

Identificación genética de bacterias ácido lácticas nativas en leche cruda de vaca y queso Poro artesanal

Genetic identification of native lactic acid bacteria in raw cow's milk and artisanal Poro cheese

J. Ulises González-de la Cruz¹; J. Jessica J. Rodríguez-Palma¹, Karla S. Escalante-Herrera²; Lázaro de la Torre Gutiérrez¹; Rosalva Pérez-Morales³; Ma. Concepción de la Cruz-Leyva^{1*}

1 Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica Multidisciplinaria de los Ríos, Carretera Tenosique-Estapilla km 1, 86904, Tenosique Tabasco. México.

2 Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación del SISAL Depto. Manejo de Zonas Costeras, Sisal Puerto de Abrigo s/n CP 97356, Sisal, Yucatán. México.

3 Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46, Col. La Victoria. CP 83304. Hermosillo, Sonora. México.

*Autor corresponsal: concepcion.delacruz@ujat.mx (M. C. de la Cruz-Leyva).

ID ORCID de los autores

J.U. González-de la Cruz  <http://orcid.org/0000-0002-2602-3513>

J.J. Rodríguez-Palma  <http://orcid.org/0000-0001-5769-9391>

K.S. Escalante-Herrera  <http://orcid.org/0000-0002-1828-8677>

L. de la Torre Gutiérrez  <http://orcid.org/0000-0002-8075-4157>

R. Pérez-Morales  <http://orcid.org/0000-0001-5384-3149>

M. C. de la Cruz-Leyva  <http://orcid.org/0000-0003-4063-9098>

RESUMEN

El sabor y aroma de los quesos se debe a la diversidad de compuestos producidos por los microorganismos, que actúan durante el cuajado de la leche y maduración de los quesos. El objetivo aquí fue, identificar bacterias ácido lácticas en leche cruda de vaca y el queso Poro artesanal que se elabora en Tabasco, México. El aislamiento de las bacterias lácticas (BAL) se realizó sobre agar MRS, LBS y M17. Las cepas aisladas fueron caracterizadas por morfología, tinción de Gram, pruebas bioquímicas y crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) y pH. La identificación genética inició con la extracción del ADN, amplificación del gen ARN ribosomal 16S con cebadores universales para bacterias. Las amplificaciones resultantes fueron secuenciadas en un laboratorio externo. Se identificaron 31 BAL, donde se observó *Lactobacillus rhamnosus* (38,71%), *Lactobacillus fermentum* (29,03%), *Lactobacillus plantarum* (6,45%) en muestras de leche y queso. También se identificó *Enterococcus durans* (6,45%) en leche y *Lactobacillus farciminis* (3,23%) en queso Poro. Todas reportadas por sus características biotecnológicas, tal como cultivos iniciadores. Estos resultados serán la base para formular y estabilizar un cultivo iniciador, que pueda ser utilizado en la elaboración del queso Poro con leche pasteurizada.

Palabras clave: ADN; bacterias ácido lácticas; queso Poro; artesanal.

ABSTRACT

The flavor and aroma of the cheeses is due to the diversity of compounds produced by the microorganisms, which act during the curdling of the milk and the maturation of the cheeses. The objective here was to identify lactic acid bacteria in raw cow's milk and the artisan Poro cheese that is made in Tabasco, Mexico. The isolation of lactic acid bacteria (LAB) was performed on MRS, LBS and M17 agar. The isolated strains were characterized by morphology, Gram staining, biochemical tests and growth at different concentrations of sodium chloride (NaCl) and pH. Genetic identification started with DNA extraction, amplification of the 16S ribosomal RNA gene with universal primers for bacteria. The resulting amplifications were sequenced in an external laboratory. 31 BAL were identified, where *Lactobacillus rhamnosus* (38.71%), *Lactobacillus fermentum* (29.03%), *Lactobacillus plantarum* (6.45%) were observed in milk and cheese samples. It was also identified *Enterococcus durans* (6.45%) in milk and *Lactobacillus farciminis* (3.23%) in Poro cheese. All of them were reported for their biotechnological characteristics, such as starter cultures. These results will be the basis for formulating and stabilizing a starter culture, which can be used in the production of Poro cheese with pasteurized milk.

Keywords: DNA; lactic acid bacteria; Poro cheese; artisanal.

Recibido: 08-01-2021.
Aceptado: 13-02-2021.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

INTRODUCCIÓN

La leche sin pasteurizar y los quesos frescos elaborados con leche cruda no son recomendables para su consumo, porque pueden estar contaminados con microorganismos patógenos que proliferan influenciados por su excelente composición nutritiva; mismos que al ser consumidos pueden afectar la salud de las personas (Nero & de Carvalho, 2019).

Sin embargo, los productos lácteos también contienen bacterias ácido-lácticas (BAL) que son benéficas para las personas. Estas tienen forma de cocos o bacilos, Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, aerotolerantes, oxidasa, catalasa y carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico, como producto principal de la fermentación de carbohidratos (Vásquez et al., 2009). Estas bacterias tienen la habilidad de crecer en un amplio rango de pH entre 3,2 a 9,6 (ácido tolerantes), temperaturas mayores a 45 °C (termorresistentes) y capaces de sobrevivir de forma natural en ambientes extremos, donde otras bacterias no pueden (Carr et al., 2002).

Entre las BAL se tienen: *Lactobacillus casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei* subsp. *paracasei*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*, entre otras (Ramírez et al., 2011). Poseen propiedades probióticas y producen diversos metabolitos como: bacteriocinas, ácidos orgánicos, etanol, aldehídos, cetonas, ésteres, diacetilo, benzoato, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), dióxido de carbono (CO₂), entre otros (Agudelo et al., 2015; De Filippis et al., 2016). A pesar de que, la leche bronca y los quesos frescos elaborados con leche sin pasteurizar pueden causar enfermedades alimentarias como se mencionó antes, hay una considerable proporción de personas que los prefieren (Yoon, Lee y Choi, 2016). Porque refieren que poseen un sabor intenso y agradable al paladar; este perfil de sabor es desarrollado por la diversidad microbiana nativa presente y que al pasteurizar la leche se

elimina (Montel et al., 2014). Ejemplo de ello, es el queso Poro Balancán originario del estado de Tabasco, México (marca colectiva número 1271541 en el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, México). El queso Poro Balancán se elabora con prácticas artesanales desde hace más 66 años, a partir de la leche sin pasteurizar e inoculado con suero extraído de 24 h como cultivo iniciador; por lo que, no se garantiza su inocuidad. Este queso posee textura con poros y ligeramente en capas, aroma intenso (ácido propiónico, ácido acético, diacetilo, CO₂, entre otros), sabor ácido y salado. Al final del proceso de elaboración, el queso se almacena por 7 a 8 días a temperatura ambiente (Villanueva-Carvajal et al., 2018). Quizá esto último, ha ocasionado que los consumidores locales y productores artesanales lo describan erróneamente como semi-madurado, pero en realidad es un queso fresco-acidificado de baja humedad.

Por otro lado, es importante puntualizar que en los quesos, el sabor es desarrollado por diversos compuestos orgánicos antes citados; formados durante la fermentación, cuajado de la leche y en su caso maduración del queso. Estos compuestos varían según las cepas bacterianas nativas presentes o utilizadas para fermentar cada tipo de queso (Li et al., 2020).

Así que, es importante el uso de las técnicas de biología molecular como la extracción del ADN genómico, amplificación de un fragmento del gen ARN ribosomal 16S con la ayuda de oligonucleótidos universales por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior secuenciación de las amplificaciones con el método de Sanger, para identificar de forma más precisa las bacterias ácido-lácticas asociadas a los alimentos agropecuarios como la leche bronca y quesos frescos artesanales. Por lo anterior, el objetivo del presente fue identificar genéticamente bacterias ácido-lácticas nativas en leche bronca y queso de Poro que se elabora en Tabasco, México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se adquirieron seis ($n = 3$) muestras de leche entera sin pasteurizar de 1 litro cada una, directamente de productores de leche en Tenosique, Tabasco y cinco marcas ($n = 2$) de queso Poro artesanal en establecimientos comerciales de dicho municipio; durante los meses de abril a octubre 2019. El procedimiento para la toma, manejo y transporte de las muestras se realizó de acuerdo con la NOM-109-SSA1, 1994. En el laboratorio, las muestras se mantuvieron a 10 °C por un lapso no mayor a 4 h.

Aislamiento de bacterias ácido lácticas

A partir de las muestras de leche y suero se prepararon diluciones decimales en una relación 1:10. Por lo cual, se utilizó 900 µL de solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0,85% y se adicionó 100

µL de leche (dilución 10⁻¹). Se homogeneizó 10 segundos en vórtex y de ahí se tomó 100 µL para tener la siguiente dilución 10⁻² hasta llegar a 10⁻⁴. En el caso del queso se pesó 1 g y se colocó en una bolsa estéril con 9 mL de NaCl al 0,85%; se homogeneizó con la ayuda de un Stomacher y se realizó diluciones hasta 10⁻⁶.

En cajas con agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe), LBS y agar M17 estéril, se inocularon con 100 µL de la dilución de la muestra de interés (10⁻⁴, 10⁻⁵ o 10⁻⁶) y se realizó extensión en superficie con asa Drigalski estéril. Las cajas inoculadas se dejaron en incubación en posición invertida por 48 h a 37 °C. Las colonias que mostraron color blanquecino a grisáceas se seleccionaron, se purificaron y se

caracterizaron fenotípicamente (tinción de Gram y pruebas bioquímicas) (Zamudio-Maya et al., 2007). Las cepas purificadas presuntivas BAL se sometieron a desafíos *in vitro* a 4% y 6% de NaCl y a diferentes pH (3,2; 4,5; 5,5 y 6,2). Los cultivos axénicos se conservaron en caldo MRS al 30% de glicerol a -15 °C (Jurado et al., 2017).

Identificación genética

Para la extracción del ADN genómico, se procedió a activar cada una de las cepas bacterianas previamente aisladas en caldo de MRS por 24 a 36 h a 36 °C. De cada cultivo axénico fresco recuperado se tomó una alícuota de 700 µL, se colocó en un tubo de 1,5 mL estéril y se centrifugó a 13 000 *xg* durante 5 min. Se desechó el sobrenadante, se adicionó 1 mL de *buffer* fosfato salino 1 X (PBS:137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ 7 H₂O y 2mM KH₂PO₂ por litro [pH 7,2]) a la pastilla y se agitó en un vórtex hasta que se suspendió. Se centrifugó a 13 000 *xg* por 3 min a temperatura ambiente (36 °C). El sobrenadante se descartó y con la pastilla se extrajo el ADN con un sistema comercial de extracción (Kit Pure Link™, Invitrogen™), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para observar la existencia de ADN genómicos después del proceso de extracción, se preparó una suspensión de agarosa (Invitrogen™) al 0,8% (p/v) en 100 mL de (Solución stock 50 X: 24.2% de Tris base; 5,71% de ácido acético glacial, 3,72% Na₂EDTA2H₂O); misma que se fundió en un equipo de microondas por 1 min. Se esperó que la suspensión gelificada bajara la temperatura (55 °C) y se adicionó 6 µL de SYBR™ SAFE, Invitrogen™ (10 000 X en dimetilsulfóxido (DMSO)). Se agitó, polimerizó y se cargó los ADN blancos en el gel polimerizado. La electroforesis se corrió con *buffer* TAE 1X por 1 h a 60 V. El gel se observó por

exposición a radiación UV en un equipo fotodocumentador *Gel Doc™ XR+ system* (BioRad) y la imagen se almacenó con el programa *Quantity One* (BioRad *imaging systems*).

Los ADN extraídos se amplificaron con iniciadores universales: 16SS (*forward*) (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3') (Edwards et al., 1989) y 16SR (*reverse*) (5'-CGGGAACGTATTCACCG-3') (Strom et al., 2002) presentes en el gen 16S ARNr de *Escherichia coli* (posición 8-1385). El volumen de reacción para cada muestra fue de 25 µL: H₂O estéril (14,05 µL), *buffer* de PCR a 5 X (2,5 µL), MgCl₂ a 4,5 mM (4,5 µL), BSA al 0,1% (0,25 µL), mezcla de dNTPs a 10 mM (0,5 µL), iniciadores 16SS y 16 SR a 5 mM (1 µL), *Taq* Polimerasa (Invitrogen®) a 1 U (0,2 µL) y ADN blanco (1 µL). La amplificación se realizó en un termociclador (BioRad) con las siguientes condiciones térmicas: 10 min a 90 °C en la desnaturalización inicial, seguido por 25 ciclos de 1 min a 94 °C, 45 segundos a 45 °C y 1 min a 72 °C con una extensión final de 7 min a 72 °C.

La verificación de las amplificaciones se realizó en gel de agarosa al 1,5% (p/v); por lo que, se siguió el procedimiento referido en el apartado anterior. A excepción del amortiguador de la electroforesis, en este caso se utilizó TBE (Tris borato-EDTA) 0,5 X. Los productos amplificados se enviaron a un laboratorio externo (Macrogen, Corea), para su secuenciación por el método enzimático de Sanger et al. (1977).

El manejo y refinado de las secuencias recibidas (±1184 pb) se utilizó el programa BioEdit; tres secuencias ±878 pb y 29 de ±1184 pb. La identificación taxonómica se realizó en la base de datos *GenBank del National Center for Biotechnology Information* (NCBI), con la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que detectó regiones de similitud local entre las secuencias (Altschul et al., 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de BAL

Se aislaron y caracterizaron 80 presuntivas bacterias ácido lácticas (BAL) de las muestras de leche bronca, queso Poro elaborado con leche sin pasteurizar y suero. Mismas que exhibieron color marrón claro a blanco, forma de cocos, bacilos y estreptococos; tinción de Gram positiva, catalasa negativa, oxidasa y citrato negativos. Competentes para crecer a diferentes concentraciones de NaCl (4% y 6%) y pH 3,2; pH 4,5; pH 5,5 y pH 6,2.

Estudios previos han reportado estas características en BAL aisladas en NaCl al 6% (Caro et al., 2013).

Identificación genética

De las 80 cepas bacterianas aisladas y caracterizadas en la primera etapa, se seleccionaron al azar 31 y se identificaron genéticamente (Tabla 1). La cobertura de las secuencias analizadas en BLAST en la base genética del NCBI fue de 100% para cada una y la identidad fue mayor al 99,54% a excepción

de las secuencias número 7 y 20 que registraron identidad de 98,5% y 98,9% respectivamente.

Con la ayuda del análisis de secuenciación parcial del gen ARN ribosomal 16S se observó que *Lactobacillus rhamnosus* (38,71%) y *Lb. fermentum* (29,03%) estuvieron mayormente presentes en la leche bronca, el queso Poro y el suero analizado. En menor proporción, se registró *Lb. plantarum* (6,45%) y *Paenibacillus lautus* (6,45%) del queso y leche; de esta última muestra igualmente se aisló *Enterococcus durans* (6,45%) y *Streptococcus equinus* (3,23%). Además, *Lb. farciminis* (3,23%) se asoció al queso Poro. *Strp. lutetiensis* (3,23%) y *Enterobacter hormaechei* (3,23% se recuperaron del suero).

La bacteria de *Lactobacillus* spp se ha observado en la leche cruda en Pico, Portugal (Domingos-Lopes et al., 2017), y *Lb. rhamnosus* se han recuperado de leche (Italia) (Innocente et al., 2016), quesos fermentados: Parmesano (Parmigiano Reggiano, Italia) (Sgarbi et al., 2013), Caciocavallo Palermitano (Sicilia, Italia) (Guarrasi et al., 2017) y

en el queso artesanal Kazak (Xinjiang, China) (Li et al., 2020).

Tabla 1
Identificación genética de las BAL aisladas de leche bronca de vaca, queso Poro y suero

Origen	Cepa	Acceso GenBank	BAL	% Idn.
Leche	1C	MT515767	<i>Strp. equinus*</i>	99,9
Q. Poro	2C	MT515768	<i>Lb. rhamnosus</i>	99,6
Suero	3C	MT515769	<i>Strp. lutetiensis</i>	99,7
Leche	4C	MT515770	<i>Lb. rhamnosus</i>	99,
Q. Poro	5C	MT515771	<i>Pnb. lautus</i>	99,9
Leche	6C	MT515772	<i>Entrc. durans</i>	100
Q. Poro	7C	MT515773	<i>Pnb. lautus</i>	98,5
Q. Poro	8C	MT515774	<i>Lb. fermentum</i>	99,9
Leche	9C	MT515775	<i>Entrc. durans</i>	100
Q. Poro	10C	MT515776	<i>Lb. fermentum</i>	99,8
Q. Poro	11C	MT515777	<i>Lb. farciminis</i>	100
Suero	12C	MT515778	<i>Lb. fermentum</i>	100
Q. Poro	26C	MT515779	<i>Lb. fermentum</i>	100
Leche	27C	MT515780	<i>Lb. rhamnosus</i>	99,8
Q. Poro	28C	MT515781	<i>Lb. rhamnosus</i>	99,9
Q. Poro	29C	MT515782	<i>Lb. rhamnosus</i>	99,8
Suero	30C	MT515783	<i>Et. hormaechei</i>	99,7
Suero	31C	MT515784	<i>Lb. rhamnosus</i>	99,7
Q. Poro	33C	MT515785	<i>Lb. plantarum</i>	99,9
Q. Poro	36C	MT515786	<i>Lb. fermentum</i>	98,9
Leche	37C	MT515787	<i>Lb. rhamnosus</i>	99,9
Leche	40C	MT515788	<i>Lb. rhamnosus</i>	99,9
Leche	43C	MT515789	<i>Lb. plantarum</i>	99,5
Leche	44C	MT515790	<i>Lb. rhamnosus</i>	99,8
Leche	48C	MT515791	<i>Lb. rhamnosus</i>	99,9
Leche	49C	MT515792	<i>Lb. rhamnosus</i>	99,9
Leche	50C	MT515793	<i>Lb. fermentum</i>	99,9
Leche	53C	MT515794	<i>Lb. rhamnosus</i>	99,8
Leche	54C	MT515795	<i>Lb. fermentum</i>	99,8
Leche	56C	MT515796	<i>Lb. fermentum</i>	100
Leche	58C	MT515797	<i>Lb. rhamnosus</i>	99,9

*Complejo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* (SBSEC)

La especie de *Lb. rhamnosus* recientemente fue renombrada como *Lactocaseibacillus rhamnosus*. Está presente en una variedad de hábitats ecológicos, muestras clínicas humanas, tracto intestinal, invertebrados, aguas residuales, carnes fermentada, pescados, verduras, cereales y productos lácteos artesanales (Zheng et al., 2020). Lo que se corroboró en este trabajo, al recuperarse ocho cepas en las muestras de leche bronca (4C, 37C, 40C, 44C, 48C, 49C, 53C y 58C), tres cepas en el queso Poro (2C, 28C y 29C) y una cepa en el suero (31C).

Los quesos frescos y madurados inoculados con BAL, contienen diferentes compuestos volátiles generados por la actividad metabólica de estas bacterias y que permite un perfil de sabor y aroma característico al queso. Por ejemplo, *Lb. rhamnosus* sintetiza cetonas, aldehídos, alcoholes y ácidos en el queso Parmesano (Sgarbi et al., 2013); en el queso Caciocavallo Palermitano se reportó la formación de 2,3-butanodiona, 2-butanona, 3-hidroxi, 1-hexanol, o-xileno y m-xileno (Guarrasi et al., 2017). En el queso Kazak promovió el desarrollo de los siguientes compuestos volátiles: alcoholes (1-octanol 2,15%; etanol 2,11%; alcohol feniletílico 83%; 1-nonanol 1,74%; hexanol 1,37%; 2-metiloctano-3-ol 1,27%; pentanol 1,26%; 2,3-butanodiol 1,23%; alcohol α -cumílico 1,17%; isoamilo 1,14%; prenol 1,03% y 2-nonen-1-ol

1,02%); aldehídos (2-heptenal 1,62%; decanal 1,57%; octanal 1,54%; hexanal 1,36%, benzaldehído 1,35%; nonanal 1,34%; 2-nonenal 1,25% y 3-butanolal 1,08%); ácidos (acético 1,75%; octanoico 1,5%; isobutírico 1,43%; heptanoico 1,35%; benzoico 1,27%; butanoico 1,19%; 3-metilbutanoico 1,09%; decanoico 1,09%; 2-metilpentanoico 1,03% y propanoico 1,02%); ésteres y cetonas (Li et al., 2020).

Es importante mencionar que *Lb. rhamnosus* posee actividad de enzimas proteasa y lactasa (186 U / mL); resistencia al pH ácido de los jugos gástricos, sales biliares, antibióticos y producción de compuestos volátiles potenciadores de aroma (cetonas y aldehídos). Por lo que, se sugiere como cultivo iniciador en la fermentación de yogur, quesos y otros alimentos biotecnológicos (Innocente et al., 2016; Tian et al., 2017). Se ha utilizado el suero como sustrato de crecimiento y protector de *Lb. rhamnosus* (Lavari et al., 2014).

En el caso de *Lb. fermentum* actualmente reclasificada como *Limosilactobacillus fermentum*; se ha recuperado de cereales y vegetales fermentados, estiércol, aguas residuales, heces y productos lácteos (Zheng et al., 2020). Aquí se aisló en la leche cruda (cepas: 27C, 50C, 54C y 56 C), queso Poro (cepas: 8C, 10C, 26C y 36C) y suero (12C). Esta especie (*Lb. fermentum*) se ha reportado en el queso artesanal Kazak (Xinjiang, China) (Li et al., 2020), queso Oaxaca (Caro et al., 2013) y quesos frescos artesanales de Veracruz, México (Portilla-Vázquez et al., 2016).

Otra BAL es *Lb. plantarum* ahora renombrada *Lactiplantibacillus plantarum* con dos subespecies: *Ltplb. plantarum* subsp. *plantarum* y *Ltplb. plantarum* subsp. *argenteratensis*. Se ha aislado de vegetales, carnes fermentadas, microbiota de insectos, tracto intestinal humano y lácteos (Zheng et al., 2020). Tal como se mostró aquí, al detectarse en el queso Poro (cepa 33C) y en la leche cruda (cepa 43C).

Las especies de *Lb. fermentum* y *Lb. plantarum* son productoras de bacteriocinas, actividad antagonista contra *Entrb. faecalis*, *Listeria innocua* o *L. monocytogenes* (Portilla-Vázquez et al., 2016). Esta última, también ha registrado resistencia a los antibióticos y capacidad acidificante (Caro et al., 2013).

Lb. fermentum posee menos genes relacionados con factores de virulencia, muestra resistencia a antibióticos (vancomicina y kanamicina) y sobrevive (>8 log¹⁰ UFC/mL) en condiciones gastrointestinales simuladas. Poseen propiedades probióticas y prometedoras para futuras aplicaciones en productos fermentados (de Souza et al., 2019). Estas BAL desarrollan metabolitos secundarios funcionales como: etanol, ácido acético y ácido succínico durante su actividad metabólica en el alimento. Por lo que, se sugieren como cultivos iniciadores en la elaboración de quesos artesanales (Portilla-Vázquez et al., 2016). El género *Enterococcus* se ha recuperado de queso elaborado con leche de vaca sin pasteurizar en Pico, Portugal (Domingos-Lopes et al., 2017), de leche y quesos en Minas Gerais, Brasil (Moraes et al., 2012) y *Entrc. durans* se aisló de leche cruda (sin

pasteurizar), queso Istria en Croacia (Fuka et al., 2017), queso Minas Frescal (Pieniz et al., 2014), queso Caciocavallo Palermitano (Sicilia, Italia) (Guarrasi et al., 2017) y en la presente investigación de leche sin pasteurizar (cepas: 6C y 9C).

Algunos *Enterococcus* han registrado la presencia de genes responsables de la síntesis de lantibióticos (*lanM*, *lanB* y *lanC*) y enterocinas (*entA*, *entB*, *entP*, *entL50AB* y *entAS48*), producción de sustancia de agregación (*asa1*) y gelatinasa (*gelE*) (Moraes et al., 2012; Domingos-Lopes et al., 2017).

Entrc. durans realiza actividad proteolítica y lipolítica; así como actividad antimicrobiana y capacidad antioxidante (Moraes et al., 2012). No registró factores de virulencia, ni genes de resistencia (*vanA*, *vanC1* y *vanC2/3*) y exhibió sensibilidad a los antibióticos comúnmente utilizados en la alimentación animal (eritromicina, tetraciclina, vancomicina, gentamicina y penicilina). También tiene la capacidad de formar biopelículas y características satisfactorias de autoagregatividad e hidrofobicidad (Pieniz et al., 2015). Por lo anterior, *Entrc. durans* puede ser usada como cultivo iniciador en alimentos fermentados, donde coadyuva en la conservación de alimentos por la producción de bacteriocinas, función probiótica (Pieniz et al., 2014; Fuka et al., 2017) y desarrollo de características sensoriales deseable en alimentos biotecnológicos como quesos.

Lb. farciminis, ahora *Companilactobacillus farciminis* se ha aislado de productos fermentados (cárnicos, masa, pescado, salmón ahumado en frío, puré de salsa de soja, aceitunas, verduras y ensilaje de maíz) y productos lácteos (Zheng et al., 2020) como el queso Poro (11C).

En el queso Poro se identificaron dos cepas de *Pnb. lautus* (5C y 7C), que tiene forma de bastón y flagelos peritricos (motilidad), catalasa positiva, Gram positiva, produce esporas termorresistentes subterminales con esporangios inflamados y es anaerobia facultativa (Mead et al., 2012). El crecimiento óptimo ocurre entre 28 a 40 °C a pH 7 en agar Columbia con sangre de oveja defibrinada al 5% durante 24 a 48 h (Zhang et al., 2019). También crece a 37 °C con 3% de cloruro de sodio (NaCl), sobre agar extracto de levadura, caldo de triptona y caldo Luria (Mead et al., 2012). En esta investigación creció en condiciones aerobias a sobre agar M17 y MRS (48 h a 37 °C), NaCl a 4% y 6%, caldo de MRS a pH 3,2; pH 4,5; pH 5,5 y pH 6,2). Esta bacteria se ha recuperado de ecosistema de manglar (Odisha, India) (Mangwani et al., 2014), aguas termales de obsidiana (que tiene temperatura de 79 ± 4 °C) del Parque Nacional de Yellowstone, Montana, EE. UU (Mead et al., 2012), muestras clínicas humanas (Saéz-Nieto et al., 2017), descargas de aguas residuales (Provincia de Niğde, Turquía) (Canpolat & Biterge-Süt, 2019), suelo y maíz ensilado. Al igual que, tetillas de vacas contaminadas por heces que puede afectar la leche y por *ende* los quesos (Borreani et al., 2019). Se reportó la presencia de esporas de *Pnb. lautus* en leche ultra pasteurizada. Esto afecta el mantenimiento de la calidad o la seguridad de los

productos alimenticios (Scheldeman et al., 2004), como el queso Poro artesanal que se distribuye en Tenosique, Tabasco México.

Se ha mencionado que *Pnb. lautus* tiene sensibilidad a antibióticos (ofloxacina, ciprofloxacina, imipenem, cloranfenicol, lincomicina, clindamicina, gentamicina, vancomicina, tetraciclina, eritromicina y estreptomina). Pero es resistente a metales pesados (plata, zinc, cobre, hierro, cobalto y cromo) (Canpolat y Biterge-Süt, 2019). Además, contiene genes glucósido hidrolasa que promueven atributos celulolíticos y lignocelulósico en la degradación de biomasa vegetal (Yadav y Dubey, 2018). Así que, aunque esta bacteria se ha asociado con infecciones humanas, también exhibe propiedades biotecnológicas.

Por otro lado, en la leche bronca se halló *Strp. equinus* (cepa 1C) y en suero *Strp. lutetiensis* (cepa 3C), ambas son parte del complejo *Streptococcus bovis/Streptococcus equinus* (SBSEC), que integran especies relacionadas genéticamente y que habitan el tracto gastrointestinal animal (*Strp. bovis*, *Strp. lutetiensis*, *Strp. alactolyticus* y *Strp. gallolyticus* subsp. *macedonicus*), humano (*Strp. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*) (Schlegel et al., 2003; Kaindi et al., 2018) y en productos lácteos (*Strp. infantarius* subsp. *infantarius*, *Strp. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*) (Kaindi et al., 2018). Clasificados como comensales, patógenos oportunistas emergentes; incluyendo acidosis ruminal, endocarditis infecciosa, cáncer colorrectal (Jans y Boleij, 2018) y linfoma intestinal (Piva et al., 2019). El SBSEC, son especies resistentes a levofloxacina, tetraciclina, eritromicina y clindamicina; susceptibilidad reducida a la penicilina y la vancomicina (Pompilio et al., 2019). Otro estudio reveló que *Strp. lutetiensis* también es resistente a enrofloxacin, marbofloxacina y tetraciclina (Piva et al., 2019).

Se ha dicho que la modificación taxonómica, habitantes compartidos, competencia natural y la transferencia horizontal de genes provoca dificultades para determinar sus mecanismos de filogenia, epidemiología y virulencia (Jans et al., 2016).

Un estudio de genómica comparativa reveló que las cepas SBSEC, albergan islas genómicas (IG) que parecen adquiridas de otros estreptococos por transferencia horizontal de genes. En el caso de las cepas virulentas, estas IG frecuentemente codifican factores de virulencia putativos, en las cepas de fermentación de alimentos las IG codifican funciones que son fundamentales para el rendimiento de la cepa durante la fermentación. Sin embargo, debido a su estrecha relación con las cepas virulentas, su uso en la fermentación de alimentos debe evaluarse críticamente (Jans et al., 2015).

En esta investigación se aisló *Et. hormaechei* (cepa 30C) de muestras de suero. Esta bacteria pertenece al complejo *Et. cloacae* y pueden tener una alta variabilidad de la expresión fenotípica, lo que dificulta la identificación de algunos de sus grupos. En Qena Governorate, Egipto se detectó contaminación de la leche en polvo para lactantes con *Et. hormaechei*. Lo que es un motivo de

preocupación, al ser considerado un patógeno común (El-Zamkan y Mohamed, 2018), causante de infecciones nosocomiales, enfermedad respiratoria (Wang et al., 2020) y sepsis, capaces de invadir los tejidos profundos. Pueden transmitirse por transferencia horizontal y producir betalactamasas de espectro extendido, que brinda resistente a cefalosporinas y carbapenémicos. Lo que aumenta los desafíos asociados con el tratamiento terapéutico (Gou et al., 2020). Finalmente, es importante mencionar que las BAL nativas aisladas con técnicas de cultivo en placa e

identificadas genéticamente en la leche bronca y queso de Poro, poseen un potencial biotecnológico ampliamente investigado. Por lo que, las cepas de BAL aisladas en este trabajo pueden ser investigadas para establecer un cultivo iniciador que pueda ser usado en la elaboración del queso Poro, a partir de leche pasteurizada y obtener este queso fresco-acidificado con las características organolépticas originales que agradan a los consumidores. Al igual que, tener una mayor posibilidad de su inocuidad.

CONCLUSIONES

Fue posible identificar una mayor diversidad de bacterias ácido lácticas nativas en la leche bronca de vaca en comparación con las detectadas en el queso de Poro. Sin embargo, las cepas de *Lb. rhamnosus*, *Lb. fermentum* y *Lb. plantarum* estuvieron presentes tanto en la leche bronca como en el queso Poro.

Así que estos resultados, podrán ser usados para formular y estabilizar un cultivo iniciador nativo, que permita elaborar el queso Poro con leche pasteurizada, sin que pierda sus propiedades organolépticas originales que agradan a los consumidores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Programa de Mejoramiento del Profesorado-Secretaría de Educación Pública (PROMEP-SEP) del gobierno de

México, por el apoyo financiero otorgado a la presente investigación (CLAVE: UJAT-CA-247, periodo: 2018-2019).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agudelo, L.N., Mabel, M., Torres-Taborda, M.M., Álvarez-López, C., & Vélez-Acosta, L.M. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Alimentos hoy*, 23(36), 186-205.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Borreani, G., Ferrero, F., Nucera, D., Casale, M., Piano, S., & Tabacco, E. 2019. Dairy farm management practices and the risk of contamination of tank milk from *Clostridium* spp. and *Paenibacillus* spp. spores in silage, total mixed ration, dairy cow feces, and raw milk. *Journal of Dairy Science*, 102(9), 8273-8289.
- Canpolat, E., & Biterge-Süt, B. (2019). Determination of Antibiotic and Heavy Metal Resistance in *Paenibacillus lautus* 51ATA. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(9), 1465-1468.
- Caro, I., Mateo, J., Sandoval, M.H., Soto, S., García-Armesto, M.R., & Castro, J.M. (2013). Characterization of Oaxaca raw milk cheese microbiota with interest in *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science*, 96(6), 3461-3470.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 4(7), 665-666.
- De Filippis, F., Genovese, A., Ferranti, P., Gilbert, J. A., & Ercolini, D. (2016). Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate. *Scientific Reports, Nature*, 6(21871), 1-11.
- De Souza, B.M.S., Borgonovi, T.F., Casarotti, S.N., Todorov, S.D., & Penna, A.L.B. (2019). *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* Strains Isolated from Mozzarella Cheese: Probiotic Potential, Safety, Acidifying Kinetic Parameters and Viability under Gastrointestinal Tract Conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 382-396.
- Domingos-Lopes, M.F.P., Stanton, C., Ross, P.R., Dapkevicius, M.L.E., & Silva, C.C.G. (2017). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*, 63, 178-190.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., & Böttger, E.C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 17(19), 7843-7853.
- El-Zamkan, M.A., & Mohamed, H.M.A. (2018). Molecular detection of *Enterobacter* spp. and other related species in powdered milk infant formula and milk powder. *Journal of Food Safety*, 38(6), e12538.
- Fuka, M.M., Maksimovic, A.Z., Tanuwidjaja, I., Hulak, N., & Schloter, M. (2017). Characterization of Enterococcal Community Isolated from an Artisan Austrian Raw Milk Cheese: Biotechnological and Safety Aspects. *Food Technology and Biotechnology*, 55 (3): 368-380.
- Gou, J. J.; Liu, N.; Guo, L. H.; Xu, H.; Lv, T.; Yu, X.; Chen, Y. B.; Guo, X. B.; Rao, Y. T.; & Zheng, B. W. 2020. Carbapenem-Resistant *Enterobacter hormaechei* ST1103 with IMP-26 Carbapenemase and ESBL Gene *bla_{SHV-17B}*. *Infection and drug resistance*, 13, 597-605.
- Guarrasi, V., Sannino, C., Moschetti, M., Bonanno, A., Di Grigoli, A., & Settanni, L. (2017). The individual contribution of starter and non-starter lactic acid bacteria to the volatile organic compound composition of Caciocavallo Palermitano cheese. *International journal of food microbiology*, 259, 35-42.
- Innocente, N., Biasutti, M., Rita, F., Bricchese, R., Comi, G., & Iacumin, L. (2016). Effect of indigenous *Lactobacillus rhamnosus* isolated from bovine milk on microbiological characteristics and aromatic profile of traditional yogurt. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 158-164.
- Jans, C., & Boleij, A. (2018). The Road to infection: Host-Microbe Interactions Defining the Pathogenicity of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* Complex Members. *Frontiers Microbiology*, 9, 603.
- Jans, C., Meile, L., Lacroix, C., & Stevens, J.A.M. (2015). Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 419-436.
- Jans, C., de Wouters, T., Bonfoh, B., Lacroix, C., Mulwa, K.D.W., Anderegg, J., Böck, D., Vitali, S., Schmid, T., Isenring, J., Kurt, F., Kogi-Makau, W., & Meile, L. (2016). Phylogenetic, epidemiological and functional analyses of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* Complex through an overarching MLST scheme. *BMC Microbiology*, 16(117): 1-16.
- Jurado, G.H., Martínez, B.J., Romero, B.D.A., Morillo, G.J.A., Orbes, V.A.E., & Mesías, P.L.N. (2017). Cinética de fermentación, pruebas de desafío in vitro y efecto de inhibición de *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992. *Veterinaria y Zootecnia*, 10(2), 72-89.

- Kaindi, D., Kogi-Makau, W., Lule, G.N., Kreikemeyer, B., Renault, P., Bonfoh, B., Otaru, N., Schmid, T., Meile, L., Hattendorf, J., & Jans, C. (2018). Colorectal cancer-associated *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* differ from a major dairy lineage providing evidence for pathogenic, pathobiont and food-grade lineages. *Scientific reports*, 8(1), 9181.
- Lavari, L., Páez, R., Cuatrin, A., Reinheimer, J., & Vinderola, G. (2014). Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic *Lactobacilli*. *The Journal of dairy research*, 81(3), 267-274.
- Li, J., Huang, Q., Zheng, X., Ge, Z., Lin, K., Zhang, D., Chen, Y., Wang, B., & Shi, X. (2020). Investigation of the Lactic Acid Bacteria in Kazak Cheese and Their Contributions to Cheese Fermentation. *Frontiers in microbiology*, 11, 228.
- Mangwani, N., Kumari, S., Shukla, S.K., Rao, T.S., & Das, S. (2014). Phenotypic Switching in Biofilm-Forming Marine Bacterium *Paenibacillus lautus* NE3B01. *Current Microbiol*, 68, 648-656.
- Mead, D.A., Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A., Cheng, J-F., Bruce, D.C., Goodwin, L.A., Pitluck, S., Chertkov, O., Zhang, X., Detter, J.C., Han, C.S., Tapia, R., Land, M., Hause, L.J., Chang, Y-J., Kyrpides, N.C., Ivanova, N.N.I., Ovchinnikova, G., Woyke, T., Brumm, C., Hochstein, R., Schoenfeld, T., & Brumm, P. (2012). Complete Genome Sequence of *Paenibacillus* strain Y4.12MC10, a Novel *Paenibacillus lautus* strain Isolated from Obsidian Hot Spring in Yellowstone National Park. *Standards in Genomic Sciences*, 6(3), 381-400.
- Montel, M-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmaures, N., & Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136-154.
- Moraes, P.M., Perin, L.M., Todorov, S.D., Silva, A. Jr., Franco, B.D., & Nero, L.A. (2012). Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 11(2), 318-328.
- Nero, L.A., & de Carvalho, A.F. (2019). *Challenges for Production and Consumption of Raw Milk and Raw Milk Products, Raw Milk*, Spain. Academic Press, 351-362 pp.
- Piva, S., Pietra, M., Serraino, A., Merialdi, G., Magarotto, J., & Giacometti, F. (2019). First description of *Streptococcus lutetiensis* from a diseased cat. *Letters in Applied Microbiology*, 69(2), 96-99.
- Pieniz, S., Andrezza, R., Anghinoni, T., Camargo, F., & Brandelli, A. (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*, 37: 251-256.
- Pieniz S., de Moura, T.A., Vaz, C.A.P., Andrezza, R., Guedes F.A.P., de Oliveira C.F.A., & Brandelli, A. (2015). Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. *Food Control*, 51, 49-54.
- Pompilio, A., Di Bonaventura, G., & Gherardi, G. (2019). An Overview on *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* Complex Isolates: Identification to the Species/Subspecies Level and Antibiotic Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 480: 2-15.
- Portilla-Vázquez, S., Rodríguez, A., Ramírez-Lepe, M., Mendoza-García P.G., & Martínez, B. (2016). Biodiversity of bacteriocin producing lactic acid bacteria from Mexican regional cheeses and their contribution to milk fermentation. *Food Biotechnology*, 30(3), 155-172.
- PROY-NOM-109-SSA1-1994. Bienes y Servicios, Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Norma Oficial Mexicana. Secretaría de Salud.
- Ramírez, R.J.C., Rosas, U.P., Velázquez, G.M.Y., Ulloa, J.A., & Arce R.F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 2(7), 1-16.
- Rojas-Herrera, R., Narváez-Zapata, J., Zamudio-Maya, M., & Mena-Martínez, M.E. (2008). A Simple Silica-based Method for Metagenomic DNA Extraction from Soil and Sediments. *Molecular Biotechnology*, 40, 13-17.
- Sáez-Nieto, J.A., Medina-Pascual, M.J., Carrasco, G., Garrido, N., Fernández-Torres, M.A., Villalón, P., & Valdezate, S. (2017). *Paenibacillus* spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species. *New Microbes and New Infections*, 19, 19-27.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467.
- Scheldeman, P., Goossens, K., Rodriguez-Diaz, M., Pil, A.; Goris, J., Herman, L., De Vos, P., Logan N. A., & Heyndrick, M. (2004). *Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 885-891.
- Schlegel, L., Grimont, F., Ageron, E., Grimont P.A.D., & Bouvet, A. (2003). Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis* / *Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 631.645.
- Sgarbi, E., Lazzi, C., Tabanelli, G., Gatti, M., Neviani, E., & Gardini, F. (2013). Nonstarter lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components. *Journal of dairy science*, 96(7), 4223-4234.
- Strom, K., Sjogren, J., Broberg, A., & Schnurer, J. (2002). *Lactobacillus plantarum* M1LAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides Cyclo (L-Phe-L-Pro) and Cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4322-4327.
- Tian, H., Shen, Y., Yu, H., He, Y., & Chen, C. (2017). Effects of 4 probiotic strains in coculture with traditional starters on the flavor profile of yogurt. *J. of Food Science*, 82(7), 1693-1701.
- Vásquez, S., Suárez, H., & Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena Nutrición*, 36(1), 64-71.
- Villanueva-Carvajal, A., Jiménez-Guzmán, J., García-Garibay, M., & Díaz-Ramírez, M. (2018). Queso de Poro de Balanca: Efecto del Proceso de Elaboración sobre las Propiedades de Inocuidad Sensorial y Funcionales. *AGROProductividad*, 11(11): 49+. Gale OneFile: Informe Académico.
- Wang, Z., Duan, L., Liu, F., Hu, Y., Leng, C., Kan, Y., Yao, L., & Shi, H. (2020). First report of *Enterobacter hormaechei* with respiratory disease in calves. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1-4.
- Yadav, S., & Dubey, S.K. (2018). Cellulose degradation potential of *Paenibacillus lautus* strain BHU3 and its whole genome sequence. *Bioresource Technology*, 262, 124-131.
- Yoon, Y., Lee, S., & Choi, K-H. (2016). Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, 63, 201-215.
- Zamudio-Maya, M., Narváez-Zapata, J., & Rojas-Herrera, R. (2008). Isolation and identification of lactic acid bacteria from sediments of a coastal marsh using a differential selective medium. *Letters in Applied Microbiology*, 46(3), 402-407.
- Zhang, Y., Zhuang, J., Pang, H., Wang, Y., Li, Y., & Zhang, J. (2019). *Paenibacillus luteus* sp. nov., isolated from soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(8), 2354-2359.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 2782-2858.