



Imágenes de: Arnoldo Wong Villarreal

# Caracterización de bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana aisladas del queso crema de Chiapas, México

## Characterization of lactic acid bacteria with antimicrobial activity isolated from cream cheese from Chiapas, Mexico

Arnoldo Wong-Villarreal<sup>1\*</sup>, Hipólito Corzo-González<sup>1</sup>, Emanuel Hernández-Núñez<sup>2</sup>, Avel González-Sánchez<sup>3</sup>, Germán Giacomán-Vallejos<sup>3</sup>

### RESUMEN

El queso crema de Chiapas es un producto artesanal fabricado en diferentes regiones de México. La capacidad de las bacterias lácticas, de producir grandes cantidades de ácido láctico y acético, tiene como efecto la disminución del pH, considerado uno de los factores primarios en la inhibición de microorganismos indeseables, como patógenos y bacterias coliformes, en alimentos lácteos. El objetivo de este trabajo fue aislar bacterias ácido lácticas y evaluar su efecto antagónico contra bacterias patógenas *in vitro* y contra patógenos presentes en la leche cuando se adicionan durante la elaboración del queso crema. Se aislaron cepas de bacterias lácticas del queso crema de Chiapas, México. Los aislados fueron identificados mediante pruebas bioquímicas API 50CH y secuencias del gen ribosomal 16S. Las bacterias de interés se usaron en pruebas de inhibición del crecimiento con cepas patógenas. Se cuantificó la producción de ácido acético y láctico por cromatografía de gases acoplado a masas en los quesos, al inicio y a los 10 d posteriores a su elaboración. Se aislaron 203 cepas bacterianas, de las cuales 82 tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de 7 cepas bacterianas patógenas. Las cepas fueron identificadas por la secuencia parcial del gen ribosomal 16S como pertenecientes al género *Lactobacillus*; la adición de estas cepas en la elaboración del queso crema redujo o eliminó coliformes, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras, mientras que en el queso elaborado con leche pasteurizada se detectaron 290 UFC/mL de mohos y levaduras. Estos resultados sugieren que las cepas de *Lactobacillus* aisladas del queso crema artesanal de Chiapas tienen potencial para su uso como cultivo iniciador con actividad de bioconservación en este y productos similares.

**PALABRAS CLAVE:** queso artesanal, ácido láctico, ácido acético, *Listeria monocytogenes*, bioconservador.

### ABSTRACT

Chiapas cream cheese is an artisanal product manufactured in different regions of Mexico. The ability of lactic bacteria to produce large amounts of lactic and acetic acid has the effect of decreasing the pH, considered one of the primary factors in the inhibition of undesirable microorganisms such as pathogens and coliform bacteria, in dairy foods. The objective of this work was to isolate lactic acid bacteria and evaluate their antagonistic effect against pathogenic bacteria *in vitro*, as well as their effect against pathogens that are present in milk when they are added in the preparation of cream cheese. Strains of lactic bacteria were isolated from cream cheese from Chiapas, Mexico. Isolates were identified by API 50CH biochemical tests and 16S ribosomal gene sequences. The bacteria under study were used in pathogen growth inhibition tests. The production of acetic and lactic acid was quantified by gas chromatography coupled to masses in the cheeses at the beginning and 10 d after its elaboration. 203 bacterial strains were isolated, 82 of which had the ability to inhibit the growth of 7 pathogenic bacterial strains. The strains were identified by the partial sequence of the 16S ribosomal gene as belonging to the genus *Lactobacillus*; The addition of these strains in the elaboration of cream cheese reduces or eliminates coliforms, *Staphylococcus aureus*, molds and yeasts, while in the cheese made with pasteurized milk 290 CFU/mL of molds and yeasts were detected. These results suggest that *Lactobacillus* strains isolated from Chiapas artisanal cream cheese has the potential to be used as a starter culture with bioconservation activity in this and similar products.

**KEYWORDS:** artisan cheese, lactic acid, acetic acid, *Listeria monocytogenes*, bioconservative.

\*Correspondencia: wova79@hotmail.com/ Fecha de recepción: 18 de septiembre de 2019/ Fecha de aceptación: 24 de agosto de 2020/ Fecha de publicación: 30 de enero de 2021.

<sup>1</sup>Universidad Tecnológica de la Selva, División Agroalimentaria, carretera Ocosingo-Altamirano km 0.5, Ocosingo, Chiapas, México, C. P. 29950. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Recursos del Mar, Unidad Mérida, Mérida, Yucatán, México.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Ingeniería, Laboratorio de Ingeniería Ambiental, Mérida, Yucatán, México.

## INTRODUCCIÓN

El queso crema de Chiapas es un producto artesanal fabricado en las regiones norte, Frailesca y costa del estado. Forma parte de la dieta básica y constituye una actividad económica para muchas familias chiapanecas. Su sabor, textura y calidad han logrado que sea reconocido como un signo distintivo de la gastronomía chiapaneca y de la identidad cultural de sus habitantes (Culebro y col., 2014). También es uno de los quesos artesanales de México que tiene marca colectiva y potencial para obtener una denominación de origen protegida (González y col., 2016). Las características físicas, químicas y microbiológicas del queso varían dependiendo de la región donde se produce (González y col., 2016). Se obtiene a través de la coagulación ácido-enzimática prolongada de la leche cruda de vaca y tiene características sensoriales únicas, debido a las bacterias ácido lácticas (BAL) endógenas de la leche de cada región (Villegas-de-Gante y Cervantes-Escoto, 2011; González y col., 2016). Se ha reportado la identificación por electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE, por sus siglas en inglés: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) y secuencia del gen ribosomal 16S de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Lactococcus* en este tipo de queso (González y col., 2016).

La capacidad de producir ácidos orgánicos por la fermentación de los carbohidratos presentes y la consecuente disminución del pH son los factores primarios en los que basan su actividad antimicrobiana las bacterias lácticas (Heredia y col., 2017). Sin embargo, su complejo sistema antagonista no se limita a la producción de ácidos, sino que también participan activamente otros metabolitos inhibitorios que, a pesar de ser sintetizados en menor cantidad, contribuyen significativamente a los fenómenos de antibiosis. Entre ellos cabe destacar la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y otros derivados del metabolismo del oxígeno ( $O_2$ ), dióxido de carbono ( $CO_2$ ), compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), benzoato, enzimas bacteriolíticas, bac-

teriocinas y antibióticos, que tienen potencial considerable para la bioconservación en la industria alimentaria y para terapia humana como posibles complementos o sustitutos de los antibióticos utilizados en la actualidad (Heredia y col., 2017; Radaic y col., 2020). Las BAL son microorganismos empleados como cultivos iniciadores, debido al papel que desempeñan en la producción de ácido láctico y la inhibición del desarrollo de patógenos (Cobo y col., 2019).

El objetivo del presente trabajo fue aislar bacterias ácido lácticas y evaluar su efecto antagónico contra bacterias patógenas *in vitro*, así como cuando son adicionadas en la elaboración del queso crema.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo y aislamiento de BAL de queso en la región de Chiapas, México

Se colectaron 9 muestras en cada uno de los 8 municipios incluidos en el estudio, considerando 3 quesos de 3 diferentes productores, para un total de 72 muestras. Los municipios donde se obtuvieron fueron Ocosingo ( $16^{\circ}54'17''$  N;  $92^{\circ}05'40''$  W), Palenque ( $17^{\circ}30'36''$  N;  $91^{\circ}58'53''$  W), Cintalapa ( $16^{\circ}41'52''$  N;  $93^{\circ}43'13''$  W), Villaflores ( $16^{\circ}14'00''$  N;  $93^{\circ}16'09''$  W), Villa Corzo ( $16^{\circ}11'00''$  N;  $93^{\circ}16'00''$  W), Rayón ( $17^{\circ}12'03''$  N;  $93^{\circ}00'42''$  W), Solosuchiapa ( $17^{\circ}25'41''$  N;  $93^{\circ}01'55''$  W) y Pijijiapan ( $15^{\circ}41'7''$  N;  $93^{\circ}12'44''$  W), de Chiapas, México. Las muestras se transportaron al laboratorio en hielera y se almacenaron a  $4^{\circ}C$  en un refrigerador (Torrey, R36L, Nuevo León, México). Después se homogenizaron usando el equipo Stomacher a 230 rpm y  $30^{\circ}C$  (Lab Blender, England); 10 g de queso se diluyeron en 90 mL de solución salina de buffer de fosfatos. Posteriormente, 1 mL de la solución obtenida fue inoculada en cajas Petri que contenían medio de cultivo agar Man, Rogosa, Sharpe (MRS, Difco, Madrid, España); cada muestra se inoculó por triplicado y fueron incubadas a  $30^{\circ}C$  por 48 h en anaerobiosis. Del crecimiento microbiano obtenido se seleccionaron 3 colonias por cada muestra, con base en su morfología circular e irregular, bordes ondulados y lisos, superficies convexas, de

colores opacos, blancos, cremosos, tinción Gram positiva y su reacción negativa a la prueba de catalasa y peroxidasa; estas son características morfológicas y bioquímicas de las BAL (Vázquez y col., 2018). En total se obtuvieron 216 colonias correspondientes a 3 colonias de las 9 muestras para cada uno de los 8 municipios.

### Actividad bactericida de las cepas

La actividad bactericida se determinó conforme al método de botón, reportado por Lewus y col. (1991). Primero se obtuvieron cultivos puros de cada cepa candidata a BAL en medio líquido MRS, incubados a 30 °C durante 18 h. Se adicionaron 10 mL del medio MRS (Difco, Madrid, España) (0.8 % de agar) en cada caja Petri, se dejaron gelificar y se colocaron 2 µL del cultivo puro de cada BAL. Las cajas Petri se incubaron a 30 °C durante 18 h. Posteriormente se utilizaron 8 mL del medio MRS, adicionando 20 µL de las cepas patógenas *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Salmonella enterica* var. Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Shigella flexnerii* (ATCC 12022) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) en una concentración de 10<sup>8</sup> UFC/mL. Cada cepa patógena fue inoculada y analizada de manera independiente de las otras. Las cepas patógenas fueron provistas por del Dr. Javier Castro Rosas, de la Universidad Autónoma de Hidalgo. Las cajas fueron incubadas a 30 °C por 18 h. El efecto antibacteriano se detectó por la presencia de halos de inhibición alrededor de las cepas ácido lácticas. Se seleccionaron las cepas que presentaron efecto inhibitorio contra las 7 cepas patógenas, descartando las que inhibieron solo a algunas de ellas.

### Agrupación genética BOX-PCR

Las cepas seleccionadas con actividad antagonista contra las 7 cepas bacterianas patógenas fueron agrupadas mediante perfiles genéticos generados por BOX-PCR, el cual fue amplificado usando el oligonucleótido BOXA1R (CTACGGCAAGGCGACGCTGACG). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 5 min y luego 35 ciclos de 95 °C

por 1 min, 63 °C durante 1 min y 72 °C durante 3 min y un ciclo de elongación final durante 10 min a 72 °C (Versalovic y col., 1991). Se construyó una matriz binaria con los perfiles genéticos obtenidos por BOX-PCR de las cepas según el método UPGMA, utilizando el coeficiente de Jaccard con corte al 70 %.

### Secuenciación del gen ribosomal 16S rARN

Para la identificación de las cepas se realizó la extracción del ADN genómico de los aislados seleccionados con base en los perfiles genéticos por BOX-PCR, empleando el kit ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprep™. Posteriormente se amplificó por PCR el gen ribosomal 16S utilizando los oligonucleótidos rBAL y fBAL (Ramos y col., 2009). Los productos de amplificación obtenidos de ~ 658 nucleótidos fueron purificados con el kit GeneJET (Thermo Scientific) y enviados para secuenciación a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las secuencias del gen ribosomal 16S fueron alineadas con el programa CLUSTALW (Thompson y col., 1994). Para detectar la similitud con especies del género *Lactobacillus* se usó el algoritmo de herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST, por sus siglas en inglés: Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos de nucleótidos del Gen bank.

### Caracterización bioquímica de las BAL

Una cepa de cada perfil genético obtenido por BOX-PCR fue cultivada en el medio MRS, para la caracterización bioquímica con API 50CH (bioMérieux).

### Árbol filogenético

Para la construcción del árbol filogenético se usó un fragmento de las secuencias del gen 16S ribosomal a fin de confirmar la identidad de los aislamientos al nivel de género mencionado. El árbol filogenético fue construido con el método neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987), empleando ~ 658 nucleótidos de acuerdo a la matriz de distancia de Jukes y Cantor (1969), utilizando el programa MEGA versión 7 (Tamura y col., 2016).

## Elaboración de queso crema en condiciones controladas de laboratorio

La elaboración del queso crema fue de manera artesanal y este proceso se realizó dos veces. Los tratamientos fueron los siguientes: leche pasteurizada (63 °C por 30 min), leche cruda de vaca y leche cruda de vaca acidificada con las cepas de *Lactobacillus* (CO42) y la mezcla de *Lactobacillus* (P47, VF17) en una concentración de 10<sup>8</sup> UFC/mL. Las cepas utilizadas (como cultivos iniciadores) para la elaboración del queso crema fueron seleccionadas con base en la compatibilidad entre cepas lácticas, que consiste en realizar pruebas de antagonismo. Por cada 10 L de leche se adicionó 1 mL de cuajo (1:10 000 v/v) y se dejó reposar 18 h (pH 4.9 a 5.3). La cuajada fue cortada y se dejó escurrir 12 h a 4 °C; se le agregó sal de mesa en una proporción del 4 % p/v; se prensó durante 4 h, se empaquetó en papel de polietileno y se almacenó a 4 °C durante 10 d, para sus análisis posterior.

## Análisis microbiológico del queso crema

Las muestras del queso crema fueron analizadas por triplicado para la determinación microbiológica de rutina: mohos y levaduras mediante la Norma Oficial Mexicana (NOM-111-SSA1-1994), bacterias coliformes por el método del número más probable (NMP) mediante la NOM-112-SSA1-1994, coliformes totales en placas de acuerdo a la NOM-113-SSA1-1994, *Salmonella* mediante la NOM-114-SSA1-1994 y *Staphylococcus aureus* con el método marcado por la NOM-115-SSA1-1994.

## Extracción de ácido láctico y acético del queso crema

Se tomaron muestras de los quesos elaborados con leche pasteurizada, leche no pasteurizada y leche adicionada con las bacterias ácido lácticas para la cuantificación de ácido láctico y ácido acético. Las muestras fueron colectadas en dos etapas: la primera el día 0, correspondiente al día de la elaboración del queso, y la segunda 10 d después de su elaboración. La extracción se realizó conforme a lo reportado por Ramírez y col. (2009), donde 5 g de queso fueron colectados de cada tratamiento y colocados en 10 mL de agua

ultrapura estéril y homogenizados; posteriormente, centrifugados 40 min a 6 000 xg.

## Preparación de las muestras y condiciones cromatográficas

Las muestras se filtraron con filtros de celulosa regenerada hyper-clean® (0.45 µm) y después se diluyeron en acetona grado HPLC (1:4). La cuantificación del ácido láctico y acético se realizó en un cromatógrafo de gases (Thermo scientific, Trace GC Ultra, Massachusetts, USA) acoplado al espectrómetro de masas (Thermo scientific, ITQ 900, Massachusetts, USA). Los compuestos se separaron usando una columna capilar (TR-5MS 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm, Thermo Scientific). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: el gas portador fue helio, con un flujo de 1.1 mL/min; puerto de inyección a 200 °C en modo sin división. El programa de temperatura del horno se mantuvo a 50 °C durante 2 min, luego se elevó a 10 °C/min a 290 °C y se mantuvo durante 1 min. La temperatura de la línea de transferencia CG-MS fue de 270 °C. El espectrómetro MS (Thermo scientific, Trace GC Ultra, Massachusetts, USA) funcionaba en modo de exploración completa (3 exploraciones/s) en un rango de m/z 35 a 200. La ionización se realizó mediante energía de impacto de electrones a 70 eV y la temperatura de la fuente de iones se mantuvo a 200 °C. Los compuestos se identificaron con base en la comparación de espectros de masas, con los contenidos en la biblioteca NIST 2.0, y en comparación con los tiempos de retención de los estándares de alta pureza.

## Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de los datos, complementada con un análisis por comparaciones múltiples de Tukey, a una significancia de  $P \leq 0.05$ , para determinar las diferencias entre las muestras de estudio. Se utilizó el paquete estadístico Sistema de Análisis Estadístico (SAS, por sus siglas en inglés: Statistical Analysis System) (SAS, 2016) versión 9.4.

## RESULTADOS

### Aislamiento de bacterias ácido lácticas

A partir de las 72 muestras del queso crema

colectadas en los diferentes municipios del estado de Chiapas, México, se aislaron un total de 203 colonias candidatas a BAL en el medio de cultivo MRS.

### Evaluación bactericida de cepas

De las 203 cepas seleccionadas como candidatas de BAL, se detectó que 82 tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de las 7 cepas patógenas: *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Salmonella enterica* var. Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* O157: H7, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Shigella*

*flexnerii* (ATCC 12022) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (Tabla 1). Se obtuvieron 121 cepas que inhibieron al menos un patógeno (datos no mostrados).

### BOX-PCR

Los productos de amplificación de las 82 cepas aisladas, analizadas mediante BOX-PCR, generaron huellas genómicas compuestas por fragmentos que varían en tamaño de 100 a 900 pares de bases. Se encontraron 10 cepas que presentaron perfiles idénticos a otras (VF4, R1, R70, S1, CO44, CO45, CO46, CO47, CO48, CO49), por lo que no fueron consideradas en

■ Tabla 1. Bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana aisladas del queso crema de las diferentes regiones del Estado de Chiapas, México.

Table 1. Lactic acid bacteria with antimicrobial activity isolated from cream cheese from the different regions of the State of Chiapas, Mexico.

Localización (Chiapas, México)	Número de cepas	Códigos de las cepas	Inhibición de cepas patógenas						
			<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	<i>Salmonella enterica</i> var. Typhimurium ATCC 14028	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Shigella flexnerii</i> ATCC 12022
Ocosingo	3	OC11, OC13, OC14	+	+	+	+	+	+	+
Palenque	23	P30, P31, P32, P33, P34, P35, P36, P37, P38, P39, P41, P42, P45, P46, P47, P48, P49, P50, P51, P52, P53, P54, P55	+	+	+	+	+	+	+
Cintalapa	3	CN1, CN14, CN16	+	+	+	+	+	+	+
Villaflores	15	VF1, VF2, VF4, VF6, VF8, VF10, VF11, VF13, VF14, VF15, VF16, VF17, VF18, VF19, VF20	+	+	+	+	+	+	+

Continúa...

Villa Corzo	1	VC2	+	+	+	+	+	+	+
Rayón	11	R1, R7, R14, R16, R33, R48, R50, R60, R66, R68, R70	+	+	+	+	+	+	+
Solosuchiapa	1	S1	+	+	+	+	+	+	+
Pijijiapan	25	CO1, CO2, CO7, CO9, CO10, CO11, CO12, CO13, CO17, CO18, CO22, CO29, CO30, CO31, CO32, CO33, CO34, CO42, CO43, CO44, CO45, CO46, CO47, CO48, CO49	+	+	+	+	+	+	+

OC = Ocosingo, P = Palenque, CN = Cintalapa, VF = Villaflores, VC = Villa Corzo, R = Rayón, S = Solosuchiapa, CO = Pijijiapan.

el dendograma que se muestra en la Figura 1, estructurado con 72 cepas, las cuales puede observarse que formaron 10 grandes grupos.

### Secuenciación del gen 16S de las cepas BAL

En cada uno de los 10 grupos del dendograma se seleccionó una cepa representativa, a la que se le realizó el análisis de las secuencias del gen 16S ribosomal. Estas cepas mostraron una similitud del 99 % con especies del género *Lactobacillus* (Tabla 2).

### Caracterización bioquímica de las cepas de BAL

Los microensayos API 50CH de las cepas BAL seleccionadas de los 10 grupos obtenidos por perfiles genéticos y secuenciadas (Figura 1) mostraron el perfil metabólico de carbohidratos que corresponde al género *Lactobacillus* (Tabla 1), en concordancia con los resultados de las secuencias del gen 16S ribosomal.

### Árbol filogenético

El análisis del árbol filogenético confirmó que las cepas CO42 y VF6 están genéticamente relacionadas con *Lactobacillus brevis*, mientras que las cepas P33, P45, P47, VF17, R48, R50,

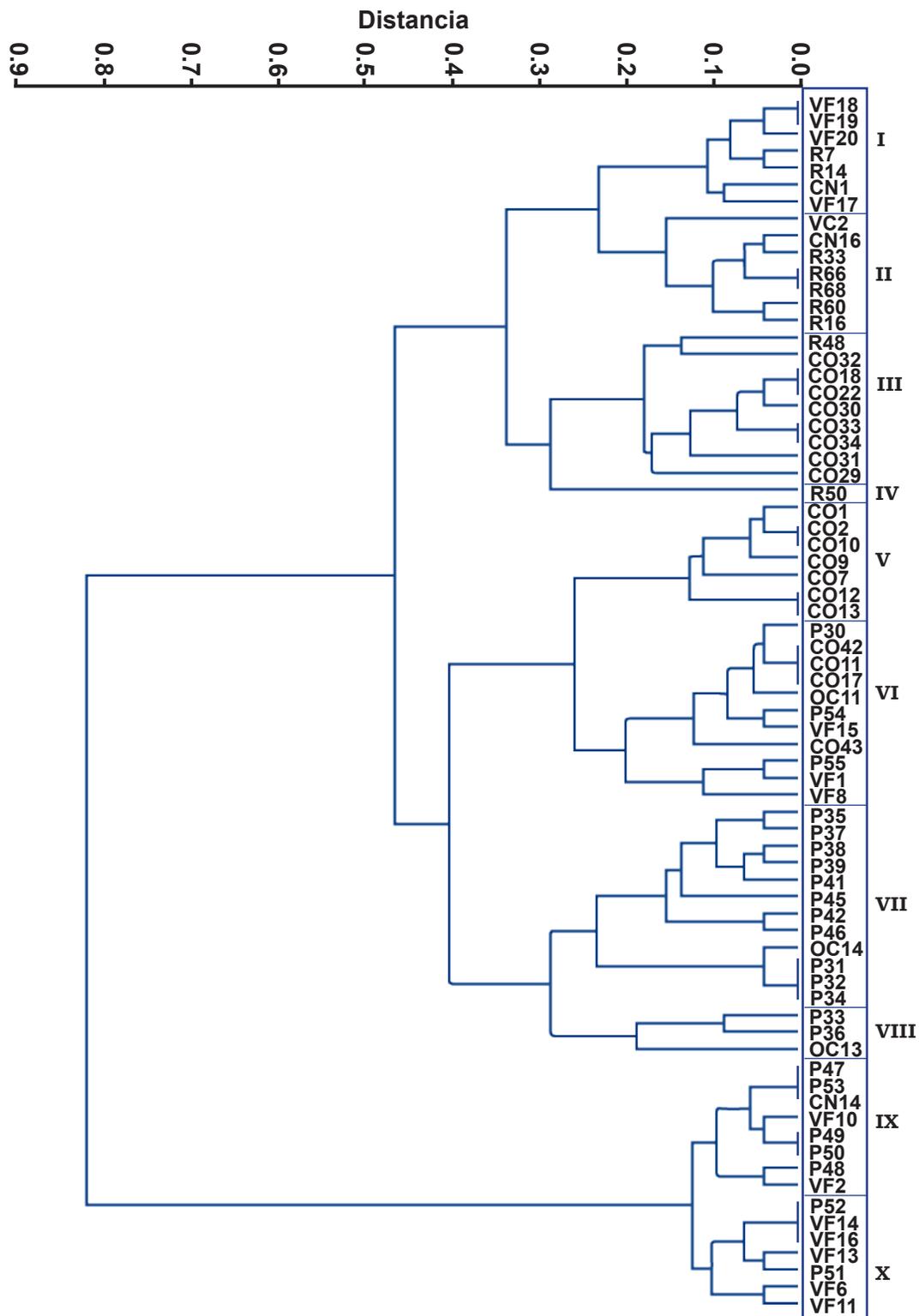
CO12 y CN16 se encuentran relacionadas con *Lactobacillus plantarum* (Figura 2 y Tabla 2).

### Análisis microbiológico del queso crema

En los análisis microbiológicos realizados a los tratamientos del queso crema elaborado con leche pasteurizada, leche no pasteurizada, leche inoculada con las cepas de *Lactobacillus* (CO42) y mezcla de *Lactobacillus* (P47, VF17) no se detectó la presencia de coliformes totales, *Staphylococcus aureus*, mohos o levaduras. Sin embargo, en los quesos elaborados con leche no pasteurizada y pasteurizada se encontraron, respectivamente, 1 200 UFC/mL y 290 UFC/mL de levaduras y mohos.

### Cuantificación del ácido láctico

No se observó diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) en el contenido de ácido láctico el día 0 en los tratamientos del queso crema elaborado con leche no pasteurizada e inoculado con las cepas de *Lactobacillus* (CO42) y la mezcla de *Lactobacillus* (P47, VF17) (Tabla 3), mientras que en el queso elaborado con leche pasteurizada se encontró menor contenido de ácido láctico inicial ( $P \leq 0.05$ ) (Tabla 3). Con respecto al contenido de ácido láctico en las muestras de 10 d de



I = *Lactobacillus plantarum*; II = *Lactobacillus plantarum*; III = *Lactobacillus* sp.; IV = *Lactobacillus plantarum*; V = *Lactobacillus plantarum*; VI = *Lactobacillus brevis*; VII = *Lactobacillus plantarum*; VIII = *Lactobacillus plantarum*; IX = *Lactobacillus plantarum*; X = *Lactobacillus brevis*.

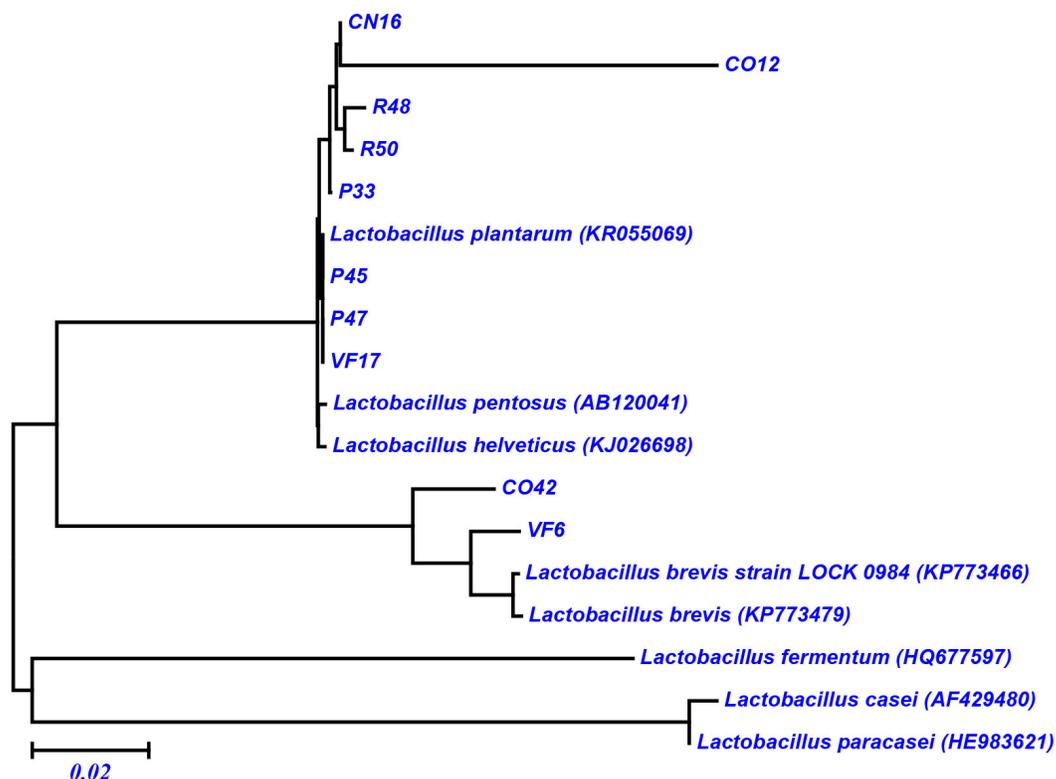
■ Figura 1. Dendrograma obtenido a partir de perfiles genéticos con BOX-PCR de bacterias ácido lácticas con actividad microbiana.

Figure 1. Dendrogram obtained from genetic profiles with BOX-PCR of lactic acid bacteria with microbial activity.

■ Tabla 2. Identificación de bacterias lácticas por secuenciación del gen 16S ribosomal y pruebas bioquímicas API 50CH, aisladas del queso crema en las diferentes regiones del estado de Chiapas, México.

Table 2. Identification of lactic bacteria by sequencing of the 16S ribosomal gene and API 50CH biochemical tests, isolated from cream cheese in the different regions of the state of Chiapas, Mexico.

Código	Grupo BOX-PCR	Cepas relacionadas	% Identidad	
			Secuencias del Gen bank	API 50CH
P33	VIII	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	99
P45	VII	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	99
P47	IX	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	99
VF6	X	<i>Lactobacillus brevis</i>	99	99
VF17	I	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	99
R48	III	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	99
R50	IV	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	99
CO12	V	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	99
CO42	VI	<i>Lactobacillus brevis</i>	99	99
CN16	II	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	99



■ Figura 2. Árbol filogenético basado en secuencias del gen 16S rARN en el que se pueden observar las especies del género *Lactobacillus* aisladas del queso crema. La barra representa 2 sustituciones de nucleótidos por 100 nucleótidos.

Figure 2. Phylogenetic tree based on sequences of the 16S rRNA gene in which species of the genus *Lactobacillus* isolated from cream cheese can be observed. The bar represents 2 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

■ Tabla 3. Determinación del contenido de ácido láctico y ácido acético en muestras del queso crema mediante cromatografía de gases acoplada a masas.

Table 3. Determination of lactic acid and acetic acid content in cream cheese samples by mass-coupled gas chromatography.

Tratamientos	Ácido láctico (g/L)		Ácido acético (g/L)	
	0 d	10 d	0 d	10 d
Leche no pasteurizada	4.56 <sup>a</sup> ± 0.6	5.17 <sup>b</sup> ± 0.1	6.55 <sup>a</sup> ± 0.2	5.10 <sup>ab</sup> ± 0.8
Leche pasteurizada	1.70 <sup>b</sup> ± 0.2	4.06 <sup>c</sup> ± 0.3	4.89 <sup>b</sup> ± 0.4	4.19 <sup>b</sup> ± 0.5
Leche no pasteurizada + <i>Lactobacillus</i> (CO42)	5.62 <sup>a</sup> ± 0.3	5.66 <sup>a</sup> ± 0.5	5.15 <sup>b</sup> ± 0.7	5.32 <sup>ab</sup> ± 0.1
Leche no pasteurizada + <i>Lactobacillus</i> (P47, VF17)	5.28 <sup>a</sup> ± 0.7	5.72 <sup>a</sup> ± 0.8	4.17 <sup>c</sup> ± 0.5	5.44 <sup>a</sup> ± 0.3

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

almacenamiento posteriores a su elaboración, se encontró diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) en el contenido de ácido láctico en el queso crema donde se inocularon las cepas de *Lactobacillus* en relación con los tratamientos del queso crema elaborado con leche pasteurizada y no pasteurizada (Tabla 3). El contenido de ácido láctico después de 10 d fue mayor en los tratamientos de los quesos donde se inocularon las cepas de *Lactobacillus* que en los de quesos elaborados con leche pasteurizada y no pasteurizada (Tabla 3).

### Cuantificación del ácido acético

Se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en el contenido de ácido acético de los quesos. En el día 0 el queso elaborado con leche no pasteurizada presentó mayor contenido de ácido acético que el queso obtenido con leche no pasteurizada con la adición de la mezcla de *Lactobacillus* (P47, VF17), que presentó el menor valor. A los 10 d, este último queso fue el que presentó mayor contenido de ácido acético, superior al obtenido con leche pasteurizada ( $P \leq 0.05$ ).

### DISCUSIÓN

Un total de 82 cepas puras, seleccionadas de las 203 cepas candidatas a BAL, presentaron efecto de inhibición del crecimiento de 7 cepas bacterianas patógenas (Tabla 1). Este efecto antagónico contra microorganismos patógenos tam-

bién fue reportado por Zapata y col. (2009) en *Lactobacillus plantarum*, que inhibió el crecimiento de *Salmonella tiphya* (ATCC 6539), *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Dicha actividad microbiana también ha sido registrada por Rivera y col. (2017), donde cepas de *Leuconostoc* spp y *Lactococcus lactis*, aisladas de queso artesanal, inhibieron el crecimiento de *Salmonella enterica* var. Typhimurium. Los 10 perfiles agrupados de huellas genómicas por BOX-PCR obtenidos de las 82 cepas con actividad antimicrobiana muestran diversidad de las BAL en el queso crema producido en las diferentes regiones del estado de Chiapas (Figura 1).

Las pruebas bioquímicas API 50CH y las secuencias del gen 16S ribosomal de las 10 cepas que representan a los grupos obtenidos por BOX-PCR mostraron similitud del 99 % con especies de *Lactobacillus plantarum* y *brevis* (Tabla 2). Sin embargo, es necesario utilizar otro marcador molecular, el gen *rpoB*, para confirmar a nivel de especie. En el árbol filogenético se puede observar que las cepas CN16, CO12, R48, R50, P33, P45, P47 y VF17 están relacionadas con *Lactobacillus plantarum*, mientras que las cepas CO42 y VF6 tienen relación con *Lactobacillus brevis* (Figura 2). Este género bacteriano también ha sido aislado de los quesos bola, cotija y doble crema, elaborados en las diferentes regiones de México, donde ha

sido reportado que restaura las características sensoriales del queso cuando es elaborado con leche pasteurizada, así como también está involucrado en el proceso de maduración (Vázquez y col., 2018; Cobo y col., 2019).

El efecto de la inhibición del crecimiento de las cepas patógenas por *Lactobacillus* puede estar relacionado con la producción de los ácidos orgánicos, como lo documentó Gao y col. (2019), donde el bajo contenido de ácido láctico afecta la inhibición de patógenos. Este efecto también se reporta en *Lactobacillus brevis* P68 y PS1, las cuales, en pH ácido originado por la producción de ácidos orgánicos, inhibieron el crecimiento de especies del género *Fusarium* (Mauch y col., 2010; Valan y col., 2015).

El efecto de la inhibición del crecimiento microbiano en los quesos elaborados con las cepas de *Lactobacillus*, evaluado 10 d después de su elaboración, puede estar relacionado con el mayor contenido de ácido láctico y acético que se detectó, ya que la producción de estos ácidos orgánicos es un mecanismo de las BAL para la inhibición de otros microorganismos. Esta característica metabólica ha sido utilizada como un método biotecnológico de conservación de algunos alimentos, para incrementar su vida útil (Gao y col., 2019). Por lo contrario, el contenido de ácido láctico fue considerablemente menor en el queso elaborado con leche pasteurizada (Tabla 3); esta disminución puede estar relacionada con la pérdida de microorganismos durante el proceso de pasteurización (Alegría y col., 2016), debido a que este proceso no solo elimina microorganismos patógenos, sino que también reduce significativamente la microbiota nativa de la leche, lo que puede afectar la producción de ácidos orgánicos, así como otras sustancias con actividad antimicrobiana, como enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas, compuestos aromáticos y antibióticos. Por otro lado, un aumento en este metabolito puede modificar la población de BAL y otros microorganismos (Martínez y col., 2016). También se puede esperar que cuando se eliminan cepas autóctonas de la leche por el proceso de pasteurización, pue-

den afectarse las características organolépticas del queso, ya que las bacterias ácido lácticas son responsables de producir metabolitos que definen estas características en los quesos artesanales, como lo han reportado Alegría y col. (2016) y Sacristán y col. (2016). Debido a estas características, las cepas de *Lactobacillus* evaluadas podrían ser utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración del queso crema, las cuales serían adicionadas posteriormente al proceso de pasteurización, contribuyendo así a que los quesos elaborados mediante este procedimiento puedan mantener sus características organolépticas (las cuales no fueron evaluadas en este estudio), que es lo que aprecian los consumidores de los quesos artesanales; y, al mismo tiempo, que contribuya a cumplir con la NOM-121-SSA1-1994, que establece que, para la fabricación de queso, la leche debe pasteurizarse (Vázquez y col., 2018). Otra aplicación que podrían tener estas cepas es la biopreservación de alimentos, con el objetivo de garantizar la inocuidad microbiológica, como lo reportan Di-Gioia y col. (2016), quienes evaluaron la capacidad de las BAL de eliminar *Clostridium* en carne fermentada. Por lo tanto, las 3 cepas bacterianas ácido lácticas que tuvieron la capacidad de eliminar a los microorganismos patógenos del queso crema podrían ser utilizadas en el proceso de biopreservación de alimentos (Di-Gioia y col., 2016; Da-Costa y col., 2019).

## CONCLUSIONES

Se aislaron 203 cepas del queso crema de las regiones productoras del estado de Chiapas, de las cuales, 82 tuvieron un efecto antimicrobiano contra 7 cepas bacterianas patógenas, así también, mostraron esta actividad cuando fueron adicionados en la elaboración del queso crema, eliminando *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras, mientras que en el queso elaborado con leche pasteurizada se detectaron 290 UFC/mL de mohos y levaduras. Estas cepas están relacionadas genéticamente con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*. El contenido de ácido láctico y acético fue mayor en los quesos a los que se adicionaron las cepas de *Lactobacillus* CO42 y *Lactobacillus* P47

y VF17. Los resultados sugieren que estas últimas cepas de *Lactobacillus* aisladas del queso crema artesanal de Chiapas tienen potencial para su uso como cultivo iniciador con actividad de bioconservación en este y productos similares, lo que permitiría estandarizar la calidad del queso comercial que se produce en la región.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRO-DEP) y a la Secretaría de Educación Pública (SEP) de México por el financiamiento para el desarrollo del proyecto de investigación “Potencial Biotecnológico de la Microflora Asociada al Queso Crema de las Diferentes Regiones del Estado de Chiapas”.

## REFERENCIAS

- Alegría, A., González, P., Delgado, S., Flórez, A. B., Hernández, B. A., Rodríguez, A., and Mayo, B. (2016). Characterization of the technological behavior of mixtures of mesophilic lactic acid bacteria isolated from traditional cheeses made of raw milk without added starters. *International Journal of Dairy Technology*. 69(4): 507-519.
- Cobo, R., Rosas, R., Gálvez, D., Adriano, L. y Vázquez, A. (2019). Bacterias ácido lácticas nativas como cultivo iniciador para la elaboración de queso crema mexicano. *Agronomía Mesoamericana*. 30(3): 855-870.
- Culebro, M., Jiménez, A., Ortiz, M. y León, H. (2014). *El queso crema Chiapas. Una historia que nos identifica*. México: Universidad Autónoma de Chiapas, Unidad de Divulgación Científica. 35-41 Pp.
- Da-Costa, J. R., Voloski, S. L., Mondadori, G. R., Duval, H. E., and Fiorentini, M. A. (2019). Preservation of meat products with bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. *Journal of Food Quality*. 1-12.
- Di-Gioia, D., Mazzola, G., Nikodinoska, I., Aloisio, I., Langerholc, T., Rossi, M., and Rovira, J. (2016). Lactic acid bacteria as protective cultures in fermented pork meat to prevent *Clostridium* spp. Growth. *International Journal of Food Microbiology*. 235: 53-59.
- Gao, Z., Daliri, E. B., Wang, J., Liu, D., Chen, S., Ye, X., and Ding, T. (2019). Inhibitory effect of lactic acid bacteria on foodborne pathogens: A Review. *Journal of Food Protection*. 82(3): 441-453.
- González, A. F., Yescas, C., Ortiz, E. A., De-la-Rosa, A. M., Mendoza, H. A., and Vallejo, C. B. (2016). Invited review: Artisanal Mexican cheeses. *Journal of Dairy Science*. 99(5): 3250-3262.
- Heredia, P., Hernández, A., González, A. y Vallejo, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*. 42(6): 340-346.
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In H. N. Munro (Ed.), *Mammalian protein metabolism* (pp 21-23). New York: Academic Press. Inc.
- Lewus, C. B., Kaiser A., and Montville, T. J. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied Environmental Microbiology*. 57(6): 1683-1688.
- Martínez, V., Moral-Ventura, S. T. D., Sachman, B., Ramírez, L. y García, M. (2016). Dinámica poblacional y aislamiento de bacterias ácido lácticas en lactosuero fermentado. *Nova Scientia*. 8(17): 326-339.
- Mauch, A., Dal-Bello, F., Coffey, A., and Arendt, E. K. (2010). The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to *in vitro* inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *International Journal of Food Microbiology*. 141(1-2): 116-121.
- NOM-111-SSA1-1994 (1994). *Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*. [En línea]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/111ssa14.html>. Fecha de consulta: 14 de marzo de 2019.
- NOM-112-SSA1-1994 (1994). *Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable*. [En línea]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/112ssa14.html>. Fecha de consulta: 14 de marzo de 2019.
- NOM-113-SSA1-1994 (1994). *Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*. [En línea]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html>. Fecha de consulta: 14 de marzo de 2019.
- NOM-114-SSA1-1994 (1994). *Bienes y servicios. Determinación de Salmonella en alimentos*. [En línea]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/114ssa14.html>. Fecha de consulta: 14 de marzo de 2019.
- NOM-115-SSA1-1994 (1994). *Bienes y servicios. Método para la determinación de Staphylococcus aureus en*

alimentos. [En línea]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/115ssa14.html>. Fecha de consulta: 14 de marzo de 2019.

NOM-121-SSA1-1994 (1994). *Bienes y servicios. Quesos: Frescos, Madurados y Procesados. Especificaciones Sanitarias*. [En línea]. Disponible en: [www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/121ssa14](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/121ssa14). Fecha de consulta: 14 de marzo de 2019.

Radaic, A., de-Jesus, M. B., and Kapila, Y. L. (2020). Bacterial antimicrobial peptides and nano-sized drug delivery systems: The state of the art toward improved bacteriocins. *Journal of Controlled Release*. 321(1): 100-118.

Ramírez, N. L., Wachter, R. M. y Pérez C. M. (2009). Producción de metabolitos y pruebas de actividad antagónica de bacterias lácticas termotolerantes aisladas de productos cárnicos. *Nacameh*. 3(1): 33-47.

Ramos, B., Bucio, A., Bautista, C., Aranda, E. y Izquierdo, F. (2009). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Universidad Ciencia Trópico Húmedo*. 25(2): 159-171.

Rivera, J. F., Villegas, A., Miranda, L. y García, J. (2017). Identificación de bacterias acidolácticas antagónicas de *Salmonella enterica* var. Typhimurium aisladas de queso artesanal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8(4): 785-797.

Sacristán, N., Fernández, D., Castro, J. M., Tornadijo, M. E., and Fresno, J. M. (2016). Effect of an autochthonous starter culture, including lactococci and *Geotrichum candidum* strains, on the ripening of a semi-hard goats milk cheese. *African Journal of Microbiology Research*. 10(9): 301-311.

Saitou, N. and Nei, M. (1987). The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4): 406-425.

SAS, Statistical Analysis System (2016). SAS® version 9.4 Macro Language: Reference. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725-2729.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22(22): 4673-4680.

Valan, M., Al-Dhabi, N. A., Rejiniemon, T. S., Lee, K. D., Huxley, V. A. J., Kim, D. H., ..., and Choi, K. C. (2015). Identification and characterization of *Lactobacillus brevis* P68 with antifungal, antioxidant and probiotic functional properties. *Indian Journal of Microbiology*. 55(1): 19-28.

Vázquez, R., Salvador, M., Adriano, M. L., DeGyves, G., and Vázquez, A. (2018). Use of starter culture of native lactic acid bacteria for producing an artisanal Mexican cheese safe and sensory acceptable. *CyTA-Journal of Food*. 16(1): 460-468.

Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, J. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genome. *Nucleic Acids Research*. 19(24): 6823-31.

Villegas-de-Gante, A. y Cervantes-Escoto, F. (2011). La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales*. 19(38): 146-164.

Zapata, S., Muñoz, J., Ruíz, O., Montoya, O. y Gutiérrez, P. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 16(1): 75-82.