M}$ of dNTPs, $0.4 \mu\text{M}$ of the two primers, 1 U of Taq DNA polymerase (MBL) and $1 \mu\text{L}$ of template DNA (50 ng). The species-specific primers used are listed in Table 1. Amplification programmes were performed following the indications of the corresponding authors. Products were analysed by electrophoresis through 1% agarose gels in a $1 \times$ TAE buffer.

Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE). TTGE was undertaken using two different target genes: 16S and *rpoB*. For the former, TTGE samples were prepared by performing a nested PCR. First a 700 bp fragment of the 16S rDNA gene was amplified as described above with primers WO1 and WO12 (Table 1), but using 1.5 U of Eppendorf Master Taq polymerase and $2 \mu\text{L}$ (100 ng) of template DNA. This PCR product was used as a template to amplify the V3 region of the 16S rDNA gene with the primer pair 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') and HDA2 (5'- GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA -3') (Ben Omar and Ampe, 2000; Ogier *et al.*, 2002). PCR reactions were carried out in a total volume of $50 \mu\text{L}$ containing $5 \mu\text{L}$ of $10 \times$ Taq reaction buffer, $10 \mu\text{L}$ of $5 \times$ Taq enhancer, 1.5 mM of $(\text{OAc})_2\text{Mg}$, $400 \mu\text{M}$ of dNTPs, $1 \mu\text{M}$ of each primer, 1.5 U of Eppendorf MasterTaq polymerase and $1 \mu\text{L}$ of the amplified 700 bp fragment of the 16S ribosomal gene. The amplification programme consisted of an initial denaturing step at $94 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 min, then

30 cycles at 94 °C for 30 s, 52 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, and a final extension of 72 °C for 5 min.

The PCR product of the V3 region was analysed by TTGE, which was performed using the Dcode universal mutation detection system (Bio-Rad) according to Ogier *et al.* (2002). Gels were photographed on an UV transillumination table (Vilber Lourmat, France) and different bands were cut out using a sterile scalpel before being

Table 1. Primers used in this study.

Primers	Specificity	Reference
WO1_for: 5'-AGAGTTTGATC(AC)TGGCTC-3'	16S rDNA	Ogier <i>et al.</i> , 2002
WO12_rev: 5'-TACGCATTTCCACC(GT)CTACA-3'	gene	
Lacto1: 5'-GTAACCTACCGAGAAAGGG-3'	<i>Lactococcus</i>	Deasy <i>et al.</i> , 2000
Lacto2: 5'-ATCTCTAGGAATAGCAC-3'		
Enterol: 5'-CCCGGCTCAACCGGG-3'	<i>Enterococcus</i>	Deasy <i>et al.</i> , 2000
Enterol2: 5'-CTCTAGAGTGGTCAA-3'		
R16-1F: 5'-CTTGACACACCGCCCGTCA-3'	<i>Lactobacillus</i>	Dubenert <i>et al.</i> , 2002
LbLMA1-R: 5'-CTCAAACCTAAACAAAGTTTC-3'		
ddl-E1: 5'-ATCAAGTACAGTTAGTCTT-3'	<i>E. faecalis</i>	Dutka-Malen <i>et al.</i> , 1995
ddl-E2: 5'-ACGATTCAAAGCTAACTG-3'		
FAC1-1: 5'-GAGTAAATCACTGAACGA-3'	<i>E. faecium</i>	Depardieu <i>et al.</i> , 2004
FAC2-1: 5'-CGCTGATGGTATCGATTCAT-3'		
DuHiF: 5'-TTATGTCCCTGTTTTGAAAAATCAA-3'	<i>E. hirae</i>	Knijff <i>et al.</i> , 2001
HiR: 5'-TTTTGTTAGACCTCTTCCGGA-3'		
DuHiF: 5'-TTATGTCCCTGTTTTGAAAAATCAA-3'	<i>E. durans</i>	Knijff <i>et al.</i> , 2001
DuR: 5'-TGAATCATATTGGTATGCAGTCCG-3'		
St1: 5'-CACTATGCTCAGAATACA-3'	<i>S. thermophilus</i>	Lick <i>et al.</i> , 2001
St2: 5'-CGAACAGCATTGATGTTA-3'		
His1: 5'-CTTCGTTATGATTTTACA-3'	<i>L. lactis</i>	Corrolier <i>et al.</i> , 1999
His2: 5'-CAATATCAACAATTCCAT-3'		
casei: 5'-TGCAGTGAATTCGACTTAA-3'	<i>Lb. casei</i>	Ward and Timmins, 1999
Y2: 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'		
Para: 5'-CACCGAGATTCAACATGG-3'	<i>Lb. paracasei</i>	Ward and Timmins, 1999
Y2: 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'		
Rham: 5'-TGCATCTTGATTTAATTTTG-3'	<i>Lb. rhamnosus</i>	Ward and Timmins, 1999
Y2: 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'		
16: 5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3'	<i>Lb. curvatus</i>	Berthier and Ehrlich, 1998
Lc: 5'-TTGGTACTATTTAATTCTTAG-3'		
brevF: 5'-CTTGCACTGATTTTAAACA-3'	<i>Lb. brevis</i>	Guarneri <i>et al.</i> , 2001
brevR: 5'-GGGCGGTGTGTACAAGGC-3'		

reamplified with the same primers. These PCR products were subject once more to TTGE analysis and the pure PCR products were sequenced as above.

For the latter, TTGE samples were amplified by the primer pair GC-rpoB1698f (5'-CGC CCC CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CAA CAT CGG TTT GAT CAA C -3') and rpoB2041r (5'- CGT TGC ATG TTG GTA CCC AT -3') (Dahllöf *et al.*, 2000), which target a 365 bp fragment of the *rpoB* gene. PCR reactions were carried out in a total volume of 50 μ L containing 5 μ l of 10 \times Taq reaction buffer, 2 mM of Cl_2Mg , 400 μ M of dNTPs, 0.5 μ M of each primer, 1.5 U of Taq polymerase (MBL) and 2 μ L of template DNA (100 ng). The amplification programme consisted of an initial denaturing step at 94 $^{\circ}C$ for 2 min, then 30 cycles at 94 $^{\circ}C$ for 60 s, 46 $^{\circ}C$ for 60 s and 72 $^{\circ}C$ for 30 s, and a final extension of 72 $^{\circ}C$ for 5 min.

The PCR product of the *rpoB* gene was analysed by TTGE in a Dcode universal mutation detection system. Acrylamide gels (6%) were prepared in 1.25 \times TAE from stock solutions (acrylamide-bisacrylamide, 37.5:1) with a urea concentration of 7 M. Gels were charged with 5 μ L of PCR products per well and run with the same TAE buffer. The TTGE parameters and gradient temperatures were optimised to separate the bacterial species studied. The electrophoresis conditions were 50 V for 16 h with an initial temperature of 58 $^{\circ}C$ and a final temperature of 65 $^{\circ}C$ (with a temperature increase of 0.4 $^{\circ}C$ per hour). Gels were photographed on a UV transillumination table (Vilber Lourmat, France) and different bands were cut out using a sterile scalpel before being reamplified with the same primers. These PCR products were subject to TTGE analysis once more and the pure PCR products were sequenced as described above.

Length heterogeneity PCR (LH-PCR). The 16S/23S intergenic spacer region specific to lactobacilli was amplified using the primer pair R16-1F and LbLMA1-R (Dubenert *et al.*, 2002; Martín-Platero *et al.*, 2008), the reverse primer LbLMA1-R being labelled fluorescently with 6-FAM. PCR reactions were carried out in a total volume of 50 μ L containing: 5 μ L of 10 \times Master Taq reaction buffer, 10 μ l of 5 \times Taq enhancer, 1.5 mM of $(OAc)_2Mg$, 400 μ M of dNTPs, 0.4 μ M of the two primers, 1 U of Eppendorf Master Taq polymerase and 1 μ L of template DNA. The amplification programme consisted of an initial denaturing step (94 $^{\circ}C$ for 3 min) followed by the amplification step of 30 cycles of 30 s at 94 $^{\circ}C$, 30 s at 55 $^{\circ}C$ and 30 s at 72 $^{\circ}C$, followed by a final extension of 5 min at 72 $^{\circ}C$. The amplified tDNA spacer regions

were denatured by heating in formamide and the length of the fragments was determined by means of automated fluorescent capillary electrophoresis on an ABI 3100 genetic analyser. Electropherogram peak values (i.e. fragment lengths) were calculated after interpolation with an internal size standard. The fingerprints were compared electronically with a database of fingerprints obtained for different *Lactobacillus* species (Martín-Platero *et al.*, 2008).

3. RESULTS.

Microbiological analyses. The microbial counts on different media are shown in Table 2. Mesophilic bacteria were present at levels of up to 10^8 CFU g^{-1} in Quesailla Arochena and 10^9 CFU g^{-1} in Torta Arochena. In both cases enterococci counts appeared one logarithmic unit below the total counts, i.e. 10^7 and 10^8 CFU g^{-1} respectively. Selective media for staphylococci yielded 10^5 CFU g^{-1} in both cases whilst in a selective medium for enterobacteria counts reached 10^9 CFU g^{-1} in Torta Arochena.

Microbial characterisation and identification. Ten to twenty colonies were isolated from each medium. A total of 160 strains from Quesailla Arochena and 120 strains from Torta Arochena were obtained and further characterised by RAPD using primer M13. Isolates that showed very similar RAPD patterns were taken to be the same strain (similarity coefficient > 85%). A representative strain of each genotype was identified by partial 16S rDNA gene sequencing, and the remaining strains of each genotype were identified by specific PCR or TTGE (data not shown). The genotyping

Table 2. Microbial counts in Aracena cheeses obtained in different media.

Culture medium	Quesailla Arochena		Torta Arochena	
	log(CFU g^{-1})	SD ^a	log(CFU g^{-1})	SD
M-17	8.83	0.05	9.61	0.07
MRS	8.73	0.04	9.37	0.05
KF	7.36	0.06	8.576	0.05
Vogel-Johnson	5.602	0.05	5.939	0.07
MacConkey	6.947	0.08	9.037	0.06

^aStandard deviation

of isolates showed a great biodiversity in both cheeses (Fig. 1 and 2). We distinguished 32 different clusters in Quesailla Arochena (Fig. 1) and 30 clusters in Torta Arochena (Fig. 2), which were regrouped into 17 different species for each cheese and came to a total of 26 different species overall. Only eight of the 26 species were common to both cheeses. Seven of the common species shared one common cluster: clusters T4 and Q20 for *Lactococcus lactis*, T16 and Q8 for *Lactobacillus plantarum*, T10 and Q15 for *Leuconostoc pseudomesenteroides*, T13 and Q2 for *Enterococcus faecalis*, T28 and Q12 for *E. devriesei*, T3 and Q29 for *E. malodoratus* and T8 and Q29 for *Klebsiella ornithinolytica* (Fig. 3). The genotypes of *Lb. paracasei* species, also present in both cheeses, were different for each cheese.

The microbiological counts of the different species and the corresponding deduced representation of each cluster (Table 3) reveal that the microbial communities of both cheeses were dominated by LAB. In Quesailla Arochena, the predominant LAB was *Lc. lactis* (3.4×10^8 CFU g⁻¹), with 4 different clusters, the most numerous being cluster Q20. The strains belonging to the *Lactobacillus* genus were grouped into 10 clusters: 2 clusters for *Lb. paracasei* (8.6×10^7 CFU g⁻¹) and 2 for *Lb. paraplantarum* (1.1×10^8 CFU g⁻¹) and 3 for *Lb. curvatus* (6.5×10^7 CFU g⁻¹) and 4 for *Lb. plantarum* (4.5×10^7 CFU g⁻¹); with a slightly lower representation were other LAB such as *Ln. mesenteroides* (2.3×10^7 CFU g⁻¹ with 2 clusters), *Ln. pseudomesenteroides* (2.3×10^7 CFU g⁻¹), *Ln. garlicum* (1.4×10^7 CFU g⁻¹), *E. devriesei* (2.9×10^7 CFU g⁻¹, with 4 clusters), *E. malodoratus* (2.3×10^7 CFU g⁻¹, with 2 clusters), and *E. faecalis* (3.1×10^6 CFU g⁻¹). In Torta Arochena the most abundant species was also *Lc. lactis* (1.4×10^9 CFU g⁻¹) with 3 clusters, T6 being the most profuse genotype. Other well represented LAB in this cheese were *Lb. paracasei* (2.1×10^8 CFU g⁻¹), *Lb. plantarum* (5.2×10^8 CFU g⁻¹, 3 clusters), *Lb. coryniformis* (5.2×10^7 CFU g⁻¹), *E. faecalis* (4.7×10^8 CFU g⁻¹), *E. devriesei* (2.0×10^8 CFU g⁻¹), *E. malodoratus* (2.0×10^8 CFU g⁻¹, 3 clusters), *E. avium* (2.0×10^8 CFU g⁻¹, 2 clusters), *Vagococcus carnophilus* (5.2×10^7 CFU g⁻¹) and *Vagococcus sp.* (5.2×10^7 CFU g⁻¹).

The NLAB were less abundant than LAB in Quesailla Arochena, in which the species belonged mainly to staphylococci, i.e. *Staphylococcus saprophyticus* (5.0×10^4 CFU g⁻¹) and *S. sciuri* (1.0×10^5 CFU g⁻¹). In this cheese we also isolated *Hafnia alvei* (2.3×10^7 CFU g⁻¹), *K. ornithinolytica* (5.0×10^4 CFU g⁻¹), *Corynebacterium flavescens* (5.0×10^4 CFU g⁻¹) and *Brevundimonas vesicularis* (2.3×10^7 CFU g⁻¹). Nevertheless, in Torta Arochena the NLAB populations constituted an important proportion of the

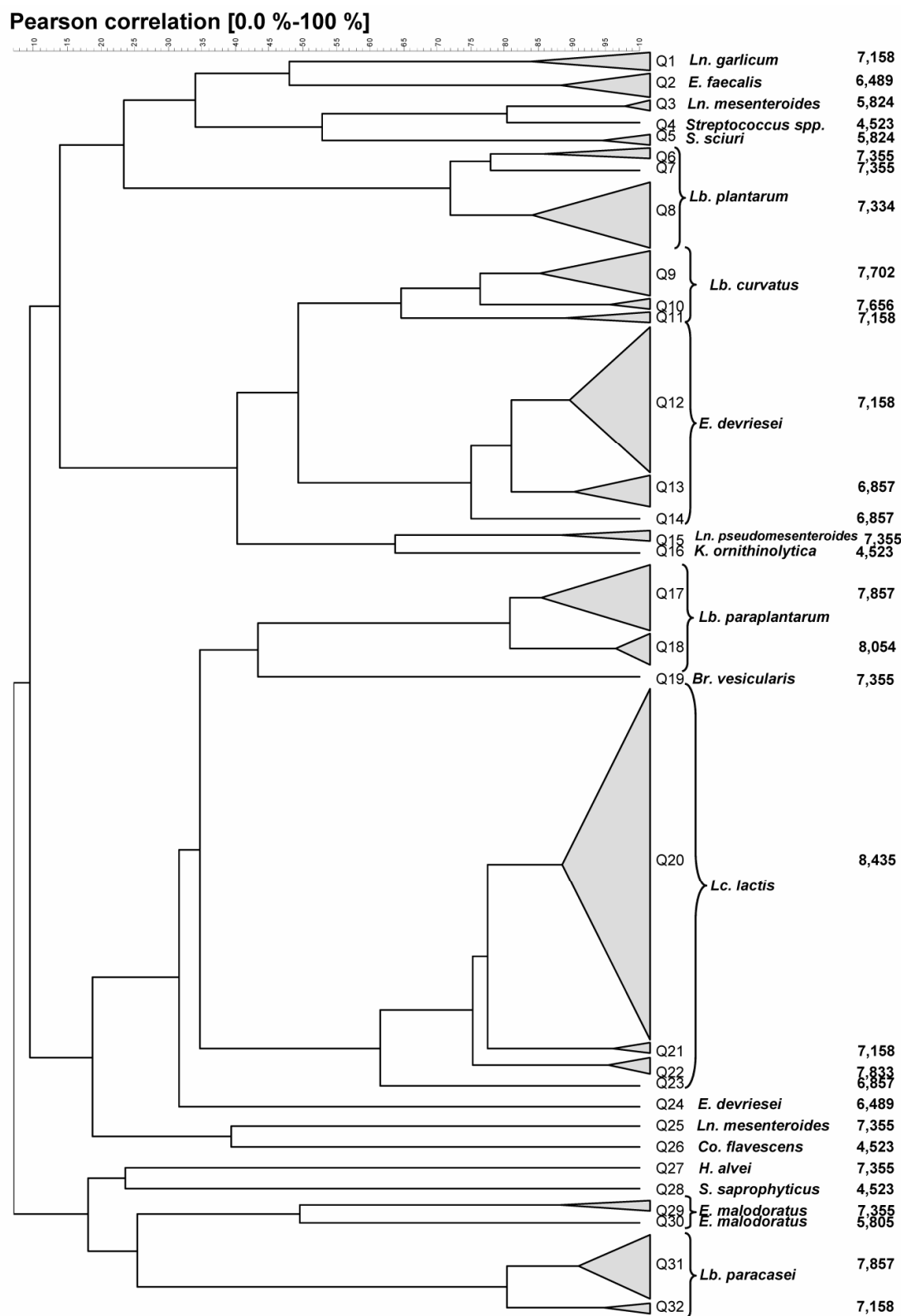


Fig. 1. RAPD cluster analysis of strains isolated from Quesaila Arochena cheese. The name, species and count in log CFU g⁻¹ of each genotype are indicated from right to left on the right-hand side of the dendrogram.

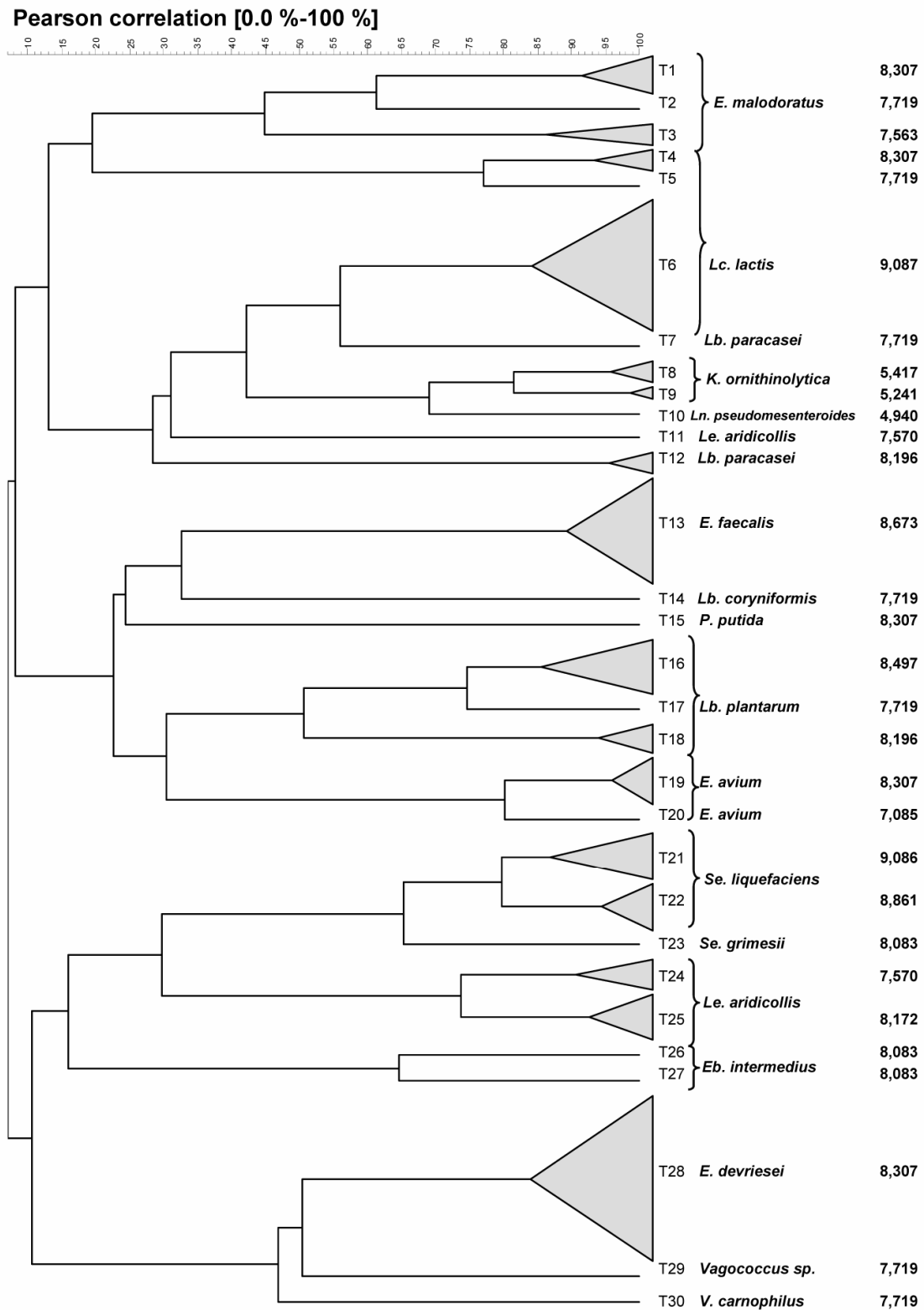
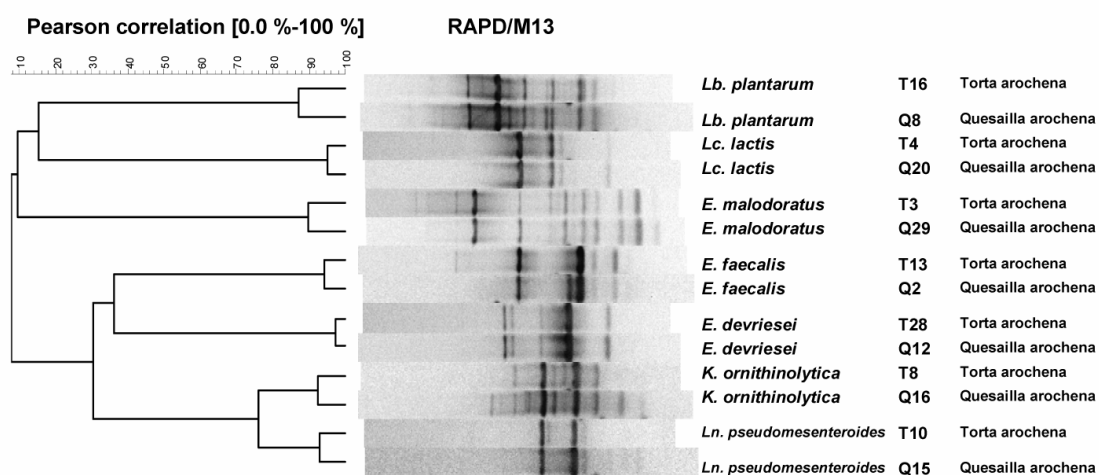


Fig. 2. RAPD cluster analysis of strains isolated from Torta Arochena. The name, species and count in log CFU g⁻¹ of each genotype are indicated from right to left on the right-hand side of the dendrogram.

Table 3. Quantification of bacterial species in Aracena cheeses after analysis by RAPD and identification by 16 RNAr sequencing or species-specific PCR.

Species	log(CFU g ⁻¹)	
	Quesaila Arochena	Torta Arochena
<i>Lb. paracasei</i>	7.94	8.32
<i>Lb. plantarum</i>	7.66	8.72
<i>Lb. paraplantarum</i>	8.05	-
<i>Lb. curvatus</i>	7.81	-
<i>Lb. coryniformis</i>	-	7.72
<i>Lc. lactis</i>	8.53	9.15
<i>Streptococcus spp.</i>	4.52	-
<i>Ln. mesenteroides</i>	7.37	-
<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	7.36	4.94
<i>Ln. garlicum</i>	7.16	-
<i>E. faecalis</i>	6.49	8.67
<i>E. devriesei</i>	7.46	8.31
<i>E. malodoratus</i>	7.36	8.31
<i>E. avium</i>	-	8.31
<i>V. carnophilus</i>	-	7.72
<i>Vagococcus sp.</i>	-	7.72
<i>S. saprophyticus</i>	4.70	-
<i>S. sciuri</i>	5.00	-
<i>Se. liquefaciens</i>	-	9.09
<i>Se. grimesii</i>	-	8.08
<i>Enterob. intermedius</i>	-	8.38
<i>H. alvei</i>	7.36	-
<i>K. ornithinolytica</i>	4.70	5.64
<i>Le. aridicollis</i>	-	8.31
<i>Co. flavescens</i>	4.70	-
<i>Br. vesicularis</i>	7.36	-
<i>P. putida</i>	-	8.31

**Fig. 3. RAPD profile of the common bacterial clusters isolated from Quesaila Arochena and Torta Arochena cheeses.**

community, some 37% of the total isolates (Table 3). High numbers of *Serratia liquefaciens* were present (1.2×10^9 CFU g⁻¹, with 2 clusters), almost equalling *Lc. lactis* (1.4×10^9 CFU g⁻¹). Other enterobacteria found in reasonably high quantities were *Se. grimesii* (1.2×10^8 CFU g⁻¹), *Enterobacter intermedius* (2.4×10^8 CFU g⁻¹, 2 clusters) and, in minor quantities, *K. ornithinolytica* (4.4×10^5 CFU g⁻¹, 2 clusters). *Leucobacter aridicollis* (2.0×10^8 CFU g⁻¹, 3 clusters) and *Pseudomonas putida* (2.0×10^8 CFU g⁻¹, one cluster) were also isolated from this cheese.

Microbial community analysis by TTGE. The microbial diversity of both cheeses was also studied by TTGE, obtaining a fingerprint community via an analysis of the 16S rDNA gene and the RNA polymerase β - subunit gene (*rpoB*) (Fig. 4). The fingerprint obtained using the V3 variable region of the 16S ribosomal gene (Fig. 4) showed 8 bands for Quesailla Arochena and 9 for Torta Arochena, with a predominance of *Lc. lactis* (bands 3 and 7), followed by *Lb. plantarum*/*Lb. paraplantarum* (band 1) in both cheeses, although *L. lactis* (band 3) did not appear in Torta Arochena. TTGE did not distinguish between *Lb. plantarum* and *Lb. paraplantarum*, which have identical V3 sequences and co-migrated in the same band. We also detected in Quesailla Arochena *Ln. pseudomesenteroides* (band 2), *Mycoplasma agalactie* (band 5) (a species that had not been isolated with the previous technique), *K. ornitholytica* (band 6) and *H. alvei* (band 8). Band 4 from Quesailla Arochena could not be identified, and attempts to sequence or clone this band met with no success. In Torta Arochena (Fig. 4) we detected two intense bands (11 and 12), corresponding to *S. liquefaciens*; other minor bands corresponded to *S. liquefaciens* (band 9), *Ln. pseudomesenteroides* (band 2), *E. faecalis* (band 10) and *K. ornithinolytica* (band 6).

The fingerprint obtained by the amplification of the *rpoB* gene yielded less diversity, showing only 8 bands in Quesailla Arochena and 4 in Torta Arochena. Band 14, corresponding to *Lb. curvatus*, only appeared in Quesailla Arochena. Nevertheless, the predominance of *Lb. plantarum* (bands 19 and 20 in both TTGE cheese profiles) and *Lc. lactis* (bands 17 and 18 in Quesailla Arochena; band 24 in Torta Arochena) is consistent with the results shown above. In addition, a previously undetected species, identified as *Ln. lactis* (band 21), was observed. Four bands designated in Figure 4 as bands 15 and 16 for Quesailla Arochena, and bands 22 and 23 for Torta Arochena, could not be identified, and probably corresponded to artefacts or DNA heteroduplex because they could neither be reamplified as single bands nor cloned.

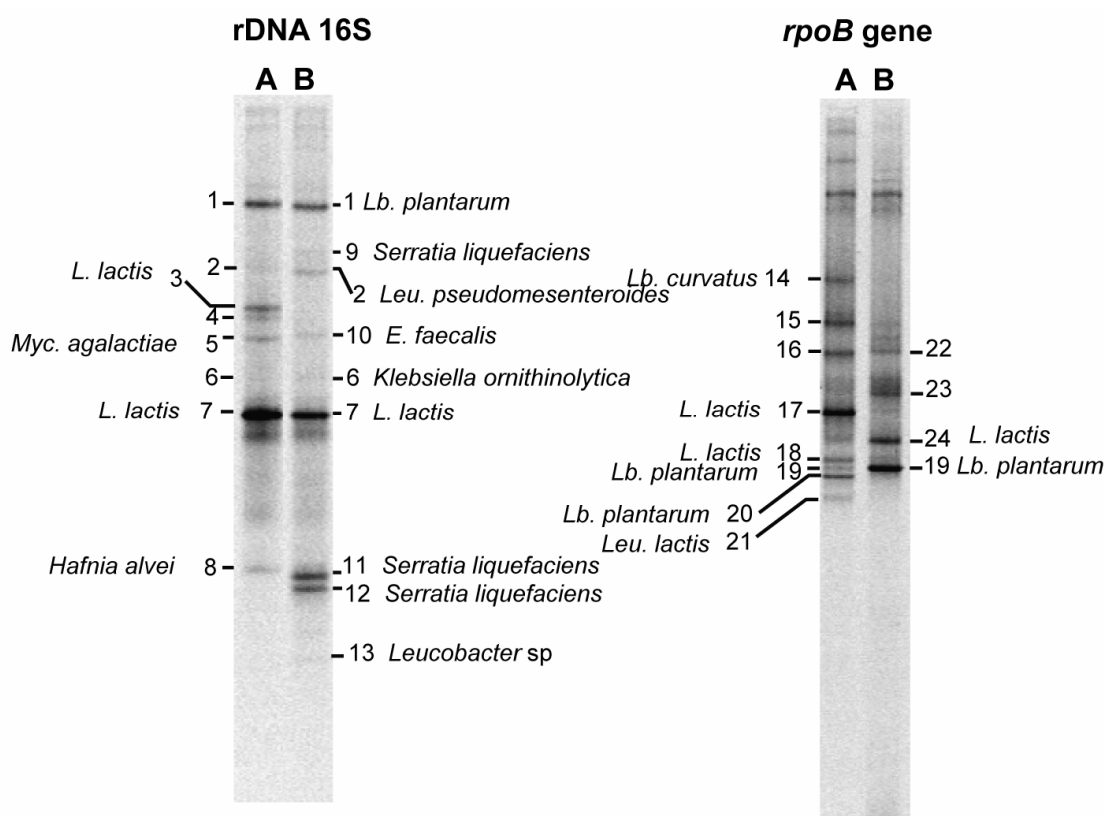


Fig. 4. TTGE profile of Aracena cheeses. A) Quesaila Arochena; B) Torta Arochena. Bands corresponding to V3 variable regions of 16S ribosomal gene: 1 *Lb. plantarum*; 2 *Ln. pseudomesenteroides*; 3 *Lc. lactis*; 5 *Myc. agalactiae*; 6 *K. ornithinolytica*; 7 *Lc. lactis*; 8 *H. alvei*; 9 *S. liquefaciens*; 10 *E. faecalis*; 5 *Enterob. intermedius*; bands 11 and 12 *S. liquefaciens*; 13 *Leucobacter* sp. Bands corresponding to *rpoB* gene: 14 *Lb. curvatus*; *Lc. lactis* (bands 17, 18 and 24); 19 *Lb. plantarum*; 21 *Ln. lactis*. Bands 4, 15, 16 from Quesaila Arochena and bands 22 and 23 from Torta Arochena could not be identified.

To confirm and quantify the most representative bacterial populations identified by TTGE analysis of both cheeses, TTGE-PCR fingerprints were made from total DNA extracted from enrichment cultures obtained by dilutions of cheeses in MRS and Rothe broths. None of the enrichment cultures yielded a fingerprint identical to that of the totalcommunity DNA and none of the TTGE patterns of diluted enrichment cultures contained as many bands as those of the non-enriched original cheese. As expected, the number of bands decreased throughout the dilution steps (Fig.5-I). Some of the dominant species, i.e. *Lc. lactis* and the *Lb. plantarum*/*Lb. paraplantarum* group, were detected in MRS broth in both cheeses, reaching titres of up to 10^8 - 10^9 cells mL^{-1} , but in the case of Rothe broth enrichment cultures lactococci accounted for up to 10^8 - 10^9 cells mL^{-1} in Quesaila Arochena alone. Also as expected, enterococci could be detected in

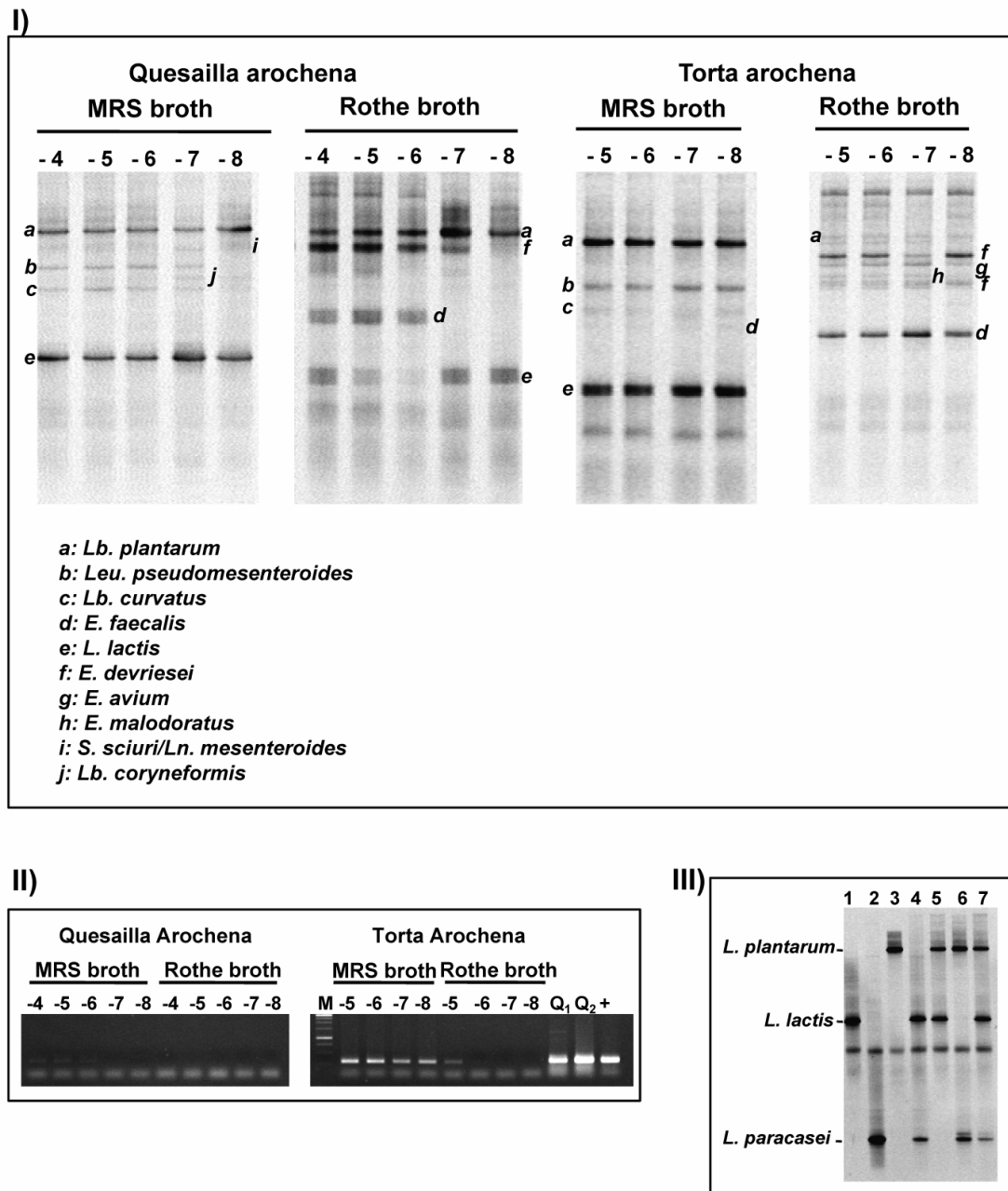


Fig. 5. Estimation of the relative abundance of bacterial species obtained from enrichment cultures in MRS and Rothe broths. I) TTGE fingerprinting of PCR-amplified 16S rDNA fragments of DNA extracted from enrichment cultures. Letters (a-j) indicate the corresponding band in total community DNA. II) Quantification of some representative bacterial species (e.g. *Lb. paracasei*) by species-specific PCR. Numbers correspond to enrichment of different dilutions (-4 to -8) in broths. III) Effect of target competition on TTGE-PCR. Lane 1, *Lc. lactis*; lane 2, *Lb. paracasei*; lane 3: *Lb. plantarum*; lane 4, *Lc. lactis* and *Lb. paracasei*; lane 5, *Lc. lactis* and *Lb. plantarum*; lane 6, *Lb. plantarum* and *Lb. paracasei*; lane 7, *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* and *Lb. paracasei*.

Rothe broth in both cheeses but the species present differed according to the cheese. *E. faecalis* and *E. devriesei* reached levels of 10^6 and 10^7 cells mL^{-1} respectively in Quesaila Arochena, whilst *E. devriesei*, *E. avium*, and *E. malodoratus* were present at up to 10^8 cells mL^{-1} in culture enrichments from Torta Arochena. *Lb. curvatus* accounted for up to 10^7 cells g^{-1} in Quesaila Arochena and Torta Arochena in MRS broth enrichments. It is worth mentioning that this species was not isolated from Torta Arochena. On the other hand, species such as *Ln. pseudomesenteroides*, which represent less than 1% (4.94 logUFC g^{-1}) of the culturable bacteria in Torta Arochena on MRS-agar, appeared in the total DNA TTGE profile and accounted for up to 10^7 and 10^8 cells mL^{-1} in MRS broth in Quesaila Arochena and Torta Arochena respectively. Therefore these results show that the microbiological levels of *Ln. pseudomesenteroides* were higher than those determined by plating and strain isolation and identification. Other bacteria isolated in scarce numbers, such as *Streptococcus* or *Corynebacterium* in Quesaila Arochena or *Vagococcus* in Torta Arochena, could not be detected either in total community DNA or in enrichment cultures. It is noteworthy that some microorganisms isolated in great quantities were not detected in the TTGE assays, *Lb. paracasei*, for example, which represented the 10.7% and 3.9% in Quesaila Arochena and Torta Arochena respectively or *Leucobacter aridicollis* (3.8 %), *S. grimesii* (2.3 %), *E. intermedius* (4.5 %), or *P. putida* (3.8 %) in Torta Arochena. Nevertheless it was possible to detect *Lb. paracasei* by species-specific PCR from total community DNA, and thus, the quantifications of these representative bacterial populations by species-specific PCR from enrichment cultures DNA (Fig. 5-II).

In an attempt to explain our failure to detect some of the most representative strains by PCR-TTGE we designed an experiment to highlight the possible effects of target competition between the primers used. To this end we carried out a TTGE analysis on a mixture of *Lc. lactis*, *Lb. paracasei*, and *Lb. plantarum* DNAs (50 ng each). This analysis (Fig. 5-III) showed that *Lc. lactis* and *Lb. plantarum* do not interfere with each other in TTGE but a clear interference could be seen with *Lb. paracasei*. Thus when this latter species was amplified together with *Lc. lactis* or *Lb. plantarum* its relative proportion was reduced. This reduction was particularly pronounced when *Lb. paracasei* was amplified together with both *Lc. lactis* and *Lb. plantarum* (Fig. 5-III, lane 7).

Lactobacillus population analysis by LH-PCR. Lactobacillus communities without culturing were also studied by LH-PCR (Fig. 6). Three groups of lactobacilli were detected, the dominant species being *Lb. plantarum* (peak size of 207 ± 1 bp) and *Lb. curvatus* (212 ± 1 bp) in both cheeses. In addition the *Lb. paracasei/Lb. rhamnosus/Lb. brevis* group (peak 218) was also detected in both cheeses, although the small area of the peak reflects the low significance of this group. It is noteworthy that *Lb. curvatus* and *Lb. paracasei* could not be detected in any of the cheeses by TTGE fingerprinting when RNA 16S was used as target gene, but *Lb. curvatus* was detected in Quesaila Arochena when the target gene was *rpoB*.

4. DISCUSSION.

The indigenous microorganisms of cheeses include a significant number of strains which may provide interesting new characteristics for large-scale industrial manufacturing, making it possible to develop new products with new properties. Quesaila Arochena and Torta Arochena are cheeses made with raw goats' milk and are traditionally manufactured without starter cultures. To obtain a more complete view of the microbial community of these two cheeses we applied both culture-dependent and culture-independent methods. In both cheeses total viable counts were very high, reaching levels of 10^8 - 10^9 CFU g⁻¹, which is similar to those found in other farmhouse cheeses made with raw milk (Gaya *et al.*, 1999; Olarte *et al.*, 2000). We isolated 280 strains which were then further genotyped by RAPD analysis and identified at species level. Both cheeses contained a considerable biodiversity with 17 different species being identified in each cheese. Thirty-two different clusters were distinguished in Quesaila Arochena and thirty in Torta Arochena. As is common in many cheese and dairy products (El-Baradei *et al.*, 2007; Giraffa, 2004; Marino *et al.*, 2003) the microbial compositions of both cheeses were dominated by LAB, *Lc. lactis* being the most abundant species (41.9% in Quesaila Arochena, and 26.4% in Torta Arochena), followed by different lactobacillus species (38.2% in Quesaila Arochena, and 14.6% in Torta Arochena), such as *Lb. paracasei* and *Lb. plantarum*. In Quesaila Arochena *Lb. paraplantarum* and *Lb. curvatus* were also present, whilst they were absent from Torta Arochena. Nevertheless, other lactobacilli such as *Lb. coryniformis* were isolated in

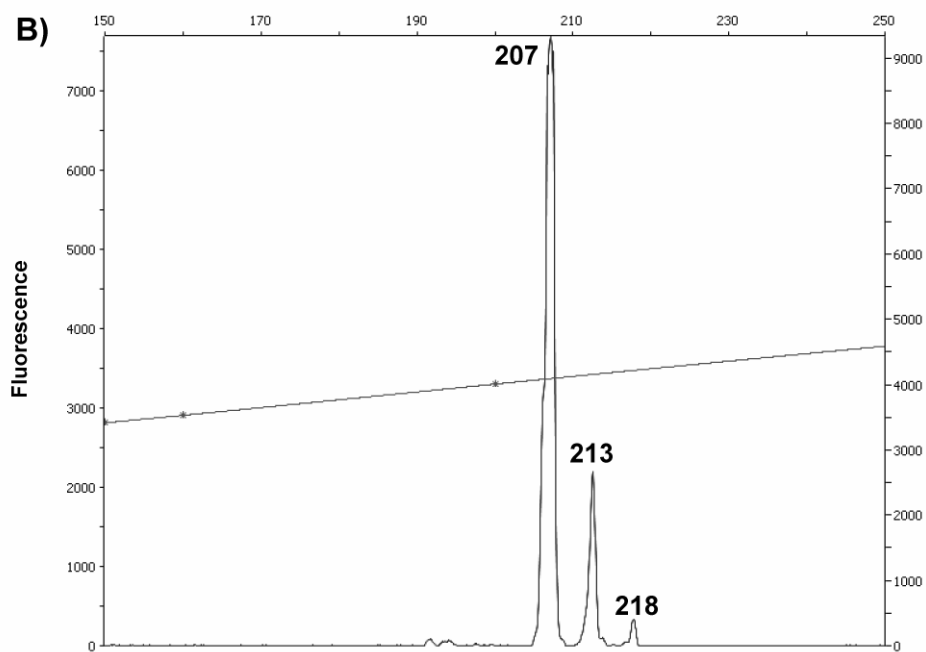
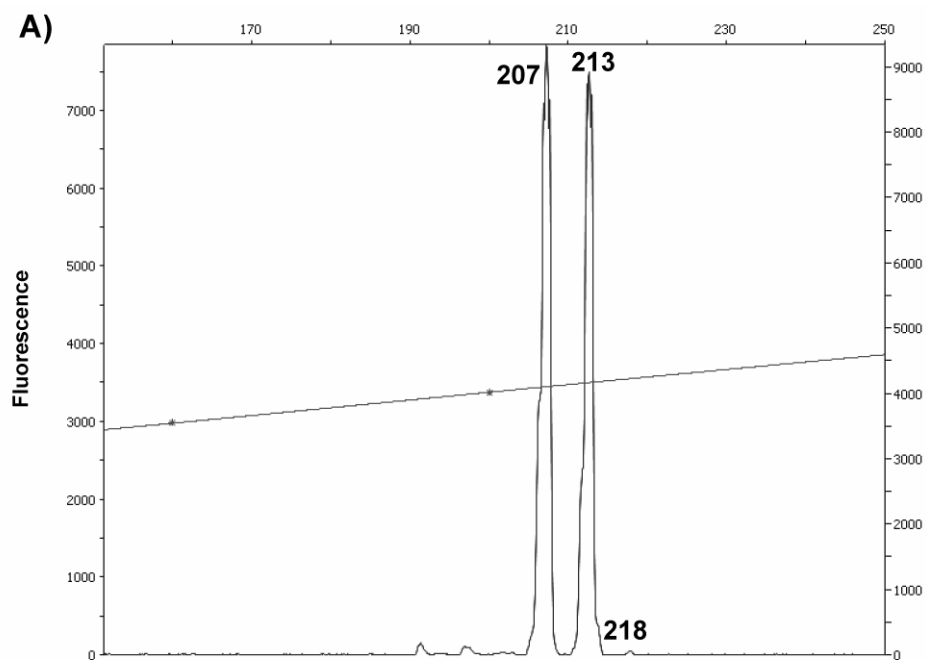


Fig. 6. LH-PCR of lactobacilli present in Aracena cheeses. A) Quesaila Arochena B) Torta Arochena.

Torta Arochena but were not detected in Quesaila Arochena. *Leuconostoc* strains were also represented in both cheeses at different levels (7.8% in Quesaila Arochena and 0.002% in Torta Arochena), sharing common clusters in the *Ln. pseudomesenteroides* group (clusters T10 and Q15 respectively). The high levels of enterococci determined in both cheeses (6.7% in Quesaila Arochena and 20.01% in Torta Arochena) are worth mentioning as they are currently a controversial group of microorganisms due to their dual role in food fermentation and in human nosocomial infections. Although the presence of enterococci in dairy products has long been considered to be an indicator of inadequate sanitary conditions during milk production and processing, it has been demonstrated that the presence of some strains of *E. faecalis* or *E. faecium* is not always related to direct faecal contamination and that these species might in fact be considered as being normal parts of food microbiota (Franz *et al.*, 1999). In addition, enterococci have been cited frequently as an important part of microbial communities in a variety of farmhouse cheeses made from raw milk from goats, sheep, water buffaloes and cows, possibly indicating an environmental origin (Psoni *et al.*, 2006). In fact, it has been suggested that they might play an important role in the ripening of these cheeses and in the acquisition of their typical taste and flavour (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006).

The compositions as well as the levels of NLAB were different in Quesaila and Torta Arochenas. In Quesaila Arochena NLAB only represented 6% of the total isolates, the most abundant species being *H. alvei* and *Br. vesicularis*. In Torta Arochena, on the other hand, NLAB represented 37% of the total isolates, where the most abundant species were *S. liquefaciens*, *S. grimesii*, *Ent. intermedius*, *Le. aridicollis* and *P. putida*, some of them, enterobacteria, for instance, accounting for almost the whole mesophilic bacterial count. Freitas and Malcata (2000) also reported high differences in NLAB content, enterobacteria included, in other goats' cheeses from the Iberian Peninsula and the Mediterranean basin. Anyway the different genera and species of *Enterobacteriaceae* present in Quesaila and Torta Arochenas are commonly found in raw-milk cheeses (Freitas and Malcata, 2000) and some authors suggest that these microorganisms contribute to their taste and flavour (Marino *et al.*, 2003; Zago *et al.*, 2007) via citrate catabolism and lipolytic and proteolytic activities (Chávez-López *et al.*, 2006). Because they are usually considered to be indicators of faecal contamination, however, their presence tends to reflect poor standards of hygiene during milking and handling and warns of the possible presence of more dangerous enteric pathogens. Although the microbial counts obtained from VJ agar (selective for staphylococci) were

similar to those cited for other cheeses, only a few of the VJ isolates in our study were not subsequently identified as staphylococci. Thus in Quesaila Arochena some isolates were identified as *S. sciuri* and *S. saprophyticus* and many others were assigned to *Ln. mesenteroides*, *K. ornithinolytica* and *C. flavescens*. In Torta Arochena, the isolates from VJ were *Ln. pseudomesenteroides*, *K. ornithinolytica* and *Le. aridicollis*. This confirms the poor selectivity of this medium, at least in most non-clinical situations, as has been reported in many studies (Callon *et al.*, 2004; Randazzo *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2006a).

Most of the isolated species were specific to each cheese, except for eight: *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Ln. pseudomesenteroides*, *E. faecalis*, *E. devriesei*, *E. malodoratus*, *K. ornithinolytica* and *Lb. paracasei*, and even these common species shared just seven clusters. Since both cheeses were manufactured in the same region and from milk from the same breed of goat it is highly likely that the common clusters derived from the milk. Microbial communities and their enzymes, especially those from LAB, are the major contributors to flavour and sensorial development in cheese (Beresford *et al.*, 2001; El Soda *et al.*, 2000; Marilley and Casey, 2004; Marino *et al.*, 2003). It has been reported that the development of secondary microbiota is influenced by the peculiarities of cheese making (Antonsson *et al.*, 2003). The fact that Quesaila arocha is a hard cheese, and Torta Arochena a very soft, spreadable cheese may well explain the significant differences found in the composition of their secondary microbiota. Thus the abundance of enterobacteria in the latter is noteworthy because, as we have mentioned above, this group of microorganisms has been recognised as contributing to the peculiar organoleptic qualities of cheeses by several metabolic means (citrate catabolism, and lipolytic and proteolytic activities).

From these results we might conclude that conventional culture-dependent methods combined with molecular techniques such RAPD can provide a significant insight into specific isolates and microbial populations occurring in cheese. Nevertheless, cultivation may either over- or underestimate microbial diversity or even be entirely misleading if the culture media used are not selective enough for monitoring the populations in question. The application of molecular methods to total community DNA, such as PCR amplification of the 16S rRNA gene in combination with temperature-gradient gel electrophoresis, can in part overcome this inconvenience and is in fact a technique commonly used to this end in microbial ecology. Hence we used TTGE-PCR to characterise the microbial communities in both cheeses with the aim of

generating a community fingerprint and detecting any non-culturable microorganisms that might be present in these ecosystems. A general result of our study was that the 16S ribosomal gene analysed in TGGE was of great importance because it revealed a greater species richness than did the *rpoB* gene and also less diversity. Thus, as compared with the 17 species detected by culture-dependent techniques in Quesaila Arochena, TTGE yielded only 8 and 4 species, depending on whether the 16S ribosomal or *rpoB* gene was analysed. Nevertheless, this approach led to the detection of unisolated microorganisms such as *Myc. agalactie* and *Ln. lactis*. Similarly, in Torta Arochena less predominant species were detected by TTGE (8 species by 16S and 2 species by *rpoB*) in contrast to the 17 species isolated by cultivation on plates. There may be several reasons for these differences: firstly, DNA amplification can vary according to the efficacy of DNA extraction, which depends in turn upon the bacterial species and food matrices (Abriouel *et al.*, 2006), although we did obtain identical TTGE profiles when we isolated DNA by other methods, such as with the Fastprep kit (data not shown); secondly, target competition by primers during PCR might occur (Heuer and Smalla, 1997), which may impinge considerably upon the amplification results. This latter hypothesis was confirmed when we observed that the presence of DNA from *Lc. lactis* or *Lb. plantarum* interfered with the detection of DNA from *Lb. paracasei* in TTGE. In fact the presence of isolated species undetected by TTGE (e.g. *Lb. paracasei*) was confirmed by species-specific PCR. This problem can often be solved by QPCR, which requires a pre-enrichment step before DNA isolation, as described by Giraffa and Neviani (2001). This is because stressed bacteria frequently do not grow if they are inoculated directly onto solid media although their physiological condition can be revived by growing them in a suitable liquid medium. This QPCR approach even offers the possibility of strain quantification, whenever the bacteria are in a culturable state. Such is the case of *Ln. pseudomesenteroides*, which was determined at 8.7×10^4 CFU g^{-1} in Torta Arochena by plating and detected by TTGE in a 10^{-8} dilution of MRS broth enrichment culture.

Due to the importance of lactobacilli in dairy products, their biotechnological potential and the difficulties inherent to their identification, we have tried to develop a reproducible and easy method of studying lactobacillus populations. Thus we analysed the lactobacillus species present in Aracena cheeses by LH-PCR. This procedure showed the predominance of *Lb. plantarum/Lb. paraplantarum*, followed by *Lb. curvatus* in Quesaila Arochena, and the predominance of *Lb. plantarum* followed by

Lb. curvatus/*Lb. coryniformis* in Torta Arochena. Interestingly, we also detected in Torta Arochena small numbers of *Lb. paracasei*, a strain undetected previously by TTGE.

Conclusion. The application of both conventional culture and molecular techniques (RAPD, PCR-MPN, TTGE, LH-PCR) to analyse the microbial communities of two Spanish farmhouse goats' cheeses (Quesailla Arochena and Torta Arochena) has led us to establish that *Lactococcus lactis* is the most abundant species, followed by different lactobacillus species such as *Lactobacillus paracasei* and *Lb. plantarum*/*Lb. paraplantarum* and *Lb. curvatus*. Other important LAB present are *enterococci* and *Leuconostoc* sp. Although the LAB group predominate in both cheeses, the high proportion of non-LAB organisms, especially enterobacteria in Torta Arochena, is noteworthy. In addition the application of RAPD revealed a great intra-species diversity and the fact that, in spite of being made in the same geographical area and with the same type of milk, the strains were specific to each type of cheese (possibly due to the different manufacturing processes followed in the two factories). One general conclusion that can be made from this study is that different results can be obtained according to the molecular approach used and, more specifically, the gene used as target. It is also important to stress that the coexistence of certain bacterial types might interfere with each other in the molecular identification process. But the final conclusion must be that both culture-dependent and culture-independent methods used in a complementary and intelligent way are necessary to get a more complete picture of microbial communities since each of them identify species that remain undetected by the others.

5. REFERENCES.

- Abriouel, H., B. Ben Omar, R. Lucas, M. Martínez-Cañamero, S. Keleke, and A. Gálvez.** 2006. Culture-independent analysis of the microbial composition of the African traditional fermented foods *poto poto* and *dégué* by using three different DNA extraction methods. *Int. J. Food Microbiol.* **111**: 228-233.
- Albenzio, M., M.R. Corbo, S.U. Rehman, P.F. Fox, M. De Angelis, A. Corsetti, A. Sevi, and M. Gobetti.** 2001. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk, or by heating the curd in hot whey. *Int. J. Food Microbiol.* **67**: 35-48.
- Altschul S.F., T.L. Madden, A. Schaffe, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Andrighetto, C., G. Marcazzan, and A. Lombardi.** 2004. Use of RAPD-PCR and TTGE for the evaluation of biodiversity of whey cultures for Grana Padano cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**: 400-405.
- Antonsson, M., G. Molin, and Y. Ardö.** 2003. *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. *Int. J. Food Microbiol.* **85**: 159-169.
- Ben Omar, N., and F. Ampe.** 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough *pozol*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3664-3673.
- Beresford, T.P., N.A. Fitzsimons, N.L. Brennan, and T.M. Cogan.** 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* **11**: 259-274.
- Berthier, F. and S.D. Ehrlich.** 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**: 97-106.
- Beuvier, E., K. Berthaud, S. Cegarra, A. Dasen, S. Pochet, S. Buchin, and G. Duboz** 1997. Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasturized or microfiltered milk. *Int. Dairy J.* **7**: 311 -323.
- Bulut, C., H. Gunes, B. Okuklu, S. Harsa, S. Kilic, H.S. Coban, and A.F. Yenidunya.** 2005. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, *Comlek peyniri* from Cappadocia region. *J. Dairy Res.* **72**: 19-24.

- Callon, C., L. Millet, and M.C. Montel.** 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J. Dairy Res.* **71**: 231-244.
- Chaves-López, C., M. De Angelis, M. Martuscelli, A. Serio, A. Paparella, and G. Suzzi.** 2006. Characterization of the *Enterobacteriaceae* isolated from a farmhouse Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *J. Appl. Microbiol.* **101**: 353-360.
- Cocolin, L., M. Manzano, C. Cantoni, and G. Comi.** 2000. Development of a rapid method for the identification of *Lactobacillus* spp. isolated from naturally fermented Italian sausages using a polymerase chain reaction-temperature gradient gel electrophoresis. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**: 126-129.
- Cogan, T.M., M. Barbosa, E. Beuvier, B. Bianchi-Salvadori, P.S. Cocconcelli, I. Fernandes, J. Gómez, R. Gómez, G. Kalantzopoulos, A. Ledda, M. Medina, M.C. Rea, and E. Rodríguez.** 1997. Characterization of the lactic bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* **64**: 409-421.
- Corroler, D., N. Desmasures, and M. Gueguen.** 1999. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Appl. Microbiol. Biotech.* **51**: 91-99.
- Dahllöf, I., H. Baillie, and S. Kjelleberg.** 2000. *rpoB*-Based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3376-3380.
- Deasy, B.M., M.C. Rea, G.F. Fitzgerald, T.M. Cogan, and T.P. Beresford.** 2000. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**: 510-522.
- Depardieu, F., B. Perichon, and P. Courvalin.** 2004. Detection of *van* alphabet and identification of *Enterococci* and *Staphylococci* at the species level by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 5857-5860.
- Dubernet, S., N. Desmasures, and M. Gueguen.** 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol. Lett.* **214**: 271-275.
- Duthoit, F., J.J. Godon, and M.C. Montel.** 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.

- Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin.** 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 24-27.
- El-Baradei, G., A. Delacroix-Buchet, and J.C. Ogier.** 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional egyptian Domiati cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1248-1255.
- El Soda, M., S.A. Madkor, and T.S. Tong.** 2000. Adjunct cultures, recent developments and potential significance to the cheese industry. *J. Dairy Sci.* **83**: 609-619.
- Ercolini, D., G. Moschetti, G. Blaiotta, and S. Coppola.** 2001. Behaviour of variable V3 region from 16S rDNA of important lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Curr. Microbiol.* **42**: 199-202.
- Foulquié-Moreno, M.R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, and L. De Vuyst.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 1-24.
- Franz, C.M., W.H. Holzapfel, and M.E. Stiles.** 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* **47**: 1-24.
- Freitas, C. and F.X. Malcata.** 2000. Microbiology and biochemistry of cheeses with appellation d'origine protégée and manufactured in the Iberian peninsula from ovine and caprine milks. *J. Dairy Sci.* **83**: 584-602.
- Gaya, P., M. Babín, M. Medina, and M. Nuñez.** 1999. Diversity among lactococci isolated from ewes' raw milk and cheese. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 849-855.
- Giraffa, G., and E. Neviani.** 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.*, **67**: 19-34.
- Giraffa, G.** 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* **28**: 251-260.
- Giraffa, G., and L. Rossetti.** 2004. Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **237**: 133-138.
- Guarneri, T., L. Rossetti, and G. Giraffa.** 2001. Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**: 377-381.
- Heuer, H., and K. Smalla.** 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil

- microbial communities. In: van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.), *Modern Soil Microbiology* (pp. 353-373). Marcel Dekker, New York.
- Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte, and G. Reuter.** 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 103-125.
- Knijff, E., F. Dellaglio, A. Lombardi, A. Andrighetto, and S. Torriani.** 2001. Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *ddl* genes. *J. Microbiol. Meth.* **47**: 35-40.
- Lazzi, C., L. Rossetti, M. Zago, E. Neviani, and G. Giraffa.** 2004. Evaluation of bacterial communities belonging to natural whey starters for Grana Padano cheese by length heterogeneity-PCR. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 481-490.
- Lick, S., K. Drescher, and K.J. Heller.** 2001. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated Göttingen minipigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4137-4143.
- López, S., and B. Mayo.** 1997. Identification and characterization of homofermentative mesophilic *Lactobacillus* strains isolated from artisan starter-free cheeses. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**: 233-238.
- Marino, M., M. Maifreni, and G. Rondinini.** 2003. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese, analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **229**: 133-140.
- Marilley, L., and M.G. Casey.** 2004. Flavours of cheese products, metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food Microbiol.* **90**: 139-159.
- Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Maqueda, and M. Martínez-Bueno.** 2007. Fast, convenient and economical method for isolating genomic DNA from lactic-acid bacteria using a modification of the “protein salting-out” procedure. *Anal. Biochem.* **366**: 102-104.
- Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Maqueda, I. Martín-Sánchez, and M. Martínez-Bueno.** 2008. Polyphasic approach to bacterial dynamics during the ripening of Spanish farmhouse cheese by culture-dependent and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 5662-5673.
- Ogier, J.C., O. Son, A. Gruss, P. Tailliez, and A. Delacroix-Buchet.** 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3691-3701.

- Olarte, C., S. Sanz, E. González-Fandos, and P. Torre.** 2000. The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goats' cheese (Cameros cheese). *J. Appl. Microbiol.* **88**: 421-429.
- Poznanski, E., A. Cavazza, F. Cappa, and P.S. Cocconcelli.** 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., C. Kotzamanides, C. Andrighetto, A. Lombardi, N. Tzanetakis, and E. Litopoulou-Tzanetaki.** 2006. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goats' milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **109**: 109-120.
- Randazzo, C.L., S. Torriani, A.D.L. Akkermans, W.M. de Vos, and E.E. Vaughan.** 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.
- Sánchez, I., S. Seseña, J.M. Poveda, and L. Cabezas, and L. Palop.** 2006a. Genetic diversity, dynamics, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **107**: 265-273.
- Sánchez, J.I., L. Rossetti, B. Martínez, A. Rodríguez, and G. Giraffa.** 2006b. Application of reverse transcriptase PCR-based T-RFLP to perform semi-quantitative analysis of metabolically active bacteria in dairy fermentations. *J. Microbiol. Meth.* **65**: 268-277.
- Ward, L.J.H., and M.J. Timmins.** 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**: 90-92.
- Zago, M., B. Bonvini, A.M. Martín-Platero, G. Mucchetti, D. Carminati, and G. Giraffa.** 2007. Characterisation of *Escherichia coli* isolated from raw milk cheeses. *Ann. Microbiol.* **57**: 49-54.

CAPÍTULO VI

Polyphasic Approach to Bacterial Dynamics during the Ripening of Spanish Farmhouse Cheese by Culture-Dependent and Culture- Independent Methods

ABSTRACT

We studied the dynamics of the microbial population during ripening of Cueva de la Magaha' cheese using a combination of classical and molecular techniques. Samples taken during ripening of this Spanish goat's milk cheese in which *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* were used as starter cultures were analyzed. All bacterial isolates were clustered by using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and identified by 16S rRNA gene sequencing, species-specific PCR, and multiplex PCR. Our results indicate that the majority of the 225 strains isolated and enumerated on solid media during the ripening period were nonstarter lactic acid bacteria, and *Lactobacillus paracasei* was the most abundant species. Other *Lactobacillus* species, such as *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus parabuchneri*, were also detected at the beginning and end of ripening, respectively. Non-lactic-acid bacteria, mainly *Kocuria* and *Staphylococcus* strains, were also detected at the end of the ripening period. Microbial community dynamics determined by temporal temperature gradient gel electrophoresis provided a more precise estimate of the distribution of bacteria and enabled us to detect *Lactobacillus curvatus* and the starter bacteria *S. thermophilus* and *L. lactis*, which were not isolated. Surprisingly, the bacterium most frequently found using culture-dependent analysis, *L. paracasei*, was scarcely detected by this molecular approach. Finally, we studied the composition of the lactobacilli and their evolution by using length heterogeneity PCR.

1. INTRODUCTION.

Lactic-acid bacteria (LAB) are functionally related by their ability to produce lactic acid via either a homo- or heterofermentative metabolism. The acidification and enzymatic processes accompanying the growth of LAB impart distinctive flavours and textures to a wide variety of fermented foods, dairy products, meats and vegetables. In addition, their preservative qualities make these bacteria useful in the control of

undesirable microorganisms (De Vuyst *et al.*, 1994). For this reason LAB have important applications in the food, agricultural and medical sectors and have been the subject of considerable research and commercial development over the past decade. Lactobacilli are well represented in fermented milks, yogurt and cheese, either as natural or intentionally added microbiota (starter cultures). *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. curvatus*, *Lb. acidophilus* and *Lb. pentosus* are common members of the NSLAB communities in dairy products (López and Mayo *et al.*, 1997; Coppola *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2001). In cheese NSLAB are represented mainly by *Lb. casei* and *Lb. paracasei* (Baruzzi *et al.*, 2000; Coppola *et al.*, 2000; Fitzsimons *et al.*, 2001) but *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* and *Lb. curvatus* are also important (Baruzzi *et al.*, 2000; Antonsson *et al.*, 2003, Sánchez *et al.*, 2006a). Although they are usually present at low levels in curd (10^2 - 10^3 CFU/g), they increase during ripening to 10^7 - 10^8 CFU/g (Demarigny *et al.*, 1996; Fox *et al.*, 1998). NSLAB have been reported as being responsible for many of the flavour qualities of cheese and their use as adjuncts to starter cultures might either improve cheese flavour or introduce off-flavours, depending upon the strains used (Olarte *et al.*, 2000; Antonsson *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2006a).

Because complex interactions in the microbial community occur during milk curdling and cheese ripening an accurate identification of the microorganisms involved provides vital information towards our understanding of their role in this process (Beresford *et al.*, 2001), which will lead to more objective criteria in the selection of strains for starter or adjunct cultures. As far as this is concerned, LAB identification on the basis of phenotypic features is very difficult because of the great variation in their fermentation profiles, which show considerable differences between strains belonging to the same species. Identification is now approached by DNA-based techniques, which allow us to discriminate between different species with similar phenotypic characteristics and also between strains belonging to the same species. Amongst the various molecular techniques used for the identification of LAB species are species-specific PCR (Marino *et al.*, 2003), restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Bulut *et al.*, 2005) and 16S ribosomal gene sequencing (Randazzo *et al.*, 2002; Poznanski *et al.*, 2004), the latter being the most extensively used to identify species. For intraspecies characterization, pulse-field gel electrophoresis (PFGE) (Klein *et al.*, 1998), repetitive enterobacterial palindromic sequences (REP)-PCR (Callon *et al.*,

2004) and rapid amplification polymorphism DNA (RAPD) (Giraffa and Rossetti, 2004) are the methods currently applied to LAB isolates from foodstuffs and dairy products. Nevertheless, all these molecular techniques are culture-dependent. It is, however, well known that only a small proportion of microorganisms are culturable and therefore culture-dependent techniques do not reflect real microbial communities (Giraffa and Neviani *et al.*, 2001). Consequently, different culture-independent techniques have been applied to fermented foods and dairy ecosystems, mainly T-RFLP (Sánchez *et al.*, 2006b), LH-PCR (Lazzi *et al.*, 2004), SSCP (Duthoit *et al.*, 2003), DGGE, (Randazzo *et al.*, 2002), TGGE (Cocolin *et al.*, 2000, Coppola *et al.*, 2000) and TTGE (Andrighetto *et al.*, 2004).

Cueva de la Magahá is a cheese made in the south of Spain (Jayena, Granada) from raw goats' milk inoculated with the starter cultures *St. thermophilus* and *Lc. lactis*. The aim of this study was to characterize the microbial communities isolated during the ripening process. The dynamics of the microbial diversity was also studied by the culture-independent techniques TTGE and LH-PCR, the latter applied to evaluate the *Lactobacillus* community, which affords a quick and easy way of fingerprinting this bacterial group.

2. MATERIALS AND METHODS.

Sample preparation and microbiological analysis. The samples analysed in this study were obtained from three different cheeses from the same batch of Cueva de la Magahá cheese, a hard farmhouse cheese made in Jayena in the province of Granada (Spain) from fresh goats' milk inoculated with starter cultures (EZAL MA-400, Rhodia Food, Sassenage, France). Its curd processed by heating to 37 °C, cutting and moulding and then salting by immersion for 24 h in natural brine (20.4°-22.2° Baumé; 25.6%-28.3% NaCl) before being ripened for 8 months by storage in controlled humidity (80-90% relativity humidity) and temperature (12-13 °C). According to the manufacturer, EZAL MA-400 is composed of a mixture of *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* and *St. thermophilus*.

Before sampling, the cheeses were washed with water and their rinds removed.

Ten-gram samples were collected aseptically from three cheeses from the same batch at 1, 17 and 34 weeks' ripening and homogenized for 2 min in 90 ml of a pre-warmed (37 °C), sterile, 2% sodium-citrate solution in sterile plastic bags with a lateral filter, using a Stomacher lab blender (IUL Instruments, Barcelona, Spain). One millilitre of the resulting mixture was taken from the filter side and tenfold serial dilutions were prepared in sterile saline solution (0.8% NaCl) up to 10^{-7} . A 100 µl aliquot was spread in triplicate on agar plates for bacterial enumeration. Plates were incubated at 28 °C for 4-7 days and the bacteria were enumerated by counting colonies on different media: Tween APT-agar, M-17 agar and brain heart infusion agar (BHA) (all from Scharlab Barcelona, Spain) to estimate total aerobic, mesophilic bacteria, Man Rogosa Sharpe (MRS) agar for LAB, Kenner Fecal agar (KFA) for enterococci, Voguel-Johnson agar (VJA) for staphylococci and MacConkey agar for enterobacteria. The average counts of the replicate cheese samples and their standard deviations were calculated after log transformation. Additionally, between ten and twenty LAB isolates (corresponding to the square roots of the total number of colonies) were randomly picked from general and selective media plates and cultured on the corresponding media. The isolates were purified, examined to study their morphology and Gram-stained and tested for catalase activity before being stored for further analyses at -70°C in the corresponding broth medium supplemented with 35 % glycerol.

Another strategy for this study was based on the quantitative PCR most probable number (QPCR-MPN) assay for detection of LAB growth in enrichment cultures. To this end 10 g replicates of 34-week-old cheese were homogenized as described above and the suspensions were serially diluted ten-fold in triplicate in tubes containing MRS broth and Rothe azide broth (Scharlau, Barcelona, Spain) and incubated without agitation at 28 °C for 48 h. Rothe azide broth was used for the primary enrichment of faecal streptococci due to the presence of sodium azide, which is both selective for enterococci and inhibitor of the accompanying flora through interference of the electron transport chain. The most probable number was determined from the more diluted tubes showing turbidity. Tubes showing turbidity were selected for TTGE analysis or multiple-specific PCR.

Genomic DNA isolation. A suspension corresponding to one gram of cheese was centrifuged for 5 min at 13,000 g in a microfuge and the sediment was stored at -70 °C or used for the extraction and isolation of genomic DNA according to Martín-Platero *et al.* (2007). The same method was applied to extract DNA from pure cultures (Martín-

Platero *et al.*, 2007).

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). All strains were genotyped using a RAPD-PCR procedure (Pérez-Pulido *et al.*, 2005). PCR was carried out in a total volume of 50 µl containing 5 µl of 10 × Taq reaction buffer, 3 mM of MgCl₂, 400 µM of dNTPs, 1 µM of M13 primer (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'), 1 U of Taq DNA polymerase (MBL, Córdoba, Spain) and 5 µl of template DNA. Amplifications were done in an iCycler 170-8720 (BioRad, Hercules, Calif.) and consisted of an initial denaturing step at 94 °C for 60 s followed by 35 cycles of 60 s at 94 °C, 20 s at 40 °C (with a 0.6 °C/s ramp) and 80 s at 72 °C (with a 0.6 °C/s ramp) plus a final extension of 5 min at 72 °C. The PCR products were analysed by electrophoresis in 1.5% agarose gels at 30 V for 16 h in 1 × TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 2.5 mM EDTA, pH 8) and revealed in ethidium bromide (0.5 µg/ml). Gels were photographed under UV light and analysed by Fingerprinting II Informatrix software (Bio-Rad, Hercules, Calif.). A similarity matrix was constructed on the bases on Pearson product moment correlation coefficient and its corresponding dendrogram was deduced using the unweighted-pair-group method with arithmetic averages (UPGMA).

16S rDNA gene sequencing. A 700 bp fragment of the 16S ribosomal DNA gene, which includes V1 to V4 variable regions, was amplified in representative strains of each RAPD genotype for subsequent sequencing. PCR was carried out in a total volume of 50 µl containing 5 µl of 10 × Taq reaction buffer, 10 µl of 5 × Taq Enhancer, 1.5 mM of (OAc)₂Mg, 400 µM of dNTPs, 0.4 µM of the primers WO1 (5'-AGA GTT TGA TC(AC) TGG CTC-3') and WO12 (5'-TAC GCA TTT CAC C(GT) C TAC A-3') (Table 1), 1 U of Eppendorf Master Taq polymerase and 1 µl of template DNA. The amplification programme consisted of an initial denaturing step at 94 °C for 4 min followed by an amplification step of 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 50 °C and 60 s at 72 °C, and a final extension of 2 min at 72 °C. PCR products were purified with a Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendorf, Hamburg, Germany) and sequenced using an ABI PRISM dye terminator cycle-sequencing ready-reaction automated sequencer (ABI 3100, Applied Biosystems). Homologies were searched in the BLASTN database (National Center for Biotechnology Information) using BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

Table 1. Primer pairs used in this study.

Primers	Specificity	Reference
WO1_for: 5'-AGAGTTTGATC(AC)TGGCTC-3'	16S rDNA	Ogier <i>et al.</i> ,
WO12_rev: 5'-TACGCATTCACCGTCTACA-3'	gene	2002
Lacto1; 5'-GTAACCTACCGAGAAAGGG-3'	<i>Lactococcus</i>	Deasy <i>et al.</i> ,
Lacto2; 5'-ATCTCTAGGAATAGCAC-3'		2000
Enterol; 5'-CCCGGCTCAACCGGG-3'	<i>Enterococcus</i>	Deasy <i>et al.</i> ,
Enterol2; 5'-CTCTAGAGTGGTCAA-3'		2000
R16-1F; 5'-CTTGACACACCGCCCGTCA-3'	<i>Lactobacillus</i>	Dubernet <i>et al.</i> ,
LbLMA1-R; 5'-CTCAAACTAAACAAAGTTTC-3'		2002
ddl-E1; 5'-ATCAAGTACAGTTAGTCTT-3'	<i>E. faecalis</i>	Dutka-Malen <i>et</i>
ddl-E2; 5'-ACGATTCAAAGCTAACTG-3'		<i>al.</i> , 1995
ddl-F1; 5'-TAGAGACATTGAATATGCC-3'	<i>E. faecium</i>	Dutka-Malen <i>et</i>
ddl-F2; 5'-TCGAATGTGCTACAATC-3'		<i>al.</i> , 1995
DuHiF; 5'-TTATGTCCCTGTTTTGAAAAATCAA-3'	<i>E. hirae</i>	Knijff <i>et al.</i> ,
HiR; 5'-TTTTGTTAGACCTCTTCCGGA-3'		2001
DuHiF; 5'-TTATGTCCCTGTTTTGAAAAATCAA-3'	<i>E. durans</i>	Knijff <i>et al.</i> ,
DuR; 5'-TGAATCATATTGGTATGCAGTCCG-3'		2001
St1; 5'-CACTATGCTCAGAATACA-3'	<i>St.</i>	Lick <i>et al.</i> , 2001
St2; 5'-CGAACAGCATTGATGTTA-3'	<i>thermophilus</i>	
His1; 5'-CTTCGTTATGATTTTACA-3'	<i>L. lactis</i>	Corroler <i>et al.</i> ,
His2; 5'-CAATATCAACAATTCAT-3'		1999
casei; 5'-TGCACTGAGATTCGACTTAA-3'	<i>Lb. casei</i>	Ward and
Y2; 5'-CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'		Timmins, 1999
para; 5'-CACCGAGATTCAACATGG-3'	<i>Lb. paracasei</i>	Ward and
Y2; 5'-CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'		Timmins, 1999
rham; 5'-TGCATCTTGATTTAATTTTG-3'	<i>Lb.</i>	Ward and
Y2; 5'-CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	<i>rhamnosus</i>	Timmins, 1999
planF; 5'-CCGTTTATGCGGAACACCTA-3'	<i>Lb. plantarum</i>	Torriani <i>et al.</i> ,
pREV; 5'-TCGGGATTACCAAACATCAC-3'		2001
brevF; 5'-CTTGCCTGATTTTAAACA-3'	<i>Lb. brevis</i>	Guarneri <i>et al.</i> ,
brevR; 5'-GGGCGGTGTGTACAAGGC-3'		2001

Species-specific PCR and multiple PCR. These techniques were used to confirm the identity of the strains belonging to the same RAPD genotype which were not identified by 16S rRNA gene sequencing. PCR was carried out in a total volume of 50 µl containing 5 µl of 10 × Taq reaction buffer, 10 µl of 5 × Taq Enhancer, 1.5 mM of (OAc)₂Mg, 400 µM of dNTPs, 0.4 µM of the two primers, 1 U of Eppendorf Master Taq polymerase and 1 µl of template DNA. The species-specific primers used are listed in Table 1. Amplifications were performed following the recommendations of the corresponding authors (Table 1). The products were analysed by electrophoresis in 1%

agarose gels in $1 \times$ TAE buffer.

Temporal Temperature-Gradient Gel Electrophoresis (TTGE). TTGE samples were prepared by nested PCR (Ogier *et al.*, 2002). First a 700 bp fragment of the 16S rRNA gene was amplified as described above with primers WO1 and WO12 (Table 1) but with 1.5 U of Eppendorf Master Taq polymerase and 2 μ l of DNA template (100 ng). This PCR product was used to amplify the V3 region of the 16S rDNA gene, for which we used two different pairs of primers (Ben Omar and Ampe, 2000, Ogier *et al.*, 2002): gc338f (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') and 518r (5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG -3'); and 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') and HDA2 (5'- GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA -3'). PCR was carried out in a total volume of 50 μ l containing 5 μ l of $10 \times$ Master Taq reaction buffer, 10 μ l of $5 \times$ Taq Enhancer, 1.5 mM of (OAc)₂Mg, 400 μ M of dNTPs, 0.4 μ M of each primer, 1.5 U of Eppendorf MasterTaq polymerase and 1 μ l of the amplified 700 bp fragment of the 16S ribosomal gene. The amplification programme included an initial denaturing step at 94 °C for 1 min and then 30 cycles of DNA amplification (30 s at 94 °C, 30 s at 52 °C and 30 s at 72 °C) and a final extension of 72 °C for 5 minutes.

The PCR product of the V3 region was analysed by TTGE using the Dcode universal mutation detection system (Bio-Rad, Hercules, Calif.) according to Ogier *et al.* (2002). The gels were photographed under UV light and the different bands were cut with a sterile scalpel and reamplified with the same pair of primers. These PCR products were subject once more to TTGE analysis and those found to be pure were sequenced as described above.

LH-PCR. The 16S/23S intergenic spacer region specific to Lactobacilli was amplified using the primer pair R16-1F and LbLMA1-R (Dubernet *et al.*, 2002); the reverse primer LbLMA1-R being labelled fluorescently with 6-FAM. PCR was carried out in a total volume of 50 μ l containing 5 μ l of $10 \times$ Master Taq reaction buffer, 10 μ l of $5 \times$ Taq Enhancer, 1.5 mM of (OAc)₂Mg, 400 μ M of dNTPs, 0.4 μ M of the two primers, 1 U of Eppendorf Master Taq polymerase and 1 μ l of template DNA. The amplification programme included an initial denaturing step at 94 °C for 3 min followed by the amplification step of 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 30 s at 72°C, and a final extension of 5 min at 72 °C. The amplified DNA spacer regions were

denatured by heating in formamide and the length of the fragments was determined by means of automated fluorescent capillary electrophoresis on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Electropherogram peak values (i.e. fragment lengths) were calculated after interpolation with an internal size standard. The fingerprints were compared electronically with a database of fingerprints obtained for different *Lactobacillus* species (Table 2).

3. RESULTS.

Microbiological analysis of the cheese samples. Microbial counts obtained by plating serial dilutions of samples are shown in Table 3. Total LAB counts were always in the range of 10^7 to 10^8 CFU/g, the highest levels occurring at mid-ripening and the lowest at the end of the process. No significant differences were observed between counts in the different culture media used, although the lowest levels were found in BHA. Enterococci were represented at levels of 10^4 CFU/g during the first week but

Table 2. LH-PCR fragment lengths obtained for different Lactobacilli species. CNRZ (National Centre for Zootechnical Research), ATCC (American Type Culture Collection), CECT (Colección Española de Cultivos Tipo), NCFB (National Collection of Food Bacteria).

Species	Source	Fragment length (± 1 bp)
<i>Lb. paraplantarum</i> 1885	CNRZ	191; 208
<i>Lb. parabuchneri</i>	Isolated from cheese	203
<i>Lb. fermentum</i> 14933	ATCC	203
<i>Lb. delbrueckii</i> 11842	ATCC	207
<i>Lb. plantarum</i> 748	CECT	207
<i>Lb. pentosus</i> 4023	CECT	208
<i>Lb. curvatus</i> 2739	NCFB	213
<i>Lb. coryniformis</i>	Isolated from cheese	213 (196) ^a
<i>Lb. acidophilus</i> 4356	ATCC	213 (196)
<i>Lb. sake</i> 2714	NCFB	214
<i>Lb. farciminis</i> 571 ^T	CECT	216
<i>Lb. paracasei</i> 4022 ^T	CECT	218
<i>Lb. rhamnosus</i>	Isolated from cheese	218
<i>Lb. brevis</i>	Isolated from cheese	218 (206; 208)

^aSecondary peaks are indicated between brackets.

Table 3. Microbial counts determined during Cueva de la Magahá cheese ripening.

Culture medium	Time of ripening (weeks)					
	1		17		34	
	Log CFU/g	SD ^a	Log CFU/g	SD	Log CFU/g	SD
MRS	7.67	0.05	8.00	0.04	7.19	0.02
APT	7.74	0.02	7.92	0.07	7.23	0.03
M-17	7.76	0.06	7.98	0.12	7.33	0.04
BHA	7.05	0.18	7.88	0.04	6.81	0.08
KF	4.60	0.09	ND ^b	NA ^c	ND	NA
VJ	ND	NA	ND	NA	4,80	0.18
MacConkey	ND	NA	ND	NA	ND	NA

^aThe standard deviations were calculated after log transformation.

^bNot detected.

^cNot applicable.

were undetectable during the remaining ripening period. Staphylococci were only detected at the end of the ripening period, at levels of 10^4 CFU/g, and *Enterobacteriaceae* were not detected at all throughout ripening. During cheese ripening pH values were lowish (from 5.44 after one week's ripening to 5.41 after 34 weeks).

Microbial identification and cluster analysis. The square root of total colonies on MRS medium, M17-glucose medium, BHA medium and KF plates containing 30 to 300 colonies were randomly picked and restreaked onto the same media to obtain a pure culture. Thus, a total of 225 isolates (119 from MRS-agar, 54 from M17-agar, 41 from BHI-agar and 11 from KF-agar) were collected at different times during the ripening period and after being tested for catalase and Gram stain were used for DNA extraction and RADP-PCR amplification. The identity level for strain discrimination was set at 86% similarity between different genotypes. The dendrograms deduced using UPGMA appear in Figure 1. After comparing RAPD profiles a total of 51 different genotypes were chosen for species identification and cluster analysis. At the end of the first week of ripening we had detected 26 different genotypes: G1-1 to G1-26. After 17 weeks' ripening 16 different genotypes were found in the cheese, ten of which were similar to those found in the isolates of the first week. The new genotypes that appeared in this

sampling were named G2-1 to G2-6. Finally, at week 34, twenty-six genotypes were detected, 19 of which (G3-1 to G3-19) were exclusive to this late stage. A strain of each cluster was identified by 16S rDNA gene sequencing and the species identity of the other members of that type was confirmed by means of PCR amplification using the species-specific probes described in Table 1.

Microbial evolution during cheese ripening. The designation of different genotypes, the species assigned to each of them and the percentage of each species compared to the total number of isolates at the three sampling times are shown in Figure 1 (A, B or C). Log counts were obtained by theoretical calculation on the basis of proportions of the different frequencies of isolation of each genotype. Cluster analysis of RAPD-PCR patterns revealed a high degree of diversity, dominated by *Lactobacillus* strains, which were the predominant bacteria throughout the whole ripening period. Other bacterial species, such as *Staphylococcus* and *Kocuria*, appeared only in the mature stage. Six genotypes, *Lb. brevis* (G1-4), *Lb. paracasei* (G1-12, G1-14), *Lb. plantarum* (G1-15, G1-20) and *Lb. farciminis* (G1-19) were found to be present during the first and seventeenth weeks but did not appear at the end of ripening, whilst another three genotypes [*Lb. paracasei* (G2-2, G2-3) and *Lb. parabuchneri* (G2-1)] were detected during the seventeenth and thirty-fourth weeks but not during the first week (Fig. 1-A, B and C). The highest titres found during the first week of ripening were genotypes G1-2 (*Lb. brevis*) and G1-15 (*Lb. plantarum*), whilst the lowest corresponded to enterococci, (approx. 10^4 CFU/g), represented by *E. faecalis*, *E. malodoratus*, *E. hirae* and above all *E. devriesei*. During ripening, however, the *Enterococcus* species gradually disappeared (Fig. 1-A and Fig. 1-C). At mid-ripening the highest levels belonged to genotypes G1-15 (*Lb. plantarum*) and G1-10 (*Lb. paracasei*) (Fig. 1-B). During the last month of ripening the bacteria that had dominated during the first week decreased, leaving genotypes G1-7 (*Lb. brevis*), G3-6, G1-10, G2-3, G1-13, G3-10, G3-3, G3-4 and G3-5, all identified as *Lb. paracasei*, G2-1 (*Lb. parabuchneri*) and G3-15 (*S. equorum*) as the best represented (Fig. 1-C).

According to the above findings, *Lb. paracasei* was certainly the most dominant bacterium (55.7 %), followed by *Lb. brevis* (18.5 %), *Lb. parabuchneri* (6.3 %) and *Staphylococcus equorum* (10.5 %), whilst *Lb. rhamnosus* (1.3%), *Lb. coryniformis* (1.3%), *S. epidermidis* (1.3%), *Kocuria* spp (1.3%), and *Corynebacterium variabile* (0.52 %) were present in minor proportions (Fig. 1-C). The highest diversity within a

A)

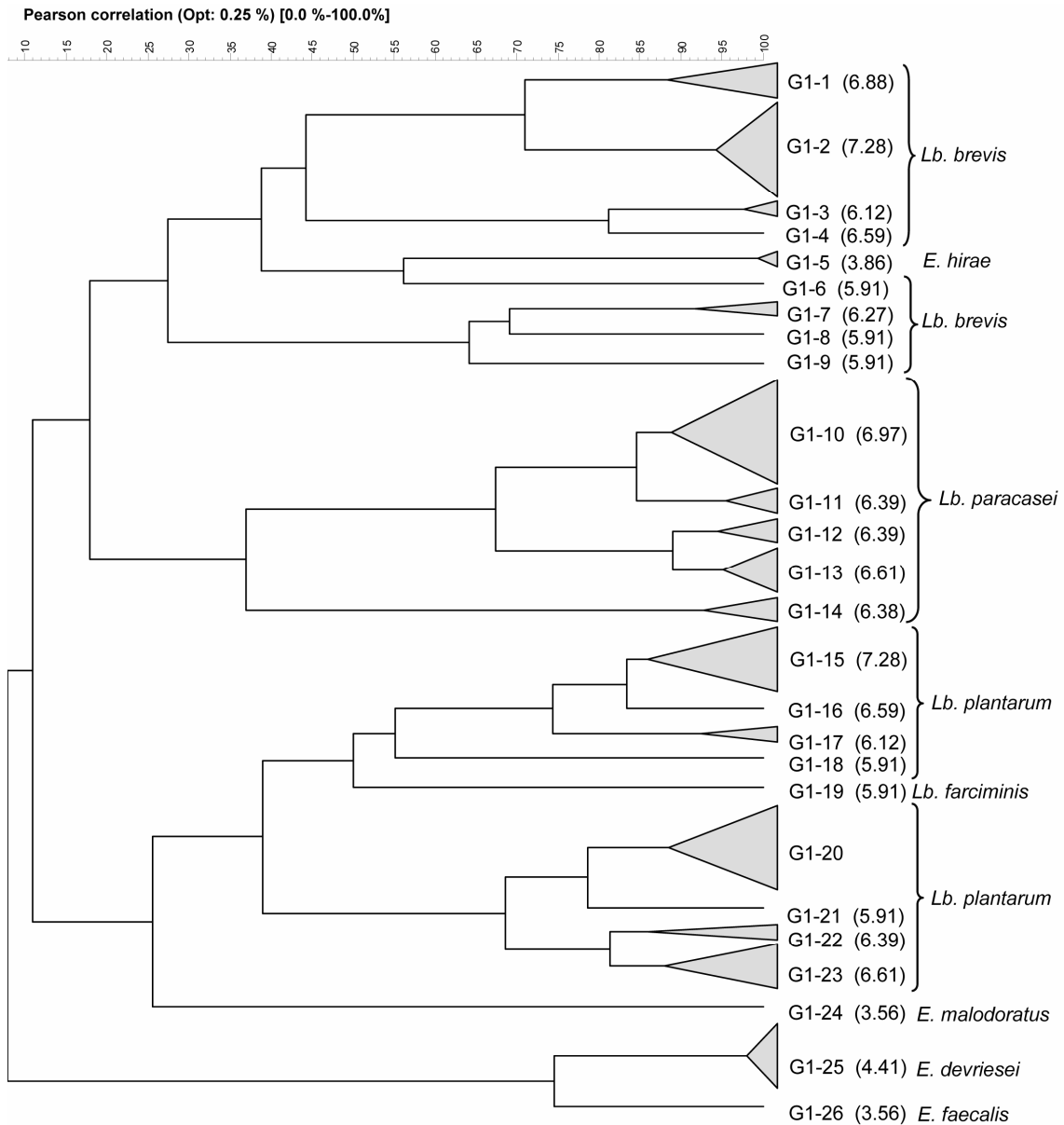


Figure 1. Dendrogram obtained after RAPD-PCR analysis of the 225 strains isolated during cheese ripening. A) 1 week's ripening; B) 17 weeks' ripening; C) 34 weeks' ripening. The genotypes and their respective counts in log CFU/g (in brackets) are indicated at the right of the dendrogram. Log CFU/g are obtained by theoretical calculation on the basis of proportions of the different frequencies of isolation of each genotype on/in different culture media.

B)

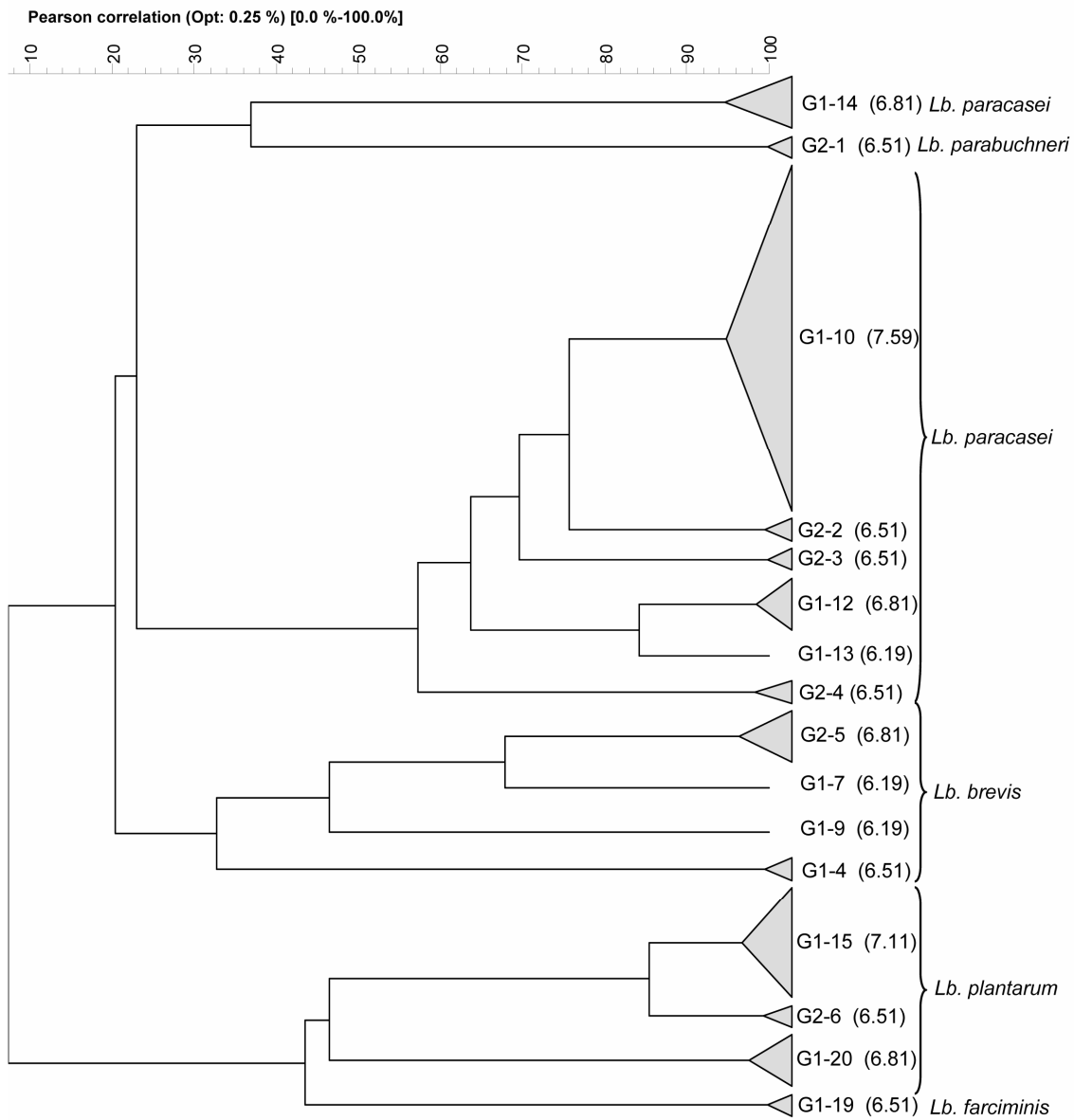


Figure 1. (continued)

C)

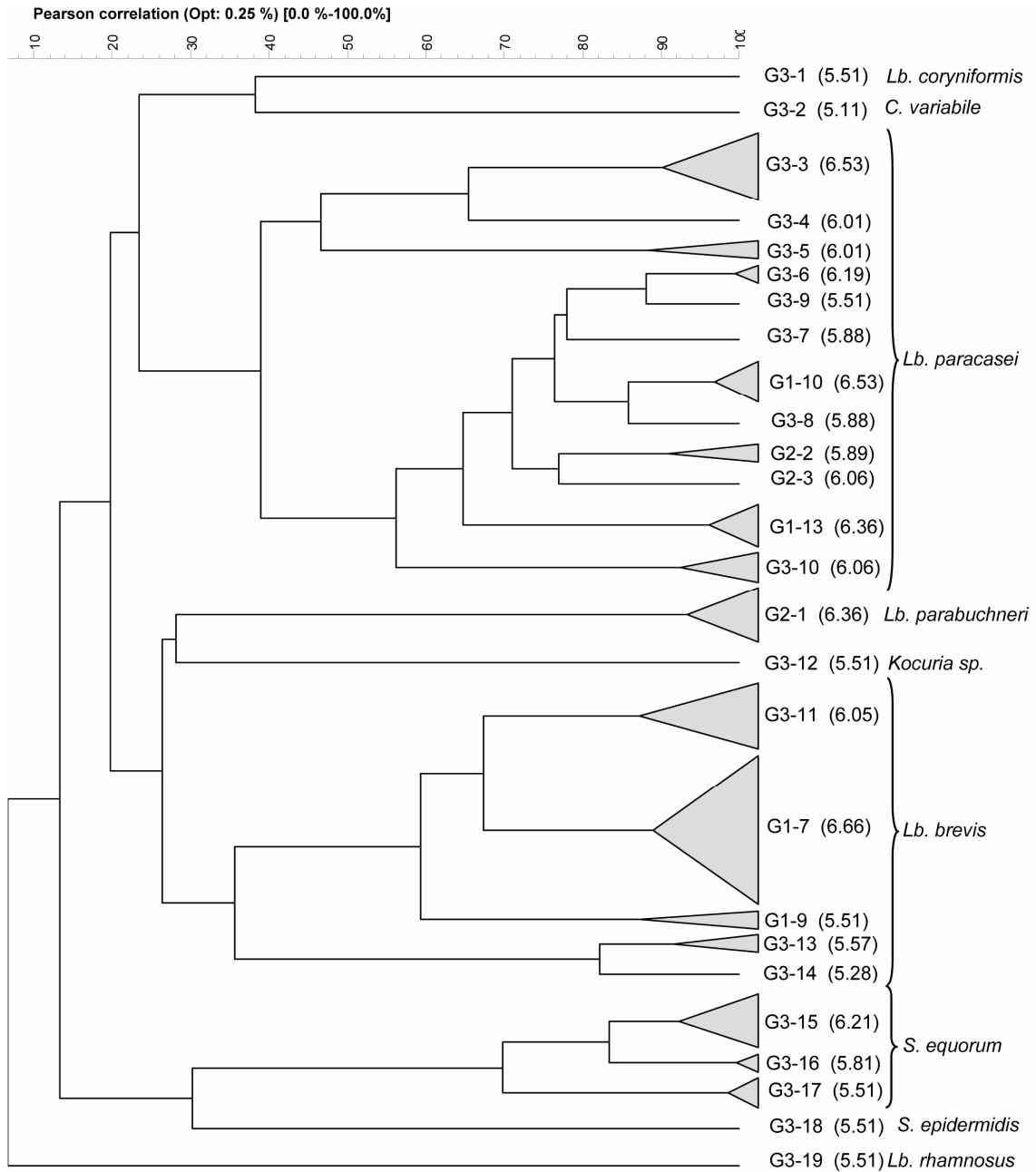


Figure 1. (continued)

single species was found in *Lb. paracasei*, with 16 different isolated genotypes (Fig. 1-A, B or C), followed by *Lb. brevis* (12 genotypes) and *Lb. plantarum* (9 genotypes). Nevertheless, the distribution of *Lactobacillus* diversity differed according to the stage of ripening. Thus, whilst during the earliest ripening stage *Lb. plantarum* and *Lb. brevis* (8 genotypes each) were the most diversified species, *Lb. paracasei* showed the highest intraspecific biodiversity from mid-ripening until full maturity. Furthermore, only four genotypes, those belonging to *Lb. brevis* (G1-7, G1-9) and *Lb. paracasei* (G1-10, G1-13), showed high titres throughout the ripening process (Fig. 1-A, B or C).

Throughout the whole ripening period an increase in biodiversity was observed, as demonstrated by the simultaneous presence of *Lb. parabuchneri*, *Lb. rhamnosus* and *Lb. coryniformis*, and in the final product even *S. equorum* and *S. epidermidis*, *Kocuria* sp. and *C. variabile* were detected.

TTGE analysis of bacterial microbiota in Cueva de la Magahá cheese and quantification of representative BAL populations. TTGE fingerprinting of the total bacterial community of Cueva de la Magahá cheese using two different pairs of primers was carried out to amplify the V3 region of the 16S rDNA gene (Fig. 2). The electrophoresis profiles obtained with primers gc338f and 518r showed the presence of 4 principal bands after the first week, identified as *Lb. plantarum* (band 1), *Lb. brevis* (band 4), *Lc. lactis* (band 7), and *St. thermophilus* (band 8) (Fig. 2). Interestingly, during ripening, new species, including *S. equorum* (band 3), *Lb. curvatus* (band 6) and *Lb. paracasei* (band 9) were detected. The bands corresponding to *Lb. plantarum* and *Lb. brevis* reached the highest intensity at the end of ripening. On the other hand, the most intense bands in the early stage, corresponding to *Lc. lactis* and *St. thermophilus*, were much less so during the later stages of ripening. The remaining species increased in intensity throughout the ripening period.

The same bacterial species were detected using the HDA1 and HDA2 primers except for *Lb. coryneformis* (band 5), which was present only at the end of ripening. Several quantitative differences were observed however. Thus, for example, the most intense bands at 34 weeks of ripening corresponded to *Lb. plantarum* and *St. thermophilus*. What is noteworthy are the differences in intensity observed between *St. thermophilus* and *Lc. lactis* according to the primers used (Fig. 2).

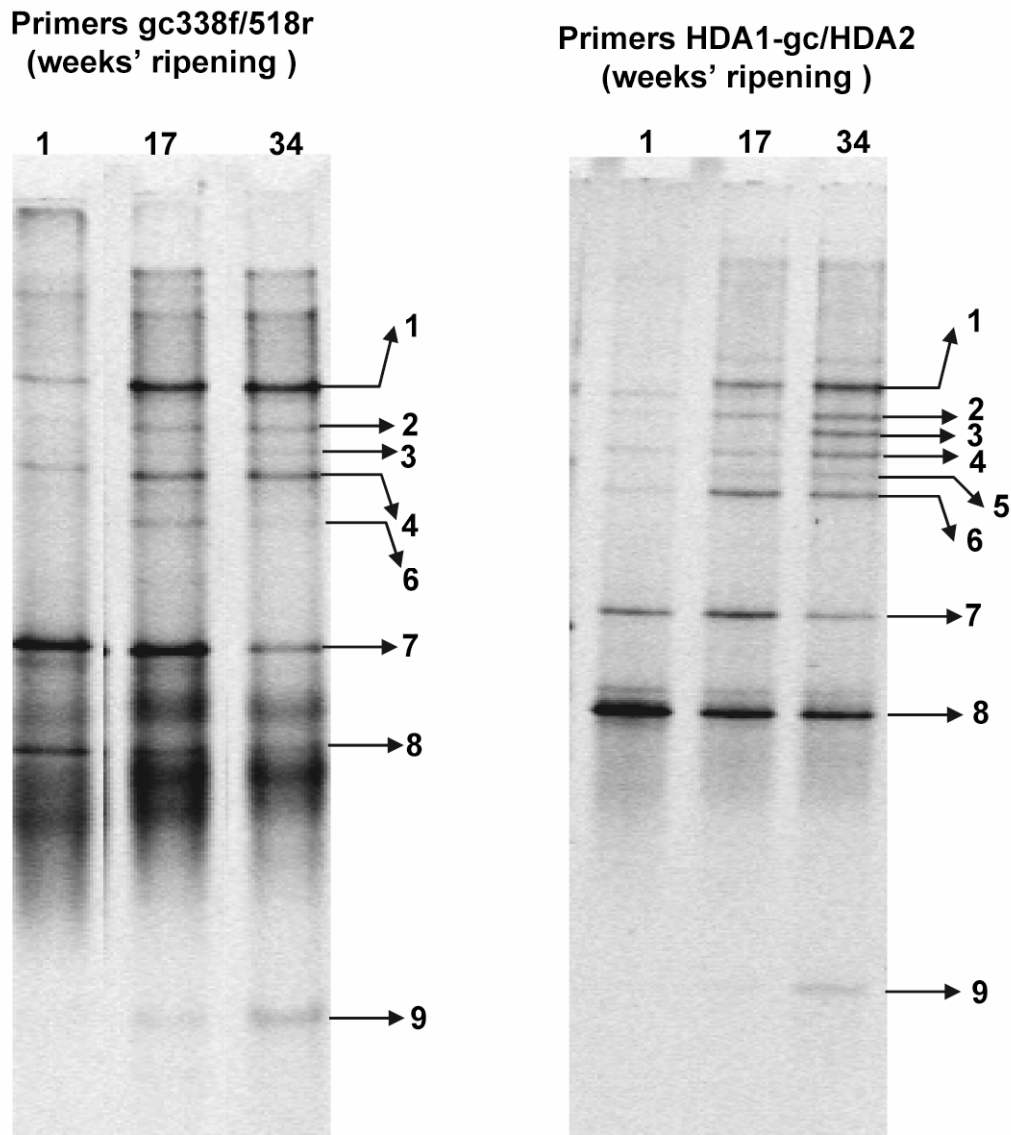


Figure 2. Temporal temperature-gradient gel-electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA of Cueva de la Magahá cheese samples at 1, 17 and 34 weeks' ripening. 1, *Lb. plantarum*; 2, *Lb. plantarum*; 3, *S. equorum*; 4, *Lb. brevis*; 5, *Lb. coryniformis*; 6, *Lb. curvatus*; 7, *Lc. lactis*; 8, *St. thermophilus*; 9, *Lb. paracasei*.

To confirm and quantify the most representative bacterial populations identified by TTGE analysis of mature cheeses (34 weeks' ripening) two series of TTGE fingerprints were made from total DNA extracted from enrichment cultures obtained by dilutions of cheese in MRS and Rothe broths. None of the enrichment cultures yielded a fingerprint identical to that of the total community DNA (Fig. 3) since the TTGE patterns of the diluted enrichment cultures contained fewer bands than those of the non-enriched original cheese. As expected, the number of bands decreased throughout the

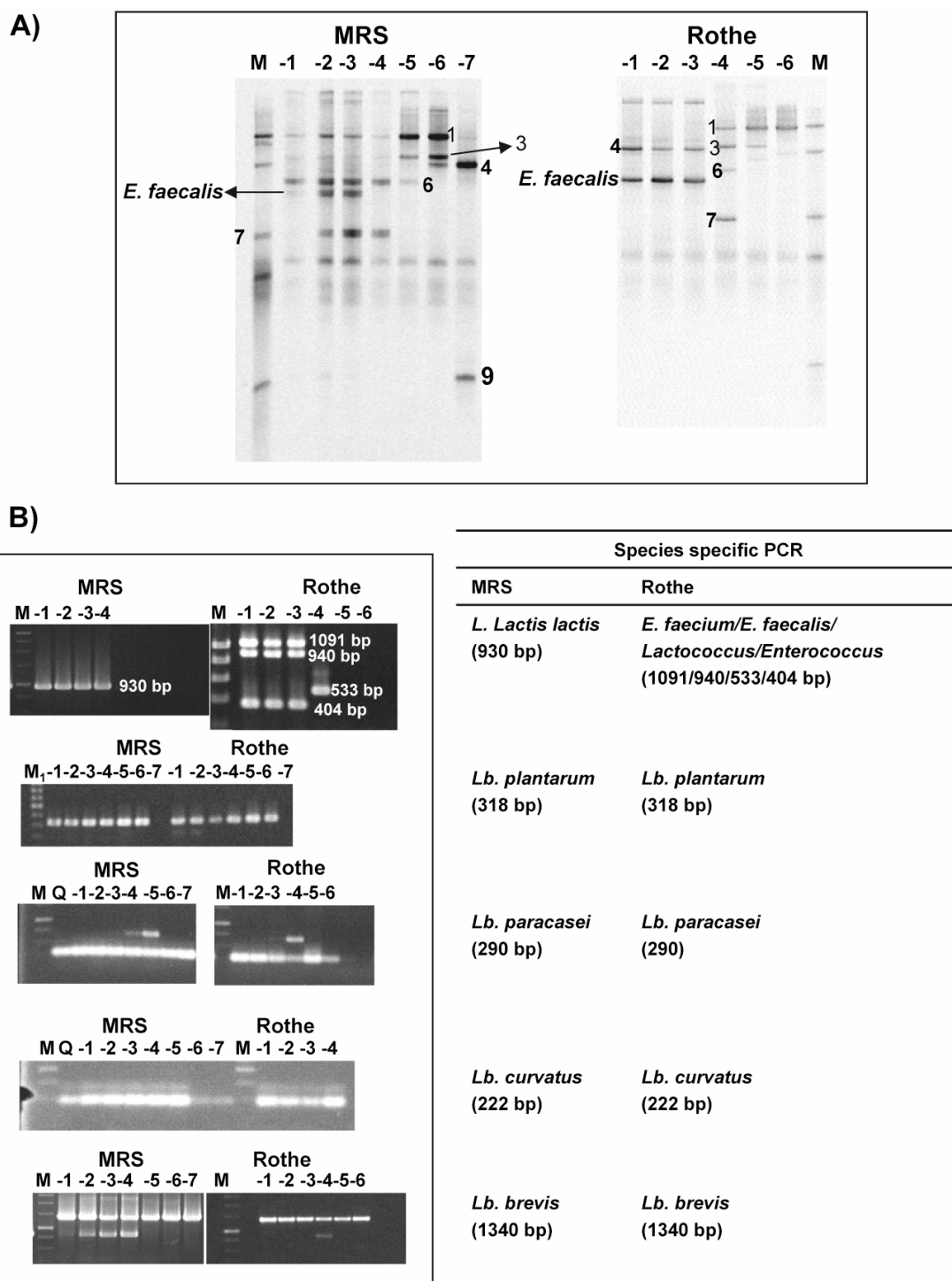


Figure 3. Estimation of relative abundance of bacterial species obtained from enrichment cultures in MRS or Rothe broths of mature cheese. A) TTGE fingerprinting of PCR-amplified 16S rDNA fragments of DNA extracted from enrichment cultures. Numbers indicate the corresponding band number of total community DNA: 1 *Lb. plantarum*; 3 *S. equorum*; 4 *Lb. brevis*; 5 *Lb. coryniformis*; 6 *Lb. curvatus*; 7 *Lc. lactis*; 9 *Lb. paracasei*. B) Quantification of representative bacterial species by specific PCR. Numbers at the top correspond to enrichment of different dilutions (-1 to -7) in broths. Lane M: 1-kbp DNA ladder (Biotools B&M Labs, Madrid, Spain); Lane M1: 100-bp DNA ladder (Biotools B&M Labs, Madrid, Spain). Q: genomic DNAs from cheese.

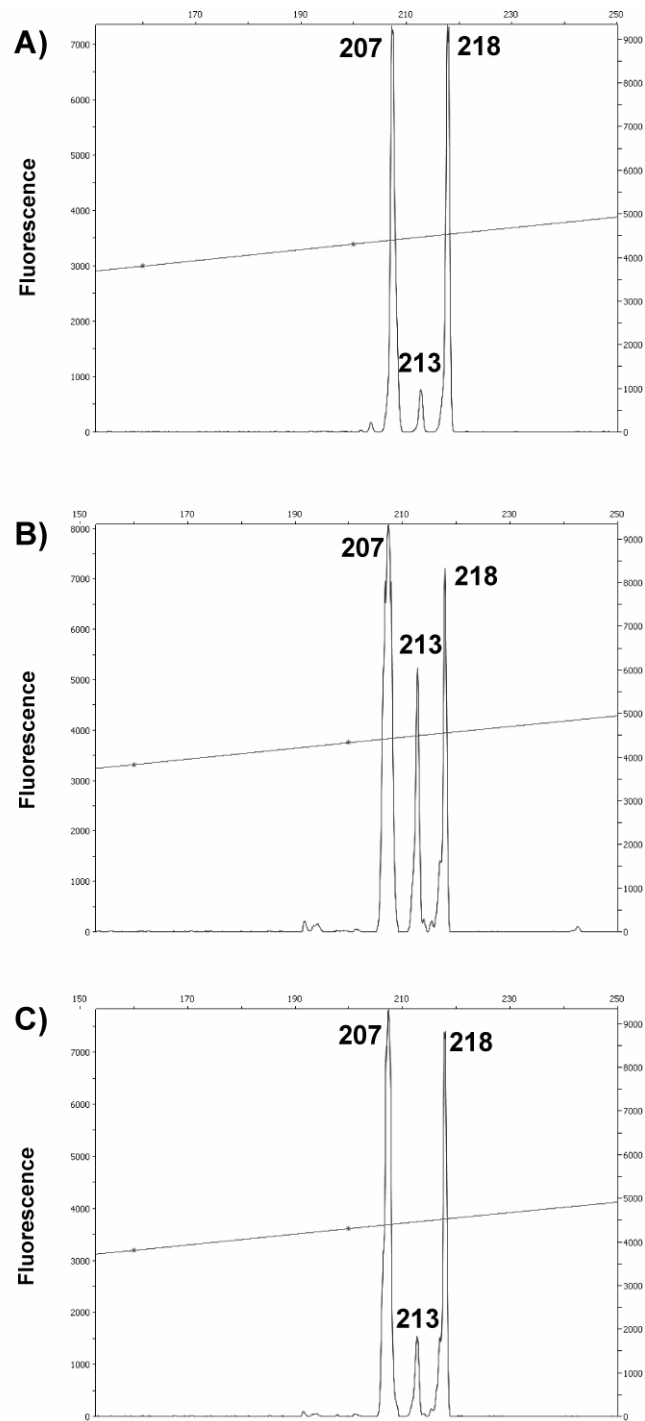


Figure 4. LH-PCR of Lactobacilli present in Cueva de la Magahá cheese. A) 1 week's ripening; B) 17 weeks' ripening; C) 34 weeks' ripening.

dilution step (Fig. 3). The dominant species, *Lb. paracasei* and *Lb. brevis* (bands 9 and 4) accounted for up to 10^7 cells g^{-1} , *S. equorum* (band 3) for up to 10^6 cells g^{-1} in MRS broth and 10^5 cells g^{-1} in Rothe broth, and *Lb. plantarum* (band 1) for up to 10^6 cells g^{-1} . Nevertheless, none of these bands (*Lb. paracasei* and *Lb. brevis*) could be detected at lower dilutions (10^{-1} - 10^{-4}). *Lb. curvatus* (band 6) accounted for up to 10^5 cells g^{-1} in MRS broth and 10^4 cells g^{-1} in Rothe broth. Other minor bacteria such *L. lactis* (band 7) and *Enterococcus faecalis/faecium* only appeared at dilutions of 10^{-2} to 10^{-4} and 10^{-1} to 10^{-3} respectively. *E. faecalis* and *E. faecium* could not be detected in the TTGE fingerprints of mature cheese. Although bands corresponding to *S. thermophilus*, *Lb. parabuchneri*, *S. epidermidis*, *Kocuria* sp and *C. variabile*, could not be detected in TTGE from any of the enrichment cultures. Quantifications of some of these bacteria, such as *Lb. paracasei*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lc. lactis*, *E. faecalis* and *E. faecium*, were confirmed by species-specific PCR from enrichment cultures (Fig. 3B).

***Lactobacillus* population analysis by LH-PCR.** Separation of the PCR products by capillary electrophoresis enabled us to distinguish between fragments differing in length by only 1 bp. This method allowed us to fingerprint the *Lactobacillus* diversity of this cheese during ripening (Fig. 4). A database with reference strains (Table 2) was established, followed by the application of LH-PCR to the total community DNA during the different ripening periods. On the basis of their peak sizes four groups could be distinguished (203, 207/208, 213/214 and 218) (Table 2). Three *Lactobacillus* groups were commonly detected during all the ripening stages: *Lb. plantarum* (peak 207/208), *Lb. curvatus/Lb. coryniformis* (peak 213) and finally the *Lb. paracasei/Lb. rhamnosus/Lb. brevis* group (peak 218). Three *Lactobacillus* groups were commonly detected during all ripening stages: *Lb. plantarum* (peak 207/208), *Lb. curvatus/Lb. coryniformis* (peak 213) and *Lb. paracasei/Lb. rhamnosus/Lb. brevis* (peak 218). The three *Lactobacillus* groups were detected in similar quantities during early ripening and the *Lb. plantarum* group was constantly detected as the most intense signal. The remaining groups showed similar signals during the mid-ripening period, but in the final product the intensity of the *Lb. paracasei/Lb. rhamnosus/Lb. brevis* group increased compared to the *Lb. curvatus/Lb. coryniformis* group. Other minor peaks (191, 194 and 201 pb) were also detected in the mature cheese. Peak 191 could be assigned to *Lb. paraplantarum*, but the other two minor peaks could not be identified by our database.

4. DISCUSSION.

Microbiological diversity in cheese is of current interest and has been the subject of many studies, which have generally used classical culture methods relying on the investigation of phenotypic characteristics. Very little is known about the biochemistry or microbial content of a great many traditional Spanish cheeses (Freitas *et al.*, 2000). Nevertheless, such information about the cheese-making process could benefit the growth of these local industries and the marketing of their traditional products, together with improving the hygienic safety of the final product, thus avoiding the spoiling of raw materials.

We have studied the microbial communities of Cueva de la Magahá cheese, monitoring them throughout their eight months of ripening period via a combination of classical and molecular techniques with the intention of minimising the biases inherent in both culture-dependent and culture-independent methods. The concentration of microorganisms in Cueva de la Magahá cheese was high, ranging from 4.6 to 7.98 log CFU/g, values which correspond to those usually found in cheeses during ripening (Fitzsimons *et al.*, 2001; Antonsson *et al.*, 2003; Østlie *et al.*, 2004, Randazzo *et al.*, 2002). During the first week LAB levels were 10^7 CFU/g, which increased by one logarithmic unit during the mid-ripening period to finally stabilise at 10^7 CFU/g. Low levels of enterococci were isolated during the initial ripening period but not thereafter. The presence of this bacterial group in cheese seems to vary depending upon the type of cheese, and its presence has been associated with the use of raw milk (Coppola *et al.*, 2000; Olarte *et al.*, 2000; Marino *et al.*, 2003) and also the season when the cheese is made. As far as NLAB populations are concerned, no *Enterobacteriaceae* were detected and 10^4 CFU/g of staphylococci were counted in the final product.

A collection of bacterial isolates obtained from cheese during the ripening period was used as starting material for this study. Biochemical characterization, although useful for general identification purposes, is less able to distinguish between individual strains and thus we used molecular techniques, which are powerful for fingerprinting the specific DNA patterns of a single strain. PCR-based DNA fingerprinting methods using arbitrary primers, such as arbitrary primer PCR (AP-PCR) and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR, have been used for studying genomic DNA polymorphisms from LAB and thus for distinguishing between different strains in a

population. The application of RAPD to investigate the diversity of the isolates from the cheese allowed us to distinguish 51 different genotypes amongst all the strains isolated (mainly *Lactobacillus*), which were present in various percentages throughout the ripening period. These genotypes were subsequently identified through 16S sequencing or specific PCR amplification. Overall, the strains present at the beginning of ripening were different from those present at the end, although a few (2-3 of each *Lactobacillus* species) persisted throughout the process. Environmental changes such as humidity, salt concentration, pH (5.44 at the beginning to 5.41 at the end of ripening), and the presence of proteins, fatty acids, free amino acids and other nutrients could well explain the succession of strains observed, a succession that has been reported in other cheeses such as Cheddar (Fitzsimons *et al.*, 2001). On analysing our results we found that most of the genotypes appeared either at the beginning of ripening (26 genotypes) or at the end of ripening (19 not detected previously genotypes plus 7 genotypes common to beginning of mid-ripening). After 17 weeks' ripening only 6 new genotypes were detected compared to those determined after the first week, 3 of which reappeared during week 34. In any case, lactobacilli predominated throughout the ripening period and only 0.05% of the strains isolated in the first samples were enterococci. At the end of the ripening period 11% of the isolates were staphylococci, which may be regarded as a normal consequence of the lower humidity of the cheese at this stage, given the higher tolerance of *Staphylococcus* spp. to dryness. Furthermore, *Kocuria* and *Corynebacterium* each accounted for 1% of the total strains isolated during this period. Brine is often a source of cheese contamination by salt-tolerant microorganisms, such as staphylococci, micrococci, enterococci, and corynebacteria.

During the early ripening period, the predominating species were *Lb. brevis* (38.97 %), *Lb. plantarum* (34 %) and *Lb. paracasei* (25.8 %), whilst during late ripening the outstanding strains were *Lb. paracasei* (55.7 %) followed by *Lb. brevis* (18.5 %). We detected high intraspecific biodiversity in *Lb. paracasei* from mid-ripening to the end, although *Lb. plantarum* and *Lb. brevis* showed the highest intraspecific biodiversity at first. *Lb. plantarum* could be considered as one of the predominant species in the first week of ripening but its populations then declined in favour of *Lb. paracasei*. Sánchez *et al.* (2006a) reported similar results for isolates obtained from several farmhouse Manchego cheeses and Zarate *et al.* (1997) reported that Tenerife goats' milk cheeses contained high proportions of *Lb. plantarum* in two-day-old cheese but that this count decreased during ripening, whereas *Lb. paracasei* was

present initially at low densities but increased during ripening to become the dominant *Lactobacillus* species in 60-day-old cheeses. In other Spanish fresh cheeses, however, *Lb. plantarum* was the main *Lactobacillus* in the mature cheese (Beresford *et al.*, 2001). These differences could easily be attributed to the distinct microbial composition of these cheeses, because the activity, growth and survival of a species are mainly determined by the other microorganisms present in its environment (Giraffa, 2004). In this respect the microbiota of any particular cheese is determined by the source of the milk, the manufacturing process and the hygienic practices observed during milking, cheese making and ripening (Beresford *et al.*, 2001).

Cheeses, especially farmhouse style, can be considered as natural ecosystems. It has been proved that some microorganisms in natural ecosystems are extremely difficult to culture (Giraffa and Neviani, 2001). Thus, in addition to culture-dependent methods, we directly applied molecular techniques to total cheese DNA so as to obtain a more complete understanding of the ecology of Cueva de la Magahá cheese. Since the results are simple to interpret and mistakes due to problems related to growth failure in culture media are avoided, dominant strains during fermentation can be easily detected and identified. In this work we used TTGE to monitor the population dynamics during cheese ripening, and to circumvent the biases inherent in subjective interpretation we confirmed the species assignment of the bands by direct sequencing. With regard to the two specific primer pairs for the V3 region of the 16S ribosomal gene used in these TTGE studies, we obtained different band intensities according to which pair was used, the best results corresponding to HDA1-gc/HDA2. Nevertheless, all profiles obtained by TTGE allowed us to distinguish between the main bacterial groups: *Lc. lactis* and *St. thermophilus* were primarily detected, and at lower intensities, *Lb. plantarum* and *Lb. brevis*. It is worth mentioning that *Lc. lactis* and *St. thermophilus* had not been detected by direct isolation. Our failure to recover these bacteria, which are generally ubiquitous in cheese, might be put down to their incapacity to grow on solid media due to their being either stressed or in a viable but non-cultivable state (VBNC). In fact their presence was established by the strategic use of the culture-independent method TTGE. During ripening the increasing number of TTGE bands revealed an increase in diversity. In the final product nine bands appeared, corresponding to *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. coryniformis*, *Lb. curvatus*, *Lb. paracasei*, *Lc. lactis*, *St. thermophilus* and *S. equorum*. It is quite surprising that the band corresponding to *Lb. plantarum* was very well defined in the final product whilst the species was not isolated at this time. High

levels of *Lb. paracasei*, on the other hand, were isolated from all the samples, whilst it was only detected by TTGE at the end of ripening as a very weak band. So, although in general our findings suggest that TTGE analysis can offer better results for species present at high concentrations, amplification results may vary according to the efficacy of DNA extraction, which depends in turn upon the bacterial species and food matrices (Abriouel *et al.*, 2006, Pérez-Pulido *et al.*, 2005). Alternatively, target competition by primers during PCR may occur, as suggested by Heuer and Smalla (1997). Accordingly Muyzer *et al.* (1993), and Heuer and Smalla (1997) reported that species representing less than 1 % of the total community would not be visible in DGGE profiles of the microbial community and Ogier *et al.* (2002) indicated that TTGE analysis only reflects the most abundant microbes. To obviate this problem we considered that a pre-enrichment step before DNA extraction might help to recover less dominant microorganisms, as suggested by Giraffa and Neviani (2001). Thus we carried out TTGE analyses of DNA extracted after enriching the cheese dilutions in broth in order to add to our findings, in a semi-quantitative way, concerning the main culturable microbial groups. The comparison of TTGE profiles obtained from the total DNA of the cheese community and from DNA extracted from enrichment cultures revealed some important differences. For example, *E. faecalis* and *E. faecium*, which could not be isolated in mature cheese, were detected from the enrichment in MRS and Rothe broths. We cannot ignore the possibility that these bacteria might be present in a VBNC state, which would make it difficult to isolate them directly in a selective medium. In fact VBNC has been induced experimentally in *Enterococcus faecalis* (15) and under suitable conditions they are able to recover from their debilitated state. This may well explain why we did not isolate enterococci from selective plates (KF) although growth was observed in general media (MRS broth) and even in selective broth (Rothe broth). This is also true of *Lb. curvatus*, detected at a titre of 10^4 and 10^5 CFU/g in Rothe and MRS broths respectively only when the culture-independent technique was used. Similarly *Lb. plantarum* was quantified at 10^6 CFU/g by Q-PCR, whereas it could not be isolated from mature cheese.

In the same way *Lc. lactis*, although not detected by direct isolation on agar, was quantified by our QPCR-TTGE in titres of 10^4 CFU/g in mature cheese, thus confirming the results obtained by TGGE analysis. Nevertheless, these approximate levels of lactococci are much lower than were to be expected as these bacteria generally reach levels of more than 10^8 CFU ml⁻¹ during milk curding. Our interpretation of this finding

is that *Lc. lactis* may be especially susceptible to the environmental conditions formed by the microbiota in this cheese, for instance, acetic acid produced by heterofermentative lactobacilli, which would kill most of the lactococci or else drive them into a VBNC state.

Finally, our monitoring of *Lactobacillus* composition by LH-PCR revealed the increasing predominance of *Lb. plantarum* throughout ripening followed by an abundant representation of the *Lb. rhamnosus/Lb. paracasei/Lb. brevis* group. Apart from this, *Lb. curvatus/Lb. coryniformis*, *Lb. paraplantarum* and two other unidentified lactobacilli were found in mature cheeses.

This study provides a complete view of the composition of the microbial community in Cueva de la Magahá cheese obtained via a polyphasic approach, combining culture-dependent and culture-independent methods. Such a combined approach was vital to obtaining a realistic view of the existing microbial ecosystem because of the proven variations between the results obtained by both types of method. Our results suggest that the failure of culture-dependent methods may be put down to minor populations' being overshadowed by the predominant ones and also to the transition to the viable but non-culturable stage, probably caused by environmental stress.

5. REFERENCES.

- Abriouel, H., N. Ben Omar, R. Lucas, M. Martínez-Cañamero, S. Keleke, and A. Gálvez.** 2006. Culture-independent analysis of the microbial composition of the African traditional fermented foods *poto poto* and *dégué* by using three different DNA extraction methods. *Int. J. Food Microbiol.* **111**: 228-233.
- Altschul S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffe, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Andrighetto, C., G. Marcazzan, and A. Lombardi.** 2004. Use of RAPD-PCR and TTGE for the evaluation of biodiversity of whey cultures for Grana Padano cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**: 400-405.
- Antonsson, M., G. Molin, and Y. Ardö.** 2003. *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. *Int. J. Food Microbiol.* **85**: 159-169.
- Baruzzi, F., M. Morea, A. Matarante, and P.S. Cocconcelli.** 2000. Changes in the *Lactobacillus* community during Ricotta forte cheese natural fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **89**: 807-814.
- Ben Omar, N., and F. Ampe.** 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough *pozol*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3664-3673.
- Beresford, T.P., N.A. Fitzsimons, N.L. Brennan, and T.M. Cogan.** 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* **11**: 259-274.
- Bulut, C., H. Gunes, B. Okuklu, S. Harsa, S. Kilic, H.S. Coban, and A.F. Yenidunya.** 2005. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, *Comlek peyniri* from Cappadocia region. *J. Dairy Res.* **72**: 19-24.
- Callon, C., L. Millet, and M.C. Montel.** 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J. Dairy Res.* **71**: 231-244.
- Cocolin, L., M. Manzano, C. Cantoni, and G. Comi.** 2000. Development of a rapid method for the identification of *Lactobacillus* spp. isolated from naturally fermented Italian sausages using a polymerase chain reaction-temperature gradient gel electrophoresis. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**: 126-129.
- Coppola, R., M. Nanni, M. Succi, A. Sorrentino, M. Iorizzo, C. Chiavari, and L.**

- Grazia.** 2000. Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheese making and the first months of the ripening. *Lait*. 80: 479-490.
- Corroler, D., N. Desmaures, and M. Gueguen.** 1999. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 91-99.
- De Vuyst, L., and E. J. Vandamme.** 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, p. 91–142. *In* De Vuyst, L., and E. J. Vandamme (ed.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications*. Blackie Academic and Professional, London, UK.
- Deasy, B.M., M.C. Rea, G.F. Fitzgerald, T.M. Cogan, and T.P. Beresford.** 2000. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**: 510-522.
- Del Mar Lleò, M., S. Pierobon, M.C. Tafi, C. Signoretto, and P. Canepari.** 2000. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4564-4567.
- Demarigny, Y., E. Beuvier, A. Dasen and G. Duboz.** 1996. Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. I. Evolution of microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative Lactobacilli. *Lait* **76**: 371–387.
- Dubernet, S., N. Desmaures, and M. Gueguen.** 2002. A PCR-based method for identification of Lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol. Lett.* **214**: 271-275.
- Duthoit, F., J.J. Godon, and M.C. Montel.** 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.
- Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin.** 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 24-27.
- Fitzsimons, N.A., T.M. Cogan, S. Condon, and T. Beresford.** 2001. Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 600-608.

- Fox, P.F., P.L.H. Mc Sweeney, and C.M. Lynch.** 1998. Significance of nonstarter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* **53**: 83–89.
- Freitas, C., and F.X. Malcata.** 2000. Microbiology and biochemistry of cheeses with appellation d'origine protégée and manufactured in the Iberian peninsula from ovine and caprine Milks. *J. Dairy Sci.* **83**: 584-602.
- Giraffa, G.** 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 251-260.
- Giraffa, G., and E. Neviani.** 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* **67**: 19-34.
- Giraffa, G., and L. Rossetti.** 2004. Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **237**: 133-138.
- Guarneri, T., L. Rossetti, and G. Giraffa.** 2001. Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**: 377-381.
- Heuer, H., and K. Smalla.** 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.), *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp. 353-373.
- Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte, and G. Reuter.** 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 103-125.
- Knijff, E., F. Dellaglio, A. Lombardi, C. Andrighetto, and S. Torriani.** 2001. Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *ddl* genes. *J. Microbiol. Methods.* **47**: 35-40.
- Lazzi, C., L. Rossetti, M. Zago, E. Neviani, and G. Giraffa.** 2004. Evaluation of bacterial communities belonging to natural whey starters for Grana Padano cheese by length heterogeneity-PCR. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 481-490.
- Lick, S., K. Drescher, and K.J. Heller.** 2001. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated Göttingen minipigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4137-4143.
- López, S., and B. Mayo.** 1997. Identification and characterization of homofermentative mesophilic *Lactobacillus* strains isolated from artisan starter-free cheeses. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**: 233–238.
- Marino, M., M. Maifreni, and G. Rondinini.** 2003. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria.

- FEMS Microbiol. Lett. **229**: 133-140.
- Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Maqueda, and M. Martínez-Bueno.** 2007. Fast, convenient and economical method for isolating genomic DNA from lactic-acid bacteria using a modification of the “protein salting-out” procedure. *Anal. Biochem.* **366**: 102-104.
- Medina R., M. Katz, S. González, and G. Oliver.** 2001. Characterization of the lactic acid bacteria in ewe’s milk and cheese from northwest Argentina. *J. Food Prot.* **64**: 559–563.
- Muyzer, G.A., E.C. de Waal, and A.G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695–700.
- Ogier, J.C., O. Son, A. Gruss, P. Tailliez, and A. Delacroix-Buchet.** 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3691-3701.
- Olarte, C., S. Sanz, E. Gonzalez-Fandos, and P. Torre.** 2000. The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goat’s cheese (Cameros cheese). *J. Appl. Microbiol.* **88**: 421-429.
- Østlie, H.M., L. Eliassen, A. Florvaag, and S. Skeie.** 2004. Phenotypic and PCR-based characterization of the microflora in Norvegia cheese during ripening. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 287-299.
- Pérez-Pulido, R., N. Ben Omar, H. Abriouel, R. Lucas-López, M. Martínez-Cañamero, and A. Gálvez.** 2005. Microbiological study of lactic acid fermentation of caper berries by molecular and culture-dependent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7872-7879.
- Poznanski, E., A. Cavazza, F. Cappa, and P.S. Cocconcelli.** 2004. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *Int. J. Food Microbiol.* **92**: 141-151.
- Randazzo, C.L., S. Torriani, A.D.L. Akkermans, W.M. de Vos, and E.E. Vaughan.** 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.
- Sánchez, I., S. Seseña, J.M. Poveda, L. Cabezas, and L. Palop.** 2006a. Genetic

- diversity, dynamics, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **107**: 265-273.
- Sánchez, J.I., L. Rossetti, B. Martínez, A. Rodríguez, and G. Giraffa.** 2006b. Application of reverse transcriptase PCR-based T-RFLP to perform semi-quantitative analysis of metabolically active bacteria in dairy fermentations. *J. Microbiol. Methods.* **65**: 268-277.
- Torriani, S., G. E. Felis, and F. Dellaglio.** 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3450-3454.
- Ward, L.J.H., and M.J. Timmins.** 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**: 90-92.
- Zarate, V., F. Belda, C. Pérez, and E. Cardell.** 1997. Changes in the microbial flora of Tenerife goat's milk cheese during ripening. *Int. Dairy J.* **7**: 635-641.

CAPÍTULO VII

Characterisation and Safety Evaluation of Enterococci Isolated from Spanish Goat Cheeses

ABSTRACT

Enterococci are common constituents of dairy products which contribute to the development of some desired organoleptic properties. This is particularly true for Mediterranean farmhouse cheese, usually made from raw milk. In addition, enterococci have emerged as important nosocomial pathogens in the last decades, where vancomycin resistant enterococci (VRE) are on the increase. In the present study, we characterized 95 enterococci strains isolated from three different farmhouse goat cheeses, which belonged to *E. faecalis*, *E. devriesei*, *E. malodoratus*, *E. avium* and *E. hirae* species. Genomic typification by RAPD and ERIC-PCR showed that the genomic types (genotypes) were cheese-specific with the exception of two genotypes shared by two different cheeses. Among the different genotypes, *E. malodoratus* was observed to have the highest intraspecific diversity. No more than 13% of isolates presented antimicrobial activity, and most of the antagonistic isolates belonged to the species *E. devriesei*. The screening of the main enterocin structural genes by dot-blot hybridization was negative for enterocins A, B and P. Nevertheless, all *E. faecalis*, *E. hirae* and *E. avium* isolates exhibited positive hybridization with enterocin EJ97 gene probe, as well as all *E. faecalis* strains hybridized with AS-48 and MR10A structural enterocin gene probes. Genes *gelE*, *esp*, *asaI*, *efaA* and *ace*, associated to enterococci virulence factors, were detected exclusively in *E. faecalis* at different frequencies. No resistance to vancomycin was detected by PCR screening. Among biogenic amine genes screened, tyrosine decarboxylase (*tdc*) gene was detected in all *E. faecalis* and *E. hirae* isolates.

1. INTRODUCTION.

Enterococci are usually present in milk and dairy products, especially farmhouse cheeses from the Mediterranean area. These are found in high numbers and contribute to cheese ripening and aroma development (Franz *et al.*, 1999; Giraffa, 2002; Foulquie-Moreno *et al.*, 2006). This has led to the increasing studies on enterococci as starter or

adjunct cultures for the manufacture of Mediterranean cheeses (Foulquie-Moreno *et al.*, 2006).

Enterococci are air-tolerant, Gram-positive, catalase-negative cocci, belonging to the Lactic Acid Bacteria (LAB) group. They differ as a whole from other Gram-positive, catalase-negative cocci in many phenotypic traits, such as their ability to grow in moderately restrictive conditions: i) between 10° and 45°C; ii) in hypersaline solutions; iii) at pH 9.6; iv) in 40% bile, and v) conserve viability after heating at 60°C for 30 min (Hardie and Whiley, 1997; Morrison *et al.*, 1997). Nevertheless, several phenotypic characteristics are not exclusive to enterococci, and are shared by other LABs such as lactococci (Murray, 1990; Devriese *et al.*, 1993; Franz *et al.*, 1999), therefore genotypic methods have to be used for a correct *Enterococcus* identification to overcome their misidentification by the classical phenotypic methods (Domig *et al.*, 2003).

Enterococci are ubiquitous microorganisms, but their primary habitat is the intestine of warm blooded animals (Giard *et al.*, 2001). Due to their ability to survive heat treatment and adverse environmental conditions, they can be found in many foods of animal (milk, cheese, fermented sausages) and vegetable (fermented olives) sources (Murray, 1990; Muller *et al.*, 2001; Ben Omar *et al.*, 2004). These organisms are frequently present in farmhouse cheeses from the Mediterranean area, in high numbers. Enterococci contribute to cheese ripening and aroma development (Franz *et al.*, 1999; Giraffa, 2002; Foulquie-Moreno *et al.*, 2006) through citrate metabolism and their proteolytic and lipolytic activities (Giraffa, 2003).

In addition, enterococci are also used for shelf-life extension and the hygienic safety of foods because they produce several antimicrobial substances such as lactic acid, hydrogen peroxide and bacteriocins (enterocins). The latter have focused much interest by the fact that they are frequently active against several Gram positive food borne pathogens such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* or *Clostridium boulinum*. For this reason they have been suggested for use as biopreservatives in foods (Franz *et al.*, 2007).

The potential of enterococci as probiotics, has also been investigated. Although the LAB strains usually used as probiotics belong to species of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, enterococci species, such *E. faecium* and *E. faecalis*, have been used too (Holzapfel *et al.*, 1998; Franz *et al.*, 2003; Foulquie-Moreno *et al.*, 2006). Nevertheless, the role of enterococci as probiotics is still controversial because of the

increasing enterococcal nosocomial infections (urinary tract infections, bacteraemia, endocarditis) and the multiple antibiotic resistant infections (Franz *et al.*, 1999). The main enterococci species involved in nosocomial infections is *E. faecalis*, and less frequently, *E. faecium* (Huycke *et al.*, 1998; Giraffa, 2002; Kayser, 2003). Nevertheless, other enterococcal species have been reported as infrequent cause of human infections (Semedo *et al.*, 2003). Several putative virulence factors have been described in enterococci such as aggregation substances, gelatinase, cytolysin, enterococcal surface protein, hyaluronidase, accessory colonization factor and endocarditis antigen (Vankerckhoven *et al.*, 2004; Dupre *et al.*, 2003). In addition, the number of antibiotic resistant enterococci, especially vancomycin resistant enterococci (VRE), are also increasing (Harthug *et al.*, 2000; Kayser, 2003; Leavis *et al.*, 2006).

Another concern with respect to enterococci virulence is the production of biogenic amines. This is a feature shared by many LAB, which produce these compounds in foods by the action of amino acid decarboxylases. Biogenic amines, mainly histamine and tyramine, have been implicated in several intoxications by cheese consumption (Ten Brick *et al.*, 1990) which have occasionally been attributed to enterococci, but this direct relation has never been proved (Giraffa, 2002). Consequently, it would be adequate to evaluate these capacities in the enterococci isolated from foods and in enterococci strains intended as starter cultures or probiotics.

The aim of this study was to investigate the biodiversity of the enterococci species present in farmhouse goat cheeses from Andalusia, as well as their traits concerning its safety status for consumption. The bacteriocinogenic capacities of the isolates were also evaluated.

2. MATERIAL AND METHODS.

Enterococci strains and culture media. All enterococci strains used in this study were isolated in our laboratory during an investigation carried out on the microbial diversity of three different farmhouse cheeses: Cueva de la Magahá (Granada, Spain), a hard cheese made from malagueña goat milk; Quesaila arochena cheese (Aracena, Spain) a hard cheese made from autochthonous white serrana goat; and Torta arochena (Aracena, Spain), a soft cheeses also made from autochthonous white serrana

goat. All isolates were previously identified at the species level by 16S ribosomal DNA gene sequencing and multiplex species specific PCR (Martín-Platero *et al.*, 2008; Martín-Platero *et al.*, submitted). *Enterococcus faecalis* S-47 (from our collection) and *Listeria innocua* CECT 4030 were used as indicator strains in assays of antimicrobial activity (Gálvez *et al.*, 1985). *Enterococcus faecalis* A-48-32 (enterocin AS-48), *E. faecalis* MRR10-3 (enterocin MR10), *E. faecium* QF22 (enterocins A, B and P) and *E. faecalis* EJ97 (enterocin EJ97) were used as positive controls in dot blot hybridizations for enterocin screening. All strains were grown in brain-heart infusion broth (BHI) (Scharlau, Barcelona, Spain) at 37°C for 18 h. Solid media were prepared by adding 1.7% agar to BHI medium (BHA). Enterococci were maintained as stocks at -80°C in 20% glycerol.

Antimicrobial activity assay. To study the antimicrobial capacities of the enterococci, the double layer technique was used as described by Gratia and Fredericq (1946). This technique consists in placing 5 µl drops of an overnight culture of the strains study on plates containing 10 ml of GM-17 agar medium [M-17 (Scharlau, Barcelona, Spain) plus 1% glucose] dissolved in sodium phosphate buffer 0.1 M, pH 7.2. After incubation at 37 °C for 18-24 h, the plates were overlaid with 6 ml of BHI-B soft agar (1.8% BHI, 0.8% agar) inoculated (2 %) with indicator strains (*Enterococcus faecalis* S-47 or *Listeria innocua* 4030), and incubated again at 37 °C to allow the growth of the indicator strain. The appearance of a clear inhibition zone around the strain spot indicated the production of any inhibitor substance active against the indicator strain.

DNA extraction. Genomic DNA from pure cultures was extracted according to Martín-Platero *et al.* (2007).

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). All strains were genomically typed by RAPD-PCR procedure. PCR reactions were carried out in a total volume of 50 µl containing 5 µl of 10 × Taq reaction buffer, 3 mM of MgCl₂, 400 µM of dNTPs, 1 µM of M13 primer (5'- GAGGGTGGCGGTTCT-3'), 1 U of MBL DNA polymerase and 2 µl of template DNA. Amplifications were performed in an iCycler 170-8720 (Biorad, Hercules, Calif.) thermocycler with a cycling programme consisting of an initial denaturing step at 94°C for 60 s, then 35 cycles of 94°C for 60 s, 40°C for 20 s (with 0.6 %/s ramp) and 72°C for 80 s (with 0.6 %/s ramp) and a final extension of 72°C for 5 min.

Products were analysed by electrophoresis through 1.5% agarose gels at 30 V for 16 h in a 1 × TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 2.5 mM EDTA, pH 8) and revealed in ethidium bromide (0.5 µg/ml). Gels were photographed on a UV transillumination table (Vilber Lourmat, France).

Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR). All strains were also genotyped by ERIC-PCR procedure. PCR reactions were carried out in a total volume of 25 µl containing 2.5 µl of 10 × Taq reaction buffer, 3 mM of MgCl₂, 400 µM of dNTPs, 1 µM of ERIC1-R primer (5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC -3'), 1 U of MBL DNA polymerase and 1 µl of template DNA. Amplifications were performed in an iCycler 170-8720 thermocycler with a cycling programme consisting of an initial denaturing step at 94°C for 3 min, then 35 cycles of 94°C for 30 s, 48°C for 60 s and 72°C for 5 min and a final extension of 72°C for 7 min.

Products were analysed by electrophoresis through 1.5% agarose gels at 30 V for 16 h in a 1 × TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 2.5 mM EDTA, pH 8) and revealed in ethidium bromide (0.5 µg/ml). Gels were photographed on the UV transillumination table (Vilber Lourmat, France).

Cluster analysis. All fingerprint pattern images obtained by RAPD and ERIC-PCR experiments were analysed by Fingerprinting II Informatrix software (Bio-Rad). Similarity matrix was based on the Pearson product moment correlation coefficient and the corresponding dendrogram was deduced using the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA).

Multiplex PCR. Different multiplex PCRs were carried out for the enterococci virulence genes (*gelE*, *hyl*, *asa1*, *esp*, *cylA*, *ace*, *efaA*, *vanA* and *vanB*) and amino acid decarboxylase genes [*hdc* (histidine decarboxylase), *odc* (ornithine decarboxylase) and *tdc* (tyrosine decarboxylase)] screening. The primers used are listed in Table 1 and the multiplex PCR conditions are shown in Table 2.

Dot-Blot. We have screened the presence of different enterocin genes by dot blot hybridization with a Bio-Dot Microfiltration Apparatus (Bio-Rad). Approximately 200 ng of DNA of enterococci isolates were denatured by adding NaOH-EDTA to a final concentration of 0.4 M NaOH and 10 mM EDTA. After 10 min at room temperature the denatured DNA was spotted on the Bio-Dot Microfiltration Apparatus assembled with a prewet nylon membrane (HyBond N+, Amersham Biosciences). After vacuum application, 500 µl of NaOH 0.4 M were spotted and vacuum-dried again.

Table 1. Primers used in this study.

Primers	Specificity	Reference
GEL11; 5'-TATGACAATGCTTTTTGGGAT-3'	Gelatinase (<i>gelE</i>)	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
GEL12; 5'-AGATGCACCCGAAATAATATA-3'		
HYL n1; 5'-ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG-3'	Hyaluronidase (<i>hyl</i>)	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
HYL n2; 5'-GACTGACGTCCAAGTTTCCAA-3'		
ASA11; 5'-GCACGCTATTACGAACTATGA-3'	Aggregation substance (<i>asaI</i>)	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
ASA12; 5'-TAAGAAAGAACATCACCACGA-3'		
ESP14F; 5'-AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG-3'	Enterococcal surface protein (<i>esp</i>)	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
ESP12R; 5'-AATTGATTCTTTAGCATCTGG-3'		
CYT I; 5'-ACTCGGGGATTGATAGGC-3'	Cytolysin (<i>cylA</i>)	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
CYT IIb; 5'-GCTGCTAAAGCTGCGCTT-3'		
EFA-AF; 5'-GCCAATTGGGACAGACCCTC-3'	Endocarditis antigen (<i>efaA</i>)	Creti <i>et al.</i> , 2004
EFA-AR; 5'-CGCCTTCTGTTCTTCTTTGGC-3'		
ACE-F; 5'-GAATTGAGCAAAAGTTCAATCG-3'	Adhesin of collagen protein (<i>ace</i>)	Ben Omar <i>et al.</i> , 2004
ACE-R; 5'-GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC-3'		
VAN-AF; 5'-TCTGCAATAGAGATAGCCGC-3'	Vancomycin resistance (<i>vanA</i>)	Lemcke and Bülte, 2000
VAN-AR; 5'-GGAGTAGCTATCCCAGCATT-3'		
VAN-BF; 5'-GCTCCGCAGCCTGCATGGACA-3'	Vancomycin resistance (<i>vanB</i>)	Lemcke and Bülte, 2000
VAN-BR; 5'-ACGATGCCGCCATCCTCCTGC-3'		
JV16HC; 5'-AGATGGTATTGTTTCTTATG-3'	Histidine decarboxylase	De la Rivas <i>et al.</i> , 2005
JV17HC; 5'-AGACCATAACCCATAACCTT-3'		
P2-for; 5'-GAYATNATNGGNATNGGNYTNGAYCARG-3'	Tyrosine decarboxylase	De la Rivas <i>et al.</i> , 2005
P1-rev; 5'-CCRTARTCNGGNATAGCRAARTCNGTRTG-3'		
3; 5'-GTNTTYAAYGCNGAYAARACNTAYTTYGT-3'	Ornithine decarboxylase	De la Rivas <i>et al.</i> , 2005
16; 5'-ATNGARTTNAGTTTCRCAYTTYTCNGG-3'		

Then the membrane was covered with 2× SSC (20× SSC is 3 M NaCl-0.3 M sodium citrate, pH 7) and air dried. The DNA was fixed in the nylon membrane by heating at 80°C during 3 hours.

The probe used in the Southern blot experiments was labelled in a thermocycling reaction using the deoxynucleoside triphosphate-labeling mix of a DIG-DNA labelling and detection kit obtained from Roche Molecular Biochemicals as specified by the manufacturer. The probes were amplified from the control strain (Table 3). Hybridization and detection of the probes were carried out as specified by the manufacturer (Roche Molecular Biochemicals, Barcelona, Spain).

Table 2. Multiplex PCR used in this study.

Multiplex PCR	Primer set	PCR product size (bp)	Primer concentration (µM)	PCR conditions	Reference
Enterococci virulence genes	GEL11/GEL12	213	0.14	(94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min) x30	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
	HYL n1/HYL n2	276	0.14		
	ASA11/ASA12	375	0.14		
	ESP 14F/ESP 12R	510	0.28		
Enterococci virulence genes	CYT I/CYT IIb	688	0.28	(94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) x30	This study
	EFA-AF/EFA-AR	688	0.10		
	ACE-F/ACE-R	1008	0.10		
Vancomycin resistances genes	VAN-AF/VAN-AR	377	0.10	(94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) x30	This study
	VAN-BF/VAN-BR	529	0.10		
Amino acid decarboxylase	JV16HC/ JV17HC	367	0.30	(94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 2 min) x30	De la Rivas <i>et al.</i> , 2005
	P2-for/ P1-rev	924	2.00		
	3/16	1446	1.00		

Table 3. Primers used for enterocin gene amplification and enterocin gene probe construction.

PRIMERS	ENTEROCIN	SIZE (bp)	TM (°C)	REFERENCE
As48-1: 5'-AATAAACTACATGGGT-3'	AS-48	377	47	Martínez-Bueno <i>et al.</i> , 1998
As-48-5: 5'-CCAAGCAATAACTGCTCTTT-3'				
E21-4; 5'-GCAGCTAAGCTAACGACT-3'	EJ97	279	49	Sánchez-Hidalgo <i>et al.</i> , 2003
E21-9; 5'-AGGGGAATTTGAACAGA-3'				
P9; 5'-GAGATTTATCTCCATAATCT-3'	A	452	49	Aymerich <i>et al.</i> , 1996
P10; 5'-GTACCACTCATAGTGGAA-3'				
EntB(f); 5'-GAAAATGATCACAGAATGCCTA-3'	B	159	52	Du Toit <i>et al.</i> , 2000
EntB(r); 5'-GTTGCATTTAGAGTATACATTTG-3'				
EntP1; 5'-ATGAGAAAAAATTATTTAGTTT-3'	P	216	50	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2002
EntP2; 5'-TTAATGTCCCATACCTGCCAAACC-3'				
LICIJ1; 5'-ATGGGAGCAATCGCAAAA-3'	MR10A	135	43	Cintas <i>et al.</i> , 1998
LICIJ2A; 5'-TTAAATATGTTTTTAAATCCA-3'				

3. RESULTS.

Enterococci typification. We studied a total of 95 enterococci strains previously isolated from three farmhouse goat cheeses, whose microbial communities have been recently studied (Martín-Platero *et al.*, 2008; Martín-Platero *et al.*, submitted). They were identified at species level by 16S rDNA analysis or species specific PCR. The source of the different strains were the following: 11 isolates came from Cueva de la Magahá cheese at the beginning of ripening (1 week of maturation), 36 from mature Quesaila arochena cheese and 48 from mature Torta arochena cheese. The different species isolated and their microbiological levels in their respective cheese are shown in Fig. 1. A total of five enterococcal species appeared among the strains studied with different population levels depending on the cheese. *E. faecalis*, *E. devriesei* and *E. malodoratus* were present in the three cheeses while *E. avium* was just present in Torta arochena and *E. hirae* only appeared in Cueva de la Magahá cheese. All the species present within a cheese were found at similar levels with slight predominances of *E. devriesei* and *E. faecalis* in some cheeses (Fig. 1).

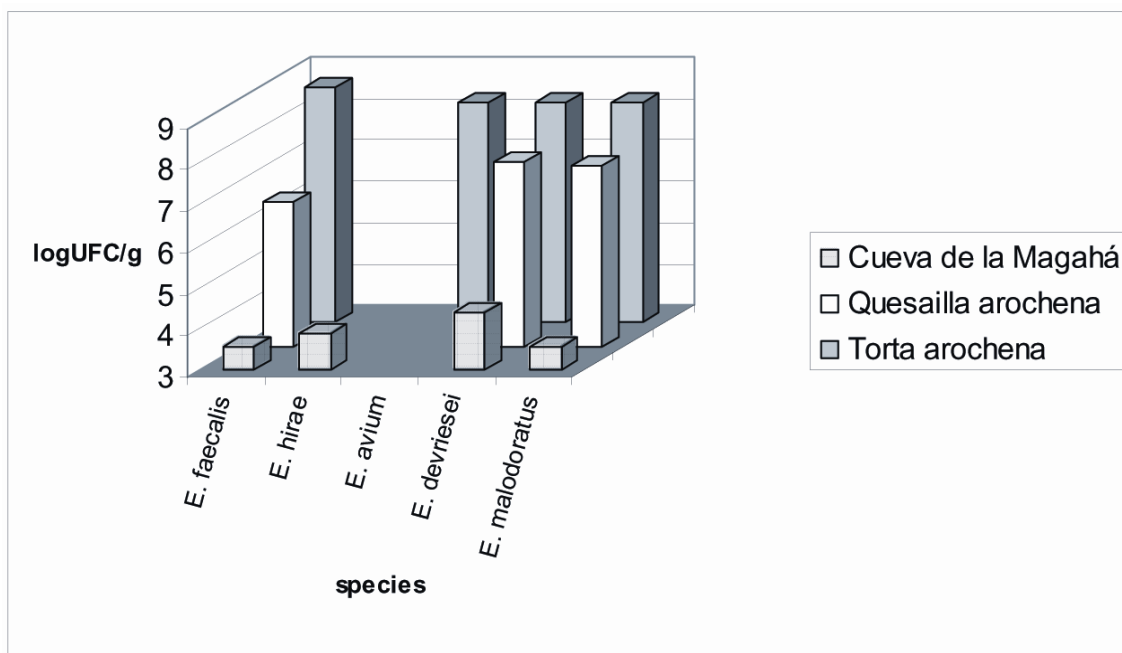


Figure 1. Microbiological levels of the different *Enterococcus* species isolated from the cheeses.

Enterococci isolates were genotyped by RAPD-PCR and ERIC-PCR (Fig. 2). The cluster analysis of RAPD-PCR gave us 19 different genotypes while the cluster analysis of ERIC-PCR gave us 24 different genotypes (data not shown). Numerical analysis of the combined RAPD-ERIC profiles finally differentiated 24 different genotypes shown in Fig. 2, where most genotypes of the same species were clustered together. The 7 genotypes of *E. malodoratus* were clustered at a cut off 46% similarity, the 2 genotypes of *E. avium* were clustered at a cut off 76% similarity, 3 out of 4 genotypes of *E. faecalis* were clustered at a cut off 66% similarity and 9 out of 10 genotypes of *E. devriesei* were clustered at a cut off 58% similarity. The highest intraspecific biodiversity was found among the 13 *E. malodoratus* strains, clustered in 7 different genotypes.

Most genotypes were specific of the cheese of origin. Only in two cases a same genotype was shared by different cheeses: genotype ME17 (*E. devriesei*), which included one strain from Cueva de la Magahá and one strain from Torta arochena; and genotype ME22 (*E. devriesei*), which included 11 strains from Quesailla arochena and 2 strains from Torta arochena.

Bacteriocin production. The production of antimicrobial substances against *E. faecalis* S-47 and *L. innocua* CECT 4030 was screened in all enterococci. Only 12 isolates (12.6% of isolates) have shown antimicrobial properties against any of the selected indicator strains. One strain of *E. malodoratus* (from Torta arochena) inhibited *L. innocua* CECT 4030, two strains of *E. faecalis* (from Quesailla arochena) inhibited *E. faecalis* S-47, and finally nine strains of *E. devriesei* (two from Quesailla arochena and seven from Torta arochena) inhibited both indicator bacteria.

We also screened for the presence of the main enterocins genes in all the *Enterococcus* isolates, by constructing probes for enterocins A, B, P, EJ97, AS-48 and MR10A. Hybridization was not observed with enterocins A, B and P probes. One *E. malodoratus* isolate (from Cueva de la Magaha cheese), four *E. avium* isolates and all *E. faecalis* and *E. hirae* isolates hybridized with EJ97 probe and some *E. avium*, *E. malodoratus* and *E. devriesei* strains showed scarce signal of hybridization with this enterocin (Table 4, Fig. 3-I). MR10A and AS-48 probes hybridized with all *E. faecalis* (Table 4, Fig. 3-II, 3-III).

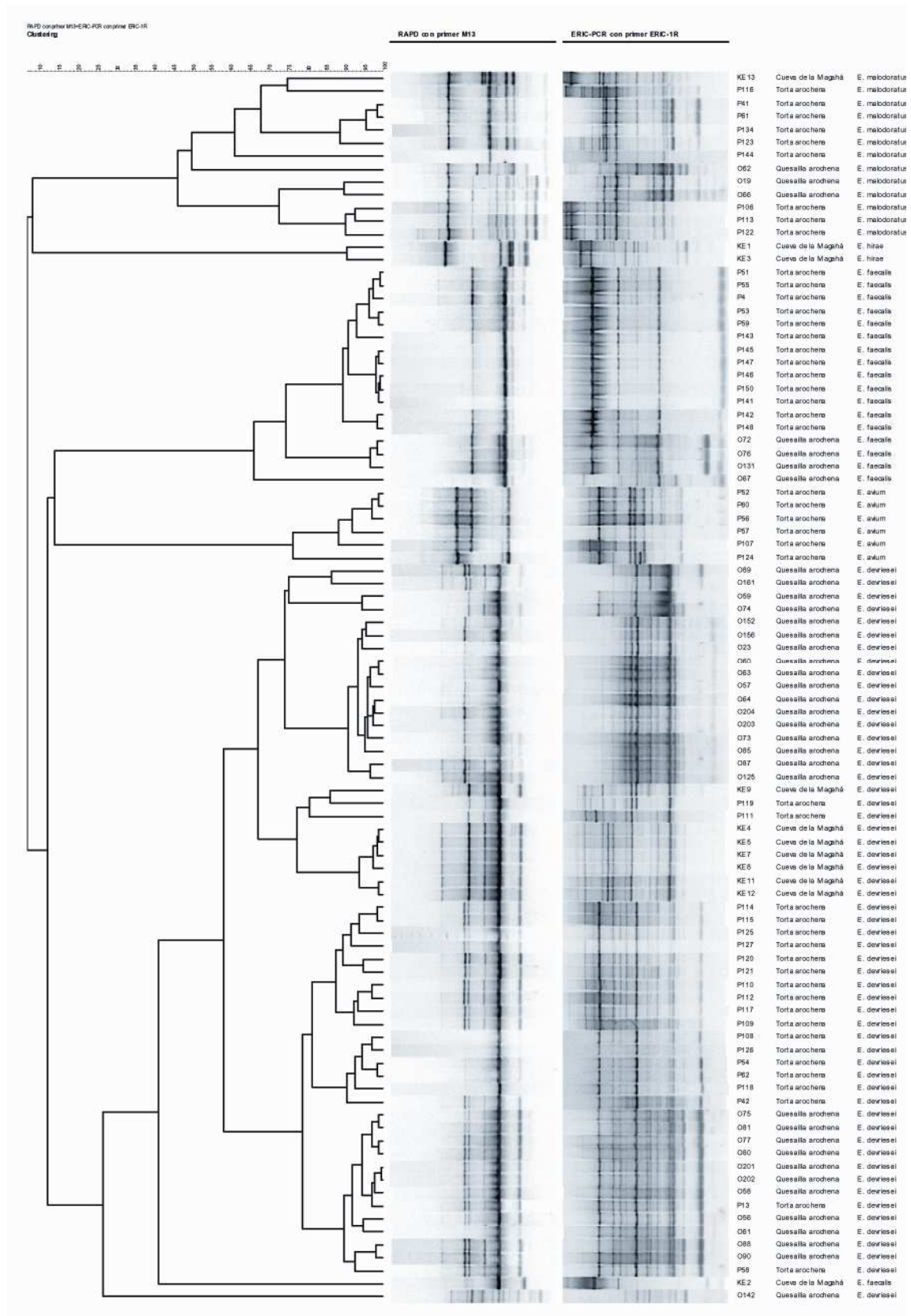


Figure 2. Cluster analysis of enterococci. The name, source of isolation, and species of each genotype are indicated from right to left on the right-side of the dendrogram.

Table 4. Dot-blot hybridization of enterocin structural gene probes with enterococci isolated from cheeses. (+) positive, (-) negative, (+/-) poor hybridization.

Strain	Species	Dot-blot hybridization (probes)					
		EJ97	MR10A	AS-48	A	B	P
KE1 (A1)*	<i>E. hirae</i>	+	-	-	-	-	-
KE2 (A2)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
KE3 (A2)	<i>E. hirae</i>	+	-	-	-	-	-
KE4 (A4)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
KE5 (A5)	<i>E. devriesei</i>	+ / -	-	-	-	-	-
KE7 (A6)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
KE8 (A7)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
KE9 (A8)	<i>E. devriesei</i>	+ / -	-	-	-	-	-
KE11 (A9)	<i>E. devriesei</i>	+ / -	-	-	-	-	-
KE12 (A10)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
KE13 (A11)	<i>E. malodoratus</i>	+	-	-	-	-	-
P4 (A12)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
P13 (B1)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
P41 (B2)	<i>E. malodoratus</i>	+ / -	-	-	-	-	-
P42 (B3)	<i>E. devriesei</i>	+ / -	-	-	-	-	-
P51 (B4)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
P52 (B5)	<i>E. avium</i>	+	-	-	-	-	-
P53 (B6)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
P54 (B7)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
P55 (B8)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
P56 (B9)	<i>E. avium</i>	+	-	-	-	-	-
P57 (B10)	<i>E. avium</i>	+ / -	-	-	-	-	-
P58 (B11)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
P59 (B12)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
P60 (C1)	<i>E. avium</i>	+	-	-	-	-	-
P61 (C2)	<i>E. malodoratus</i>	-	-	-	-	-	-
P62 (C3)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
P106 (C4)	<i>E. malodoratus</i>	+ / -	-	-	-	-	-
P107 (C5)	<i>E. avium</i>	+	-	-	-	-	-
P108 (C6)	<i>E. devriesei</i>	+ / -	-	-	-	-	-
P109 (C7)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
P110 (C8)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
P111 (C9)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
P112 (C10)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
P113 (C11)	<i>E. malodoratus</i>	-	-	-	-	-	-
P114 (C12)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
P115 (D1)	<i>E. devriesei</i>	+ / -	-	-	-	-	-
P116 (D2)	<i>E. malodoratus</i>	+ / -	-	-	-	-	-
P117 (D3)	<i>E. devriesei</i>	+ / -	-	-	-	-	-
P118 (D4)	<i>E. devriesei</i>	+ / -	-	-	-	-	-
P119 (D5)	<i>E. devriesei</i>	+ / -	-	-	-	-	-
P120 (D6)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
P121 (D7)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
P122 (D8)	<i>E. malodoratus</i>	+ / -	-	-	-	-	-
P123 (D9)	<i>E. malodoratus</i>	-	-	-	-	-	-
P124 (D10)	<i>E. avium</i>	+ / -	-	-	-	-	-
P125 (D11)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-

Table 4. (continued)

Strain	Species	Dot-blot hybridization (probes)					
		EJ97	MR10A	AS-48	A	B	P
P126 (D12)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
P127 (E1)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
P134 (E2)	<i>E. malodoratus</i>	-	-	-	-	-	-
P141 (E3)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
P142 (E4)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
P143 (E5)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
P144 (E6)	<i>E. malodoratus</i>	-	-	-	-	-	-
P145 (E7)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
P146 (E8)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
P147 (E9)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
P148 (E10)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
P150 (E11)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
O19 (E12)	<i>E. malodoratus</i>	-	-	-	-	-	-
O23 (F1)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O56 (F2)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O57 (F3)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O58 (F4)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O59 (F5)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O60 (F6)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O61 (F7)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O62 (F8)	<i>E. malodoratus</i>	-	-	-	-	-	-
O63 (F9)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O64 (F10)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O66 (F11)	<i>E. malodoratus</i>	-	-	-	-	-	-
O67 (F12)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
O72 (G1)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
O73 (G2)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O74 (G3)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O75 (G4)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O76 (G5)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
O77 (G6)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O80 (G7)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O81 (G8)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O85 (G9)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O87 (G10)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O88 (G11)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O89 (G12)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O90 (H1)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O125 (H2)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O131 (H3)	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
O142 (H4)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O152 (H5)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O156 (H6)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O161 (H7)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O201 (H8)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O202 (H9)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O203 (H10)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-
O204 (H11)	<i>E. devriesei</i>	-	-	-	-	-	-

*Brackets indicate the membrane position of the strain (see Fig. 3).

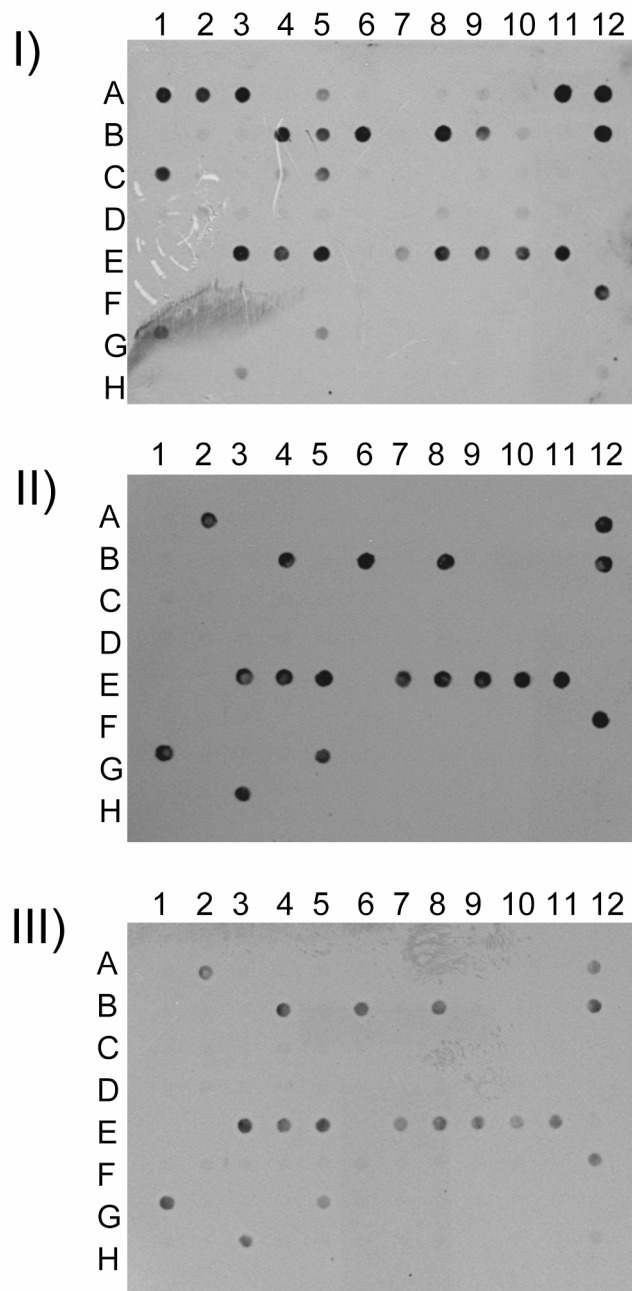


Figure 3. Dot-blot hybridization of enterocin structural gene probes with enterococci isolated from cheeses. I) Dot-blot hybridization with enterocin EJ97. II) Dot-blot hybridization with enterocin MR10A. III) Dot-blot hybridization with enterocin AS-48. Each strain position is shown in Table 4.

Virulence factors. Among all species screened for virulence gene factors (*gelE*, *hyl*, *asa1*, *esp*, *cylA*, *ace*, *efaA*, *vanA* and *vanB*), only *E. faecalis* strains positively amplified some of the nine genes screened. All *E. faecalis* isolates harboured at least three of the genes studied (Fig. 4A). A 44.44% of *E. faecalis* had simultaneously the *gelE*, *asa1*, *esp* and *efaA* genes, a 27.78% had the *gelE*, *asa1* and *esp* genes, a 22.22% had the *gelE*, *esp*, *ace* and *efaA* genes and a 5.56% had the *gelE*, *asa1*, *ace* and *efaA* genes. Studying the distribution of the different virulence genes individually (Fig. 4B), the *gelE* gene was present in a 100% of *E. faecalis* isolates. The genes *esp*, *asa1* and *efaA* were detected with percentages of 94.44%, 77.78% and 72.22% respectively. Finally, the *ace* gene was detected in 27.78% of *E. faecalis* isolates. The remaining virulence genes (*hyl*, *cylA*, *vanA* and *vanB*) were not detected in any of the strains.

Biogenic amines. The presence of amino acid decarboxylase genes, for the production of histamine, tyramine and putrescine, were screened by multiplex PCR. No isolates were amplified for either histidine decarboxylase (*hdc*) or ornithine decarboxylase (*odc*), while all *E. faecalis* and *E. hirae* have shown to carry the tyrosine decarboxylase (*tdc*).

4. DISCUSSION.

The *Enterococcus* genus is naturally present in many traditional Mediterranean cheeses (Foulquie-Moreno *et al.*, 2006), and, in consequence, they have been consumed during centuries by consumers. Moreover, their contribution to flavour and aroma development and maturation of the fermented foods are well documented (Centeno *et al.*, 1999; Oumer *et al.*, 2001; Sarantinopoulos *et al.*, 2002b). In spite of this, enterococci do not have the GRAS (Generally Recognise As Safe) *status* because its implications in some nosocomial infections (Giraffa, 2002; Ogier and Serror, 2008). Therefore, the presence of enterococci in foods and their programmed application is currently questioned.

This study highlights the genetic diversity, antimicrobial capacities and virulence traits of 95 *Enterococcus* strains isolated from three farmhouse goat cheeses from southern Spain (Andalusia). The levels of the enterococcal populations were different between the three cheeses. An 11.6% of the enterococci isolates studied, came

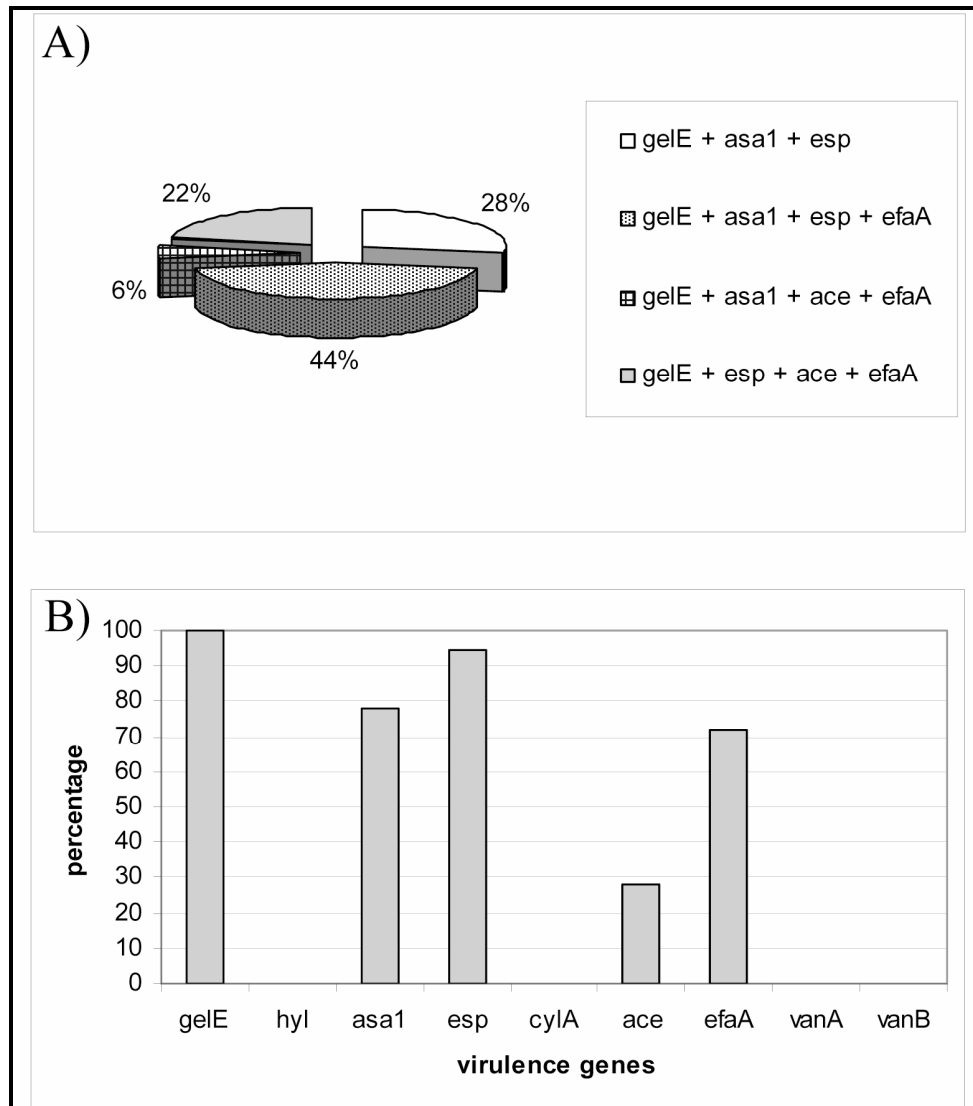


Figure 4. Incidence of virulence genes in *E. faecalis* strains isolated from cheeses. A) Frequency of strains with cluster of virulence genes. B) Frequency of the different virulence genes in *E. faecalis* isolates.

from fresh Cueva de la Magaha cheese, found in low levels (4×10^4 CFU/g), and disappeared during the eight months of ripening (Martín-Platero *et al.*, 2008). A 37.9% of isolates came from mature Quesaila arochena cheese and the remaining 50.5% came from mature Torta arochena cheese, found in high levels (6.61×10^7 CFU/g and 8.4×10^8 CFU/g respectively) (Martín-Platero *et al.*, submitted). These different levels of enterococci reflect the variability of this genus among different cheeses as is reported for this group of bacteria (Foulquie-Moreno *et al.*, 2006). Usually they range from 10^4 to 10^7 CFU/g, but in our study, enterococci from Torta arochena reaches levels of up to

10⁸ CFU/g. The *Enterococcus* species most commonly isolated in cheese until now have been *E. faecalis* and *E. faecium*, followed by *E. durans* (Giraffa, 2003; Ogier and Serror, 2008), while in our study *E. devriesei*, *E. faecalis* and *E. malodoratus* have been the most frequent species isolated in the three cheeses. *E. hirae* was only present in Cueva de la Magahá cheese and *E. avium* was only isolated from Torta arochena (Fig. 2). It is worth mentioning that it is the first time that *E. devriesei* and *E. malodoratus* are reported in cheeses, even constitute an important proportion of the enterococci populations in them. The presence of these unusual species could be specific of the Andalusia region, giving those cheeses their particular flavour and aroma. Nevertheless, we have to take into account the absence of references of *E. devriesei* in cheese may be due to the recent description of this species (Svec *et al.*, 2005). Anyhow, it would be interesting to study the biotechnological properties and the applicability of these species for cheese technology considering the lack of virulence genes.

Many fingerprinting methods have been applied to study microbial biodiversity. An accurate species identification and typification is important for correct bacterial selection for further use in food technology and probiotics (Martín *et al.*, 2005). In this sense, RAPD and ERIC-PCR have been revealed as reliable tools for the identification and typification of LAB from foods (Suzzi *et al.*, 2000; Ventura and Zink, 2002). Their discriminative power increases when combined with other techniques, such as PFGE, or when different primers are used (Tailliez *et al.*, 1998; Bauer *et al.*, 2000; Van Den Braak *et al.*, 2000). In our study the combination of RAPD and ERIC-PCR has been proved a good technique to identify and typify the *Enterococcus* isolates from cheese, as is shown in our results. Most species were clustered together, except one *E. faecalis* isolate (genotype ME23) and one *E. devriesei* isolate (genotype ME24), which formed single linkages with their respective *E. faecalis* and *E. devriesei* groups. In addition, the cluster analysis showed that most strains are specific of their cheese, suggesting that specific features were needed for growth in each cheese as the result of the different environmental conditions. An exception was the genotype ME22 (*E. devriesei*) which was composed by 11 isolates from Quesailla arochena and 2 isolates from Torta arochena, indicating that some strains could develop in different conditions and under different microbial communities. These cheeses have been manufactured in the same region (Martín-Platero *et al.*, submitted) and with the same type of milk (white *serrana* goat), so the colonization by a same strain can be easily understood. In the other exception, two isolates each belonging to different cheeses (Cueva de la Magahá and

Torta arochena) produced in two separate Spanish provinces (Granada and Huelva respectively) and manufactured by different process and from different goats milk (*malagueña* goat and white *serrana* goat), were found to belong to the same genotype (*E. devriesei* ME17). It is worth mentioning that this strain disappears during the maturation of the Cueva de la Magahá cheese (Martín-Platero *et al.*, 2008) while it was detected in mature Torta arochena cheese (Martín-Platero *et al.*, submitted).

A frequent feature between *Enterococcus* strains is the production of enterocins that inhibit other bacteria including pathogenic bacteria, such as *Listeria* and *Clostridium* (Giraffa, 2003). This feature is of special interest for the application of enterococci as starter or protective culture in cheese manufacture (Sarantinopoulos *et al.*, 2002a), therefore we screened our enterococci isolates for the production of antimicrobial substances, using *Listeria* and *Enterococcus* as indicator strains, as these are the most prevailing type of antagonisms among enterococci (De Vuyst *et al.*, 2003). We found that 12.6% of strains inhibited these indicator strains, which is far from the results obtained by other authors who found more than 65% of enterocin production for *E. faecalis*, although this proportion depends of the species (De Vuyst *et al.*, 2003). *E. faecalis* just represents 18.9% of our enterococcal isolates, and within this species, only 11.1% of *E. faecalis* have shown inhibitory activity. In addition, the latter *E. faecalis* isolates were active only against *E. faecalis*. Similar narrow spectrums are found within the bacteriocinogenic isolates of *E. malodoratus*, which have only shown activity against *L. innocua*. This type of narrow spectrum bacteriocins would be of interest in cheese technology to inhibit pathogenic bacteria, but allowing the LAB to do their function in cheese ripening (De Vuyst *et al.*, 2003). The widest antimicrobial activity was shown by *E. devriesei*. This is the first report of the antimicrobial capacities of this species. Suzzi and coworkers (2000) point out that the antibacterial activity of enterococcal strains could be related with particular microhabitats or areas. In addition to the phenotypical detection of enterocin production, we screened for the presence of the most frequent enterocins by dot-blot hybridization because under experimental conditions, the possession of an enterocin structural gene does not imply their production, and a single strain could produce more than one enterocin (Cintas *et al.*, 2000; De Vuyst *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2003). The dot-blot hybridization for enterocin detection has been described previously by several authors (Martínez *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 1998). This methodology permitted us to exclude the presence of the enterocins A, B and P genes among our enterococci. Even though in a

previous study enterocins A, B and P showed a high prevalence among enterococci, enterocins A and B have revealed to be specific of *E. faecium* (De Vuyst *et al.*, 2003), a species not present in our study. Interestingly, results obtained on the distribution of enterocins EJ97, MR10 and AS-48 has shown high distribution of EJ97 among enterococci (Table 4, Fig. 3-I) as is revealed by the hybridization with all *E. faecalis*, *E. hirae*, one *E. malodoratus*, four *E. avium* and, with a poor signal, some *E. avium*, *E. malodoratus*, and *E. devriesei*. It is noteworthy that in the *E. faecalis* V583 genome (the only *Enterococcus* complete genome available) a hypothetical protein (EFA0015) obtained 97% similarity to EJ97 (Nes *et al.*, 2007), although there is no proof on the antimicrobial activity of the putative protein (Nes *et al.*, 2007). According to our results, enterocin EJ97 or a similar peptide is widely distributed among enterococci. Something similar happens with enterocins MR10 and AS-48, broadly distributed among *E. faecalis* according to the hybridization of the corresponding probes with all *E. faecalis*. In fact, Joosten and coworkers (1997) revealed a high frequency of AS-48 or a related peptide between *E. faecalis* and *E. faecium*. The production of a bacteriocin needs additional genes, such as regulatory, immunity or export genes, therefore presence of a bacteriocin gene does not imply its production and therefore must be taken into account. The ongoing genome sequencing projects in LAB and the consequent microarrays studies will highlight the antimicrobial peptide mine of LAB as well as their expression profile (Nes y Johnsborg, 2004). In this field, the small size of bacteriocin genes becomes a problem because they are usually inadequately annotated. Improving search tools for identification of peptide bacteriocin genes should help us in this subject (Nes *et al.*, 2007).

A major concern on enterococci is their pathogenicity potential. They are emerging pathogens involved in urinary tract infections, bacteraemia, endocarditis and multiple antibiotic resistances (Franz *et al.*, 1999) but the enterococcal virulence and pathogenic mechanisms are still largely unknown (Creti *et al.*, 2004). Nevertheless some putative virulence factors have been described such as the enterococcal surface protein, gelatinase, aggregation substance or the cytolysin (Eaton and Gasson, 2001), but none have been clearly and unequivocally associated to clinical isolates (Creti *et al.*, 2004). Furthermore, in the therapy of enterococcal infections, vancomycin is one of the last options, making of special concern the VRE spreading (Bonten *et al.*, 2001). The *van* gene cluster is transferable making this antibiotic resistance the most important safety aspect to be evaluated in food grade enterococci (Klein, 2003). *E. faecalis* had

been the predominant enterococcal species of clinical isolates (80-90% of enterococcal isolates) (Kayser, 2003) whereas *E. faecium* constitute the remaining 5-15%. Nevertheless, other enterococcal species have been reported as infrequent cause of human infections (Semedo *et al.*, 2003). Cytolysin, aggregation substance and gelatinase genes are well known to have a silent state, making the genotypic study more important than the phenotypic screening because they could be undetected under laboratory conditions, but expressed *in vivo*, therefore overlooking the pathogenicity potential of such strains (Eaton and Gasson, 2001; Semedo *et al.*, 2003; Creti *et al.*, 2004). In addition, it is important to study the presence of virulence traits in species other than *E. faecalis* and *E. faecium* to correctly evaluate the evolution of the virulence within the *Enterococcus* genus, as was revealed by the spreading of virulence factors in different enterococcal species, such as the detection of *gelE*, *agg* and *esp* in *E. faecium* or the detection of the *cyl* operon in *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. saccharolyticus*, *E. solitarius* and *E. seriolicida* (Semedo *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2005). We have studied the presence of nine virulence genes (*gelE*, *hyl*, *asa1*, *esp*, *cylA*, *ace*, *efaA*, *vanA* and *vanB*) among our cheese enterococcal isolates, being *E. faecalis* the only species that harboured some of them. In our study, the *gelE* gene was detected in all *E. faecalis* isolates, and *esp*, *asa1*, and *efaA* genes were also present in high proportions (94.44%, 77.78% and 72.22%, respectively). The *ace* gene had less representation (27.78%), and the remaining screened genes (*cylA*, *hyl*, *vanA* and *vanB*) were not detected. As in our study, *gelE*, *esp*, *asa1*, and *efaA* seems to be highly represented in *E. faecalis* (Creti *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005). The *ace* gene was present in 27.78% of *E. faecalis* as opposed to the 100% found by Creti and coworkers (2004). The latter genes and *cyl* distribution are contradictorily described among clinical and non-clinical enterococci (Creti *et al.*, 2004). The frequency of the undesired *cyl* gene presence among enterococci is highly variable and does not correlate with clinical nor food isolates (Semedo *et al.*, 2003; Creti *et al.*, 2004), and the *hyl* gene, until now, is shown to be specific for *E. faecium* (Vankerckhoven *et al.*, 2004) and we do not have this species. The *van* genes have shown low incidence between food enterococcal isolates even for dairy and cheese isolates (Teuber *et al.*, 1999; Franz *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2005), which is the major concern to consumer safety and for technological applications. It is noteworthy that all *E. faecalis* carried at least three virulence genes. A 27.8% of total *E. faecalis* carried three genes (*gelE*, *asa1* and *esp*)

while the rest carried four virulence genes. No patterns were observed between the virulence genes studied, which is in accordance to the results of Eaton and Gasson (2001). Creti and coworkers (2004) analysed the grouping of different virulence genes showing the carriage of four virulence genes among most isolates, even commensal isolates. They only observed a smaller number of virulence genes in strains isolated from endocarditis and from the environment.

Finally, to complete the safety status analysis of the enterococci, we screened the presence of several amino decarboxylases (*hdc*, *odc* and *tdc* genes). In our study, only the tyrosine decarboxylase was detected among enterococci. It was present in all *E. faecalis* and *E. hirae*. This tyramine production is a common characteristic of enterococci isolates from cheese, which is considered a negative trait for the possible use of enterococci on food (Psoni *et al.*, 2006).

In conclusion, the enterococci populations from these Analucia farmhouse goat cheeses have a high genotypic diversity related to their source. In all of the cheeses, *E. devriesei* has been revealed as an important enterococcal species. The predominance of *E. devriesei* and *E. malodoratus* has never been reported in other cheeses. Only a small proportion of the enterococci (12.6%) produced enterocins, being *E. devriesei* the main bacteriocinogenic species. Moreover, our results have shown that the antimicrobial peptides EJ97, MR10 and AS-48 or related peptides are broadly distributed among enterococci. Most enterococci isolates have shown to be safe, except *E. hirae* and more specifically *E. faecalis* strains which showed some putative virulence traits. The species described for the first time in this study, which are free of virulence determinants, could be an interesting new strain source for cheese technology after a biotechnological characterisation.

5. REFERENCES.

- Aymerich, T., H. Holo, L.S. Havarstein, M. Hugas, M. Garriga and I.F. Nes.** 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1676-1682.
- Bauer, S., A. Tholen, J. Overmann and A. Brune.** 2000. Characterization of abundance and diversity of lactic acid bacteria in the hindgut of wood- and soil-feeding termites by molecular and culture-dependent techniques. *Arch. Microbiol.* **173**: 126-137.
- Ben Omar, N., A. Castro, R. Lucas, H. Abriouel, N.M.K. Yousif, C.M.A.P. Franz, W.H. Holzapfel, R. Pérez-Pulido, M. Martínez-Cañamero, and A. Gálvez.** 2004. Functional and Safety Aspects of Enterococci Isolated from Different Spanish Foods. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**: 118-130.
- Bonten, M.J.M., R. Willems and R.A. Weinstein.** 2001. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect. Dis.* **1**: 314-325.
- Centeno J.A., S. Menéndez, M. Hermida, and J.L. Rodríguez-Otero.** 1999. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* **48**: 97-111.
- Cintas, L.M., P. Casaus, C. Herranz, L.S. Håvarstein, H. Holo, P.E. Hernández and I.F. Nes.** 2000. Biochemical and Genetic Evidence that *Enterococcus faecium* L50 Produces Enterocins L50A and L50B, the *sec*-Dependent Enterocin P, and a Novel Bacteriocin Secreted without an N-Terminal Extension Termed Enterocin Q. *J. Bacteriol.* **182**: 6806-6814.
- Cintas, L.M., P. Casaus, H. Holo, P.E. Hernández, I.F. Nes and L.S. Havarstein.** 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* **180**: 1988-1994.
- Creti, R., M. Imperi, L. Bertuccini, F. Fabretti, G. Orefici, R. Di Rosa and L. Baldassarri.** 2004. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different Sources. *J. Med. Microbiol.* **53**: 13-20.

- De las Rivas, B., A. Marcobal and R. Muñoz.** 2005. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS Microbiol Lett.* **244**: 367-372.
- Devriese, L. A., B. Por, and Collins, M. D.** 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. App. Bacteriol.* **75**: 399-408.
- De Vuyst, L., M.R. Foulquié-Moreno and H. Revets.** 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* **84**: 299-318.
- Domig, K.J., H.K. Mayer, and W. Kneifel.** 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Phenotypic and genotypic criteria. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 165-188.
- Dupre, I., S. Zanetti, A.M. Schito, G. Fadda, and L.A. Sechi.** 2003. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J. Med. Microbiol.* **52**: 491-498.
- Du Toit, M., C.M.A.P. Franz, L.M.T. Dicks and W.H. Holzapfel.** 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 482-494.
- Eaton, T.J. and M.J. Gasson.** 2001. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1628-1635.
- Foulquie-Moreno, M.R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, and L. De Vuyst.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 1-24.
- Foulquie-Moreno, M.R., R. Callewaert, B. Devriese, J. Van Beeumen and L. De Vuyst.** 2003. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.* **94**: 214-229.
- Franz, C.M., A.B. Muscholl-Silberhorn, N.M. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings and W.H. Holzapfel.** 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4385-4389.
- Franz C.M., M.E. Stiles, K.H. Schleifer, and W.H. Holzapfel.** 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 105-122.

- Franz, C.M., M.J. van Belkum, W.H. Holzapfel, H. Abriouel and Antonio Gálvez.** 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**: 293-310.
- Franz, C.M., W. H. Holzapfel, and M.E. Stiles.** 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* **47**: 1-24.
- Gálvez, A, E. Valdivia, M. Maqueda, and E. Montoya.** 1985. Production of bacteriocin-like substances by group D streptococci of human origin. *Microbios.* **43**: 223-232.
- Giard J.C., J.M. Laplace, A. Rince, V. Pichereau, A. Benachour, C. Leboeuf, S. Flahaut, Y. Auffray, and A. Hartke.** 2001. The stress proteome of *Enterococcus faecalis*. *Electrophoresis.* **22**: 2947-2954.
- Giraffa, G.** 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 163-171.
- Giraffa G.** 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 215-222.
- Gratia, J., and P. Fredericq.** 1946. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol.* **93**: 1040-1041.
- Gutiérrez, J., R. Criado, A. Olivera, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, M.F. Fernández, L.M. Cintas and P.E. Hernández.** 2002. Cloning, production, secretion and purification of the bacteriocin enterocin P in *Escherichia coli*. International Symposium on Enterococci in Foods: Functional and Safety Aspects. Berlín. Abstract P.16.
- Hardie, J. M., and R.A. Whiley.** 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* **26**: 1S-11S.
- Harthug, S., A. Digranes, O. Hope, B.E. Kristiansen, A.G. Allum, and N. Langeland.** 2000. Vancomycin resistance emerging in a clonal outbreak caused by ampicillin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**: 19-28.
- Holzapfel, W.H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger, and J.H.J. Huis in't Veld.** 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 85– 101.
- Huycke, M.M., D.F. Sahn, and M.S. Gilmore.** 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* **4**: 239–249.
- Joosten, H.M., E. Rodríguez and M. Nuñez.** 1997. PCR detection of sequences similar to the AS-48 structural gene in bacteriocin-producing enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**: 40-42.

- Kayser, F.H.** 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 255-262.
- Klein, G.** 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 123-131.
- Leavis, H.L., M.J.M Bonten, and R.J.L. Willems.** 2006. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 454-460.
- Lemcke R, and M. Bülte.** 2000. Occurrence of the vancomycin-resistant genes *vanA*, *vanB*, *vanCl*, *vanC2* and *vanC3* in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork. *Int. J. Food Microbiol.* **60**: 185-194.
- Martin, B., M. Garriga, M. Hugas and T. Aymerich.** 2005. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* **98**: 1177-1190.
- Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Maqueda and M. Martínez-Bueno.** 2007. Fast, convenient and economical method for isolating genomic DNA from lactic-acid bacteria using a modification of the “protein salting-out” procedure. *Anal. Biochem.* **366**: 102-104.
- Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Maqueda and M. Martínez-Bueno.** 2008. Polyphasic approach to bacterial dynamics during the ripening of Spanish farmhouse cheese by culture-dependent and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 5662-5673.
- Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Maqueda and M. Martínez-Bueno.** Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' cheeses from Sierra de Aracena. Submitted.
- Martínez, M.I., E. Rodríguez, M. Medina, P.E. Hernández and J.M. Rodríguez.** 1998. Detection of specific bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 1099-1103.
- Martínez-Bueno, M., E. Valdivia, A. Gálvez, J. Coyette and M. Maqueda.** 1998. Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **27**: 347-58.
- Morrison, D., N. Woodford, and B. Cookson.** 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* **83**: 89S-99S.
- Muller, T., A. Ulrich, E.M. Ott, and M. Muller.** 2001. Identification of plant-associated enterococci. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 268-278.

- Murray, B. E.** 1990. The life and times of the *Enterococcus*. Clin. Microbiol. Rev. **3**: 46-65.
- Nes, I.F., D.B. Diep, and H. Holo.** 2007. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. J. Bacteriol. **189**: 1189-1198.
- Nes, I.F., and O. Johnsborg.** 2004. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. Curr. Opin. Biotechnol. **15**: 100-104.
- Ogier, J.C. and P. Serror.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. Int. J. Food Microbiol. **126**: 291-301.
- Oumer, B.A., P. Gaya, E. Fernandez-Garcia, R. Marciaca, S. Garde, M. Medina, and M. Nuñez.** 2001. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. J. Dairy Res. **68**: 117-129.
- Psoni, L., C. Kotzamanides, C. Andrighetto, A. Lombardi, N. Tzanetakis and E. Litopoulou-Tzanetaki.** 2006. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. Int. J. Food Microbiol. **109**: 109-120.
- Rodríguez, E., M.I. Martínez., M. Medina, P.E. Hernández and J.M. Rodríguez.** 1998. Detection of enterocin AS-48-producing dairy enterococci by dot-blot and colony hybridization. J. Dairy Res. **65**: 143-148.
- Sánchez-Hidalgo, M., M. Maqueda, A. Galvez, H. Abriouel, E. Valdivia and M. Martínez-Bueno.** 2003. The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 1633-1641.
- Sarantinopoulos, P., F. Leroy, E. Leontopoulou, M.D. Georgalaki, G. Kalantzopoulos, E. Tsakalidou and L. De Vuyst.** 2002a. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. Int. J. Food Microbiol. **72**: 125-136.
- Sarantinopoulos P., G. Kalantzopoulos, and E. Tsakalidou.** 2002b. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. Int. J. Food Microbiol. **76**: 93-105.
- Semedo, T., M. Almeida Santos, P. Martins, M.F. Silva Lopes, J.J. Figueiredo Marques, R. Tenreiro, and M.T. Barreto Crespo.** 2003. Comparative Study Using Type Strains and Clinical and Food Isolates To Examine Hemolytic

- Activity and Occurrence of the *cyl* Operon in Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2569-2576.
- Suzzi, G., M. Caruso, F. Gardini, A. Lombardi, L. Vannini, M.E. Guerzoni, C. Andrighetto and M.T. Lanorte.** 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *J. Appl. Microbiol.* **89**: 267-274.
- Svec, P., M. Vancanneyt, J. Koort, S.M. Naser, B. Hoste, E. Vihavainen, P. Vandamme, J. Swings, and J. Björkroth.** 2005. *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2479-2484.
- Tailliez, P., J. Tremblay, S.D. Ehrlich and A. Chopin.** 1998. Molecular diversity and relationship within *Lactococcus lactis*, as revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Syst. Appl. Microbiol.* **21**: 530-538.
- Ten Brink, B., C. Damink, H.M.L.J. Joosten, and J.H.J. Huis inát Veld, J.H.J.** 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **11**: 73-84.
- Teuber, M., L. Meile and F. Schwarz.** 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**: 115-137.
- Van Den Braak, N., E. Power, R. Anthony, H.P. Endtz, H.A. Verbrugh and A. Van Belkum.** 2000. Random amplification of polymorphic DNA versus pulsed field gel electrophoresis of *Sma*I DNA macrorestriction fragments for typing strains of vancomycin-resistant enterococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**: 45– 52.
- Vankerckhoven, V., T. Van Outgaerden, C. Vael, C. Lammens, S. Chapelle, R. Rossi, D. Jabes, and H. Goznes.** 2004. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa*I, *gel*E, *cyl*A, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 4473-4479.
- Ventura, M., and R. Zink.** 2002. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* **217**: 141-154.

CAPÍTULO VIII

Discusión general y Conclusiones

1. DISCUSIÓN.

La pluralidad geográfica y climática de España junto con la herencia cultural aportada por las diferentes civilizaciones que poblaron durante siglos la península Ibérica, han dado como resultado un exuberante patrimonio gastronómico que se refleja tanto en la gran variedad de procedimientos y técnicas utilizadas en la elaboración de los quesos, como en la rotunda personalidad de sabores, texturas y formas de los mismos. El sector quesero español se caracteriza por su gran variedad productiva. La producción nacional de quesos en 2006 alcanzó las 314.500 toneladas, con un incremento del 12,5% en los tres últimos años (Anónimo, Ministerio de Agricultura 2006). Este pequeño, pero continuo, crecimiento de la producción quesera española resulta significativo si se compara con el resto de países de la Unión Europea, cuya producción y consumo se mantiene prácticamente estacionados.

Atendiendo al tipo de leche utilizada, el queso de leche de vaca y los fabricados con mezclas de leches de vaca, oveja y cabra constituyen más del 80% del mercado actual, seguidos del de oveja con un 12,2% y por último el de cabra con un 5,4%. Hay que resaltar que a este último le corresponde el mayor crecimiento. España, a pesar de encontrarse muy por debajo de otros países europeos en volumen productivo (4% del total europeo) ocupa, sin embargo, el segundo lugar después de Francia, en cuanto a diversidad de productos (Anónimo, Ministerio de Agricultura 2006).

La industria quesera española la conforman un grupo bastante heterogéneo donde coexisten pequeñas y medianas empresas de carácter local y artesanal, junto a grandes industrias y grupos alimentarios altamente tecnificados. En 2002 el número de fábricas censadas era de 2.597. Sin embargo hay que señalar que tan solo una quinta parte de las mismas producen el 94,5% del volumen total, y únicamente las diez primeras mantienen producciones superiores a las 10.000 toneladas (Anónimo, Ministerio de Agricultura, 2006). Aproximadamente la mitad de la producción española corresponde a quesos de mezcla de carácter industrial, y se concentra principalmente en las Comunidades Autónomas de Castilla-La Mancha, Castilla-León, Cataluña, Asturias, Cantabria, Galicia y Andalucía. La producción artesanal paralela, con más o menos

renombre, se extiende por todo el territorio peninsular e insular, y se caracteriza por su enorme atomización. A pesar de tratarse de un segmento de producción limitada, su acusado carácter artesanal sigue actuando de agente transmisor y garante de la esencia cultural quesera española. Aunque en nuestro país, existen numerosas variedades de quesos asociados con este tipo de producción, sobretodo en los quesos elaborados con leche de cabra, hay pocos estudios relacionados con su bioquímica y microbiología (revisado por Freitas y Malcata, 2000). El conocimiento en profundidad de los microorganismos presentes en estos productos tradicionales va a ser un factor importante para su comercialización, en la cual son muy importantes las garantías sanitarias del producto además de constituir una valiosa fuente de nuevas cepas para la industria láctea.

Hasta ahora gran parte de los estudios relacionados con la microbiología de los quesos, se han basado en técnicas clásicas que implican la siembra y el recuento posterior en medios de cultivo de mayor o menor poder selectivo, y han estado dirigidos, principalmente, a la descripción de géneros o grupos microbianos previamente descritos como representativos de este hábitat (Giraffa, 2004). Ello ha limitado indudablemente los resultados y el hallazgo de otros microorganismos implicados, que previamente no habían sido referidos o eran de difícil cultivo. Las técnicas moleculares de análisis del ADN y ARN han supuesto un gran avance en la identificación y tipificación de microorganismos puesto que, en ocasiones, es posible identificarlos sin necesidad de aislarlos. Entre las limitaciones de estas técnicas están, entre otras, los problemas técnicos asociados con la extracción y purificación del ADN/ARN. Por ello, y para llevar a cabo con éxito esta tarea se requieren métodos que permitan obtener ADN de cierta calidad, sin excesiva fragmentación, libre de inhibidores, y que además, se adecue o refleje lo más fielmente posible, la comunidad objeto de estudio (Dahllöf, 2002). La extracción directa de ADN a partir del queso, presenta enormes dificultades, principalmente por el alto contenido en grasas y proteínas de la muestra, que exige separar los microorganismos de la matriz del queso. Entre los métodos más eficientes figuran aquellos que han estado basados en la extracción con fenol, CTAB, purificación con Chelex, los que incluyen agentes caotrópicos como el isocianato de guanidina o los que emplean kits comerciales (Ausubel *et al.*, 1987; Wallace, 1987; Boom *et al.*, 1990; Hill y Keasler, 1991; Wernars *et al.*, 1991; Giesendorf *et al.*, 1992; Nelson y Krawetz, 1992; Jones *et al.*, 1993; Bej *et al.*, 1994). Estos métodos, aunque resultan eficaces, pueden presentar algunos

inconvenientes derivados del empleo de compuestos orgánicos tóxicos como el fenol/cloroformo, bien porque en el análisis de muchas muestras sean excesivamente caros y/o engorrosos, o bien porque consumen mucho tiempo, e incluso porque el ADN que se obtiene está muy fragmentado. Por ello, hemos creído oportuno desarrollar un método de extracción y purificación de ADN que, en lo posible, elimine algunos de estos inconvenientes y que al mismo tiempo resulte eficaz para el estudio de las comunidades de bacterias lácticas presentes en los quesos. En este sentido, el método descrito en esta Memoria y designado como MSOP ha resultado ser uno de los más eficientes, sobre todo en cuanto a rapidez, economía y simplicidad en su aplicación (Martín-Platero *et al.*, 2007), pues evita en todo momento el uso de solventes orgánicos, como fenol y cloroformo, o sustancias tóxicas como el isocianato de guanidina. El procedimiento consta de un corto número de etapas muy sencillas:

- separación de las células de la matriz del queso,
- seguida de tratamiento de los microorganismos con lisozima y proteasas
- lo que favorece la lisis posterior en presencia de SDS,
- y finalmente, eliminación de las proteínas y restos celulares por precipitación de la muestra en presencia de alta concentración de sales.

En este procedimiento sólo se utilizan, además de reactivos comunes (tampón Tris-HCl, EDTA, acetato sódico, SDS), dos tubos de microcentrífuga por muestra analizada, lo que evita en parte el tedioso trabajo de transferir muestras continuamente de un tubo a otro. El ADN extraído presenta un índice de $A_{260/280} > 1,8$ y un tamaño comprendido entre 20-25 kpb estimado mediante electroforesis en gel de agarosa, lo que confirma su alto grado de pureza e integridad. Además, es susceptible de ser amplificado por PCR y manipulado con enzimas de restricción. Este método se ha empleado con éxito tanto en la extracción de ADN a partir de quesos como de cultivos microbianos, tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas, incluso se ha utilizado con éxito en la purificación de ADN de células eucariotas (hongos, plantas, protozoos) (resultados no presentados en esta Memoria). La calidad/cantidad del ADN extraído era similar o incluso superior al que se podría obtener con los diferentes kits comerciales con los que se ha comparado, tales como AquaPure Genomic DNA Isolation kit (BioRad), FastDNA Spin kit (Q-Biogene), DNA Isolation kit (Rafer), Perfect dDNA Blood kit (Eppendorf) o InstaGene Matrix (BioRad). Por todo ello, y para todos los análisis genómicos llevados a cabo en este trabajo, a excepción de los publicados en el capítulo IV de esta Memoria, las extracciones de ADN, tanto del queso

como de los microorganismos a caracterizar, se han realizado mediante el método MSOP (Martín-Platero *et al.*, 2007).

La segunda parte del trabajo, se ha centrado en la realización de un estudio polifásico de la microbiota de algunas variedades de quesos artesanales andaluces, como el queso Alberquilla (Alpujarra, Granada), la quesaila Arochena curada (Aracena, Huelva), la torta Arochena (Aracena, Huelva) y el queso Cueva de la Magahá (Jayena, Granada), combinando métodos dependientes e independientes de cultivo. En todos los casos se trataba de queso elaborados con leche cruda de cabra, tan sólo el queso de la Alberquilla, contenía además leche cruda de oveja. Se trata además, de quesos en cuya elaboración no se utilizan cultivos iniciadores, salvo el queso Cueva de la Magahá que si los llevaba (ref. EZAL MA-400, compuesto de una mezcla de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* y *S. thermophilus*). En este último queso se realizó un estudio de dinámica de la población bacteriana a lo largo del periodo de maduración, lo que nos ha permitido evaluar el impacto que tenía la microbiota no iniciadora en este proceso. En ningún caso existía conocimiento previo de la composición microbiológica de estos quesos.

Para abordar este estudio hemos seguido dos estrategias: la primera basada en una tipificación inicial de los aislados a partir de medios de cultivo generales y selectivos mediante RAPD, seguido de una identificación mediante análisis de la secuencia del gen responsable del ARNr 16S y PCR específicas; y la segunda basada en el análisis del ADNr 16S de la comunidad microbiana por electroforesis en gradiente temporal de temperatura (TTGE) y LH-PCR.

Los títulos microbianos de los quesos analizados en esta Memoria se situaron en torno a 10^7 - 10^9 UFC/g en el producto final listo para consumir, valores que son muy similares a los descritos por otros autores (revisado por Fox *et al.*, 1998). El título más bajo correspondió al queso Cueva de la Magahá y el más alto a la torta Arochena. Este título tan elevado de 10^9 UFC/g suele ser una característica diferencial de los quesos elaborados con leche cruda y sin el uso de cultivos iniciadores (Gaya *et al.*, 1999; Olarte *et al.*, 2000); en cambio el título más bajo, 10^7 UFC/g del queso Cueva de la Magahá, podría estar relacionado con el uso de los cultivos iniciadores, que producen una acidificación más rápida de la leche durante la etapa previa a la coagulación (Fox *et al.*, 2000). Es importante destacar, que en este último se obtuvieron niveles de casi un orden superior cuando el muestreo se realizó en la mitad del periodo de maduración.

A partir de los diferentes medios de cultivos utilizados para los recuentos, se aislaron un conjunto de cepas para su posterior identificación. Esta colección estaba inicialmente formada por un total de 711 cepas, de las cuales 206 procedían del queso Alberquilla, 160 de la quesaila Arochena, 120 de la torta Arochena y finalmente 225 del queso Cueva de la Magahá. Dado el alto número de cepas aisladas y para tratar de diferenciarlas, fue necesario recurrir a una técnica de tipificación como el RAPD, que ya ha sido utilizado con éxito en estudios de diversidad microbiana de derivados lácteos (Baruzzi, *et al.*, 2000; Fitzsimons *et al.*, 2001; Antonsson *et al.*, 2003; Andrighetto *et al.*, 2004; Østlie *et al.*, 2004). En nuestro caso, también esta técnica ha demostrado su eficacia a la hora de tipificar los aislados microbianos, permitiendo reducir significativamente el número de cepas a identificar, que pasaron las 711 cepas a 165 grupos (genotipos o grupos genómicos). De cada grupo genómico se identificó al menos un aislado mediante secuenciación parcial o total del gen ribosómico ARN 16S, confirmándose posteriormente la identidad del resto de los integrantes del grupo mediante tinción de Gram, prueba de la catalasa y PCR específica. El número de grupos genómicos obtenidos para cada especie ha sido variable y no siempre proporcional al número de aislados. Un ejemplo significativo a este respecto fue el de la población de enterococos; así, mientras que los 67 aislados de *E. faecalis* se agruparon en 10 genotipos, los 13 aislados de *E. malodoratus* lo hicieron en 7.

En todo caso, la técnica de RAPD ha puesto de manifiesto la existencia de la gran diversidad microbiana, tanto intraespecífica como interespecífica en todos los quesos analizados, resultados, por otra parte, altamente probables si tenemos en cuenta que se trata de procesos de fermentación que se suceden de forma espontánea, a expensas de los microorganismos presentes en la leche, en la maquinaria, utensilios y superficies de la fábrica, o incluso en el propio aire. Además, los genotipos encontrados en cada especie bacteriana eran exclusivos de cada variedad de queso analizado, aunque de forma minoritaria se detectaron perfiles comunes a varios quesos. Por ejemplo en los quesos de Aracena aparecieron 7 genotipos similares, lo cual parece lógico si se tiene en cuenta que son quesos elaborados en una misma región, en queserías muy próximas entre sí y con leches del mismo tipo de cabra (blanca serrana).

Con respecto a las proporciones de géneros y especies, se encontraron importantes diferencias, si bien siempre resultaron mayoritarias las poblaciones de BAL: >99 % en el queso de la Alberquilla, 94 % en la quesaila Arochena, 86 % en el queso Cueva de la Magahá, y por último 63 % en la torta Arochena. Las variaciones con

respecto a las proporciones totales de BAL también son frecuentes cuando se trata de quesos artesanales, a diferencia de aquellos elaborados de forma industrial, en los que tales oscilaciones suelen ser menores, al igual que su heterogeneidad en cuanto a especies (Beuvier *et al.*, 1997; Albenzio *et al.*, 2001; Fitzsimons *et al.*, 2001; Randazzo *et al.*, 2002; Antosson *et al.*, 2003; Marino *et al.*, 2003; Giraffa *et al.*, 2004; Østlie *et al.*, 2004; El-Baradei *et al.*, 2007).

De entre las BAL, los lactobacilos fueron el grupo de microorganismos más abundante en quesos duros como el Cueva de la Magahá y la Alberquilla, llegando a representar entre el 80 y 90 % respectivamente del total de la microbiota, siendo *Lb. paracasei* la especie más abundante (con porcentajes relativos en torno al 60 %). Hay que resaltar que *Lb. brevis*, especie heterofermentadora que suele aparecer con menor frecuencia en quesos, alcanzó una alta proporción en el queso Cueva de la Magahá (18,5 %) y niveles algo inferiores en el queso Alberquilla (6,2 %). Con respecto a *Lb. plantarum*, la situación fue inversa, siendo más abundante en el queso la Alberquilla (17,4 % en los aislamientos a partir de M17-glucosado) que en el Cueva de la Magahá, en el que sólo se pudo detectar mediante enriquecimiento en medio líquido del queso maduro. No obstante, hay que señalar que en el queso Cueva de la Magahá este lactobacilo fue mucho más abundante en las etapas tempranas de maduración del queso, en las que representaba el 34 y el 22 % de la comunidad microbiana a las 1 o 17 semanas de maduración, respectivamente. Por tanto, la ausencia de *Lb. plantarum* en el queso maduro, podría estar relacionado con el mayor tiempo de maduración en cámara del queso Cueva de la Magahá respecto al de la Alberquilla (8 meses frente a 6 de este último). Otras diferencias encontradas en la microbiota de estos quesos duros han sido las relacionadas con las poblaciones de lácticas no iniciadores (NSLAB) minoritarias, como *Lb. parabuchneri* (9,5 %), *Lb. rhamnosus* (1,3 %) y *Lb. coryniformis* (1,3 %), que han sido detectadas en el queso Cueva de la Magahá, pero están ausentes en la Alberquilla. Por último, cabe resaltar la escasa presencia de lactococos en estos dos tipos de quesos. De hecho, sólo aparecieron, en proporción minoritaria, en el queso Alberquilla (próximo al 4 % respecto de la microbiota total) o en una fracción muy baja (títulos de 10^4 UFC/g) en el queso Cueva de la Magahá, lo que dificultó el aislamiento en cultivo puro para su posterior caracterización y/o tipificación. Este último dato es más relevante aún por el hecho de que esta especie constituye una de las dos integrantes de los cultivos iniciadores implementados en la fabricación del queso Cueva de la Magahá. Olarte y colaboradores (2000) obtuvieron resultados similares en el queso

Cameros, donde los cultivos iniciadores empleados (principalmente representados por *Lc. lactis*) desaparecían completamente en el queso maduro.

Por el contrario, en los quesos de Aracena, los lactococos fueron los microorganismos más abundantes, estando representados en un 42% en la quesaila Arochena y en un 26,2% en la torta Arochena, mientras que la presencia de los lactobacilos fue algo inferior, 38,2% y 14,6% del total de la microbiota, respectivamente. En todos los casos, los lactococos pertenecían a la especie *Lc. lactis*, con cuatro y tres grupos genómicos respectivamente (dos de ellos comunes a ambos quesos). Entre los lactobacilos, las especies más abundantes fueron *Lb. paraplantarum* (13,9 %), *Lb. paracasei* (10,7 %) y *Lb. curvatus* (8 %) en la quesaila Arochena, y *Lb. plantarum* (9,7 %) en la torta Arochena. Los niveles tan bajos de *Lb. paracasei* en este último queso (3,9 %), podrían atribuirse al efecto antagonista ejercido por otras poblaciones mayoritarias como lactococos, enterococos y enterobacterias (Fox *et al.*, 2000). También es interesante destacar que no se detectaron especies de *Lb. brevis* en ninguno de estos dos quesos.

Por lo que respecta a la presencia de bacterias lácticas no iniciadoras (NSLAB), distintas de los lactobacilos y los lactococos, hay que resaltar que sólo fueron significativas en los quesos de Aracena y en el de la Alberquilla. De entre ellos cabe resaltar:

- Las especies del género *Enterococcus*, especialmente importantes en la torta Arochena (hasta el 20 % del total de la microbiota del queso), siendo *E. faecalis* la especie dominante con un 8,8 %, seguido de *E. devriesei*, *E. malodoratus* y *E. avium*, con niveles cercanos al 3,5 % cada una. Los enterococos tuvieron un porcentaje más bajo en el caso de la quesaila Arochena, con niveles próximos al 7 %, siendo *E. devriesei* y *E. malodoratus* las especies dominantes (3,6 % y 2,8 % respectivamente), y *E. faecalis* sólo tuvo un escaso 0,4 %. Por el contrario, los enterococos fueron una fracción minoritaria en el queso Alberquilla (0,1 %), con *E. faecium* como especie dominante. En el queso Cueva de la Magahá, los enterococos aislados en la primera semana en placas de medio KF con títulos de 10^4 UFC/g, sólo pudieron ser cuantificados en el queso maduro mediante enriquecimiento en caldo selectivo de Rothe. Este resultado podría ser atribuido al deficiente estado fisiológico de las células, motivado por el estrés que ocasionan las desfavorables condiciones físico-químicas y biológicas ambientales. De esta forma se explicaría la ausencia de crecimiento en medios sólidos y su crecimiento

en caldo Rothe, ya que los medios líquidos son más favorables para la recuperación de células debilitadas. Situaciones de estrés celular en enterococos ya han sido descritas en trabajos anteriores (Del Mar Lleò *et al.*, 2000). Por último, hay que señalar que la presencia de enterococos en alimentos en títulos elevados se ha relacionado con una probable contaminación fecal de la leche, ya sea en origen o producida durante el procesado del alimento, y, por tanto, estaría ligada a escasas condiciones higiénico-sanitarias (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006).

- Con respecto al género *Leuconostoc*, se obtuvieron porcentajes y niveles parecidos tanto en los quesos de Aracena como en el de Alberquilla, aunque las proporciones dependieron, en parte, de los medios de cultivo utilizados (MRS o M17-G). Así, llegaron a representar el 7,8 % en la quesaila Arochena, en la que se describieron tres especies (*Ln. mesenteroides*, *Ln. pseudomesenteroides* y *Ln. garlicum*); el 4,9 % en la torta Arochena (*Ln. pseudomesenteroides*) y hasta el 11% en el queso Alberquilla, también con dos especies, *Ln. mesenteroides* y *Ln. pseudomesenteroides*. Por último, se aislaron especies de *Vagococcus carnophilus* (1,8 %) en la torta Arochena y *Pediococcus urinaequi* en el queso Alberquilla. En relación con esta última especie, cabe resaltar que sólo se aislaron en medio MRS, en el que los pediococos llegaron a representar hasta el 29 % del total de los microorganismos aislados, aunque su presencia fue negativa en medio M17-G, incluso a pesar de que a partir de este medio se aislaron mayor número de colonias. Los pediococos se consideran microorganismos que aparecen de forma ocasional en quesos y representan una fracción minoritaria dentro de las NSLAB. No suelen ser fermentadores de lactosa, pero tienen la capacidad de oxidar el lactato y citrato hasta acetato y formato (Fox *et al.*, 2000). El número tan elevado que se ha encontrado en los aislamientos a partir de medio MRS pero no de M17, sugiere que podrían tener requerimientos de condiciones más ácidas para el crecimiento.

Como se ha comentado, las poblaciones de BAL son mayoritarias tanto en los quesos de elaboración artesanal como en los de elaboración industrial. Sin embargo, en los primeros, debe ser mencionada la alta presencia de microorganismos distintos a las BAL que podrían ser responsables de algunas de las características de interés asociadas a algunos de estos quesos (Freitas y Malcata, 2000; Johnson, 2001; Beresford *et al.*, 2001). De hecho, estas poblaciones parecen tener una especial importancia en algunos de los quesos aquí analizados, tal como es la torta Arochena, en la que llegaron a

representar hasta el 37% de la microbiota, aislandose microorganismos fermentadores facultativos del grupo de las enterobacterias (29,4 %), algunos gram negativos aerobios como *Pseudomonas putida* (3,7 %), y *Leucobacter aridicollis* (3,7 %) entre las gram positivas. En cuanto a las enterobacterias cabe resaltar la altas proporciones de *Serratia liquefaciens*, en niveles muy próximos (22,7%) a los de *Lc. lactis*, y en menor número *Se. grimesii* (2,25 %) y *Enterobacter intermedius* (4,5 %). En los otros quesos, hay que señalar los niveles relativamente altos encontrados de *Hafnia alvei* en la quesaila Arochena (2,8 %) y también la presencia de un microorganismo no fermentador inusual en quesos como *Brevundimonas vesicularis*. Otras especies se encontraron en órdenes inferiores 10^4 - 10^5 UFC/g (<0,1 %); entre ellas se encuentran *K. ornithinolytica* en los quesos de Aracena, o *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* y *Obesumbacterium proteus* en el queso Alberquilla. *Pseudomonas* sp. y probablemente *Brevundimonas*, ambas gram negativas aerobias, suelen ser los principales microorganismos psicrotrofos encontrados en la leche, y aunque son fácilmente inactivadas por tratamiento térmico, el hecho de que la materia prima utilizada haya sido leche cruda, podría explicar su presencia (Griffiths *et al.*, 1981).

Además de las enterobacterias, se encontraron en el queso Cueva de la Magahá, y en una proporción variable, diferentes especies de estafilococos como *Staphylococcus equorum* y *S. epidermidis* en (11,8 % del total de la microbiota). En cambio en la quesaila Arochena, los estafilococos sólo constituyeron una fracción minoritaria (<0,01 %) con dos especies asignadas, *S. sciuri* y *S. saprophyticus*. En lo que respecta a poblaciones distintas de las anteriores, cabe mencionar la presencia de micrococos (1%) y corinebacterias (0,5 %), ambos aislados del queso Cueva de la Magahá.

En relación con las cuantificaciones realizadas, conviene resaltar la falta de selectividad que han tenido algunos de los medios de cultivo, hecho que ya ha sido referido por otros autores y que en ocasiones podría derivar en la descripción de falsos positivos a la hora de realizar recuentos (Randazzo *et al.*, 2002; Callon *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2006). Entre los mejores ejemplos en este sentido están los medios Vogel-Johnson y Baird Parker (ambos selectivos para estafilococos), y de los cuales se aislaron poblaciones tan dispares como *Ln. pseudomesenteroides*, *K. ornithinolytica* y/o *Leucobacter aridicollis*.

En definitiva, la composición microbiana de los quesos estudiados se halla, en líneas generales, en concordancia con la de otros quesos de cabra del área mediterránea y de la Península Ibérica (Freitas y Malcata, 2000). Aunque las BAL son los principales

microorganismos implicados en la maduración de los quesos, y por lo tanto responsables en parte del sabor y aroma de los mismos (debido a su metabolismo fermentativo y sus capacidades proteolíticas y lipolíticas), la presencia de otros microorganismos distintos puede ser considerable (El Soda *et al.*, 2000; Smit *et al.*, 2005). Sin duda, es la presencia de enterobacterias el aspecto más problemático, y aunque también ha sido referida por otros autores y suele ser habitual en quesos de elaboración artesanal (Freitas y Malcata, 2000; Zago *et al.*, 2007), el alto número encontrado en algunos de ellos, puede constituir un potencial riesgo para la salud de los consumidores. Tradicionalmente se les ha considerado indicadores de contaminación fecal y, además, determinadas cepas, especialmente *E. coli* y *Salmonella*, han estado implicadas en infecciones e intoxicaciones alimentarias derivadas de su consumo (De Buyser *et al.*, 2001; Haeghebaert *et al.*, 2003; Verzoy-Rozand *et al.*, 2005). La legislación limita la presencia de *E. coli* a un máximo de 10^5 UFC/g y prescribe la ausencia de *Salmonella* en 25 g en el caso de los quesos elaborados con leche cruda (directiva CE 2073/2005). En este sentido y por lo que respecta a estas dos especies, los quesos estudiados se encuentran acordes con la legislación, puesto que los niveles de *E. coli* detectados en un único queso (Alberquilla), están por debajo de los permitidos (10^4 UFC/g). Sin embargo se han encontrado otras poblaciones de enterobacterias con títulos especialmente altos, como es el caso de *Se. liquefaciens* en la torta Arochena (10^9 UFC/g) o *H. alvei* en la quesaila Arochena (10^7 UFC/g). Algunos autores sugieren la implicación de poblaciones de enterobacterias en el desarrollo del sabor de ciertos quesos de elaboración artesanal debido al metabolismo del citrato y a sus actividades proteolíticas y lipolíticas (Marino *et al.*, 2003; Zago *et al.*, 2007), que conferirían al producto propiedades organolépticas deseables (Chávez-López *et al.*, 2006). Sin embargo, incluso considerando que deban estar presentes para mantener las cualidades del producto, habría que asegurarse de la ausencia de cepas patógenas, como O157:H7 en el caso de *E. coli*, e incluso examinar el potencial patógeno de las cepas presentes, en el caso de que existiera.

Hay que señalar la utilidad del RAPD para poner de manifiesto la gran heterogeneidad en cuanto a grupos genómicos que presentaron las distintas especies aisladas, grupos que en casi todos los casos fueron específicos de cada variedad de queso. Esta gran heterogeneidad es más patente en los quesos artesanales elaborados con leche cruda que en el caso de los fabricados a gran escala o de forma industrial, con leche pasteurizada y cultivos iniciadores (Fox *et al.*, 2000). En algunos casos, la mayor

variedad de grupos genómicos dentro de una especie, estuvo relacionada con la mayor proporción relativa de la misma. Tales son los casos de los quesos duros estudiados (Cueva de la Magahá o el de Alberquilla) en los que la especie mayoritaria fue *Lb. paracasei*, y en la que se describieron hasta 12 y 11 grupos distintos respectivamente y *Lb. brevis*, con 4 grupos genómicos en cada uno. También en los quesos de Aracena, en los que la proporción relativa más importante de microorganismos fueron los lactococos, aparecieron diferentes grupos genómicos en esta especie, 4 en la quesaila Arochena o 3 en la torta Arochena. Por otra parte, no todos los grupos genómicos estuvieron igualmente representados, de forma que algunos se podían encontrar en una proporción más elevada. Estas valoraciones son importantes puesto que gran parte de las características organolépticas de los quesos, están ligadas a la presencia de determinadas especies y sobre todo de determinadas cepas, lo que debe tenerse en cuenta a la hora de seleccionar cepas para ser utilizadas como cultivos adicionales, sobre la base de una serie de características fisiológicas y tecnológicas determinadas (Beresford *et al.*, 2001). No obstante, conviene resaltar que no siempre se encontró en nuestro estudio una relación directa entre la proporción de una especie determinada y la mayor o menor heterogeneidad genotípica. Uno de los mejores ejemplos en este sentido es el de la torta Arochena, en la que la técnica del RAPD sólo permitió establecer dos grupos genómicos en *Serratia liquefaciens*, enterobacteria mayoritaria en este queso (casi el 23 % de la población total). De igual forma en *E. faecalis* (otra de las especies más abundantes) sólo se pudo adscribir un grupo genómico, mientras que *E. malodoratus*, mucho menos abundante, se dividía en tres distintos. Estos resultados podrían atribuirse a varios factores: a que la propia técnica de RAPD sea incapaz de poner de manifiesto una presencia mayor de grupos para determinadas especies, o simplemente que sean esos los únicos grupos genómicos existentes. Por todo ello, sería conveniente tipificar algunos de estos grupos mediante herramientas alternativas, como la electroforesis en campo pulsante que podría complementar la información obtenida mediante el RAPD.

La estrategia de tipificación de cepas mediante RAPD, también nos ha permitido conocer a fondo la dinámica de las poblaciones microbianas que intervienen en la maduración del queso, en nuestro caso aplicado con éxito al queso Cueva de la Magahá. Este queso, como ya se ha referido, es de elaboración artesanal y está hecho con leche cruda de cabra empleando cultivos iniciadores (mezcla de *Lc. lactis* y *S. thermophilus*) y cuajo animal. Tiene un tiempo de maduración en cámara de alrededor de 8 meses en

condiciones estables de temperatura y humedad. En la primera fase de la fabricación, la leche es inoculada previamente con los cultivos iniciadores en las proporciones aconsejadas por el proveedor, incubándose a continuación a 37 °C. En esta etapa, los cultivos iniciadores alcanzan un título $> 10^9$ UFC/g durante las primeras horas (datos no presentados). Una vez producido el coágulo, se practica el corte y posterior prensado y moldeado del mismo, y entonces el queso se sumerge en una salmuera natural (25,6-28,3% NaCl) durante aproximadamente 24 h. Se completa la fabricación mediante maduración en cámara durante 8 meses, durante la cual los quesos son volteados a diario. Entre las funciones de los cultivos iniciadores está la acidificación rápida de la leche durante las primeras horas que favorece la posterior implantación de otras bacterias lácticas y la eliminación de posibles contaminantes, indeseables ó alterantes. Es interesante resaltar el comportamiento de *Lc. lactis* que alcanzó títulos de 10^9 UFC/g en el queso fresco recién prensado y salado (resultados no presentados en esta Memoria), pero a partir de este momento se redujo bruscamente su presencia, siendo, de hecho, indetectable en cualquiera de los tiempos posteriores de muestreo (1, 17 y 34 semanas). Durante la primera semana de maduración los cultivos iniciadores fueron reemplazados por otras bacterias lácticas, especialmente lactobacilos, existiendo además fracciones minoritarias de enterococos ($< 0,1$ %), representados por las especies *E. devriesei*, *E. hiraе*, *E. malodoratus* y *E. faecalis*. El desplazamiento de las poblaciones de los cultivos iniciadores (*Lc. lactis* y *S. thermophilus*) por el ulterior establecimiento de lactobacilos, es un fenómeno ya observado en otras fermentaciones lácticas y de forma particular en quesos de cabra elaborados con cultivos iniciadores (Olarte *et al.*, 2000; Johnson, 2001). En el caso del queso Cueva de la Magahá, la sustitución de la microbiota iniciadora por NSLAB fue un proceso muy rápido (< 7 días) en el que se implantaron tres especies mayoritarias, *Lb. brevis* (39 %), *Lb. plantarum* (34,1 %) y *Lb. paracasei* (25,8 %), y también de forma minoritaria *Lb. farciminis* (1 %). Conforme avanzó el periodo de maduración del queso, variaron tanto las proporciones de las especies como los grupos genómicos en los que estaban incluidas (Martín-Platero *et al.*, 2008):

- Así, las poblaciones de *Lb. paracasei*, se incrementaron progresivamente hasta llegar a ser el microorganismo mayoritario del queso maduro: 55,7 % del total de la población. Igualmente los grupos genómicos pasaron de 5 en la primera semana, hasta 12 en la semana 34.

- Las poblaciones de *Lb. brevis* se redujeron enormemente hasta representar sólo el 18,5 %, pasando de 8 a 3 grupos genómicos.
- Algunos grupos fueron incluso desapareciendo, como los de *Lb. plantarum* o *Lb. farciminis*. Sin embargo, hay que matizar que la no detección de estos microorganismos puede atribuirse, bien a que realmente hayan sido eliminados del queso o a que se encuentren en un estado de estrés fisiológico, viables pero no cultivables. Este último parece ser el caso de *Lb. plantarum*, cuyos títulos cayeron por debajo de las 10⁶ UFC/g de forma que sólo pudieron cuantificarse mediante enriquecimiento en caldo y posterior detección por PCR específica y/o TTGE (Martín-Platero *et al.*, 2008).
- También en esta sucesión de especies de lactobacilos aparecieron otras nuevas, como *Lb. parabuchneri* (9,5 %), *Lb. coryniformis* (1,3 %) o *Lb. rhamnosus* (1,3%), además de varios grupos de bacterias no lácticas, como estafilococos, micrococos y corinebacterias.

Por lo general, todas estas bacterias (NSLAB y no lácticas) suelen ser tolerantes a la sal, a los ácidos y son anaerobios facultativos, y por lo tanto pueden crecer y desarrollarse adecuadamente en el queso. Incluso se han descrito lactobacilos aislados del queso que pueden llegar a crecer en presencia de un 10% de NaCl (Fox *et al.*, 2000). La fuente de energía de estos microorganismos suele ser la fermentación de los carbohidratos aunque, en este queso, la concentración de lactosa es mínima pues ya ha sido utilizada previamente por los cultivos iniciadores. Se ha sugerido como posibles sustratos energéticos el citrato y los aminoácidos e incluso las moléculas de carbohidratos ligadas a las glucoproteínas de la leche (Fox *et al.*, 2000).

Quizás el aspecto más importante a destacar en esta dinámica de poblaciones haya sido la desaparición gradual de los cultivos iniciadores, sobre todo de *Lc. lactis*. Dicha desaparición se ha atribuido a la autólisis inducida durante los primeros momentos de la fermentación (por activación de la muramidasa intracelular), que permite la liberación de enzimas intracelulares (peptidasas) que, junto con la quimosina del cuajo hidrolizan la caseína hasta péptidos cortos y aminoácidos. Van a ser estas sustancias las que posteriormente utilizarán el resto de las BAL y que, por lo tanto, serán precursores de los sabores de los quesos (Fox *et al.*, 2000). La lisis puede estar ligada a diversos factores ambientales, como son el nivel de sal y la presencia de fagos (Fox *et al.*, 2000). Por lo que respecta a la tasa de sustitución de las especies, pueden intervenir también factores ambientales, como la temperatura y humedad relativa. Así,

en algunos quesos elaborados con leche pasteurizada y cultivos iniciadores y con temperatura de maduración baja, como es el caso del queso Cheddar, la proporción de NSLAB suele ser inicialmente baja y, por ello, la sustitución de la microbiota iniciadora por las NSLAB suele ser más lenta. En cambio, en aquellos quesos que utilizan una temperatura más elevada (14-18 °C en el queso Comté), tanto la proporción de NSLAB al inicio de la fermentación, como la velocidad de crecimiento de las mismas, suele ser más elevada (Fox *et al.*, 2000; Fitzsimons *et al.*, 2001), por lo que la desaparición gradual de los iniciadores se produce también de forma más rápida. En el caso del queso Cueva de la Magahá, la situación se asemeja más al segundo caso.

Finalmente, en lo que a la dinámica de poblaciones en el queso Cueva de la Magahá se refiere, hay que mencionar que no todos los genotipos estaban presentes en los tres muestreos, de forma que sólo 4 de ellos (dos pertenecientes a *Lb. brevis* y otros 2 de *Lb. paracasei*) persistieron a lo largo de todo el proceso de maduración. Esta circunstancia puede ser interesante a la hora de seleccionar cepas para ser utilizadas como cultivos iniciadores secundarios sobre la base de determinadas características tecnológicas concretas. Fitzsimons y colaboradores (2001), en un estudio sobre dinámica poblacional en quesos, también observaron altibajos en la sucesión de diferentes grupos genómicos durante la maduración que, dependiendo del momento del muestreo, aparecían o desaparecían.

Como segunda aproximación al estudio de la microbiota presente en los quesos, elegimos varias metodologías independientes de cultivo basadas en el análisis del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Una de estas estrategias fue la TTGE, que, básicamente, consiste en lo siguiente: extracción del ADN total del queso; amplificación por PCR de la región variable V3 del gen responsable del ARNr 16S; separación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis desnaturizante y con gradiente temporal de temperatura y por último extracción, secuenciación y análisis posterior de cada uno de los fragmentos obtenidos. Mediante esta técnica, se genera *a priori*, un perfil de la comunidad microbiana del ecosistema (Ogier *et al.*, 2002; Abriouel *et al.*, 2006; El-Baradei *et al.*, 2007), que comprende tanto los microorganismos cultivables, como los viables pero no cultivables e incluso los no viables.

Los resultados obtenidos con esta herramienta, nos han permitido generar la huella genética de cada uno de los quesos analizados. Hay que resaltar que difieren de los alcanzados por las técnicas de cultivo en los siguientes aspectos:

- Gran parte de los taxones mayoritarios de los quesos analizados por técnicas de cultivo, aparecieron también reflejados en el análisis por TTGE, si bien la intensidad de las bandas no estaba directamente relacionada con la abundancia de los mismos. En el queso Cueva de la Magahá, aparecieron 9 bandas correspondientes a 8 taxones distintos (*Lb. plantarum*, *S. equorum*, *Lb. coryneformis*, *Lb. curvatus*, *Lc. lactis*, *S. thermophilus* y *Lb. paracasei*); en el queso Alberquilla, 10 bandas y un total de 8 taxones (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Enterococcus*, *Lb. acidophilus*, un taxón no identificado correspondiente a un fijador de nitrógeno, *Lc. lactis*, *E. coli* y *Lb. paracasei*); en la quesaila Arochena aparecieron claramente 8 bandas, de las cuales una no pudo ser identificada, y el resto correspondieron a un total de 6 taxones diferentes (*Lb. plantarum*, *Ln. pseudomesenteroides*, *Lc. lactis*, *Mycoplasma agalactiae*, *Klebsiella ornithinolytica* y *Hafnia alvei*); y finalmente en la torta Arochena, se detectaron un total de 9 bandas correspondientes a 7 taxones (*Lb. plantarum*, *Se. liquefaciens*, *Ln. pseudomesenteroides*, *E. faecalis*, *K. ornithinolytica*, *Lc. lactis* y *Leucobacter*). La presencia en un perfil de TTGE de más bandas que taxones se justifica por el hecho de que determinadas especies tienen más de una copia distinta de ARNr 16S, tal es el caso de *Lb. plantarum* y *Se. liquefaciens* que aparecieron con dos, y también en algunos casos en *Lc. lactis*. Algunos de estos taxones, a pesar de que se detectaron de forma clara y nítida en los perfiles de TTGE, no fueron detectados por los métodos de cultivo. Los mejores ejemplos corresponden a *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lc. lactis* y *S. thermophilus* del queso Cueva de la Magahá; *Myc. agalactiae* de la quesaila Arochena y por último *Lb. acidophilus* y un taxón no identificado en el queso Alberquilla. Los resultados más sorprendentes fueron los hallados en el queso Cueva de la Magahá, sobre todo en lo que respecta a los taxones de *Lc. lactis* y *S. thermophilus*, microorganismos utilizados como cultivo iniciadores. Dada la alta intensidad de las bandas detectadas, este resultado vendría a apoyar la hipótesis anteriormente sugerida de la existencia de células en estado viable pero no cultivable, o bien de células no viables, y de las cuales evidentemente se puede obtener suficiente cantidad de ADN como para ser amplificado. Alternativamente, se podría considerar que el ADNr 16S de estos taxones sea más eficientemente amplificado, con lo cual la existencia de pequeñas poblaciones de estos microorganismos bastaría para lograr su detección

mediante PCR-TTGE. De hecho, las poblaciones de *Lc. lactis* en el queso maduro pudieron ser cuantificadas mediante enriquecimiento de las células del queso en los medios MRS y Rothe hasta un título de 10^4 UFC/g. Estas mismas explicaciones podrían ser aplicables a *Lb. plantarum* y *Lb. curvatus* en el queso Cueva de la Magahá.

- Otra de las grandes diferencias entre ambas metodologías ha sido la ausencia de numerosos taxones en los perfiles de TTGE o, en algún caso, su débil presencia (p.e. *E. malodoratus* en torta Arochena y *Lb. paracasei* en Cueva de la Magahá o quesaila Arochena, entre otros). Varios factores han sido referidos como responsables de la ausencia de bandas en los perfiles de TTGE, entre los que están la diferente eficacia de los métodos de extracción del ADN que puede variar según la matriz utilizada (Pérez-Pulido *et al.*, 2005; Abriouel *et al.*, 2006). También han sido descritos problemas asociados a la propia reacción de amplificación del ADN o a la competencia entre las dianas por los cebadores empleados (Heuer *et al.*, 1997). Concretamente, pudimos comprobar que la presencia de ADN de *Lc. lactis* o de *Lb. plantarum* interfería de manera importante en la amplificación del ADNr 16S de *Lb. paracasei* y por ello en su detección por TTGE, aún estando la presencia del ADN de esta última especie verificada con toda seguridad mediante amplificación por PCR específica (Martín-Platero *et al.*, enviado). Por tanto, se podría concluir que la intensidad de las bandas que aparecen en un perfil de TTGE no está relacionada con la mayor presencia del ADN del microorganismo en cuestión, ni tampoco con su mayor nivel poblacional, sino más bien con la eficacia a la hora de su amplificación (por las razones anteriormente expuestas). Por otra parte, existe una gran dificultad para detectar microorganismos que se encuentran en baja proporción, y en este sentido, la amplificación por PCR específica es una herramienta mucho más eficaz.

Algunas de las limitaciones que presenta el TTGE a la hora de detectar microorganismos concretos podrían quedar resueltas complementándola con otras técnicas, como enriquecimiento en medios generales y selectivos seguido de un análisis por PCR-TTGE y posterior confirmación por PCR específica. De esta forma, se lograría poner de manifiesto, aunque de manera semicuantitativa, microorganismos que de otra no se detectan (Martín-Platero *et al.*, 2008). Esta herramienta podría, en gran parte,

eliminar algunas de las carencias que llevan asociadas las técnicas independientes de cultivo.

Puesto que la amplificación del ADNr 16S de la comunidad evidenció algunos problemas en la detección de algunos de los microorganismos más representativos, se optó por utilizar una diana diferente para la PCR, el gen *rpoB* (Dahllöf *et al.*, 2000). Este gen, al igual que el ADNr 16S, está altamente conservado (con varios dominios variables) y es de distribución casi universal, por lo que es un buen candidato para ser utilizado en estudios de biodiversidad microbiana. Entre los principales inconvenientes, además de los problemas asociados a la propia reacción de amplificación, están el menor número de secuencias disponibles y la carencia de regiones *consensus* específicas de los diferentes taxones (Dahllöf *et al.*, 2000). En nuestro caso, este estudio se ha aplicado sólo a la quesaila y torta Arochenas y los resultados fueron menos interesantes que los obtenidos a partir de la amplificación del ADNr 16S. Así, mediante esta técnica sólo se pusieron de manifiesto 4 taxones en la quesaila Arochena, *Lb. curvatus*, *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* y *Leuconostoc lactis*, y dos en la torta Arochena, *Lc. lactis* y *Lb. plantarum*. Además, aparecieron numerosas bandas que no pudieron ser identificadas, probablemente por tratarse de heterodúplex o artefactos generados durante la amplificación. El resultado más sobresaliente fue la detección de dos taxones en la quesaila Arochena (*Lb. curvatus* y *Ln. lactis*), no detectados en los análisis del ADNr 16S. De ellos, *Ln. lactis*, tampoco pudo ser aislado empleando técnicas de cultivo.

En conjunto, podemos afirmar que ambas aproximaciones son complementarias y por lo tanto deberían de emplearse conjuntamente a la hora de hacer un estudio exhaustivo de la microbiota de un queso. Los resultados obtenidos han sido comparables a los de otros autores, entre ellos Ercolini y colaboradores (2001), que evaluaron la microbiota del queso Mozzarella encontrando microorganismos altamente representados (*E. faecalis*, *Lb. fermentum*), que, sin embargo, no aparecían en los perfiles de DDGE. También están los de Miambi y colaboradores (2003), Ben Omar y Ampe (2000), Ogier y colaboradores (2002) y Meroth y colaboradores (2003), quienes detectaron numerosos taxones de BAL que no habían podido ponerse de manifiesto por las técnicas de cultivo y sí mediante métodos independientes de cultivo.

En relación con los métodos independientes de cultivo para el estudio de la microbiota de quesos, debemos concluir que hemos diseñado una estrategia para evaluar las poblaciones mayoritarias de lactobacilos, que combina PCR y electroforesis capilar (LH-PCR). Este grupo de microorganismos, de acuerdo con nuestros resultados y los

obtenidos por otros autores, suele ser el predominante en muchos quesos y en otros constituye una fracción importante de la microbiota (Demarigny *et al.*, 1996; Fox *et al.*, 1998; Beresford *et al.*, 2001; Fitzsimons *et al.*, 2001). Específicamente, la reacción de PCR se basó en la utilización de dos cebadores específicos para el género *Lactobacillus* que anillan en el extremo 3' del ADNr 16S y en el extremo 5' de la región intergénica existente entre ADNr 16S y ADNr 23S. Puesto que esta región intergénica es enormemente variable, tanto en secuencia como en tamaño, es de suponer que pequeñas variaciones de los amplicones podrían ser detectadas mediante electroforesis capilar. Además, el área de los picos ofrece también información sobre la abundancia relativa de los mismos. Un análisis previo, realizado sobre lactobacilos de colección y sobre lactobacilos aislados en nuestro laboratorio, permitió establecer tres grandes grupos de fragmentos amplificados, según su tamaño:

- Grupo de *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus* y *Lb. delbrueckii*, con un tamaño de 207-208 pb.
- Grupo de *Lb. curvatus*, *Lb. coryneformis*, *Lb. acidophilus* y *Lb. sakei*, con un tamaño de 213-214 pb.
- Grupo de *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. brevis*, con un tamaño de 218 pb.

El análisis mediante LH-PCR de los ADNs purificados de las comunidades estudiadas, permitió detectar algunos de los principales grupos de lactobacilos mayoritarios en los quesos. En el queso Cueva de la Magahá, los dos picos mayoritarios correspondieron a 208 y 218 pb. El pico de 218 pb está justificado por la alta presencia en el queso del taxón *Lb. paracasei/Lb. brevis*, mientras que el de 208 sugiere que *Lb. plantarum* tendría una alta representación en el queso, como ya ha sido comentado anteriormente. El pico minoritario de 213 pb estaba así mismo justificado por la presencia de *Lb. curvatus* y *Lb. coryneformis*. Un perfil similar al anterior se obtuvo en el caso del queso Alberquilla, que, además, en este caso está en consonancia con los resultados obtenidos mediante TTGE y las técnicas de cultivo. En los dos quesos de Aracena estudiados se obtuvieron dos perfiles distintos de LH-PCR con dos picos mayoritarios (207 y 213 \pm 1) y uno minoritario (218 \pm 1) en la quesaila Arochena y tres picos (207, 213, y 218 \pm 1, con área decreciente) en la torta Arochena. El pico mayoritario de 207 bp, estaba en consonancia por la alta presencia de *Lb. plantarum/paraplantarum* en ambos quesos; el de 213 pb por el nivel alto de *Lb. curvatus* en la quesaila Arochena y/o de *Lb. coryneformis* en la torta Arochena. Por último el pequeño pico de 218 pb en ambos quesos, correspondía a *Lb. paracasei*, y era

ligeramente superior en la torta Arochena, acorde con la demostrada mayor presencia de esta especie en el queso.

La presencia del género *Enterococcus* en los quesos estudiados, ha merecido una especial atención por tratarse de uno de los grupos más controvertido dentro de las BAL y cuya presencia en alimentos despierta mayor recelo. En primer lugar, los enterococos constituyen una de las poblaciones de microorganismos que se aíslan con mayor frecuencia de quesos artesanales y de otros alimentos fermentados en el área mediterránea (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). En segundo lugar, los enterococos, dada su abundancia en el intestino y en las heces de animales de sangre caliente, han sido considerados clásicamente como indicadores de contaminación fecal, y, por lo tanto, de la higiene de los alimentos. A esto hay que sumar que algunas cepas de enterococos están dotadas de diversos caracteres hipotéticamente relacionados con la virulencia, que les convierten en potenciales patógenos oportunistas. (Eaton y Gason, 2001; Franz *et al.*, 2001; McBride *et al.*, 2007). Además, en las últimas décadas, han aparecido como importantes patógenos emergentes, responsables de infecciones nosocomiales (Giraffa, 2002) por lo que su presencia en los alimentos deba ser evaluada como un posible factor de riesgo para la salud humana (Franz *et al.*, 1999; 2003). En el lado opuesto, están los estudios que sugieren el papel “importante” que podrían ejercer en alimentos fermentados, contribuyendo en gran medida al desarrollo del aroma y el sabor de los quesos durante la maduración (Centeno *et al.*, 1999; Oumer *et al.*, 2001; Sarantinopoulos *et al.*, 2002b). Sin embargo debido a esta controversia, los enterococos, al contrario que otras BAL, no gozan aún del *status* GRAS (Ogier y Serror, 2008).

En nuestro estudio los enterococos han sido detectados a niveles variables en los quesos analizados, desde 10^4 UFC/g al comienzo de la maduración en el queso Cueva de la Magahá hasta 10^8 UFC/g en la torta Arochena. Entre las especies aisladas cabe destacar la alta presencia de *E. devriesei* en casi todos los quesos estudiados, junto con *E. faecalis* y *E. malodoratus*. La excepción fue el queso Alberquilla, en el que la mayoría de los enterococos pertenecían mayoritariamente a la especie *E. faecium*, y en menor proporción a *E. devriesei* (Abriouel *et al.*, 2008). Además de *E. faecium*, aparecieron de forma puntual otras especies como *E. hirae* en el queso Cueva de la Magahá o *E. avium* en la torta Arochena. Esta variabilidad, en cuanto al número y tipo de especies, también ha sido referida en otros quesos de elaboración artesanal, estando posiblemente asociadas a los periodos estacionales en los que se elaboran los quesos (Foulquié-Moreno, *et al.*, 2006). Sin duda el resultado más inesperado fue la alta

proporción de cepas de *E. devriesei* o de *E. malodoratus*, ya que la mayoría de los enterococos referidos hasta la fecha habían sido situados entre las especies *E. faecalis*, *E. faecium*, y *E. durans* (Giraffa, 2003; Ogier y Serror, 2008). Es probable que la alta presencia de estas dos especies esté en relación con la clase de leche utilizada, casi exclusivamente de cabra, siendo el queso Alberquilla la excepción (pues además contiene leche de oveja). Otra causa de que *E. devriesei* haya sido raramente referido como integrante de las poblaciones de enterococos en quesos puede ser su reciente definición como especie (Svec *et al.*, 2005). De cualquier forma es desconocido el papel (tecnológico/ biotecnológico) que desempeñan *E. devriesei* y *E. malodoratus* en los quesos, especialmente en el caso de *E. devriesei*, que al tratarse de un microorganismo de reciente descripción, sus hábitat primarios y demás características ecológicas no han sido aún documentados (Svec *et al.*, 2005).

Al igual que el resto de las BAL aisladas de los quesos, la tipificación mediante RAPD y, en este caso, también por ERIC-PCR, puso de manifiesto una amplia diversidad de grupos genómicos, especialmente en *E. malodoratus*. También aquí la mayoría de los establecidos fueron específicos del tipo de queso, aunque se encontraron algunos grupos comunes, principalmente en los quesos de Aracena.

Entre las características tecnológicas deseables en los enterococos, se encuentran su capacidad antagonista debida a la producción de sustancias inhibitoras, la ausencia de determinantes de virulencia y la no producción de aminas biógenas. Por ello, hemos evaluado la presencia de estas propiedades en los enterococos aislados. Entre la primera destaca la producción de bacteriocinas (enterocinas), sustancias antimicrobianas que pueden llegar a limitar el crecimiento de numerosas especies bacterianas, incluidas las propias BAL, microorganismos patógenos y otras especies de microorganismos alterantes de alimentos (Giraffa, 2003). En este sentido algunos enterococos productores de enterocinas han sido empleados con éxito como cultivos iniciadores en la fabricación de quesos (Sarantinopoulos *et al.*, 2002a). En este trabajo, hemos estudiado la capacidad de producir sustancias antimicrobianas frente a varios microorganismos indicadores en los distintos grupos genómicos de enterococos. Hay que destacar la baja frecuencia de cepas bacteriocinogénicas encontrada en nuestro estudio a diferencia de la referida por otros investigadores como De Vuyst y colaboradores (2003). La mayoría de los enterococos bacteriocinogénicos se aislaron de los quesos de Aracena (alrededor del 14%), lo cual era razonable, habida cuenta que en estos quesos es donde la población de enterococos fue más alta. Este carácter estuvo asociado preferentemente a cepas de *E.*

devriesei, un resultado interesante si se tiene en cuenta que aún no se ha descrito la producción de sustancias inhibidoras de tipo bacteriocina en esta especie, por lo que es posible que se traten de nuevos inhibidores. También mostraron actividad antibacteriana algunas cepas de *E. faecalis* y de *E. malodoratus*, aunque su espectro de acción era más reducido, siendo las primeras activas frente a *E. faecalis* S-47 y las segundas frente a *L. innocua* CECT 4030.

En un intento de aproximar el tipo de inhibidor producido por las diferentes cepas, se puso a punto un ensayo de “*macroarray*” o dot-blot con el fin de evaluar la presencia de genes estructurales responsables de la producción de enterocinas. No obstante, hay que tener en cuenta que la presencia del gen estructural de una bacteriocina no implica su producción en condiciones experimentales, y a esto hay que añadir que una cepa puede producir más de una enterocina (Cintas *et al.*, 2000; De Vuyst *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2003). En este ensayo, los ADNs purificados de las diferentes cepas se transfirieron a membranas de nylon mediante un aparato de microfiltración, y posteriormente se hibridaron con sondas específicas deducidas de los genes de bacteriocinas conocidas (Martínez *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 1998). De este modo pudimos verificar la ausencia de genes responsables de las enterocinas A, B y P entre las poblaciones de enterococos estudiadas. Los resultados más inesperados fueron los encontrados con las sondas de las enterocinas EJ97, MR10 (homóloga a la enterocina L50) y AS-48. Así, la derivada de la enterocina EJ97, hibridaba específicamente con numerosas cepas de *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. avium* y una cepa de *E. malodoratus*. De igual forma, las sondas derivadas de MR10 hibridaron ampliamente con cepas de *E. faecalis*. No obstante cuando se verificó, mediante PCR, la presencia de estos tres genes en las respectivas cepas, en todos los casos fue negativa. El análisis *in silico* del genoma de *E. faecalis* V583 (único genoma de enterococos disponible), puso de manifiesto la existencia de una proteína hipotética (EFA0015) similar en un 97% a EJ97, si bien no se ha comprobado que se trate de un compuesto antimicrobiano (Nes *et al.*, 2007). Algo similar podría ocurrir con MR10 y AS-48. Joosten y colaboradores (1997) ya refirieron una alta incidencia de cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* que albergaban secuencias similares a la de AS-48, si bien no es frecuente el aislamiento de cepas de enterococos productoras de esta enterocina.

El segundo aspecto relacionado con las propiedades tecnológicas de los enterococos es su potencial patógeno. A este respecto, los enterococos poseen caracteres de virulencia que no son fáciles de poner de manifiesto mediante métodos fenotípicos

convencionales, entre los que están las capacidades de adherencia a los tejidos del hospedador, de invasión y formación de abscesos, de modulación de la respuesta inmune del hospedador y la producción y secreción de diferentes productos tóxicos (Murray, 1990; Morrison *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 1999; Kayser, 2003; McBride *et al.*, 2007). La presencia de estos determinantes de virulencia parece estar limitada a cepas de *E. faecalis* y, en menor medida de *E. faecium*. Los efectos negativos sobre el hospedador han sido demostrados tanto *in vivo* en modelos animales como *in vitro* en cultivos celulares (Olmsted *et al.*, 1994; Cox y Gilmore, 2007).

El estudio de la presencia de determinantes de virulencia en los enterococos aislados en este estudio ha confirmado que sólo las cepas de *E. faecalis*, y en mucho menor número las de *E. faecium*, poseían algunos de ellos. En el resto de especies no se detectó ningún factor de virulencia. En cuanto a *E. faecium*, tan sólo dos cepas del queso Alberquilla portaban el antígeno de la endocarditis (EfaA). La presencia de este antígeno pudo ponerse de manifiesto también en el ADN directamente purificado del queso (Abriouel *et al.*, 2008). En el caso de *E. faecalis*, los determinantes *gelE*, *esp*, *asa1* y *efaA* fueron los que con más frecuencia aparecieron, lo que está de acuerdo, con ligeras diferencias, con los expuesto en trabajos similares previos (Creti *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005). Así, mientras que sólo el 27,8 % de nuestros *E. faecalis* dieron positivos para la adhesina del colágeno (Ace) Creti y colaboradores (2004) encontraron un 100 % de cepas de *E. faecalis* positivas para este carácter. También es importante resaltar que, al igual que en el estudio de Eaton y Gasson (2001), casi todas las cepas de *E. faecalis* portaban tres o más factores de virulencia, si bien no hemos encontrado un patrón de agrupación entre los diferentes factores de virulencia estudiados. Un aspecto destacable en cuanto a la seguridad de los enterococos objeto de estudio, ha sido la falta de resistencia a vancomicina, ya que ninguna cepa portaba los operones transmisibles *vanA* y *vanB*, cuya presencia es de especial importancia que sea evaluada en los enterococos de grado alimentario (Klein, 2003).

Para recompletar la valoración de la seguridad de los enterococos, se ha estudiado la capacidad de producir aminas biógenas por medio del rastreo de los genes responsables de las amin Descarboxilasas más relevantes. Los principales aminoácidos implicados en las intoxicaciones por aminas biógenas son la tirosina (que genera tiramina), histidina (genera histamina), lisina (responsable de la cadaverina) y ornitina (de la putrescina). La producción de estas aminas por descarboxilación de aminoácidos, supone un riesgo en los alimentos ya que pueden ser responsables de intoxicaciones

ligadas a su consumo (Ten Brick *et al.*, 1990), provocando diversos síntomas como cefaleas, vómitos, aumento de la presión arterial, reacciones alérgicas, etc. No obstante, es necesario tener en cuenta que no siempre la producción de este tipo de sustancias está ligada a la existencia de enterococos (Giraffa, 2002), puesto que otras BAL pueden también producirlas, pudiendo incluso ser de origen endógeno (en el propio alimento). En nuestro caso, sólo los grupos genómicos de las especies de *E. faecalis* y *E. hirae* portaban el gen responsable de la tirosina descarboxilasa con producción de tiramina, considerada una propiedad indeseable en cepas de enterococos que se pretendan aplicar a alimentos (Psoni *et al.*, 2006). En el resto de grupos y especies los resultados fueron negativos para la tiramina, histamina y putrescina. Por lo tanto, cabría afirmar que, a excepción de las cepas de *E. faecalis*, el resto de especies de enterococos aisladas podrían considerarse seguras en cuanto a la producción de este tipo de compuestos.

Para finalizar, podemos afirmar que los resultados presentados en esta Memoria arrojan datos importantes sobre la diversidad microbiana de 4 quesos de cabra andaluces de elaboración artesanal. Hemos generado un banco de cepas, representado principalmente por bacterias lácticas, que podría constituir una buena base para realizar posteriores estudios biotecnológicos, enfocados a su aplicación en la industria láctica. El desarrollo de fermentos, que puedan ser utilizados como cultivos iniciadores primarios o cultivos secundarios, sobre la base de sus propiedades tecnológicas, funcionales e incluso probióticas, podría ser una alternativa interesante a la hora de obtener productos fermentados que, sin perder las cualidades sensoriales de interés, sean más homogéneos y mejorados en sus cualidades higiénico-sanitarias. Además el disponer de estas cepas también puede posibilitar la obtención de nuevos productos con propiedades organolépticas determinadas.

2. CONCLUSIONES.

En función de los precedentes bibliográficos y de los resultados obtenidos en la presente Memoria, se extraen las siguientes conclusiones:

1. El método de extracción y purificación de ADN genómico desarrollado (MSOP) es de gran simplicidad, rapidez y reproducibilidad, y de gran utilidad para el aislamiento de ADN de las cepas aisladas y de las comunidades microbianas de los quesos, con un rendimiento similar o superior al obtenido por diferentes sistemas comerciales.
2. Las bacterias del ácido láctico constituyen la microbiota predominante en los 4 quesos andaluces estudiados, entre las que *Lactobacillus* o *Lactococcus* son los géneros mayoritarios. Las especies *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* y *Lb. curvatus* son las más abundantes entre los lactobacilos y *Lc. lactis* la más abundante entre los lactococos. Además, las enterobacterias están altamente representadas en la torta Arochena.
3. La técnica de RAPD-PCR es una herramienta eficaz para la tipificación de las bacterias presentes en el queso. Su aplicación muestra la gran diversidad intraespecífica de estas bacterias y la especificidad de la mayoría de los grupos genómicos para cada queso. Además, permite seguir la dinámica poblacional a lo largo de la maduración del queso.
4. En el queso Cueva de la Magahá, elaborado con leche cruda, las bacterias lácticas no iniciadoras son las mayoritarias desde la primera semana de maduración a pesar de estar elaborado con cultivos iniciadores.
5. Además de los microorganismos mayoritarios, mediante PCR-TTGE del ADN de la comunidad se pueden identificar microorganismos que no se aíslan en cultivo, si bien este método no permite la detección de algunas de las poblaciones mejor representadas. Estas limitaciones se corrigen, en parte, con la combinación de PCR-TTGE y el enriquecimiento en cultivos líquidos.
6. Los resultados de TTGE varían en función de los genes diana y de los cebadores empleados en la PCR. Así, comparando los genes ADNr 16S y *rpoB* empleados en este estudio, se concluye que el ADNr 16S permite obtener mayor biodiversidad.

7. La LH-PCR de la región intergénica de los genes ADN_r 16S y 23S es una herramienta muy eficaz para evaluar las distintas poblaciones del género *Lactobacillus* dentro de una comunidad microbiana.
8. Los enterococos son especialmente abundantes en los quesos de Aracena, estando representados por las especies *E. devriesei*, *E. faecalis*, *E. malodoratus* y *E. avium*.
9. La producción de bacteriocinas es poco frecuente entre los enterococos aislados, siendo *E. devriesei* la principal especie productora. Los genes de virulencia más frecuentes son *gelE*, *esp*, *asa1* y *efaA*, portados sobre todo por *E. faecalis*. En ningún caso se encontraron los genes de resistencia a la vancomicina. Respecto a la producción de aminos biógenas, sólo las especies *E. faecalis* y *E. hirae* presentan el gen responsable de la producción de tiramina.
10. Los métodos dependientes e independientes de cultivo son complementarios entre sí. Cada uno de ellos proporciona distinta sensibilidad en el estudio de las comunidades microbianas y en la detección de microorganismos particulares. Por tanto, en cada caso será necesario valorar el método o combinación de métodos a aplicar.

3. BIBLIOGRAFÍA.

- Abriouel, H., A.M. Martín-Platero, M. Maqueda, E. Valdivia y M. Martínez-Bueno M.** 2008. Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* **127**: 200-208.
- Abriouel, H., N. Ben Omar, R. Lucas, M. Martínez-Cañamero, S. Keleke, y A. Gálvez.** 2006. Culture-independent analysis of the microbial composition of the African traditional fermented foods poto poto and dégué by using three different DNA extraction methods. *Int. J. Food Microbiol.* **111**: 228-233.
- Albenzio, M., M.R. Corbo, S.U. Rehman, P.F. Fox, M. De Angelis, A. Corsetti, A. Sevi, y M. Gobetti.** 2001. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk, or by heating the curd in hot whey. *Int. J. Food Microbiol.* **67**: 35-48.
- Andrighetto, C., G. Marcazzan y A. Lombardi.** 2004. Use of RAPD-PCR and TTGE for the evaluation of biodiversity of whey cultures for Grana Padano cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**: 400-405.
- Antonsson, M., G. Molin e Y. Ardö.** 2003. *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. *Int. J. Food Microbiol.* **85**: 159-169.
- Anónimo.** 1996. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith y K. Struhl.** 1987. *Current Protocols in Molecular Biology* vol. 1 y 2. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- Baruzzi, F., M. Morea, A. Matarante y P.S. Cocconcelli.** 2000. Changes in the *Lactobacillus* community during Ricotta forte cheese natural fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **89**: 807-814.
- Bej, A.K., M.H. Mahbubani, M.J. Boyce y R.M. Atlas.** 1994. Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 368-373.
- Ben Omar, N., y F. Ampe.** 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3664-3673.

- Beresford, T.P., N.A. Fitzsimons, N.L. Brennan y T.M. Cogan.** 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* **11**: 259-274.
- Beuvier, E., K. Berthaud, S. Cegarra, A. Dasen, S. Pochet, S. Buchin, y G. Duboz.** 1997. Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasturized or microfiltered milk. *Int. Dairy J.* **7**: 311-323.
- Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-van Dillen y J. van der Nordaa.** 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 495-503.
- Callon, C., L. Millet y M.C. Montel.** 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J. Dairy Res.* **71**: 231-244.
- Centeno J.A., S. Menéndez, M. Hermida, y J.L. Rodríguez-Otero.** 1999. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* **48**: 97-111.
- Chaves-López, C., M. De Angelis, M. Martuscelli, A. Serio, A. Paparella y G. Suzzi.** 2006. Characterization of the Enterobacteriaceae isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *J. Appl. Microbiol.* **101**: 353-360.
- Cintas, L.M., P. Casaus, C. Herranz, L.S. Håvarstein, H. Holo, P.E. Hernández y I.F. Nes.** 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* **182**: 6806-6814.
- Cox, C.R. y M.S. Gilmore.** 2007. Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. *Infect Immun.* **75**: 1565-1576.
- Creti, R., M. Imperi, L. Bertuccini, F. Fabretti, G. Orefici, R. Di Rosa y L. Baldassarri.** 2004. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J. Med. Microbiol.* **53**: 13-20.
- Dahllöf, I.** 2002. Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr. Opin. Biotech.* **13**: 213-217.
- Dahllöf, I., H. Baillie, and S. Kjelleberg.** 2000. *rpoB*-Based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3376-3380.

- De Buyser, M.L., B. Dufour, M. Maire y V. Lafarge.** 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* **67:** 1-17.
- Del Mar Lleò, M., S. Pierobon, M. C. Tafi, C. Signoretto, and P. Canepari.** 2000. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:** 4564-4567.
- Demarigny Y., E. Beuvier, A. Dasen y G. Duboz.** 1996. Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. I. Evolution of microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative lactobacilli. *Lait* **76:** 371-387.
- De Vuyst, L., M.R. Foulquié-Moreno y H. Revets.** 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* **84:** 299-318.
- Eaton, T.J. y M.J. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and edical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67:** 1628-1635.
- El-Baradei, G., A. Delacroix-Buchet y J.C. Ogier.** 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional egyptian Domiati cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **73:** 1248-1255.
- Ercolini, D., G. Moschetti, G. Blaiotta, y S. Coppola.** 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of “culture dependent” and “culture independent” approaches. *Syst. Appl. Microbiol.* **24:** 610-617.
- El Soda, M., S.A. Madkor y P.S. Tong.** 2000. Adjunct cultures: recent developments and potential significance to the cheese industry. *J. Dairy Sci.* **83:** 609-619.
- Fitzsimons, N.A., T.M. Cogan, S. Condon y T. Beresford.** 2001. Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *J. Appl. Microbiol.* **90:** 600-608.
- Foulquié-Moreno, M.R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, y L. De Vuyst.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106:** 1-24.

- Foulquie-Moreno, M.R., R. Callewaert, B. Devreese, J. Van Beeumen y L. De Vuyst.** 2003. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.* **94**: 214-229.
- Fox, P.F., T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P. L.M. Mc Sweeney.** 2000. Microbiology of cheese ripening (capítulo 10; pag. 206-235). En: *Fundamentals of cheese science*. P.F.Fox et al. (eds.), Aspen Publishers, USA
- Fox, P.F., P.L.H. Mc Sweeney y C.M. Lynch.** 1998. Significance on nonstarter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* **53**: 83-89.
- Franz, C.M., W. H. Holzapfel, y M.E. Stiles.** 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* **47**: 1-24.
- Franz, C.M., I. Spech, P. Haberer y W. H. Holzapfel.** 2001. Bile salt hidrolase activity of enterococci isolated from foods: screening and quantitative determinations. *J. Food Prot.* **64**: 725-729.
- Franz, C.M., M.E. Stiles, K.H. Schleifer y W. H. Holzapfel.** 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Fodd Microbiol.* **88**: 105-122.
- Freitas, C. y F.X. Malcata.** 2000. Microbiology and biochemistry of cheeses with appellation d'origine protegée and manufactured in the Iberian peninsula from ovine and caprine milks. *J. Dairy Sci.* **83**: 584-602.
- Gaya, P., M. Babín, M. Medina y M. Nuñez.** 1999. Diversity among lactococci isolated from ewes' raw milk and cheese. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 849-855.
- Giesendorf, B.A.J., W.G.V. Quint, M.H.C. Henkens, H. Stegeman, F.A. Huf y H.G.M Niesters.** 1992. Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. in chicken products by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbio.* **58**: 3804-3808.
- Giraffa, G.** 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 163-171.
- Giraffa, G.** 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 215-222.
- Giraffa, G.** 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 251-260.
- Griffiths M.W., J.D.Phillips, y D.D. Muir.** 1981. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J. Appl. Bacteriol.* **50**: 289-303.
- Haeghebaert, S., P. Sulem, L. Deroudille, E. Vanneroy-Adenot, O. Bagnis, P. Bouvet, F. Grimont, A. Brisabois, F. Le Querrec, C. Hervy, E. Espié, H. de**

- Valk y V. Vaillant.** 2003. Two outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 8 linked to the consumption of Cantal cheese made with raw milk, France, 2001. *Eurosurveillance* **8**: 151-156.
- Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla, y E.M.H. Wellington.** 1997. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3233–3241.
- Hill, W.E. y S.P. Keasler.** 1991. Identification of foodborne pathogens by nucleic acid hybridization. *Int. J. Food Microbiol.* **12**: 67-76.
- Johnson, M.E.** 2001. Cheese products. En *Applied Dairy Microbiology* (E.H. Marth and J.L. Steele, eds.; 2ª edición). Marcel Dekker, Inc. 270 Madison Avenue, New York, NY 10016; pag. 345-384.
- Jones, D.D., R. Law y A.K. Bej.** 1993. Detection of *Salmonella* spp. in oysters using polymerase chain reactions (PCR) and gene probes. *J. Food Sci.* **58**: 1191-1197.
- Joosten, H.M., E. Rodríguez y M. Nuñez.** 1997. PCR detection of sequences similar to the AS-48 structural gene in bacteriocin-producing enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**: 40-42.
- Kayser, F.H.** 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 255-262.
- Klein, G.** 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 123-131.
- Marino, M., M. Maifreni y G. Rondinini.** 2003. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **229**: 133-140.
- Martin, B., M. Garriga, M. Hugas y T. Aymerich.** 2005. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* **98**: 1177-1190.
- Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Maqueda y M. Martínez-Bueno.** 2007. Fast, convenient and economical method for isolating genomic DNA from lactic-acid bacteria using a modification of the “protein salting-out” procedure. *Anal. Biochem.* **366**: 102-104.
- Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Maqueda y M. Martínez-Bueno.** 2008. Polyphasic approach to bacterial dynamics during the ripening of Spanish

- farmhouse cheese by culture-dependent and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 5662-5673.
- Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Maqueda y M. Martínez-Bueno.** Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' cheeses from Sierra de Aracena. Enviado.
- Martínez, M.I., E. Rodríguez, M. Medina, P.E. Hernández y J.M. Rodríguez.** 1998. Detection of specific bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 1099-1103.
- McBride, S.M., V.A. Fischetti, D.J. Leblanc, R.C. Jr. Moellering, y M.S. Gilmore.** 2007. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS ONE.* **7**: e582, 1-22.
- Meroth, C.B., J. Walter, C. Hertel, M.J. Brandt, y W.P. Hammes.** 2003. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 475-482.
- Miambi, E., J.P. Guyot, y F. Ampe.** 2003. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* **82**: 111-120.
- Morrison, D., N. Woodford. Y B. Cookson.** 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* **83**: 89S-99S.
- Murray, B.E.** 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 46-65. **Nes, I.F., D.B. Diep, y H. Holo.** 2007. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* **189**: 1189-1198.
- Nelson, J.E. y S.A. Krawetz.** 1992. Purification of cloned and genomic DNA by guanidine thiocyanate/isobutyl alcohol fractionation. *Anal. Biochem.* **207**: 197-201.
- Nes, I.F., D.B. Diep, y H. Holo.** 2007. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* **189**: 1189-1198.
- Ogier, J.C., O. Son, A. Gruss, P. Tailliez, y A. Delacroix-Buchet.** 2002. Identification of the Bacterial Microflora in Dairy Products by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3691-3701.
- Ogier, J.C. y P. Serror.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**: 291-301.

- Olarte, C., S. Sanz, E. Gonzalez-Fandos y P. Torre.** 2000. The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goat's cheese (Cameros cheese). *J. Appl. Microbiol.* **88**: 421-429.
- Olmsted, S.B., G.M. Dunny, S.L. Ellandsen y C.L. Wells.** 1994. A plasmid-encoded surfaced protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **170**: 1549-1556.
- Østlie, H.M., L. Eliassen, A. Florvaag y S. Skeie.** 2004. Phenotypic and PCR-based characterization of the microflora in Norvegia cheese during ripening. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 287-299.
- Oumer, B.A., P. Gaya, E. Fernandez-Garcia, R. Marciaca, S. Garde, M. Medina, y M. Nuñez.** 2001. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *J. Dairy Res.* **68**: 117-129.
- Pérez-Pulido, R., N. Ben Omar, H. Abriouel, R. Lucas-López, M. Martínez-Cañamero, y A. Gálvez.** 2005. Microbiological study of lactic acid fermentation of caper berries by molecular and culture-dependent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** : 7872-7879.
- Psoni, L., C. Kotzamanides, C. Andrighetto, A. Lombardi, N. Tzanetakis y E. Litopoulou-Tzanetaki.** 2006. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **109**: 109-120.
- Randazzo, C.L., S. Torriani, A.D.L. Akkermans, W.M. de Vos y E.E. Vaughan.** 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16s rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1882-1892.
- Rodríguez, E., M.I. Martínez., M. Medina, P.E. Hernández y J.M. Rodríguez.** 1998. Detection of enterocin AS-48-producing dairy enterococci by dot-blot and colony hybridization. *J. Dairy Res.* **65**: 143-148.
- Sánchez, I., S. Seseña, J.M. Poveda, L. Cabezas y L. Palop.** 2006. Genetic diversity, dynamics, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **107**: 265-273.
- Sarantinopoulos, P., F. Leroy, E. Leontopoulou, M.D. Georgalaki, G. Kalantzopoulos, E. Tsakalidou y L. De Vuyst.** 2002a. Bacteriocin production by

- Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *Int. J. Food Microbiol.* **72**: 125-136.
- Sarantinopoulos P., G. Kalantzopoulos, y E. Tsakalidou.** 2002b. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **76**: 93-105.
- Smit, G., B.A. Smit y W.J.M. Engels.** 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 591-610.
- Svec, P., M. Vancanneyt, J. Koort, S.M. Naser, B. Hoste, E. Vihavainen, P. Vandamme, J. Swings, y J. Björkroth.** 2005. *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2479-2484.
- Ten Brick B., C. Damink, H.M.L.J. Joosten y J.H.J. Huis in't Veld.** 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **11**: 73-84.
- Vernozy-Rozand, C., C. Mazuy-Cruchaudet, C. Bavai, M.P. Montet, V. Bonin, A. Dernburg e Y. Richard.** 2005. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **105**: 83-88.
- Wallace, D.M.** 1987. Large- and small-scale phenol extractions. *Meth. Enzymol.* **152**: 33-48.
- Wernars, K., C.J. Heuvelman, T. Chakraborty y S.H.W. Notermans.** 1991. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *J. Appl. Microbiol.* **59**: 2161-2165.
- Zago, M., B. Bonvini, A.M. Martín-Platero, G. Mucchetti, D. Carminati y G. Giraffa.** 2007. Characterisation of *Escherichia coli* isolated from raw milk cheeses. *Ann. Microbiol.* **57**: 49-54.

