



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

División de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DE LA DIETA COMPLEMENTADA CON NOPAL EN
VACAS LECHERAS SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE LA
LECHE Y QUESO FRESCO**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA
EN DESARROLLO
TECNOLÓGICO EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL**

QUE PRESENTA:

MVZ LAURA MELISSA HUERTA MARTÍNEZ

ASESORA: DRA. ROSA ELENA PÉREZ SÁNCHEZ*

CO-ASESOR: DR. JUAN JOSÉ VALDEZ ALARCÓN

Morelia, Michoacán diciembre de 2016



DEDICATORIA

A mi hija Valentina Robles Huerta, eres mi motor, motivación y le das sentido a mi vida.

Te dedico mi vida entera.

A mis padres Alejandro Huerta y Maricela Martínez, por darme la vida, por su apoyo incondicional y por siempre dar lo mejor de sí en pro de mi formación personal y profesional.

A mi esposo Adrian Robles Solorio, por caminar a mi lado y recordarme cada día lo mucho que vale la pena luchar. Por ser mi compañero de vida y apoyarme en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores Dra Rosa Elena Pérez Sánchez y Dr Juan José Valdez Alarcón, por toda la sabiduría compartida y ser un ejemplo profesional.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología UMSNH, por ser mis segundos hogares y permitirme formarme profesionalmente.

A la Facultad de Agrobología Presidente Juárez, UMSNH por permitirme realizar parte de mi trabajo experimental en sus instalaciones.

A CONACYT por el apoyo económico para poder realizar este trabajo y obtener mi grado.

NOMBRE: LAURA MELISSA HUERTA MARTÍNEZ

CURP: HUML851010MBSRRR08

NACIONALIDAD: MEXICANA



DOMICILIO: SAN LUIS POTOSÍ # 26, COLONIA AMPLIACIÓN REVOLUCIÓN

TELÉFONO: (452) 5450678

e-mail: mely_huma@hotmail.com

ESCOLARIDAD:

Años	Nivel, Institución y Plantel
1991-1997	Primaria: Instituto Morelos A.C. Uruapan, Michoacán
1997-2000	Secundaria: Instituto Morelos Uruapan, Michoacán
2000-2003	Preparatoria: Colegio de Ciencias y Humanidades Uruapan, Michoacán
2003-2008	Licenciatura: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Medicina Veterinaria y Zootecnia

CURSOS ADICIONALES

“CURSO DE ACTUALIZACIÓN EN OFTALMOLOGÍA EN PERROS Y GATOS”, REALIZADO LOS DÍAS 05,06 Y 07 DE MARZO DE 2007 EN LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA U.M.S.N.H. MORELIA, MICHOACÁN, CON DURACIÓN DE 15 HORAS.

“CONFERENCIA DE ENCUESTA NACIONAL INGRESO Y GASTO EN LOS HOGARES” ORGANIZADA POR EL INEGI EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 2007.

Participación como organizador y asistente en el “III FORO NACIONAL DE CUNICULTURA” REALIZADO DEL 17 AL 19 DE ABRIL DE 2008 CON UNA DURACIÓN DE 20 HORAS, EN MORELIA, MICHOACÁN, CON UNA DURACIÓN DE 20 HORAS.

“CURSO DE RECONOCIMIENTO DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES EXÓTICAS DE LOS ANIMALES, LOS SISTEMAS Y PLANES DE EMERGENCIA” LLEVADO A CABO EN EL AUDITORIO DEL SPUM EN MORELIA, MICHOACÁN, LOS DÍAS 16 AL 19 DE JUNIO DEL 2008, CON UNA DURACIÓN DE 32 HORAS.

“CURSO EXTRACURRICULAR DE PREPARACIÓN ACADÉMICA PARA PRESENTAR EL EXAMEN GENERAL PARA EGRESO DE LA LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA (EGEL-MVZ)”, EN LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DURANTE EL PERIODO COMPRENDIDO DEL 4 DE AGOSTO AL 18 DE SEPTIEMBRE DEL 2008, CON UNA DURACIÓN DE 240 HORAS.

“CURSO TEÓRICO DE ANESTESIA Y CIRUGÍA VETERINARIA DE GRANDES ESPECIES, PEQUEÑAS ESPECIES Y ESPECIES SILVESTRES” REALIZADO DEL 27 AL 30 DE OCTUBRE DEL AÑO 2008 EN LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, CON UNA DURACIÓN DE 20 HORAS.

“ESTRÉS LABORAL” , CON UNA DURACIÓN DE 3 HORAS DENTRO DEL MARCO DE LA SEMANA DE CULTURA LABORAL 2009 “POR LA EXCELENCIA EN EL TRABAJO”, REALIZADO EN LA UNIVERSIDAD DON VASCO.

“CURSO-TALLER DE CAPACITACIÓN A PRESTADORES DE SERVICIOS PROFESIONALES EN EL MODELO GGAVATT” CON UNA DURACIÓN DE 16 HORAS DEL 9 AL 10 DE SEPTIEMBRE DEL 2009.

“II CURSO TALLER ELABORACIÓN DE PRODUCTOS LÁCTEOS” REALIZADO EL 6 Y 7 DE NOVIEMBRE DE 2009, EN LA FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA “PRESIDENTE JUÁREZ”.

“CAPACITACIÓN DE LA TÉCNICA DIGESTIBILIDAD IN VITRO” LLEVADA A CABO DEL 8 AL 12 DE NOVIEMBRE DEL 2010, EN EL CAMPO EXPERIMENTAL DEL INIFAP EN TECOMÁN, COLIMA.

Participación como ponente en el “2° FORO ACADÉMICO DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA”

Participación en el “PRIMER FORO DE FORTALECIMIENTO Y CAPACITACIÓN DE DESARROLLO RURAL INTEGRAL”. DESARROLLO RURAL MEXIQUENSE, FUNDACIÓN SUSTENTABLE. TOLUCA, MÉXICO ENERO 2015.

CURSO DE CAPACITACIÓN A PROMOTORES TÉCNICOS PARA LA EJECUCIÓN DEL CAFPT. ASOCIACIÓN NACIONAL DE EGRESADOS DE CHAPINGO, 10-12 ABRIL 2014.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Generalidades del género <i>Opuntia</i>	3
1.2 Propiedades nutricionales del nopal para su utilización como forraje	4
1.3 Comportamiento productivo y cambios cualitativos en leche y los productos lácteos como consecuencia de la complementación con nopal en la dieta de bovinos	7
1.4 Microbiología de la leche y queso	8
1.5 Microbiología y biotecnología	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVOS	14
5. MATERIAL Y MÉTODOS	15
5.1 Grupos y tratamientos	15
5.2 Medición de la producción láctea	16
5.3 Análisis de la calidad de leche y del queso fresco	17
5.4 Extracción de ADN por lisis química	18
5.4.1 Primera estandarización de la técnica	20
5.4.2 Segunda estandarización de la técnica	20
5.4.3 Tercera estandarización de la técnica	21
5.4.4 Cuarta estandarización de la técnica	21
5.5 Protocolo establecido para extracción de ADN por lisis química	22
5.6 Extracción por lisis enzimática	24
5.7 Extracción por combinación de las dos técnicas (Lisis química-Lisis enzimática)	25
5.8 Evaluación de la cantidad y pureza del ADN extraído	25
5.9 Amplificación de los ARNr de diferentes grupos bacterianos	26
6. RESULTADOS	27

6.1 Producción láctea (PL)	27
6.2 Análisis bromatológico de la leche	29
6.3 Análisis de la calidad microbiológica de la leche y queso fresco	30
6.4 Extracción de ADN de leche y queso fresco	32
6.4.1 Comparación de los tres métodos de extracción de ADN	32
6.5 Capacidad del ADN para llevar a cabo la PCR	35
7. CONCLUSIONES	36
7.1 El nopal como forraje	36
7.2 Técnicas de extracción de ADN de muestras lácteas	36
8. BIBLIOGRAFÍA	38

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Composición química de los cladodios de nopal, heno de alfalfa y rastrojo de maíz usados como suplemento alimenticio	5
Cuadro 2. Promedio de fibra detergente neutra (NDF), fibra detergente ácida (ADF), hemicelulosa, celulosa y contenidos de lignina (% de MD) de algunas especies de <i>Opuntia</i>	6
Cuadro 3. Características organolépticas y composición nutrimental de leche de vacas alimentadas convencionalmente y con nopal	8
Cuadro 4. Medias de mínimos cuadrados para las unidades formadoras de colonias (UFC) en leche y subproductos lácteos de acuerdo con la alimentación de las vacas	8
Cuadro 5: Grupos de animales sobre los cuales se aplicaron los tratamientos	15
Cuadro 6. Dietas para bovinos productores de leche para el grupo 1 (dieta convencional) y el grupo 2 [dieta con nopal forrajero (<i>Opuntia ficus-indica</i>)]	16
Cuadro 7. Análisis bromatológico de la leche de acuerdo con el	29

tratamiento

Cuadro 8. Medias de mínimos cuadrados para las unidades formadoras de colonias (UFC) de mesófilos aerobios en leche y subproductos lácteos de acuerdo con la alimentación de las vacas	30
Cuadro 9. Medias de mínimos cuadrados para las unidades formadoras de colonias (UFC) de coliformes totales en leche y subproductos lácteos de acuerdo con la alimentación de las vacas	32
Cuadro 10. Comparación de los métodos de extracción de ADN	33

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Tendencia de la producción láctea (medias de mínimos cuadrados) en ambos grupos (vacas alimentadas convencionalmente y vacas complementadas con nopal).	27
Figura 2. Electroforesis de ADN genómico extraído con los tres métodos. (A: Bandas correspondientes a ADN extraído con el método enzimático en muestras lácteas, B: con extracción utilizando el método con el producto DNAzol® y C: utilizando el método combinado).	33
Figura 3. Electroforesis de la amplificación del ribosomal 16S procariótico de ADN genómico proveniente de las muestras de leche y queso extraído por los dos métodos de extracción más el combinado (A = enzimático, B = DNAzol y C = combinado).	35

RESUMEN

El objetivo general de la presente investigación fue evaluar el efecto del uso del nopal como complemento alimenticio en la dieta de vacas lecheras de raza Holstein sobre la producción láctea (PL) y calidad fisicoquímica y microbiológica de la misma, así como de su subproducto (queso fresco). Adicionalmente, se evaluaron tres técnicas de extracción de ADN microbiológico (DNAzol, enzimática y combinada) a partir de muestras de leche y de queso fresco para determinar una técnica viable de extracción que permitiera futuros análisis moleculares para la evaluación de la calidad microbiológica de productos lácteos, a partir de amplificaciones del ADN obtenido. Para ello, se midió la producción de leche a un grupo de vacas lecheras complementadas en su dieta con nopal ($n=5$) y a otro grupo testigo ($n=5$), se realizaron mediciones diarias durante 29 días; en los días 0, 7, 15 y 29 se llevó a cabo la manufactura de queso fresco a partir de 500 ml de la leche de cada animal, adicionalmente se realizó análisis fisicoquímico a las muestras de leche mediante ultrasonografía. Los datos fueron analizados con la metodología de modelos mixtos con mediciones repetidas (SAS, 2000). Las diferencias estadísticas entre tratamientos se obtuvieron mediante el método de medias de mínimos cuadrados (SAS, 2000). Los resultados mostraron diferencias ($p<0.05$) a partir del día 16 de PL entre los grupos, con un promedio de 1.8 litros de leche más para el grupo 2. Para la calidad fisicoquímica de la leche no se encontraron cambios significativos ($p>0.05$) entre grupos. Se observó diferencias ($p<0.05$) entre las UFC de bacterias mesofilas aerobias en leche y queso. El promedio para leche fue de 3.07/ml y 2.4/ml y para queso de 3.6/g, y 3.3/g para el grupo 1 y 2 respectivamente. Se aisló una mayor cantidad de ADN de leche en la técnica enzimática y la combinada comparada con la técnica utilizando DNAzol, y para el caso de las muestras de queso se aisló mayor cantidad de ADN en la técnica enzimática ($P<0.05$). Respecto a la pureza, la técnica combinada fue de la que se obtuvo ADN más puro para ambas muestras ($P<0.05$). Como conclusión se puede establecer que la complementación de nopal a la dieta de vacas aumenta la producción de leche, y mejora su calidad sin cambios fisicoquímicos de la leche y que un método enzimático o combinado es efectivo para aislar ADN de muestras lácteas para futuros análisis de calidad microbiológica.

Palabras claves: calidad de la leche, opuntia, poblaciones microbianas, ADN, extracción.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate nopal as a dietary supplement for Holstein cows and to determine its effects on milk yield, as well as, in the physicochemical and the microbiological quality of raw milk and fresh cheese. In addition, three microbiological DNA extraction techniques were evaluated (DNAzol; enzymatic and combined), from milk and fresh cheese samples, in order to determine the most feasible technique which allowed for future evaluation of dairy products, from DNA amplifications. For this purpose, there were used milk yield sample determinations from a group of cows supplemented with nopal ($n=5$), and from other equal size group, which was considered as a control one, receiving a conventional diet. There were daily measurements for a 29 days period; during days 0, 15 and 29 d, cheese was made from 500 ml milk from each cow. At the same time, ultrasonography measurements of physicochemical analysis were made. The data were analyzed through mixed models methodology with repeated measurements. Statistical differences between treatments means were estimated by using the least squares means. Results showed statistical differences between groups for milk yield ($p < 0.05$) beyond day 16, with an average of 1.8 more liters of milk for group 2. For the physicochemical milk quality, no significant changes were found ($p > 0.05$) between groups. Statistical differences ($p < 0.05$) were observed among the counts of aerobic mesophilic bacteria from milk and cheese. The average for milk was 3.07/ml and 2.4/ml and for cheese 3.6/g, and 3.3/g for groups 1 and 2 respectively. A higher amount of milk DNA was isolated by using the enzymatic and combined technique compared to DNAzol. For the case of the cheese samples more DNA was isolated by using the enzymatic technique ($P < 0.05$). Regarding purity, the combined technique gave the best DNA for both samples ($P < 0.05$). In conclusion, it can be established that cactus supplementation to cow's diet increases milk production and improves its quality without changes in the physicochemical parameters, on the other hand, an enzymatic or combined methodology is effective for DNA isolation from milk samples for future analysis of microbiological quality.

Key words: milk quality, opuntia, microbiological populations, DNA, extraction.

1. INTRODUCCIÓN

La ganadería en México se ha ubicado a través de los años como una de las actividades económicas más importantes del país. Dentro del sector productor de bovinos, los productores que habitan en zonas rurales, utilizan como sistema de producción el pastoreo extensivo con poca o nula tecnificación, o sistemas semi-intensivos donde se aprovechan zonas de agostadero para la alimentación de los animales durante las épocas de crecimiento de forraje o en otros casos la utilización de esquilmos agrícolas. Este escenario se puede ver en el estado de Michoacán, donde a pesar de que la ganadería constituye una de las tres principales actividades económicas, se enfrenta a un problema fundamental que afecta negativamente al desarrollo de este sector. Durante la época de estiaje en las zonas rurales de México, los sistemas de bovinos productores de leche se enfrentan a fluctuaciones frecuentes en la cantidad y la calidad de los forrajes (Ortega *et al.* 2010), debido a la precipitación pluvial. Por lo tanto, en zonas con estiaje prolongado la escasez del pasto nativo se acentúa y por lo regular sólo hay disponibilidad de esquilmos agrícolas para pastoreo (Espinosa *et al.* 2007). Por tanto, en los sistemas de producción de tipo extensivo o semiintensivo, (Reveles *et al.* 2010) determinaron que este factor (estiaje prolongado) incide en el comportamiento productivo de los hatos al presentarse variabilidad en la cantidad y calidad de los insumos que se proporcionan al ganado, afectando la rentabilidad de los sistemas de producción lecheros.

Ante esta situación se hace necesaria la evaluación e implementación de forrajes alternativos de tipo autóctono que permitan mejorar la productividad y por tanto los ingresos a los productores y que además permitan una restauración de los suelos y mejor aprovechamiento del agua. Algunos productores han intentado resolver la problemática de la alimentación del ganado recurriendo a la utilización de forrajes alternativos autóctonos, entre los cuales destaca la presencia de las especies del género *Opuntia* spp.

1.1 Generalidades del género *Opuntia*

Opuntia representa a un género de las cactáceas que incluye alrededor de 300 especies, cuya clasificación taxonómica ha resultado complicada debido a la poliploidía; así como a la existencia de numerosos híbridos interespecíficos (Reynolds y Arias, 2003).

La evolución de los miembros de los subgéneros de *Opuntia* en ambientes áridos y semiáridos ha conducido al desarrollo de diversas características de adaptación anatómica, morfológica y fisiológica, resultando en particularidades tal y como fueron descritas por Sudzki Hills (1995), dentro de las que destacan la reproducción asincrónica, el metabolismo del ácido crasuláceo y la succulencia (principal característica morfológica de los nopales y en general de las cactáceas), la cual según Bravo (1978), se debe a la necesidad de modificar su estructura y funcionamiento para la conservación interna de la humedad (Ver sección Ecofisiología de *Opuntia*).

El nopal (*Opuntia* spp.) es un recurso forrajero que se encuentra ampliamente distribuido en el país y se presenta abundancia de diferentes especies, en México se localizan 61 géneros de los 92 que existen en América del Norte y esto lo ubica como centro de diversidad (Bravo, 1978). El nopal forrajero representa un recurso alimenticio idóneo para la complementación en la alimentación de bovinos por poseer las cualidades: capacidad de producción de cladodios o pencas, fuente barata de alimentación, forraje fresco, palatable y susceptible a explorarse durante todo el año (Carranza, 2001; Flores, 2004; Ramírez, *et al.* 2007). Lo caracteriza su amplia producción de biomasa, disponibilidad de almacenamiento en graneros, es capaz de desarrollar elevada productividad en regiones que poseen estrés por agua, ayuda a combatir la erosión y por sus cualidades nutritivas: contenido de 80-95% de agua, 3 a 5% de proteína, 1.76% de grasa cruda, 9.18% de fibra, 69.95% de extracto libre de nitrógeno (E.L.N.); concentraciones altas de carbohidratos solubles y calcio, además la especie de nopal forrajero *Opuntia ficus-indica* cuenta con el mayor índice de crecimiento, mayor distribución y sus pencas maduras no poseen espinas.

1.2 Propiedades nutricionales del nopal para su utilización como forraje

El nopal como recurso forrajero para la alimentación del ganado productor de leche promete ser una opción sustentable. Sin embargo éste no representa a un alimento balanceado (debido al bajo contenido proteico, de fósforo y sodio), por tanto debe ser parte de la dieta y no fuente única nutritiva, debe complementarse con otros insumos ricos en proteínas, fibra, energía y minerales, (maíz, alfalfa, avena, harinolina, silo y rastrojo) ya que de ser utilizado como único alimento, la cantidad suministrada tendría que ser muy grande (Azócar, 2003).

En estudios bromatológicos, el nopal ha demostrado ser un alimento que suministra 2.25 mcal/kg, lo que lo hace un alimento energético, esto en comparación con otros forrajes como el heno de alfalfa (2.52 mcal/kg) o como el rastrojo de maíz (1.69 mcal/kg). En cuanto a proteína cruda (PC) el nopal aporta un 3.5%, porcentaje inferior al que aporta el rastrojo de maíz (4.5%) o al propio heno de alfalfa (18.8%); sin embargo, su contenido de minerales es mayor: Calcio (Ca) 2.01% y Fósforo (P) 0.11%, mientras que el heno de alfalfa y el sorgo aportan el 1.68 y 0.50% de Ca y 0.08 y 0.29% de P, respectivamente (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición química de los cladodios de nopal, heno de alfalfa y rastrojo de maíz usados como suplemento alimenticio

	Heno de alfalfa ¹	Rastrojo de maíz ²	Cladodios de nopal ¹
Materia seca, MS (%)	93.06	86.5	15.04
Materia orgánica, MO (%)	88.75	84.4	90.00
Proteína cruda, PC (%)	18.86	4.5	3.51
Energía metabolizable, EM (mcal/kg)	2.52	1.69	2.25
Ca ⁺⁺ (%)	1.68	0.50	2.01
P (%)	0.29	0.08	0.11

Fuente: Azócar y Rojo, 1991¹; Maynar, 1989².

Cabe mencionar que a pesar de que el nopal posee bajo contenido de fibra, éste nivel se mantiene de la misma manera en la fracción de lignocelulosa. Se sabe que elevados niveles de ésta son responsables de disminuir la digestibilidad, por lo tanto se espera que los cladodios de nopal posean una mayor digestibilidad en comparación con otros forrajes (Nefzaoui y Salem, 2003) (Cuadro 2).

Mientras que en algunos forrajes ampliamente utilizados en la alimentación de bovinos, la degradación potencial en el rumen a menudo se alcanza a las 48 horas, en el caso del nopal se lleva a cabo de una manera más rápida (entre 6-8 horas). Por tanto la materia seca del nopal permanece en el tracto gastrointestinal sólo por un corto tiempo, permitiendo un mayor volumen disponible en el rumen y un reflejo menor de llenado para la ingesta de

una mayor cantidad de forrajes, por lo tanto el incremento de este insumo en la dieta no reduce la ingesta de los otros componentes de la ración (Nefzaoui y Salem, 2003).

Cuadro 2. Promedio de fibra detergente neutra (NDF), fibra detergente ácida (ADF), hemicelulosa, celulosa y contenidos de lignina (% de MD) de algunas especies de *Opuntia*

Especies	NDF	ADF	Hemicelulosa	Celulosa	Lignina
Alfalfa (ref. sp.)	45.15	29.91	15.24	21.49	7.93
<i>O. engelmannii</i>	31.18	11.29	19.88	7.95	2.89
<i>O. filipendula</i>	33.30	15.31	17.99	10.49	3.97
<i>O. versicolor</i>	39.85	18.98	20.87	13.73	3.86
<i>O. polyacantha</i>	31.16	18.42	12.74	12.69	4.79
<i>O. fragilis</i>	35.08	15.47	19.61	10.97	3.91

Fuente: Ben Thlija, 1987.

En cuanto al contenido de cenizas en el nopal, se tiene información de que es elevado (10-25%), cualidad debida probablemente a sus elevados niveles de calcio, la mayoría de las especies de *Opuntia* poseen contenidos de fósforo menores a los requeridos por los animales. Las elevadas cantidades de calcio contenidas en las pencas se deben a que la deficiencia de agua en las zonas áridas o semi-áridas provoca que éste forraje acumule grandes cantidades de solutos de Calcio, lo cual permite que la planta extraiga por ósmosis la mayor cantidad de agua posible. El contenido de Calcio por tanto es más elevado que los requerimientos de los animales; sin embargo, no representa problemática un exceso de éste en la dieta, pero cabe destacar que una relación calcio/fósforo no balanceada debe ser corregida (Nefzaoui y Salem, 2003).

Los otros minerales requeridos en la dieta (manganeso, cobre, zinc, magnesio y hierro) se encuentran en niveles aceptables en las dietas en rumiantes, excepto para el caso del sodio el cual se encuentra en niveles por debajo de lo requerido (Shoop *et al.* 1977).

Opuntia ha llegado a captar especial interés en la alimentación de rumiantes, por las cualidades nutritivas descritas, además de poseer la cualidad de convertir el agua en materia seca y eventualmente en energía digestible, cualidad que puede aprovecharse en los tiempos de sequía por proveer dichos nutrientes, motivo que ha sido de interés para su

utilización como forraje, no sólo en bovinos sino en otras especies como cerdos y ovinos (Mendoza 2015).

1.3 Comportamiento productivo y cambios cualitativos en leche y los productos lácteos como consecuencia de la complementación con nopal en la dieta de bovinos

García *et al* (2005) determinaron que al complementar la dieta de los bovinos con *Opuntia*, se incrementa no solo la producción de leche, sino que mejora la calidad y vida de almacén de los subproductos lácteos. Lo que concuerda con las nuevas investigaciones en donde se ha demostrado que la utilización del nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la complementación de dietas para bovinos productores de leche es una alternativa viable para evitar los efectos detrimentales en la época de estiaje (Ortiz *et al.* 2010). Así mismo, se ha corroborado un aumento sobre la producción láctea utilizando 12 kg de nopal en base fresca como complemento de la dieta de los bovinos durante esta época y en sistemas familiares (Ortiz *et al.* 2012).

Estudios preliminares (Ortiz *et al.* 2010) también demostraron que el suministro de nopal en la dieta de bovinos productores de leche, modifica las propiedades de cuajado y textura en el queso fresco que se obtiene a partir de ella. Aparentemente, esta modificación no se debe a las características bromatológicas de la leche (Ver cuadro 3). Al estudiar la carga microbiana de mesófilos totales y coliformes totales en la leche y en el queso fresco se observó una reducción en ambos indicadores para los lácteos obtenidos de vacas alimentadas con nopal (Ver cuadro 4). Por lo anterior, la inclusión del nopal en la dieta puede disminuir la carga microbiana en el queso fresco y posiblemente modificar el tipo de poblaciones microbianas presentes, ya que en la elaboración del subproducto, ocurren reacciones microbiológicas naturales, donde los microorganismos reaccionan a los nutrientes que la leche posee para llevar a cabo su metabolismo y dar como resultado un cambio en las características del producto (coagulación enzimática, separación proteica, remoción de carbohidratos, fermentación, oxidación de lípidos, etc.).

Cuadro 3. Características organolépticas y composición nutrimental de leche de vacas alimentadas convencionalmente y con nopal

COMPONENTE	LECHE (VACAS COMPLEMENTADAS CON NOPAL)	LECHE (ALIMENTACIÓN NORMAL)
COLOR	BLANCO AMARILLENTO DÉBIL	BLANCO AMARILLENTO
OLOR	INODORA	CARACTERÍSTICO
SABOR	NORMAL	NORMAL
ASPECTO	NORMAL	NORMAL
DENSIDAD	1.025	1.026
ACIDEZ	15	16
SÓLIDOS TOTALES (en g %)	11.12	10.73
SÓLIDOS NO GRASOS (en g %)	8.12	7.73
GRASA (en g %)	3.0	3.0
CENIZAS (g %)	0.69	0.83
PROTEÍNA (g %)	2.49	2.66
LACTOSA (g %)	3.00	3.86

Fuente: Ortiz *et al.* 2010

Cuadro 4. Medias de mínimos cuadrados para las unidades formadoras de colonias (UFC) en leche y subproductos lácteos de acuerdo con la alimentación de las vacas

Alimento	Producto	UFC	e.e.
Con Nopal	Leche	25.2 ^a	323.8
	Subproductos lácteos	54.2 ^a	457.9
Sin Nopal	Leche	144.0 ^a	345.9
	Subproductos lácteos	1734.2 ^b	346.0

^{a,b} = diferencias estadísticas ($p < 0.05$) dentro de columna; e.e. = error estándar

Fuente: Ortiz *et al.* 2010

1.4 Microbiología de la leche y queso

La leche cruda es un medio natural de crecimiento para los microorganismos (Robinson, 2002). La microbiota presente en la leche es variable respecto a las condiciones de manejo que preceden, principalmente debidas a las condiciones sanitarias durante su recolección y el manejo de la misma. El contenido de microorganismos en leche cruda determina su calidad. Indica los niveles de higiene durante el ordeño como limpieza de utensilios y equipo, así como el estado de salubridad de la ubre de cada animal (Spreer, 1998).

Es importante el análisis de los microorganismos presentes, pues de éstos se pueden analizar su utilidad y su propia capacidad de generar cambios en materia de calidad sanitaria, así como de alteraciones organolépticas en la leche y por consiguiente en los productos lácteos o en su defecto por ser agentes causales de enfermedades en el consumidor. De esta manera son numerosos los grupos de microorganismos que pueden encontrarse en ella (bacterias, hongos e inclusive virus). Su presencia es debida a la contaminación inicial durante la producción, colecta y manejo (Robinson, 2002).

De acuerdo con Celis y Juárez (2009), debido a la importancia en el ámbito industrial lácteo se pueden resumir algunos de los microorganismos generalmente encontrados en ella y que alteran sus cualidades nutritivas y de sus productos:

A. Bacterias:

De acuerdo a su importancia (conformacional y de sanidad) se pueden conformar en dos grupos: Bacterias lácticas y Bacterias coliformes. Dentro de ellas pueden encontrarse bacterias Gram positivas y Gram negativas, siendo en las primeras las más destacadas dentro del grupo de las lácticas las de los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragonococcus*, *Alloiococcus* y *Bifidobacterium*. Éstas poseen las propiedades de ser anaerobias facultativas, mesófilas y termófilas; pueden ser homofermentativas (generalmente el producto de su metabolismo es ácido láctico) o heterofermentativas (de las cuales el producto de su metabolismo además de ser ácido láctico, otros ácidos o gases). Su importancia en la elaboración de productos lácteos radica en su capacidad de fermentar lactosa, lo cual resulta en una acidez importante para la coagulación de la leche por efecto en la coalescencia de las caseínas, por lo tanto son importantes en la textura y consistencia. Además se involucran en el aporte de aroma y sabor por sus productos metabólicos (acetaldehído, diacetilo, acetoina, acetona, lactonas, ácidos volátiles, alcohol y gas). También poseen efectos de preservación por ciertas razones, como la capacidad de algunas especies de producir bacteriocinas, la acidez producida inhibe el crecimiento de otras especies y por la competencia de nutrientes.

Otro género bacteriano que posee importancia en la alteración de la leche pero de manera patógena son los micrococcos, dentro de los cuales los más destacados son los Estafilococos, microorganismos fermentadores causantes de diversas patologías como la mastitis (llega a contaminar la leche) y diversas enfermedades transmisibles a humanos, entre ellas las intoxicaciones alimentarias. Existen otros géneros que pueden llegar a presentarse más que en la leche cruda, en los productos lácteos como bacterias *Clostridium*, *Bacillus* y *Corynebacterium*.

En el grupo de las bacterias Gram negativas, la familia de las enterobacterias son las más importantes, pues son encontradas en la leche y productos por contaminación y pobres condiciones higiénicas y su importancia radica en la alteración que producen en la leche y productos a nivel patológico y de calidad. Las que más comúnmente se encuentran son *Escherichia coli*, *Enterobacter aerógenes*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Serratia*. Las pseudomonas son otro género importante, pues alrededor de un 50% de la flora microbiana Gram negativa de la leche está representada por éste. Poseen la capacidad de ser psicrófilas, proteolíticas y lipolíticas por lo que juegan un papel importante en la preservación de los productos lácteos.

B. Levaduras:

En la leche pueden encontrarse especies como *Candida cremoris* y *Saccharomyces lactis*. Algunas especies son utilizadas como cultivos lácteos para el afinado de los quesos madurados (*Penicillium candidum*, *Penicillium camemberti* y el *Penicillium roqueforti*).

1.5 Microbiología y Biotecnología

Los métodos de análisis molecular para estudiar las poblaciones microbianas contribuyen de manera importante para identificar las especies que se pueden encontrar en los productos lácteos así como su calidad (Andriamahery *et al.* 2011). Además permiten identificar la totalidad del microbioma existente en una muestra sin necesidad de realizar cultivos

bacterianos, los cuales además de ser específicos para cada grupo y especie bacteriana, no garantizan aislar la totalidad de la población microbiológica de una muestra.

La leche y los productos lácteos albergan un enorme reservorio de diversidad microbiana fenotípica y genética, la cual puede tener amplios potenciales para aplicaciones biotecnológicas (Wouters *et al.* 2002; Topisirovic *et al.* 2006; Van Hylckama Vlieg *et al.* 2006). Esta diversidad de microorganismos depende de las condiciones ambientales, nutritivas, sanitarias y las que sean manipuladas para cuestiones industriales. Para el estudio de la dinámica microbiológica existen numerosas técnicas de biología molecular, donde, a través de una muestra, se emplean métodos de “rastreo molecular” que permiten discernir diferencias o composiciones discretas entre muestras de moléculas de complejidad variable. Para el estudio de las poblaciones microbianas, las moléculas de complejidad variable corresponden a las secuencias de los genes que codifican el ARN ribosomal, generalmente el 16S de procariotes o 18S de eucariotes. La técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una herramienta útil para evaluar cambios microbiológicos (dinámicas poblacionales), presencia de microorganismos metabólicamente activos en el producto, lo cual es de gran relevancia para poder afirmar qué microflora se encuentra y bajo qué circunstancias.

La extracción de ADN es el primer paso y sumamente importante para el análisis biomolecular de los microorganismos presentes en una muestra. No existe literatura suficiente sobre extracción de ADN de leche ni de comparaciones de métodos de extracción simultáneos (Psifidi *et al.* 2010). Los métodos más comunes de extracción de ADN de muestras de leche y queso buscan eliminar primeramente el exceso de macromoléculas que afectan la pureza del ADN a obtener (proteínas, carbohidratos y lípidos principalmente) con métodos de lisis mecánica utilizando esferas de circonio seguido de tratamientos con agentes caotrópicos y enzimas para la disrupción y desnaturalización de dichas macromoléculas. Es importante determinar una técnica de extracción de ADN de muestras lácteas a fin de establecer un protocolo efectivo que permita aislar el genoma de todos los microorganismos presentes de una manera sencilla y eficaz para realizar posteriores estudios moleculares que para el caso de estas muestras podrían ser metagenómicos,

epidemiológicos, librerías genéticas o especializados en el aislamiento de genes de algún microorganismo en particular sin necesidad de realizar cultivos sobre todo para la determinación de la calidad.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La época de estiaje no permite contar con una producción sostenida de forraje durante todo el año, por lo que la carencia de esta fuente de alimentación para el ganado vacuno representa un problema para los productores de las zonas rurales.

Ante la ausencia de recursos forrajeros en la gran mayoría de los sistemas extensivos y junto con la problemática productiva y económica que trae consigo, se hace necesaria la elección de alternativas que se basen en la suplementación o complementación de la alimentación en el ganado durante esas épocas críticas.

Esta complementación servirá para evitar la problemática que básicamente consiste en afectaciones nutricionales (pérdida de peso, cambios en los índices de conversión alimenticia, disminución en la condición corporal de los animales), reproductivos (efecto negativo en la actividad ovárica de las vacas), productivos (disminución en la producción de becerros y de leche), y por lo tanto económicos.

El uso del nopal en combinación con rastrojos supone una alternativa viable para contrarrestar dicha problemática y proporcionar una buena calidad nutritiva, elevando así los parámetros reproductivos y productivos de los animales. Aunado a esto, se mejora la calidad de los subproductos lácteos al aumentar la calidad nutricional de la leche y así mismo las características organolépticas. Es aquí donde se centra este estudio, en el análisis microbiológico de la leche y de un subproducto lácteo (queso). Posteriormente al encontrar una metodología adecuada para extraer el ADN de los microorganismos presentes en leche y productos lácteos con técnicas sencillas y que permitan extraer el genoma de los microorganismos, se podrá en futuros estudios evaluar el comportamiento de las poblaciones microbianas e identificar a los microorganismos involucrados sin necesidad de cultivarlos.

3. HIPÓTESIS

El uso del nopal en la dieta de las vacas lecheras aumenta la producción láctea y modifica la calidad microbiológica de la leche y sus subproductos.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el impacto de la complementación con nopal (*Opuntia* spp.) sobre la producción y calidad microbiológica de la leche y su subproducto (queso).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar y evaluar la producción de leche en vacas lecheras complementadas con nopal versus vacas alimentadas convencionalmente.
2. Comparar la calidad microbiológica y bromatológica de la leche y subproducto de vacas complementadas con nopal versus vacas alimentadas convencionalmente.
3. Determinar una técnica de extracción de ADN viable que permita evaluar la calidad microbiológica de la leche y subproductos lácteos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS:

5.1 Grupos y tratamientos. Para comprobar el objetivo uno, se utilizó la leche de 10 vacas del sistema bovinos de leche de la Facultad de Agrobiología Presidente Juárez-UMSNH, ubicada en Uruapan, Michoacán. Las vacas son de raza Holstein, cuya edad oscila entre 1 y 6 partos. Se formaron 2 grupos de 5 animales, homogenizados en cuanto a etapa de la producción y a la productividad de leche y quedaron conformados de la siguiente manera (Cuadro 5).

Cuadro 5: Grupos de animales sobre los cuales se aplicaron los tratamientos

	ID	NP	DL	PPL
GRUPO 1	1	6	90	13.95
	52	2	135	10.15
	74	3	87	12.93
	56	2	183	10.93
	6	2	115	11
GRUPO 2	20	5	120	14
	14	3	98	11.28
	71	4	111	13.37
	72	2	115	9.4
	5	1	89	11.4

(Grupo: 1= testigo/sin nopal 2=tratamiento/con nopal. ID=Identificación del animal. NP=Número de partos. DL=Días de lactancia. PPL=Promedio de producción láctea.

Las dietas para cada tratamiento fueron balanceadas en un software especializado para la formulación de raciones para animales domésticos (UFFDA)®, para ello, se consideraron los insumos que son utilizados de manera habitual dentro del sistema de producción de bovinos productores de leche, como se observa en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Dietas para bovinos productores de leche para el grupo 1 (dieta convencional) y el grupo 2 [dieta con nopal forrajero (*Opuntia ficus-indica*)]

Dieta convencional			
Insumo	MS (Kg)	MS (%)	MF (Kg)
<i>Salvado</i>	2	89	2.247
<i>Sorgo</i>	0.5	88	0.568
<i>Concentrado</i>	1	88	1.136
<i>Pasto nativo</i>	5	32.4	15.432
<i>Maralfalfa</i>	4	17.6	22.727
<i>Melaza</i>	0.9	75	1.2
Kg totales/día	13.4		43.31
Dieta con inclusión con nopal			
<i>Salvado</i>	2	89	2.247
<i>Sorgo</i>	0.5	88	0.568
<i>Concentrado</i>	1	88	1.136
<i>Pasto nativo</i>	5	32.4	15.432
<i>Melaza</i>	0.9	75	1.2
<i>Nopal</i>	2	13.36	14.970
Kg totales/día	11.4		35.553

MS= materia seca contenida en cada insumo (en % y en Kilogramos) y MF= materia fresca (Kilogramos)

5.2 Medición de la producción láctea. Ésta se llevó a cabo diariamente durante todo el período del experimento (29 días) en las ordeñas por la mañana y por la tarde a todos los animales de ambos grupos con medidores de leche (Tru-test®).

Los datos fueron analizados con la metodología de modelos mixtos con mediciones repetidas. Las diferencias estadísticas entre tratamientos se obtuvieron mediante el método de medias de mínimos cuadrados (SAS, 2000) bajo el siguiente modelo:

$$y_{ijklm} = \mu + \text{animal}_i + \text{trat}_j + \text{med}_k + b1(x1 - \bar{X}1) + b2(x2 - \bar{X}2) + \epsilon_{ijkl}$$

Dónde:

y_{ijklm} = Una observación de producción láctea (litros de leche producida por animal por día)

μ = Promedio que caracteriza a la población

animal_i = Efecto aleatorio del i-esimo animal

trat_j = Efecto fijo del J-esimo tratamiento $j=(1,2)$

med_k = Efecto fijo de la l-esima medición $l=(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10....29)$

$b1(x1 - \bar{X}1)$ = Efecto de regresión de la covariable número de parto

$b2(x2 - \bar{X}2)$ = Efecto de regresión de la covariable días de lactancia

ϵ_{ijkl} = Error aleatorio asociado a cada observación $\epsilon_{ijkl} \sim (0, \delta^2)$

Para el segundo objetivo se llevó a cabo el muestreo durante el ordeño de la mañana. Para la toma de muestras se realizó la limpieza de la ubre y después el despunte de cada uno de los pezones, se tomaron muestras de 40 ml de cada animal en tubos graduados previamente esterilizados e inmediatamente se refrigeraron a -4°C.

La elaboración del queso se llevó a cabo con la utilización de 500 ml de leche cruda de cada uno de los animales de ambos grupos, aplicando 2ml de cuajo comercial CUAMEX® directamente sobre la leche cruda, dejando reposar de 15 a 30 minutos para luego realizar el corte de la cuajada, deshidratación o desuerado con tela de manta, salado (5 gramos de sal) y moldeado. Finalmente se obtuvieron quesos de 50 gramos en promedio. Al finalizar el procedimiento se refrigeraron a -4°C en bolsas resellables.

5.3 Análisis de la calidad de leche y del queso fresco. Para determinar la composición y calidad de la leche y de los subproductos lácteos se realizó un análisis fisicoquímico y bromatológico de los mismos durante cada etapa de muestreo con la utilización del equipo de análisis por ultrasonido Lacticheck®,

El análisis microbiológico se realizó en el CMEB (Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología) de la FMVZ – UMSNH, localizado en el municipio de Tarímbaro, Michoacán y la metodología para el análisis consistió en:

Conteo de bacterias en muestras de leche y queso: El conteo de las células mesófilas se realizó a partir de diluciones seriales de 10 muestras de leche y 10 de queso (5 del grupo testigo y 5 de los tratamientos) en Agar para Cuenta Estándar con tres repeticiones por muestra, según la norma NOM-092-SSA1-1994. Para el conteo de coliformes totales, las diluciones se sembraron en Agar Bilis Rojo Violeta siguiendo las indicaciones de la norma NOM-113-SSA1-1994 con el mismo número de muestras y repeticiones.

Los datos fueron analizados con la metodología de modelos mixtos con mediciones repetidas (SAS, 2000). Las diferencias estadísticas entre tratamientos se obtuvieron mediante el método de medias de mínimos cuadrados (SAS, 2000). El modelo utilizado fue el siguiente.

$$y_{ijklm} = \mu + \text{animal}_i + \text{trat}_j + \text{med}_k + b1(x1 - \bar{X}1) + b2(x2 - \bar{X}2) + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

y_{ijklm} = Una observación del conteo bacteriano (UFC de mesófilos aerobios y coliformes totales) en leche cruda y queso fresco

μ = Promedio que caracteriza a la población

animal_i = Efecto aleatorio del i-esimo animal

trat_j = Efecto fijo del J-esimo tratamiento $j=(1,2)$

med_k = Efecto fijo de la l-esima medición $l=(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10....40)$

$b1(x1 - \bar{X}1)$ = Efecto de regresión de la covariable número de parto

$b2(x2 - \bar{X}2)$ = Efecto de regresión de la covariable días de lactancia

ϵ_{ijkl} = Error aleatorio asociado a cada observación $\epsilon_{ijklm} \sim (0, \delta^2)$

En el tercer objetivo, se tomó como primera opción la utilización de la metodología de extracción de ADN por lisis química debido a los resultados previamente obtenidos por el equipo de investigación (Villegas *et al.* 2013). Cabe mencionar que se realizaron varias estandarizaciones de la técnica para poder establecer la que resultase efectiva para dichas muestras. Se evaluaron además otras dos técnicas de extracción, una donde a diferencia de la antes descrita, se lleva a cabo la lisis celular por medio de enzimas y como una tercera opción se realizó una combinación de ambas técnicas para complementar el análisis.

5.4 Extracción de ADN por lisis química

Se llevaron a cabo distintos ensayos, para lograr estandarizar y confirmar la extracción de ADN mediante la técnica del DNAzol® de Invitrogen®. Para llevar a cabo estos análisis, se utilizó leche y queso, productos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH; por la disponibilidad y cercanía de los mismos.

El protocolo de extracción del DNAzol®, establece una metodología que incluye los siguientes pasos a seguir:

1. Lisis celular y de núcleo:

Homogeneizar 25-50 mg de tejido (muestra) en 1 ml de DNAzol®.

2.-Centrifugación (opcional):

Centrifugar a 10,000 x g. a 4°C o temperatura ambiente. El sobrenadante viscoso resultante se transfiere a un tubo nuevo. Este paso remueve fragmentos de tejidos insolubles, RNA y exceso de polisacáridos. Esto es requerido sólo en el aislamiento de ADN de tejidos que contengan gran cantidad de material celular y extracelular.

3.-Precipitación del ADN:

Precipitar el ADN proveniente del lisado/homogeneizado con la adición de 0.5 ml de etanol al 100% por 1 ml de DNAzol® utilizado.

Mezclar por inversión y dejar a temperatura ambiente por 1-3 minutos. Rápidamente debería ser visible el ADN como un precipitado turbio. Se remueve el precipitado con una pipeta; se transfiere a otro tubo lentamente por las paredes de éste. Se decanta el sobrenadante, dejando a la pastilla de ADN cerca del fondo del tubo. Los tubos se deben colocar boca abajo por un minuto.

4.-Lavado de ADN:

Se lava el precipitado de ADN dos veces con 0.8-1.0 ml de etanol al 75 %. En cada lavado se suspende el ADN en etanol invirtiendo los tubos 3-6 veces. Se almacenan los tubos verticalmente de 0.5-1 minuto para permitir que el ADN se distribuya al fondo de los tubos; se remueve el etanol por pipeteo o decantación.

5.-Solubilización de ADN:

Se deja secar el ADN, guardándolo en un tubo abierto por 5-15 segundos después de la remoción con etanol. Disuelve el ADN en 8mM NaOH por pipeteo cuidadoso de la pastilla a través de la punta de la pipeta. Adicionar una adecuada cantidad de NaOH para tener una concentración de ADN de 0.2-3µl. Típicamente se agregan 0.1-0.3 ml de NaOH al aislado de ADN.

Luego de que el ADN es solubilizado en NaOH 8 Mm, se ajusta la solución de ADN a un pH deseado mediante la adición de HEPES. Se utilizan las siguientes cantidades de 0.1 M o 1 M de HEPES por cada ml utilizado para el NaOH:

PH FINAL	0.1 M DE HEPES (μl)	PH FINAL	1 M HEPES (μl)
8.4	86	7.2	23
8.2	93	7.0	32
8.0	101		
7.8	117		
7.5	159		

5.4.1 Primera estandarización de la técnica.

Se llevó a cabo la extracción de ADN mediante la utilización del reactivo DNAzol®, sin embargo, no se utilizaron las instrucciones previamente establecidas por el fabricante. Se utilizó la metodología siguiente: Se tomó una muestra de 200 ml de leche del sector de lácteos de la FMVZ-UMSNH y otra de aproximadamente 50 gramos de queso fresco. Se prepararon 6 tubos para el caso de la leche y 6 para queso. Se colocaron 250 μl de leche en cada tubo y 250 μg de queso para los 6 tubos restantes; teniendo así 12 muestras en total. Los 250 μl de leche y 250 μg de queso de cada tubo se mezclaron con 1 ml de DNAzol®. Cada tubo fue sometido a un agitador vórtice durante 1 minuto para la mezcla de las muestras. Luego del vórtice, los tubos se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 10,000 r.p.m. Se notó una mezcla que no precisaba distinción de fases, por lo tanto se sometió a una segunda centrifugación- Posterior a ésta se observó en todas las muestras una capa de consistencia grasosa en la superficie del tubo, imposibilitando la toma del sobrenadante debido a su consistencia y a la dificultad para tomar la fase acuosa y ante esta situación se buscó alterar algún paso de la metodología que se llevó a cabo.

5.4.2 Segunda estandarización de la técnica

Para la segunda extracción de la muestra, se llevó a cabo la metodología anterior, sin embargo se cambiaron las concentraciones de muestra – reactivo, procurando aumentar la cantidad de reactivo de DNAzol® al doble en relación a cada μl o μg respectivo a leche o queso, se incrementaron el número de centrifugaciones de igual manera al doble; sin embargo el resultado fue el mismo en cuanto a la 1ª metodología. La separación de fases se mostró de manera más evidente respecto a la metodología antes mencionada.

5.4.3 Tercera estandarización de la técnica

Para esta metodología, se basó en la propuesta por las indicaciones del reactivo antes mencionada. Se buscó proporcionar la cantidad de muestra – reactivo, a manera de encontrar una equivalencia para disminuir el volumen que indica el protocolo, por cuestiones de practicidad en cuanto a manejo de muestra en tubos de 2 ml utilizando 500 μl o 500 μg de muestra (leche y queso respectivamente) – 100 μl de DNAzol®. Se preparó el reactivo HEPES siguiendo la metodología del fabricante a un volumen de 40 ml mediante los siguientes cálculos: Peso molecular HEPES=238.3, concentración deseada= 0.1M, volumen final=40 ml; $gr = (Pm)(M)(L)$, $gr = (238.3)(0.1)(0.04)$ y por tanto gr necesarios de HEPES a 0.1M en 40 ml=0.9532 gramos en 40 ml. Se procedió a preparar el reactivo en base a los cálculos obtenidos Posteriormente se realizó la mezcla muestra – reactivo DNAzol® a las concentraciones previas; se llevó a cabo la mezcla mediante el vórtice durante 1 minuto para cada muestra. Se llevaron a cabo 2 centrifugaciones a 12,000 r.p.m durante 15 minutos ambas. Se agregaron 500 μl de T.E. para incrementar volumen. Se realizó el decantado del sobrenadante. La pastilla resultante se sometió a secado a temperatura ambiente mediante la inversión de los tubos. La pastilla se lavó con etanol al 70% por 2 veces y se resuspendió en TE, los tubos fueron colocados en el concentrador de ADN durante 10 minutos. Se preparó un gel de agarosa a fin de poder apreciar si se obtuvo ADN de las muestras tratadas con el reactivo y bajo los procedimientos llevados a cabo. Se preparó agarosa al 0.7% en TAE 1X. La cantidad a preparar fue de 100 ml; por lo tanto a través de la fórmula siguiente se obtuvieron la cantidad de agarosa a utilizar así como el volumen:

Agarosa 0.7%

Concentración inicial: 100%

Volumen inicial=??? $V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i} = \frac{(0.7\%) \times (100\text{ml})}{100\%} = 0.7\text{gr agarosa}$

Concentración final= 0.7 C_i 100%

Volumen final=50 ml

TAE 1X

Concentración inicial= 50X

Volumen inicial= ¿?? $V_i = \frac{1X \times 100\text{ml}}{50X} = 2\text{ ml TAE}$

Concentración final= 1X 50X

Volumen final=100 ml

Se afora a 100 ml con agua destilada.

Una vez preparada la solución, se fundió en horno de microondas durante aproximadamente 1.5-2 minutos. El fundido total se vació a la cámara de electroforesis previamente armada. Se dejó gelificar durante 40 min. Se llevó a cabo la electroforesis durante 50 min aproximadamente. Y mediante el transiluminador se observó la presencia de ADN sin embargo una parte estaba degradada además de que la muestra no era del todo limpia (las muestras contenían mucha cantidad de grasa y proteínas).

5.4.4 Cuarta estandarización de la técnica

Se llevó a cabo una cuarta estandarización con el reactivo DNAzol®, pero modificando específicamente las limpiezas de los productos mediante la siguiente metodología:

- A) Esta vez se llevaron a cabo limpiezas con fenol, y se agregó NaCl a la resuspensión.
- B) Se llevaron a cabo alrededor de 6 centrifugaciones con lavados con fenol. Y un último lavado con etanol fue realizado.

- C) Se incrementó volumen con TE (100 μ l) y los tubos fueron llevados al aparato Termomixer donde fueron sometidos a 50° y 550 rpm.
- D) Los productos fueron cargados en un gel de agarosa al 1% (50 ml) en TAE 1X.
- E) A través de la electroforesis pudo observarse una mejor resolución, sin embargo se siguió observando la impureza del ADN.

5.5 Protocolo establecido para extracción de ADN por lisis química

Se estableció un protocolo para la extracción de ADN de queso y leche: Homogeneización con solución de PBS y filtrado de la muestra homogeneizada (ambos pasos para muestras de queso fresco). Se centrifugó a pulso durante algunos segundos (queso) a fin de separar sólidos y empastillar células. En el caso de la leche 1.5 μ l son centrifugados a 12,000 rpm durante 10-12 minutos para el mismo fin. Se decantó el líquido y adición de 250 μ l de PBS para resuspensión de pastilla y adición del reactivo DNAzol (1 ml por 250 μ l de muestra). Vórtex (1 minuto) y posteriormente centrifugación 12,000 rpm 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se adicionó 1 volumen de fenol. Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos y se retiró el fenol. Se adicionó 1 volumen de isopropanol o 2 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el ADN adicionando NaCl 0.003 M. Las muestras se almacenaron en el congelador durante 10 minutos o durante el resto del día y posteriormente se llevó a cabo una centrifugación a 12,000 rpm por 10 minutos (Empastillado). Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla para resuspender en TE (Tris EDTA).

Paralelamente se llevó a cabo otra metodología para la extracción de ADN, basada en la digestión enzimática, la cual consistió en los siguientes pasos: Se pesaron 2 gramos de queso y se midieron 2 ml de leche; El queso se trituró en mortero y se homogeneizó con solución PBS 1X, 2:1; Se tomaron 2 ml de la solución y se filtraron. Se empastillaron los 2 ml de leche o del homogenizado de queso (12,000 rpm 10 minutos). Se decantó la fase líquida (dejando 100 μ l) y se eliminó la capa superior de grasa con una punta de pipeta. Se agregaron 200 μ l de Buffer TEN (30 mM Tris HCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl) y 400 μ l de solución de lisis celular (SDS, Proteinasa K). Las muestras se incubaron a 37°C durante 24 horas en agitación continua para posteriormente centrifugarlas a 10,000 rpm 10 minutos retirando el sobrenadante. Se agregó 1 volumen de Fenol:cloroformo:alcohol

isoamílico (25:24:1) y se mezcló invirtiendo el tubo 2 a 4 veces. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, se retiró la fase líquida superior y se le repitió un lavado con fenol. A la pastilla resultante se le agregó Isopropanol (1 volumen), y las muestras se almacenaron en el congelador durante 1 hora. Las muestras se centrifugaron para empastillar el ADN y se decantó el líquido. La pastilla fue lavada con etanol al 70% 2 veces y se dejaron secar los tubos invertidos. Finalmente se resuspendió en 80 µl de T.E.

Los procedimientos llevados a cabo para cada una de las tres técnicas evaluadas y que permitieron aislar el ADN directamente de la muestra se explican a continuación:

5.6 Extracción por lisis enzimática

Brevemente, dos gramos de queso se homogenizaron con solución PBS 1X, 2:1. Se dejó sedimentar por un minuto y se tomaron dos ml de la solución para posteriormente filtrarla con la ayuda de fibra de algodón colocada en tubos de 200 µl cuyo extremo se perforó para captar el líquido en tubos de 2 ml. La leche y el líquido proveniente del queso se empastillaron en una centrífuga Eppendorf 5415 C a 12,000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante fue descartado casi en su totalidad, dejando aproximadamente 100 µl en el tubo. La capa superior de grasa resultante se eliminó con la ayuda de una punta de pipeta. Se agregaron 200 µl de Buffer TEN (30 mM Tris HCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl) y 400 µl de solución de lisis celular [SDS al 1%, Proteinasa K (20 mg/ml 10 Mm Tris HCL Ph 8)]. Se incubaron a 37°C durante 24 horas en agitación continua. Se centrifugaron a 10,000 rpm 10 minutos y se retiró el sobrenadante. Se agregó 1 volumen de Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, se retiró la fase líquida superior y se repitió la extracción con fenol, y luego a la fase líquida restante se le agregó un volumen de Cloroformo. Nuevamente se centrifugó a 10000 rpm 10 minutos y se agregó Isopropanol (1 volumen), y las muestras se almacenaron en el congelador durante 1 hora. Se centrifugó para empastillar el ADN y se decantó el líquido cuidadosamente, se lavó la pastilla con etanol al 70% 2 veces y se dejaron secar los tubos invertidos para posteriormente resuspender en 100 µl de buffer TE.

5.7 Extracción por combinación de las dos técnicas (Lisis química-Lisis enzimática)

Se realizó el primer paso utilizado para la extracción con DNAzol para ambas muestras (homogenización, precipitación y vórtex), pero seguidamente se llevó a cabo una mezcla con la solución de lisis enzimática e inmediatamente las muestras se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C en agitación continua. Se centrifugaron a 10,000 rpm 10 minutos y se retiró el sobrenadante. Se agregó 1 volumen de Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, se retiró la fase líquida superior y se repitió la extracción con fenol, y luego a la fase líquida restante se le agregó un volumen de Cloroformo. Nuevamente se centrifugó a 10000 rpm 10 minutos y se agregó Isopropanol (1 volumen), y las muestras se almacenaron en el congelador durante 1 hora. Se empastilló el ADN por centrifugación, se decantó el líquido y se lavó la pastilla con etanol al 70% 2 veces. Finalmente se dejaron secar los tubos invertidos para resuspender la pastilla en 100 µl de buffer TE y proceder a su almacenaje.

5.8 Evaluación de la cantidad y pureza del ADN extraído

Para poder evaluar cada una de las técnicas de extracción de ADN en leche y queso fresco y determinar la técnica más efectiva, se evaluaron tres aspectos importantes aplicables para todos los métodos de extracción en general: Cantidad y pureza.

La cuantificación permitió medir la concentración de ADN total (nanogramos de ADN por microlitro de extracto) y se llevó a cabo mediante medición con absorbancia de UV a 260 nm (Sambrook *et al.* 1989) utilizando un espectrofotómetro calibrado Eppendorf. Se llevaron a cabo tres repeticiones para cada muestra y para cada una de las técnicas. La cantidad de ADN total (nanogramos de ADN/mililitro de muestra) se calculó posteriormente.

La pureza del ADN genómico de las muestras se evaluó con base en el cociente de la absorbancia UV 260/280 nm. Se realizó un análisis de electroforesis de los productos de extracción de ADN en geles de agarosa al 1%. Seis microlitros del producto de extracción se mezclaron con 1 microlitro de buffer de carga 6X Azul para cargar en el gel, el cual se corrió en TAE 1X por 40 minutos a 140V. Las imágenes digitales de los geles fueron

visualizadas en un trasiluminador de radiación Ultravioleta para reconocer la presencia del ADN y evaluar su integridad y pureza.

5.9 Amplificación de los ARNr de diferentes grupos bacterianos

Para la amplificación de los fragmentos bacterianos del gen de ARN ribosomal 16S, se utilizaron los oligonucleótidos SRV3-1 (5' P-CGG YCC AGA CTC CTA CGG G 3') y SRV3-2 (5'-TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3') comprendiendo la región variable 3 (Lee *et al.* 1996). Se utilizaron 100 ng del ADN total obtenido en todas las reacciones de PCR, MgCl₂ 1.5 mM, Buffer 10X en concentración final 1X, dNTP's 500 µM, 10 µM de cada oligonucleótido (SRV3-1 y SRV3-2) y 2.5 Unidades de Taq Polimerasa. Las condiciones de la reacción fueron: 1 ciclo por 5 minutos a 95°C seguido por 25 ciclos a 3 temperaturas (T1 96°C por 0.30 min, T2 50°C por 0.30 min y 65°C por 4 min), un ciclo a 65°C durante 7 minutos y un último ciclo a 4°C durante 15 minutos.

6. RESULTADOS

6.1 Producción láctea (PL)

Los resultados mostraron que del día 1 al día 15 no se encontraron cambios significativos ($p < 0.05$) respecto a la PL en ambos grupos excepto en el día 11, sin embargo a partir del día 16 se observaron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los grupos. El grupo 2 (vacas alimentadas con nopal) logró mayor producción con respecto al grupo 1 con tendencia a incrementar con el aumento de días. La diferencia de PL para el día 29 de evaluación fue de 1.8 litros más para el grupo 2 (Figura 1).

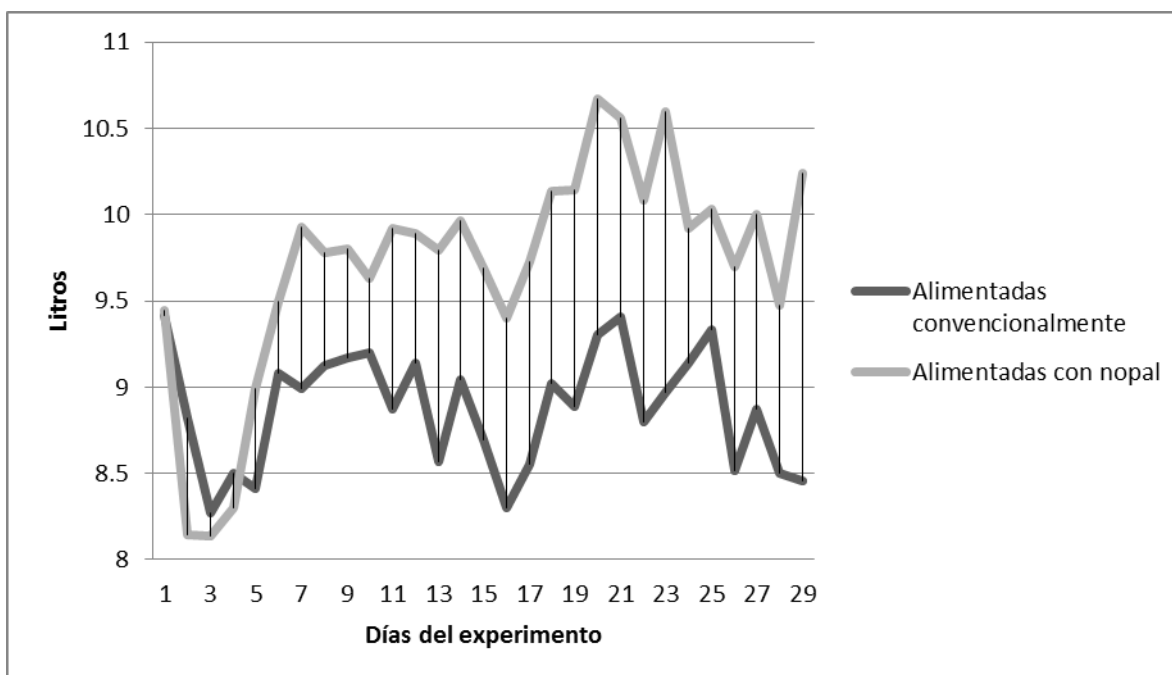


Figura 1. Tendencia de la producción láctea (medias de mínimos cuadrados) en ambos grupos (vacas alimentadas convencionalmente y vacas complementadas con nopal).

Los resultados que determinaron incremento en la PL concuerdan con López *et al.* (2007), Pérez *et al.* (2010) y Ortiz *et al.* (2012), quienes determinaron que la utilización de *Opuntia ficus-indica* como complemento en la dieta para bovinos productores de leche incrementa la producción.

Este incremento se atribuye al aumento de las concentraciones totales de Ácidos Grasos Volátiles (AGVs), puesto que se ha demostrado que el nopal aporta altas cantidades de carbohidratos, material celulolítico y hemicelulítico, mismos que mejoran tanto la fermentación vía ruminal y el proceso de glicolisis, produciendo un incremento de AGVs y de adenosina trifosfato (ATP), productos que afectan positivamente la PL (Nefzaoul, 2003; Relling y Mاتيoli, 2003).

López (2010), determinó que el uso de *Opuntia ficus-indica* con niveles de inclusión de 18 y 27 kg por día de materia fresca como complemento de la dieta, produjeron de 21 a 24 kg por día de leche, respectivamente. Sin embargo, cuando el consumo de nopal se incrementa por arriba de 27 kg la PL decrece, lo que sugiere que el incremento de inclusión de nopal en la dieta para bovinos productores de leche tiene una relación inversa con respecto a la PL. Al respecto González *et al.* (1998), determinaron que a mayor proporción de nopal en la dieta disminuye la PL en el ganado Holstein, por lo que recomiendan complementar las dietas con heno de alfalfa, avena o sorgo. Respectivamente Azocar (2003) establece que al suministrar alfalfa y complementar con 34% de *Opuntia ficus-indica* a la dieta de los bovinos productores de leche se estimula la PL, atribuyendo dicho efecto al contenido de agua del nopal.

Mazuca *et al.* (1995) y Romero *et al.* (2005), determinaron que al incrementar la inclusión de nopal en la dieta de bovinos disminuye el tiempo de rumia, lo cual puede tener un efecto negativo sobre la digestibilidad de la dieta y la absorción de ácidos grasos volátiles (AGV) (Bach, 2005). Luna y Urrutia (2008), atribuyen el detrimento en la PL debido a que al incluir cantidades mayores de nopal en la dieta se produce un efecto laxante, debido a las

relaciones calcio/fósforo (2.01/0.11 %). Por lo que probablemente dichos factores provoquen un desequilibrio en la absorción de nutrientes y por tanto la PL se ve afectada.

En un estudio reciente llevado a cabo por Mendoza (2012), se evaluaron cambios en la PL con inclusión de diferentes cantidades de nopal en la dieta y se encontró que la inclusión de 10 a 20 kg por día de nopal en materia fresca por día, como complemento de la dieta durante la época de estiaje, las vacas Holstein incrementan la PL, ello comparado con una inclusión de 0.0 y 30 kg por día de *Opuntia ficus-indica*. Por lo que el incluir entre 10 y 20 kg de nopal en la dieta de ganado bovino productor de leche permitiría a los productores de las zonas rurales con estiaje prolongado mantener la productividad de sus hatos más allá de la época de lluvias, donde existe una mayor disponibilidad de forraje. Puesto que el nopal (como fuente de energía) al aportar azúcares solubles y combinarse con el conjunto de los nutrientes del resto de los insumos de la dieta, mejora la fermentación ruminal, con esto pudiera originar a una mayor proporción de ácidos grasos volátiles (AGV) y energía para la síntesis de la leche (Ramírez *et al.* 2007).

6.2 Análisis bromatológico de la leche.

Los resultados respecto al análisis bromatológico mostraron que las características nutritivas de la leche son iguales estadísticamente entre los grupos (Cuadro 8).

Cuadro 7. Análisis bromatológico de la leche de acuerdo con el tratamiento

COMPONENTE	LECHE (VACAS ALIMENTADAS CONVENCIONALMENTE)	LECHE (VACAS COMPLEMENTADAS CON NOPAL)
COLOR	Blanco amarillento	Blanco amarillento
GRASA (%)	3.8916 ^a	3.9788 ^a
PROTEINA (%)	3.0872 ^a	3.1920 ^a
LACTOSA (%)	4.4024 ^a	4.5712 ^a
SÓLIDOS NO GRASOS (%)	8.1180 ^a	8.3952 ^a

Los valores con la misma letra dentro de la misma fila representan valores sin cambios significativos ($P < 0.05$).

La composición de la leche de los bovinos contiene del 77 al 80% de agua, el resto corresponden a sólidos totales, mismos que están compuestos entre 3.0 y 3.5% de grasa, 3.0 a 3.5% de proteína y 4.0 a 6.0 % de carbohidratos. La composición de estos elementos son afectados por factores endógenos (raza, biotipo, edad, etapa de lactancia, estado nutricional interno) y exógenos, los cuales determinan su constitución química así como sus características físicas. Sin embargo, estos factores son poco controlables, aun y cuando en el caso de la nutrición y alimentación sea factible lograr efectos significativos en la producción como en la calidad de la leche, puesto que tanto la calidad y la producción láctea dependen de la disposición de nutrientes en la circulación sanguínea (Manterola, 2012). Por tanto, al no encontrar diferencias estadísticamente significativas en la calidad química de la leche se puede deber a que no se alteraron las dietas respecto a incrementar o disminuir algún nutriente específico o la relación forraje/concentrado, ya que ambas raciones fueron balanceadas de manera que ambos grupos estuvieran equilibrados respecto al aspecto nutricional.

6.3 Análisis de la calidad microbiológica de la leche y queso fresco

En cuanto a la calidad microbiológica de la leche, se encontraron cambios en el grupo de mesófilos aerobios, donde se observó una disminución de $0.5974 \log^{-10}$ de UFC/ml, tanto en muestras de leche como en queso en vacas del grupo 2. Sin embargo en las muestras de queso se observó una disminución de $0.3152 \log^{-10}$ de UFC/ml, a una $p < 0.07$ (Cuadro 9).

Cuadro 8. Medias de mínimos cuadrados para las unidades formadoras de colonias (UFC) de mesófilos aerobios en leche y subproductos lácteos de acuerdo con la alimentación de las vacas

<i>Producto</i>	DIETA CONVENCIONAL		DIETA COMPLEMENTADA CON NOPAL	
	UFC	Error estándar	UFC	Error estándar
Leche	3.0769 ^a	0.1325	2.4794 ^b	0.1299
Queso	3.6160 ^a	0.1218	3.3008 ^{b*}	0.1218

^{a,b} = diferencias estadísticas ($p < 0.05$) dentro de fila. ^{b*} = diferencias estadísticas ($p < 0.07$)

Desde tiempos antiguos existió la creencia de que la suplementación con *Opuntia* incrementa no solo la producción de leche, sino que mejora la calidad de la mantequilla en términos de consistencia, y vida de almacén, así como también de impartir un atractivo

color “dorado” al producto final (Griffiths, 1934; D’Arces, 1941; Aguilar, 1946; Blanco, 1958; Calvino, 1952; González *et al.* 1998). Sin embargo, dicha característica puede atribuirse a los cambios en las poblaciones microbianas de leche y por tanto de subproductos, dentro de los cuales los factores atribuibles a dichos cambios son temperatura, acidez, humedad, antibióticos, agentes desinfectantes utilizados durante el oreño, manufactura y transporte y antibióticos (Celis y Juárez, 2009).

En este estudio no se llevó a cabo un análisis de la acidez de la leche y queso, sin embargo el detrimento en el número de UFC mesófilas aerobias pudo haberse debido a un cambio de poblaciones microbianas donde hubo predominancia de bacterias ácido-lácticas (BAL), recordando que éstas tienen acción conservadora debido a la inhibición de un gran número de microorganismos patógenos y dañinos por varios productos finales de la fermentación, como lo son el ácido láctico y acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y productos secundarios (Ramírez *et al.* 2011). Por otra parte, la acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos por las BAL, reduce el pH del ambiente con un efecto inhibitorio de bacterias Gram-positivas y Gram negativas. En ese sentido, la forma no disociada del ácido láctico puede penetrar la pared celular microbiana, donde el pH más alto del contenido celular promueve la disociación, dando lugar a la liberación de iones hidrógeno y el anión correspondiente; de modo que, ambos iones interfieren en el metabolismo e inhiben el crecimiento celular (Vázquez *et al.* 2009). Cuando el oxígeno está presente, las BAL pueden producir peróxido de Hidrógeno el cual genera radicales hidroxilo que causan peroxidación a los lípidos de la membrana y susceptibilidad de la célula microbiana de muchos microorganismos. Algunas BAL heterofermentativas producen bióxido de Carbono, el cual promueve un ambiente anaeróbico, reduce el pH y puede ayudar a destruir la integridad de la pared celular microbiana (Ouwehand, 1998). Así mismo, el diacetilo es producido por BAL que fermentan el citrato y es sintetizado en el metabolismo intermediario del piruvato y se le ha demostrado actividad antimicrobiana para levaduras, bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Con lo anteriormente expuesto, la disminución de microorganismos que afectan la calidad sanitaria de la leche se puede atribuir a los cambios en las poblaciones microbianas de la

leche cruda. Un análisis posterior de dichas poblaciones permitirá identificar los géneros y especies involucradas.

En cuanto a las unidades formadoras de colonias de microorganismos coliformes no se encontraron cambios estadísticamente significativos ($p < 0.05$) entre grupos a pesar de que las tendencias mostraron de igual manera disminución de microorganismos en la leche de vacas complementadas con nopal, el no encontrarse diferencias estadísticamente significativas pudo ser consecuencia de la heterogeneidad en los resultados de los conteos, ya que en algunas muestras tanto de leche como de queso, de ambos grupos, no se encontraron unidades formadoras de colonias (Cuadro 10), fenómeno que pudo ser consecuencia al buen manejo higiénico-sanitario que se llevó a cabo al momento de la ordeña de la ubre (desinfección con yodo) en este estudio, recordando que los microorganismos del género de los coliformes, se pueden encontrar en la leche como consecuencia de una mala limpieza de la ubre por parte del ordeñador.

Cuadro 9. Medias de mínimos cuadrados para las unidades formadoras de colonias (UFC) de coliformes totales en leche y subproductos lácteos de acuerdo con la alimentación de las vacas

Producto	DIETA CONVENCIONAL		DIETA COMPLEMENTADA CON NOPAL	
	UFC	Error estándar	UFC	Error estándar
Leche	0.3449 ^a	0.2885	0.2579 ^a	0.2798
Queso	1.2216 ^a	0.2215	0.7896 ^a	0.2215

^{a,b} = diferencias estadísticas ($p < 0.05$) dentro de fila.

6.4 Extracción de ADN de leche y queso fresco

6.4.1 Comparación de los tres métodos de extracción de ADN.

Se compararon el rendimiento, pureza e integridad del ADN obtenido mediante los tres métodos utilizados para la extracción de muestras lácteas. En cuanto al rendimiento de ADN, en el caso de la muestra de leche se observó mayor producción con los métodos enzimático y combinado. Respecto a la pureza se obtuvieron resultados mayores en el ADN extraído con el método combinado para ambas muestras, aunque en el caso de la muestra de queso fueron estadísticamente diferentes los tres métodos (Cuadro 11).

Cuadro 10. Comparación de los métodos de extracción de ADN

		DNAzol		Enzimática		Combinada	
		Promedio	Error Estándar	Promedio	Error Estándar	Promedio	Error Estándar
Leche	Producción ¹	264.44 ^a	45.94	619 ^b	43.58	495.71 ^b	52.09
	Pureza ²	1.37 ^x	0.09	1.30 ^x	0.08	1.69 ^y	0.08
Queso	Producción ¹	158 ^a	41.08	596 ^b	41.08	380 ^c	49.10
	Pureza ²	1.15 ^x	0.08	1.43 ^y	0.08	1.72 ^z	0.08

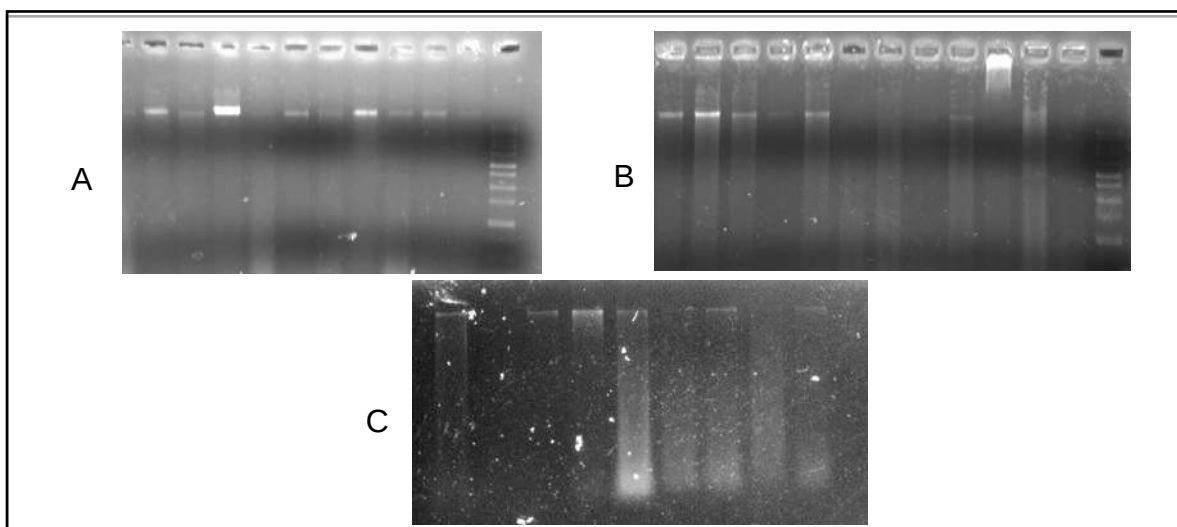
¹ Producción se indica como μg de ADN ml^{-1} de leche o mg queso ($n=10$).

² Pureza se indica como el cociente $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$

Los valores con diferente letra en las filas representan diferencias significativas entre métodos ($P<0.05$).

En lo referente a la integridad, el ADN genómico extraído se visualizó en un gel de agarosa al 1%. Se observó mayor integridad de las bandas en el método enzimático de extracción de ADN (Figura 2).

Figura 2. Electroforesis de ADN genómico extraído con los tres métodos. (A: Bandas correspondientes a ADN extraído con el método enzimático en muestras lácteas, B: con extracción utilizando el método con el producto DNAzol® y C: utilizando el método combinado).



En una investigación llevada a cabo por Psifidi *et al.* (2010), se llevó a cabo la comparación de 6 métodos para la extracción de ADN genómico de muestras lácteas y en dos de los métodos se utilizaron de manera similar a la presente investigación dos kits comerciales de extracción de ADN e igualmente se modificó la técnica prevista por los productos comerciales adicionando soluciones de lisis y agentes caotrópicos y quelantes para eliminar sustancias inhibitorias como lípidos y otros sólidos. En el mismo estudio estas soluciones prácticamente son iguales a las utilizadas en este trabajo en el método enzimático. Por tanto, el método enzimático fue eficiente, basta con una mezcla de enzimas y agentes caotrópicos para llevar a cabo la extracción sin la necesidad de implementar kits comerciales, los cuales representan gastos extras y por sí solos no son eficientes para ser utilizados como métodos de extracción para este tipo de muestras.

ambién se llevó a cabo una combinación de ambos protocolos para poder comparar cuál técnica resultaba ser la mejor. Se encontraron diferencias significativas respecto a las tres técnicas. Al comparar DNAzol y el método enzimático, el método enzimático resultó ser mejor en cuanto a cantidad de ADN aislado en muestras de leche y queso, y en cuanto a la pureza para el caso de la leche no se mostraron diferencias significativas y las cantidades fueron muy similares, sin embargo, para el caso del queso si las hubo y el ADN extraído por el método enzimático resultó más puro significativamente. Adicionalmente, comparando los dos métodos con uno más que fue el de combinar ambas técnicas se encontraron diferencias notables en los dos aspectos evaluados, a excepción de la cantidad de ADN aislado para el caso de la leche, en lo demás el método combinado resultó ser mejor para obtener una buena cantidad de ADN de muestras lácteas y además con un grado de pureza mayor.

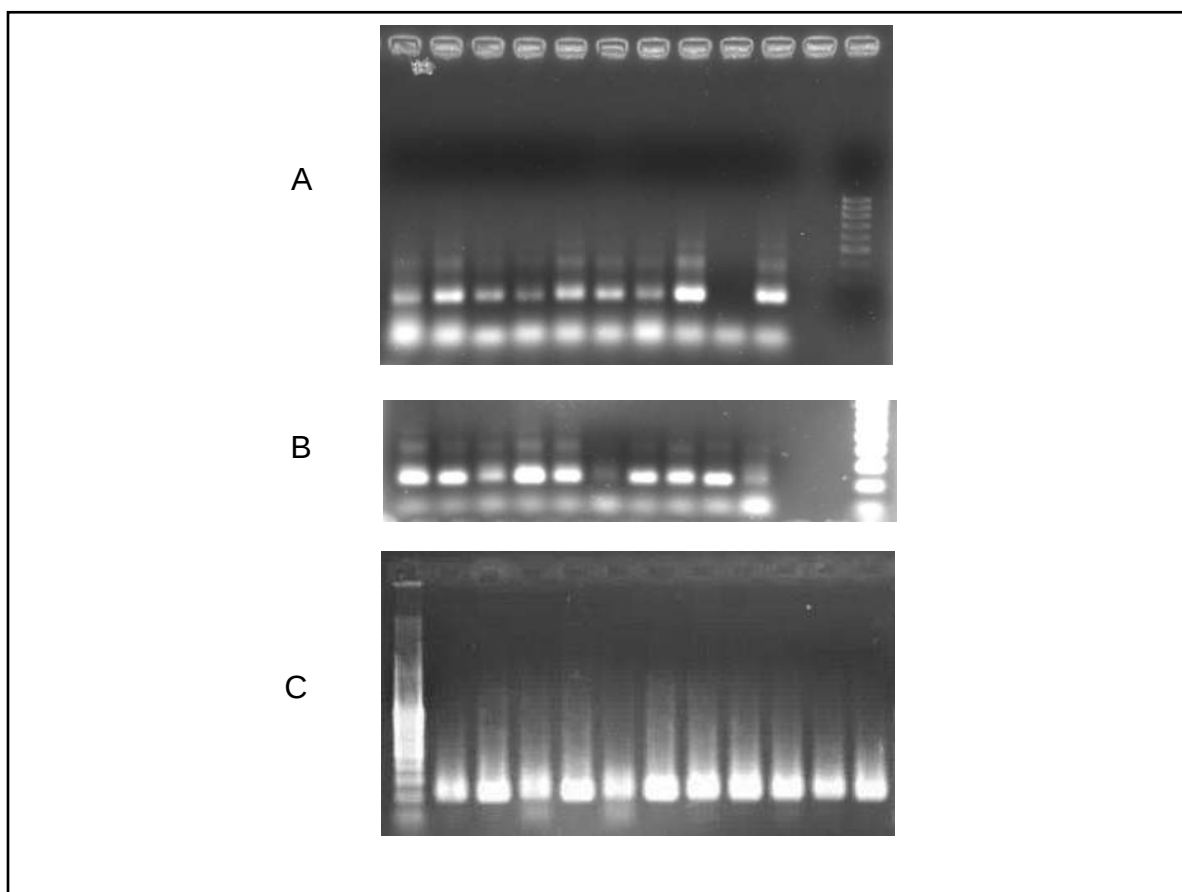
El protocolo de extracción de ADN enzimático demuestra ser eficiente para este tipo de muestras. A pesar de que lleva más tiempo llevarlo a cabo debido a que se aconseja la incubación con la solución de extracción durante 24 horas para mejores resultados, la relación costo-beneficio es más adecuada y la cantidad de ADN extraído es buena. Además

la solución de lisis ya preparada correctamente puede almacenarse en stocks bajo congelación durante meses con las debidas precauciones.

6.5 Capacidad del ADN para llevar a cabo la PCR.

Se amplificó la región variable 3 del gen de ARN ribosomal 16S procariótico. Se utilizaron las 10 muestras de leche y las 10 de queso de ambos métodos de extracción. Se observaron fragmentos de aproximadamente 200 pb, y se observaron productos inespecíficos de aproximadamente 500 pb en ambas electroforesis (Figura 3). Se observó la presencia de los fragmentos para ambos métodos tras el almacenamiento en el congelador por pocos días.

Figura 3. Electroforesis de la amplificación del ribosomal 16S procariótico de ADN genómico proveniente de las muestras de leche y queso extraído por los dos métodos de extracción más el combinado (A = enzimático, B = DNAzol y C = combinado).



7. CONCLUSIONES

7.1 El nopal como forraje

El nopal puede ser un recurso viable para la complementación de las dietas del ganado lechero en las zonas rurales del país durante la época de estiaje, ya que permite incrementar la producción de leche, mejorar la calidad tanto de la leche como del queso y no hay modificación de sus propiedades fisicoquímicas.

7.2 Técnicas de extracción de ADN de muestras lácteas.

Este estudio provee técnicas que pueden ser aplicables para la extracción de ADN genómico bacteriano de productos lácteos y se demostró que el método combinado es el mejor para el aislamiento del material genético de la microbiota en leche y queso fresco.

Se demostró la utilización del ADN extraído para la amplificación de productos del ribosomal 16S procariótico que posteriormente puede ser utilizado para realizar técnicas de biología molecular para la identificación de los microorganismos involucrados en la calidad de leche y productos lácteos o para evaluar cambios en las poblaciones microbianas en dichos productos durante procedimientos en la industria alimentaria, control sanitario e inclusive diagnóstico, entre muchas otras aplicaciones, utilizando técnicas como PCR-DGGE (Muyzer *et al.* 1993), T-RFLP (Kitts, 2001; Marsh 2000), entre otras.

Son pocos los estudios enfocados a la investigación del ecosistema microbiano en leche y en productos lácteos utilizando técnicas independientes de cultivo de biología molecular (Andriamahery *et al.* 2011), los cuales pueden ser aplicables a la microbiología alimentaria (Giannino *et al.* 2009). DGGE permite obtener información de especies a través del análisis de los productos de PCR de similar longitud pero con diferentes secuencias y está basado en la movilización diferencial en una matriz de gel de acrilamida de incrementada concentración desnaturizante (urea y formamida) (Settani *et al.* 2006). Esta técnica ha sido utilizada para caracterizar la diversidad microbiológica en numerosos ambientes lácteos (Ercolini *et al.* 2001; Cocolin *et al.* 2002; Lafarge *et al.* 2004; Ogier *et al.* 2004). Además, también se ha utilizado para seguir la dinámica microbiana durante la

manufactura y maduración de quesos tradicionales (Coppola *et al.*, 2001; Randazzo *et al.*, 2002; Flórez y Mayo, 2006).

También se ha utilizado anteriormente en el análisis de poblaciones microbianas de quesos artesanales durante su maduración (Alegría *et al.*, 2009; Casalta *et al.* 2009; Dolci *et al.* 2009). T-RFLP permite monitorear cambios en la estructura y composición de las comunidades microbianas y recientemente se ha estado investigando de manera amplia diferentes aplicaciones y metodologías sobre todo en el aspecto estadístico permitiendo a los investigadores hacer elecciones metodológicas y estadísticas apropiadas para sus estudios determinados, su mayor ventaja es la conveniencia para análisis rutinarios con altos números de muestras, su alta reproducibilidad y su alta precisión (Schutte *et al.* 2008). Ésta aplicación genera información de huella genética confiable aún de comunidades bacterianas muy complejas y provee información cuantitativa (Osborn *et al.* 2000).

La técnica de extracción de ADN combinada es aplicable para numerosos estudios de biología molecular de evaluación de comunidades bacterianas cuantitativa y cualitativamente y permitirá su aplicación para que haya más estudios de evaluación de poblaciones microbianas en la industria alimenticia respecto a productos lácteos debido a su importancia económica y nutricional.

8. BIBLIOGRAFÍA

Alegría A, Alvarez-Martín P, Sacristán N, Fernández E, Delgado S, Mayo B. 2009 Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *Int J Food Microbiol.* 136(1):44-51.

Andriamahery E., Lapointe G., Roy D., 2011. Assessment of the bacterial diversity of treated and untreated milk during cold storage by T-RFLP and PCR-DGGE methods. *Dairy Sci. & Technol.* (2011) 91:573–597.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.

Azócar, P. 2003. El nopal (*Opuntia* spp.) Como Forraje. Estudio FAO producción y protección vegetal. Pp. 169 [En línea] <http://www.fao.org/docrep/007/y2808s/y2808s0a.htm#TopOfPage> [consulta 2/03/2012].

Azócar, P. y Rojo, H. 1991. Uso de cladodios de tuna (*Opuntia ficus-indica*) como suplemento forrajero estival de cabras en lactancia en reemplazo de heno de alfalfa. *Avances en Producción Animal*, 16(1-2): 173-182.

Bach, A. 2005. Trastornos ruminales en el vacuno lechero: un enfoque práctico. XVIII Curso de Especialización FEDNA. Barcelona, España. pp. 119-139.

Ben Thlija, A. 1987. Nutritional value of several *Opuntia* species. M.Sc. thesis. 84 p.

Bonaïti C., Parayre S., Irlinger F., 2006. Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. *International Journal of Food Microbiology* 107 (2006) 171 – 179.

Bravo H., 1978. 1978. *Las cactáceas de México*. v. 1. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 743 p.

Callon, C., Delbe` s, C., Duthoit, F., Montel, M., 2006. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 172–180.

Carranza, S. J. A. 2001. Caracterización morfológica de cladodios de opuntia spp. Del campo experimental de la Uruza. U. A. CH. Tesis profesional. Chapingo. México. Pp 82.

Casalta E, Sorba JM, Aigle M, Ogier JC. 2009. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *Int J Food Microbiol.* 133(3):243-51.

Celis, M. Juárez, D. 2009. Microbiología de la leche. Seminario de Procesos Fundamentales Físico-Químicos y Microbiológicos Especialización y Maestría en Medio Ambiente Laboratorio de Química F.R. Bahía Blanca – U.T.N. pp. 13-18. [En línea] http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_micrb_09/microbiologia_leche.pdf [consulta 2/03/2012].

Cocolin L, Aggio D, Manzano M, Cantoni C & Comi G. (2002) An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *Int Dairy J* 12: 407–411.

Coppola, S., Blaiotta, G., Ercolini, D., Moschetti, G. (2001) Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheeses. *J. Appl. Microbiol.*, 90: 414-420.

Díaz, R.G., Wachter, R. C. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. Artículo de revisión Revista Latinoamericana de microbiología. Vol. 45, No. 1-2 Enero - Marzo. 2003 Abril - Junio. 2003 pp. 30 – 40

Dolci P, Barmaz A, Zenato S, Pramotton R, Alessandria V, Cocolin L, Rantsiou K, Ambrosoli R. 2009 Maturing dynamics of surface microflora in Fontina PDO cheese studied by culture-dependent and -independent methods. *J Appl Microbiol.*106(1):278-87.

Duthoit, F., Godon, J.J., Montel, M.C., 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3840– 3848.

Ercolini D., Moschetti G., Blaiotta G., Coppola S. (2001). Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Curr. Microbiol.*, 42: 199-202.

Espinosa, V., Rivera, G., y García, L. 2007. Utilidades económicas generadas por la lechería familiar. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*. Vol. 7. No. 14 p. 19-41.

Fitzgerald JR, Meaney WJ, Hartigan PJ, Smyth CJ, Kapur V (1997) Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol Infect.* 119, 261-269.

Flores, V.C.A. 2004. Los nopales y la lucha contra la desertificación. En Esparza- Frausto, G., Valdez-Cepeda y Méndez-Gallegos, S. (Editores). *El nopal: tópicos de actualidad*. pp.167-182.

García, H.L.A., Aguilar V.A., Luévano G.A. y Cabral M.A. 2005 La globalización productiva y comercial de la leche y sus derivados. *Articulación de la ganadería intensiva lechera de la Comarca Lagunera*. Plaza y Valdés editores, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, México.

Giannino, M.L., M. Marzotto, F. Dellaglio and M. Feligini, 2009. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.*, 130: 188-195.

González, C.F. G., Llamas I. y Bonilla, J. A. 1998. Utilización del nopal como sustituto parcial de alfalfa en dietas para vacas lecheras. *Tec. Pecuaria en México*.

Kitts, CL. 2001. Terminal Restriction Fragment Patterns –a Tool for Comparing Microbial Communities and Assesing Community Dynamics. *Curr. Iss. Int. Microbiol.* 2:17-25

Lafarge, V., Ogier, J.C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.Y., Gruss, A. & Delacroix-Buchet, A. 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl. Environ Microbiol*, 70(9), 5644-5650.

Lee, D.-H., Zo, Y.-G., Kim S.-J. 1996. Non-radiative method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single strand conformational polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3112-3120.

López, G. J. 2010. Uso Y Manejo Del Nopal Forrajero En El Noreste De México. IX Simposium-Taller Nacional y II Internacional “Producción y Aprovechamiento del Nopal y Maguey” Campus de Ciencias Agropecuarias, UANL. Escobedo, Nuevo León, México.

López, J.J., Fuentes, J.M. y Rodríguez A. (2007). Producción y uso de *Opuntia* como forraje en el centro-norte de México. Estudio de la FAO. [En línea] <http://www.fao.org/docrep/007/y2808s/y2808s08.htm#TopOfPage> [Consulta 1/10/2011].

Luna, V., J y J. Urrutia M. 2008. Nopal para forraje en el Altiplano Potosino. Folleto para productores No 49. INIFAP-CIRNE- Campo Experimental San Luis San Luis Potosí, S.L.P. México 31p.

Manterola, B. H. 2012. Manejo nutricional y composición de la leche. [En línea] www.agronomia.uchile.cl/u/download.jsp?document../pdf [consulta 2/07/2012].

Marroquín, J. S. 1964. Estudio ecológico y dasonómico de las zonas áridas del norte de México. INIF. Publicación especial. México,DF. Pp 166.

Marsh, T.L., Saxman, P., Cole, J., and Tiedje, J.M. 2000. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3616-21.

Mazuca, N. R. M., Romero-Paredes, R. J., Cano, R. P. 1995. Utilización del nopal (*Opuntia* spp) en dietas para las cabras lactantes. I. Digestibilidad, producción de leche. Congreso internacional en producción caprina. X Reunión nacional sobre caprinocultura. Zacatecas, México.

Medina, M.R., Tirado G.E., Mejía H. I., Camarillo S.I. y Cruz, V.C. 2006. Digestibilidad *in situ* de dietas con harina de nopal deshidratado conteniendo un preparado de enzimas fibrolíticas exógenas. Pesq. Agropec. Bras, Brasília. 41:7. 1173-1177.

Mendoza, J.L. 2012. Efecto de diferentes niveles de inclusión de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la dieta de vacas Holstein sobre la producción de leche en época de estiaje. Tesis de licenciatura F.M.V.Z., U.M.S.N.H. Michoacán, México. Pp 38.

Mendoza, O.J.L. 2015. Producción de gas *in vitro* y modificación cualitativa de las poblaciones microbianas del rumen por efecto del nopal (*Opuntia ficus-indica*) como complemento de la dieta de vacas Holstein. Tesis de Maestría. Facultad de Agrobiología-UMSNH. Morelia, Michoacán. P 4.

Mondragón-Jacobo, C. 2003. El Nopal (*Opuntia* spp) como forraje. Estudio FAO Producción y Protección Vegetal.

Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.

Nefzaoui, A. y Ben Salem, H. 2003 forraje estratégico y herramienta eficiente para combatir la desertificación en la región wana. Estudio de la FAO. [*En línea*] <http://www.fao.org/docrep/007/y2808s/y2808s0c.htm#TopOfPage> [consulta 12/05/2012].

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA.

Ogier, J.C., V. Lafarge, V. Girard, A. Rault and V. Maladen *et al.*, 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied Environ. Microbiol.*, 70: 5628-5643.

Ortega, P.R., Murillo, A.B., Espinoza, V.J.L., Palacios, E.A., Carreón, P.L., Palacios, M.E., and Plascencia, J.A. 2010. Chemical composition and proportion of precursors of rumenic and vaccenic acids in alternative forages for the feeding of ruminants in arid ecosystems. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12: 33 – 45. Universidad Autónoma de Yucatán. México.

Ortiz R.R., Pérez S. R.E., García S. P.A., Gómez R. B. y Valdez A. J.J (2010) Producción y calidad microbiológica de la leche cruda y del queso fresco provenientes de vacas Holstein bajo una dieta complementada con nopal (*Opuntia ficus-indica*). [*En línea*].

<http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/nutricion/articulos/produccion-leche-provenientes-vacas-t3072/141-p0.htm> consulta [20/08/2011].

Ortiz, R. R., Valdez, A. J. J., Gómez, R. B., López, M. J., Chávez, M. M. P., García, S. P. A y Pérez, S. R. E. 2012. Yield and microbiological quality of raw milk and fresh cheese obtained from holstein cows receiving a diet supplemented with nopal (*Opuntia ficus indica*). African Journal of Microbiology Research Vol. 6 pp. 3409-3414.

Osborn AM, Moore ER, Timmis KN (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. Environ Microbiol 2:39–50.

Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial components from acid lactic bacteria. Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects. (S. Salminen y A. Von Wright, eds.) 2nd edition. Pp. 139-160. Marcel Dekker Inc. New York USA.

Parayre, S., Falentin, H., Madec, M., Sivieri, K., Le Dizes, A., Sohier, D., Lortal, S., 2007. Easy DNA extraction and optimisation of PCR-temporal temperature gel electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. J. Microbiol. Methods 69, 431–441.

Pérez S.R.E. García S.P.A. Ángel P.M.E. Valdez J.J. Ramos B. Ortiz R.R. y Ramírez G. 2010. Producción de la leche provenientes de vacas Holstein bajo una dieta complementada con nopal (*Opuntia ficus-indica*). Morelia Michoacán, México.

Psifidi A., Dovas C.I., Banos G., 2010. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. Molecular and Cellular Probes 24 93-98.

Ramírez J.C., Rosas P., Velázquez M.Y., Ulloa J.A., Arce F. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en los alimentos y sus efectos en la salud. Revista Fuente, Año 2. No. 7. Universidad Autónoma de Nayarit. [En línea]. <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdfconsulta> [1/09/2014].

Ramírez T., H. M.; J. A. Reyes A., J.M. Pinos R. y J. R. Aguirre R. 2007. Efecto de la especie y madurez sobre el contenido de nutrientes en cladodios de nopal. Agrociencia. 41(6):619-626.

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.

Relling, A. y Mattioli G. 2003. Fisiología Digestiva Y Metabólica De Los Rumiantes. Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.L.P.

Reynolds, S.; Arias, E. 2003. El nopal (*Opuntia* spp.) Como Forraje. Estudio FAO producción y protección vegetal. [En línea] <http://www.fao.org/docrep/007/y2808s/y2808s04.htm#TopOfPage>. [consulta 21/05/2012].

Reveles, H.M., Flores, O. M., Blanco, M. F. y Valdez, C. R. 2010. El Manejo Del Nopal Forrajero En La Producción Del Ganado Bovino. VIII Simposium-Taller Nacional y 1er Internacional “Producción y Aprovechamiento del Nopal”. RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial No. 5. ISSN 1870-0160.

Robinson, R.K. 2002. Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products. John Wiley and Sons Inc. New York. ISBN 0-471-38596-4. pp. 39-50.

Romero, P.R.J.I., Ramírez, L.R.G., Mazuca, N.R.M., y Cano, R.P. 2005. Utilización del nopal (*Opuntia megacantha*) en sustitución de alfalfa en dieta para cabras lactantes. Consumo y rumia. XVII Semana Internacional de Agronomía. Universidad de Juárez del Estado de Durango. Venecia Durango, México. pp. 342-346.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.

Schutte UM, Abdo Z, Bent SJ, Shyu C, Williams CJ, Pierson JD, Forney LJ (2008) Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. Appl Microbiol Biotechnol 80:365–380.

Settani L, Valmorri S, Douwe van Sinderen, Suzzi G, Paparella A, Corsetti A, Combination of Multiplex PCR and PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis for Monitoring Common Sourdough-Associated *Lactobacillus* Species. Appl Environ Microbiol. 2006 May; 72(5): 3793–3796. doi: 10.1128/AEM.72.5.3793-3796.2006.

Shoop, M.C., Alford, E.J. y Mayland, H.F. 1977. Plains prickly pear is good for cattle. Journal of Range Management, 30: 12-17.

Spreer, E. 1998. Milk and dairy product technology. Marcel Dekker Inc. New York, USA. ISBN 0-8247-0094-5. 475 p.

Sudzuki Hills, F. 1995. Anatomy and morphology. p.28-35, En: G. Barbera, P. Inglese & E. Pimienta B. (eds) Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO Plant Production and Protection Paper, 132.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596-1599.

Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I., Lozo, J., 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int. J. Food. Microbiol.* 112, 230–235.

Van Hylckama Vlieg, J.E., Rademaker, J.L., Bachmann, H., Molenaar, D., Kelly, W.J., Siezenm, R.J., 2006. Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 183–190.

Vázquez, S.M., Suárez, H. y Zapata, S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición.* 36(1):64-71.

Villegas G, Vargas Y, Gonzalez N, Aguilera F, Gutierrez E., Bravo A, Cajero M, Baizabal VM, Valdez JJ. (2013) Evaluation of DNA extraction methods of rumen microbial populations. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29:301–307

Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Intl. Dairy J.* 12, 91–109.