

## Identificación de *Enterococcus* aislados de lactosuero de quesos artesanales de Puebla

### Identification of *Enterococcus* isolated from whey of artisanal cheeses from Puebla

Ma. Gabriela Alvarado-Castillo<sup>1</sup> , Claudia Montalvo-Paquini<sup>1\*</sup> , Guadalupe Baltazar-Gómez<sup>2</sup>, Omar Ortega-Cadena<sup>1</sup> , Francisco Javier Camacho-Martínez<sup>2</sup> , María del Tránsito Borraz-Arguello<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Universidad Politécnica de Puebla. Tercer Carril del Ejido Serrano s/n, Cuanalá. CP. 72640. Juan C. Bonilla, Puebla, México.

<sup>2</sup>Universidad Interserrana del Estado de Puebla-Ahuacatlán. Los llanos Km 1 Carretera Amixtlan, CP. 73330. San Andrés Tlayehualancingo, Puebla, México.

\*Autor de correspondencia: maria.alvarado@uppuebla.edu.mx

#### Nota científica

Recibido: 01 de abril 2023

Aceptado: 20 de febrero 2024

**RESUMEN.** La producción de queso artesanal en México iguala o supera a la producción formal, aproximadamente por cada 100 L de leche de bovino se obtienen 10 kg de queso y 90 L de lactosuero, este residuo es considerado como contaminante por su alta carga orgánica que además favorece el desarrollo de *Enterococcus*. En este trabajo se identificaron *Enterococcus* en muestras de lactosuero de cuatro localidades en Puebla. Se aislaron bacterias Gram positivas, catalasas negativas, con capacidad para crecer a diferentes temperaturas (10, 40 y 45 °C), valores de pH (9.2 y 9.6), y concentración de NaCl (4 y 6.5%). Se hicieron pruebas de PCR de punto final para confirmar la detección de *Enterococcus faecium* (19 cepas) y *Enterococcus faecalis* (seis cepas) en lactosuero de tres localidades, estos resultados sugieren que es necesario una mejor vigilancia sanitaria del lactosuero, para evitar la proliferación de microorganismos potencialmente patógenos.

**Palabras clave:** Aislamiento, bacterias ácido lácticas, *Enterococcus*, identificación molecular.

**ABSTRACT.** Mexico's cheese artisanal production is similar or higher than industrial production, approximately 100 L cow's milk are used to made 10 Kg of cheese and 90 L of whey, that could be considered like an environmentally harmful by product because it has a high content of organic matter that promotes the growth and development of *Enterococcus*. In this study, *Enterococcus* strains were identified in whey from four locations of Puebla. Bacterial gram positive were isolated, furthermore their metabolism shown negative catalase, growth at different temperature (10, 40 and 45 °C), pH values (9.2 and 9.6) and NaCl concentrations (4 and 6.5%). Endpoint PCR tests were made to confirm detection of *Enterococcus faecium* (19 strains) and *Enterococcus faecalis* (six strains) in whey from three locations, these results suggest that a better sanitary control of whey is necessary to avoid the proliferation of potentially pathogenic microorganisms.

**Keywords:** Isolation, lactic acid bacteria, *Enterococci*, molecular identification.

**Como citar:** Alvarado-Castillo MG, Montalvo-Paquini C, Baltazar-Gómez G, Ortega-Cadena O, Camacho-Martínez FJ, Borraz-Arguello MT (2024) Identificación de *Enterococcus* aislados de lactosuero de quesos artesanales de Puebla. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 11(1): e3727. DOI: 10.19136/era.a11n1.3727.

## INTRODUCCIÓN

México es uno de los productores de leche más importantes en el mundo. La producción de leche bovina en 2022 fue de 13 mil 105 millones de litros a nivel nacional, que lo ubican como el décimo quinto lugar entre los países con mayor producción de leche bovina; mientras que en el estado de Puebla la producción de leche fue de 456 mil 601 litros (SIAP 2023). De los cuales el 23% fue utilizada por la industria quesera, pero este porcentaje corresponde a la industria formal, ya que es difícil cuantificar la participación de los negocios que fabrican queso de forma artesanal (González-Córdova *et al.* 2016, Mazorra-Manzano y Moreno-Hernández 2019).

En México, el tipo de queso de fabricación tradicional que más se consume es el fresco, cuya demanda representa alrededor del 80% (González-Córdova *et al.* 2016). Otras variedades de igual importancia, por el alto consumo entre la población, son el queso Panela y el queso Oaxaca también llamado Quesillo, y en menor escala el requesón (Torres-Llanaez *et al.* 2006, Caro *et al.* 2020). La mayoría de estos quesos artesanales son elaborados con leche cruda de vaca, aunque en el caso de queso panela también se utiliza leche de oveja, cabra o una mezcla de las tres (González-Córdova *et al.* 2016). El uso de leche sin pasteurizar para la fabricación de estos tipos de queso hace que el lactosuero generado durante el proceso tenga una variedad de bacterias ácido lácticas no iniciadoras (BAL-Ns) llamadas así porque no fueron adicionadas deliberadamente, es decir, son de origen autóctono que cuando forman parte del queso otorgan sabores, texturas y olores característicos al producto (Bettera *et al.* 2023, Buchanan *et al.* 2023). La importancia de este tipo de queserías se debe a que aproximadamente el 70% de los quesos mexicanos son producidos de forma artesanal por industrias micro, pequeñas o medianas, ubicadas en rancherías y pequeños pueblos con métodos rústicos, generalmente carentes de un control de calidad estricto y que muchas veces presentan incumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994 que recomienda el uso de leche pasteurizada para la fabricación de queso (Torres-Llanaez *et al.* 2006, González-Córdova *et al.* 2016, Metz *et al.* 2020) y la NOM-243-SSA1-2010 que indica las especificaciones sanitarias que deben cumplir los derivados lácteos en su elaboración (Rivera-de-la-Cruz *et al.* 2017, Rangel-Ortega *et al.* 2023). El principal subproducto generado durante la fabricación de quesos es el lactosuero, que en la mayoría de los casos se vierte como efluente, considerando que el 90% de la leche que se usa para fabricar queso se convierte en lactosuero, su producción se torna relevante (Asas *et al.* 2021). El lactosuero es un líquido translúcido, verdoso, obtenido por separación del coágulo de leche, después de la precipitación de las proteínas, principalmente caseína, durante la elaboración de queso, contiene proteína sérica, lactosa, minerales y grasa, es decir, aproximadamente el 55% de los sólidos de la leche y dependiendo del método usado para la precipitación de la caseína se clasifican en suero dulce y suero ácido (Rocha-Mendoza *et al.* 2020). El suero dulce es generado cuando se utilizan enzimas (cuajo, quimosina o renina) para la separación del coágulo de la leche durante la elaboración tradicional de queso fresco, panela, de pasta cocida o prensada (vaca) y quesos de ovejas; se caracteriza por ser pobre en ácido láctico, en calcio, fósforo y con pH mayor a 6.0. El suero ácido es resultado de la separación de la caseína por la adición de ácidos orgánicos (ácido cítrico, acético o láctico), la fermentación de la lactosa con bacterias ácido lácticas (BAL) autóctonas de la leche utilizada o con cultivos iniciadores (Rocha-Mendoza *et al.* 2020). El lactosuero genera un serio problema ambiental por su alta carga orgánica, su demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de 35 000 mg L<sup>-1</sup> y la demanda

química de oxígeno (DQO) de 68 000 mg L<sup>-1</sup> por cada 100 L de suero, representa un nivel de contaminación equivalente a las aguas residuales producidas por 45 personas al día (Asas *et al.* 2021). Pero no es el único problema, también puede ser fuente de bacterias como *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*, que a pesar de su baja virulencia, son responsables de infecciones nosocomiales, involucradas en una gran variedad de cuadros clínicos relacionados con infecciones del tracto urinario, abdominal, pélvico y pueden presentar resistencia a antibióticos como la vancomicina (Terzić-Vidojević *et al.* 2021, Davis *et al.* 2022). Las bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* son parte de la microbiota secundaria de quesos de elaboración tradicional debido a su ubicuidad y capacidad para crecer en ambientes ácidos y salinos; además, los componentes de alto valor nutricional del lactosuero lo hacen un medio apropiado para el desarrollo de *Enterococcus* (Rabaioli *et al.* 2019, Song *et al.* 2022, Dosuky *et al.* 2022, Marasco *et al.* 2022, Bettera *et al.* 2023). Según Li C *et al.* (2020) se estima que la producción anual del lactosuero en todo el mundo es de  $1.15 \times 10^8$  a  $1.40 \times 10^8$  toneladas, con un aumento cada año del 1 al 2%, por lo que se han propuesto varias alternativas para el aprovechamiento de tan grandes cantidades de este residuo lácteo (Asas *et al.* 2021, Park *et al.* 2021), una de ellas es el consumo humano, como fuente de proteína y lactosa, sin embargo, es de interés monitorear la presencia de microorganismos potencialmente dañinos para evitar enfermedades en la población que consuma tales productos (Asunis *et al.* 2020, Decadt *et al.* 2023). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de especies de *Enterococcus* de relevancia ambiental y clínica a partir de muestras de lactosueros de quesos de producción artesanal de las localidades de Chipilo, Cholula, Nealtican, y Santa Ana Xalmimilulco en el estado de Puebla.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de microbiología y biología molecular de la Universidad Politécnica de Puebla. Se recolectaron 36 muestras de lactosuero de queserías artesanales de las localidades de Chipilo, Cholula, Nealtican y Santa Ana Xalmimilulco en el estado de Puebla. Las localidades fueron consideradas por su alta producción en queso fresco, panela, quesillo y requesón, debido a que son los quesos de mayor consumo por la población aledaña. Los lactosueros se clasificaron dependiendo del tipo de queso por el cual se originaron. Aquellos lactosueros cuyos productores no establecieron claramente el tipo de queso que lo originó, se denominaron como lactosueros mixtos de queserías. El muestreo se realizó de acuerdo con la norma NMX-F-285-1977 que hace referencia a la toma y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Los lactosueros fueron recolectados en recipientes estériles, transportados y almacenados a temperatura de refrigeración de 2 a 8 °C hasta su procesamiento.

### Aislamiento de BAL

Todas las muestras se inocularon en agar Man Rogosa y Sharpe (MRS marca DIFCO), primero se realizaron diluciones seriadas de cada muestra hasta 10<sup>-2</sup> en solución salina isotónica al 0.85%, se utilizaron 50 µL como inóculo y se distribuyeron por estría masiva en placas P100 con el agar mencionado, posteriormente se incubaron a 37 °C por 24 h. La purificación se llevó a cabo

eligiendo colonias aisladas semejantes en morfología a las BAL, pequeñas, blanquecinas o transparentes, con forma circular, borde entero, y con diámetro de aproximadamente 1 mm para la resiembra. Las bacterias purificadas con morfología de cocos Gram positivos y catalasa negativos, se aislaron en medio sólido MRS (DIFCO). Los cultivos puros se conservaron por congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en medio líquido MRS con glicerol al 20%.

### Caracterización fenotípica

Las colonias puras, se evaluaron siguiendo el criterio de Ludwig *et al.* (2009) para discriminar a los *Enterococcus* del resto de las BAL. Se realizaron pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas (10, 40 y  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), valores de pH (9.2 y 9.6) y concentraciones de NaCl (4 y 6.5%) en caldo MRS a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Se utilizó el agar KF (Kenner Fecal) Streptococcus base (Merk), este medio contiene azida de sodio para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas y púrpura de bromocresol como sustancia indicadora que cambia a amarillo en condiciones ácidas, adicionalmente el medio se preparó con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) que tiñe de rojo a las colonias capaces de reducir el TTC, como en el caso de los *Enterococcus*. Los microorganismos aislados se inocularon en el medio de lactosa azul de china (Merk Millipore) para verificar si eran capaces de producir ácido láctico a partir de lactosa, las cepas que presentaron esta propiedad crecieron como colonias de un color azul intenso. Para la prueba de asimilación de azúcares se utilizó como medio de cultivo base, el caldo rojo fenol conteniendo diferentes carbohidratos al 1%: lactosa, xilosa, sacarosa, maltosa, ribosa, fructosa y glucosa (Sigma-Aldrich). La producción de  $\text{CO}_2$  se observó mediante el uso del caldo rojo fenol (Merk) con glucosa y campana Durham. La prueba de movilidad se realizó en medio MIO (BD BIOXON). También se incluyó la prueba de citrato, prueba de hemólisis en agar sangre y crecimiento en manitol (BD BIOXON). Todas las pruebas se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h.

### Identificación molecular

La extracción de ADN, se realizó a partir de un cultivo de 24 h de células bacterianas inoculadas en 5 mL de caldo MRS e incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El rompimiento de la membrana celular se llevó a cabo con Bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) según Doyle *et al.* (1987) con las modificaciones necesarias para la extracción de ADN bacteriano. La biomasa obtenida se incubó a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 min con 1 mL de la solución amortiguadora de extracción (CTAB 2%: Tris-HCl, EDTA, pH 8; NaCl, 2-mercaptoetanol). Para precipitar las proteínas se añadió cloroformo-alcohol isoamílico. A partir de la fase acuosa se precipitaron los ácidos nucleicos con isopropanol frío. El precipitado de ADN se lavó con etanol al 70%, se solubilizó en agua libre de nucleasas y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La verificación de la calidad y peso molecular del ADN se realizó por electroforesis en geles al 0.8 y 1.5% (m/v) de agarosa (promega) teñidos con bromuro de etidio ( $0.2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para ADN genómico y para productos de PCR, respectivamente. Para el registro de los geles se usó un fotodocumentador UVP photoDoc-it, Imaging System. Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el sistema comercial TopTaq® Master Mix Kit (Qiagen) para PCR. Cada tubo de reacción contenía 12.5  $\mu\text{L}$  de Top Taq Mix, 1  $\mu\text{L}$  de cada iniciador, 2-3  $\mu\text{L}$  de ADN y agua libre de nucleasas a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . La amplificación de las secuencias nucleotídicas utilizadas para la caracterización molecular se realizó por PCR. La reacción se dispuso en un termociclador Bio-Rad MyCycler bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$

por 2 min, 30 ciclos conformados por tres etapas, desnaturalización a 94 °C por 1 min, hibridación por 1 min en un rango de 46 a 60 °C dependiendo de cada par de iniciadores, polimerización por 1 min a 72 °C, y una extensión final a 72 °C por 1 min. Los productos de la PCR fueron analizados mediante una cámara de electroforesis (Modelo Mini-Sub® Cell GT Bio-rad) en un gel de agarosa al 2% utilizando 1.3 µL de la solución de azul de bromofenol por cada de 5 µL de muestra. El voltaje de corrida fue de 100 v por 30 min.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de 36 muestras de lactosuero se purificaron 89 cepas de cocos Gram positivas, catalasa negativas, fermentadores de lactosa, todas con características generales de BAL, de estas cepas solamente 33 demostraron capacidad de soportar temperaturas de incubación de 45 °C, crecimiento en medios con azida de sodio como el agar KF, crecimiento a pH 9.6 y halotolerancia moderada (NaCl al 4%), el resto de las cepas se descartaron por no cumplir con los criterios fenotípicos de la población objetivo. Estos criterios han sido utilizados por varios autores para la identificación preliminar de *Enterococcus* en quesos de leche bronca (Murugesan *et al.* 2018, Margalho *et al.* 2020, Terzić-Vidojević *et al.* 2021), en leche de camella (Hawaz *et al.* 2016) lactosuero (De-Sousa *et al.* 2020), muestras de agua (Davis *et al.* 2022) y ambientales (Domig *et al.* 2003). La Tabla 1 contiene los resultados de las pruebas fenotípicas realizadas a los 33 aislados presuntivos, todas las cepas resultaron negativas a motilidad y hemólisis, lo que indica que son bacterias no filamentosas y no secretan hemolisinas, por esta razón no causan la lisis de glóbulos rojos denotando inocuidad en las cepas aisladas. Según Georges *et al.* (2022) la secreción de hemolisinas en microorganismos de este género ha sido relacionada con alta toxicidad en infecciones humanas. Todos los aislados tornaron el medio ácido al degradar ribosa, fructosa y glucosa, pero ninguna de las cepas produjo CO<sub>2</sub> al metabolizar la glucosa, lo cual coincide con lo publicado por Domig *et al.* (2003) quienes indican que el metabolismo de este grupo de bacterias es homofermentativo y utilizan la vía de Embden-Meyerhof-Parnas para producir ácido láctico sin descarboxilación a partir de glucosa. Los resultados obtenidos en el perfil de fermentación de carbohidratos coinciden con Dosuky *et al.* (2022) quienes identificaron *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. hirae* en lactosuero de queso salado. La determinación de la especie se realizó según el criterio del manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Ludwig *et al.* 2009) y de acuerdo con los resultados se agruparon en 3 especies. Las bacterias positivas a hidrólisis de citrato y a la reducción de TTC se clasificaron como *E. faecalis*. Debido a que la capacidad de hidrolizar citrato indica la presencia de la enzima citrasa y está altamente valorada en la producción de quesos madurados debido a que mejora el olor y sabor (Terzić-Vidojević *et al.* 2021). El resultado negativo a la producción de ácido a partir de sacarosa y manitol es propio de *E. durans*, sin embargo, la fermentación de maltosa para ésta misma especie tuvo resultados que no concordaron con la referencia.

**Tabla 1.** Resultados de las pruebas fenotípicas de las cepas aisladas de lactosuero.

Prueba fenotípica	<i>E. faecium</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. durans</i>		<i>Enterococcus</i> sp.	
	Ludwig (2009)	Cepas aisladas	Ludwig (2009)	Cepas aisladas	Ludwig (2009)	Cepas aisladas	Ludwig (2009)	Cepas aisladas
movilidad	-	-	-	-	-	-	-	-
hemólisis	d	-	-	-	D	-	D	ND
Citrato	-	-	+	+	-	-	-	-
CO <sub>2</sub> con Glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento:								
a 10 °C	+	d	+	-	+	-	+	-
a 40 °C		+		+		+	+	+
a 45 °C	+	+	+	+	+	+	d	+
en pH 9.2		+		+		+		+
en pH 9.6	+	+		+		+		d
en 4% NaCl		+		+		+		+
en 6.5% NaCl	+	+	+	d	+	d	d	-
Con Azida de sodio	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de TTC	-	-	+	d		-		-
	Producción de ácido con:							
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	d	+	+	+	-	+	+
Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	d
Sacarosa	d	+	+	d	-	-		+
fructosa	+	+	+	+	+	d	+	+
Ribosa	+	+	+	d	+	d	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+
manitol	d	+	+	ND	-	-		ND

+ ,90% o más cepas son positivas; - ,90% o más cepas son negativas; d, 11-89% de las cepas son positivas; ND, no determinada.

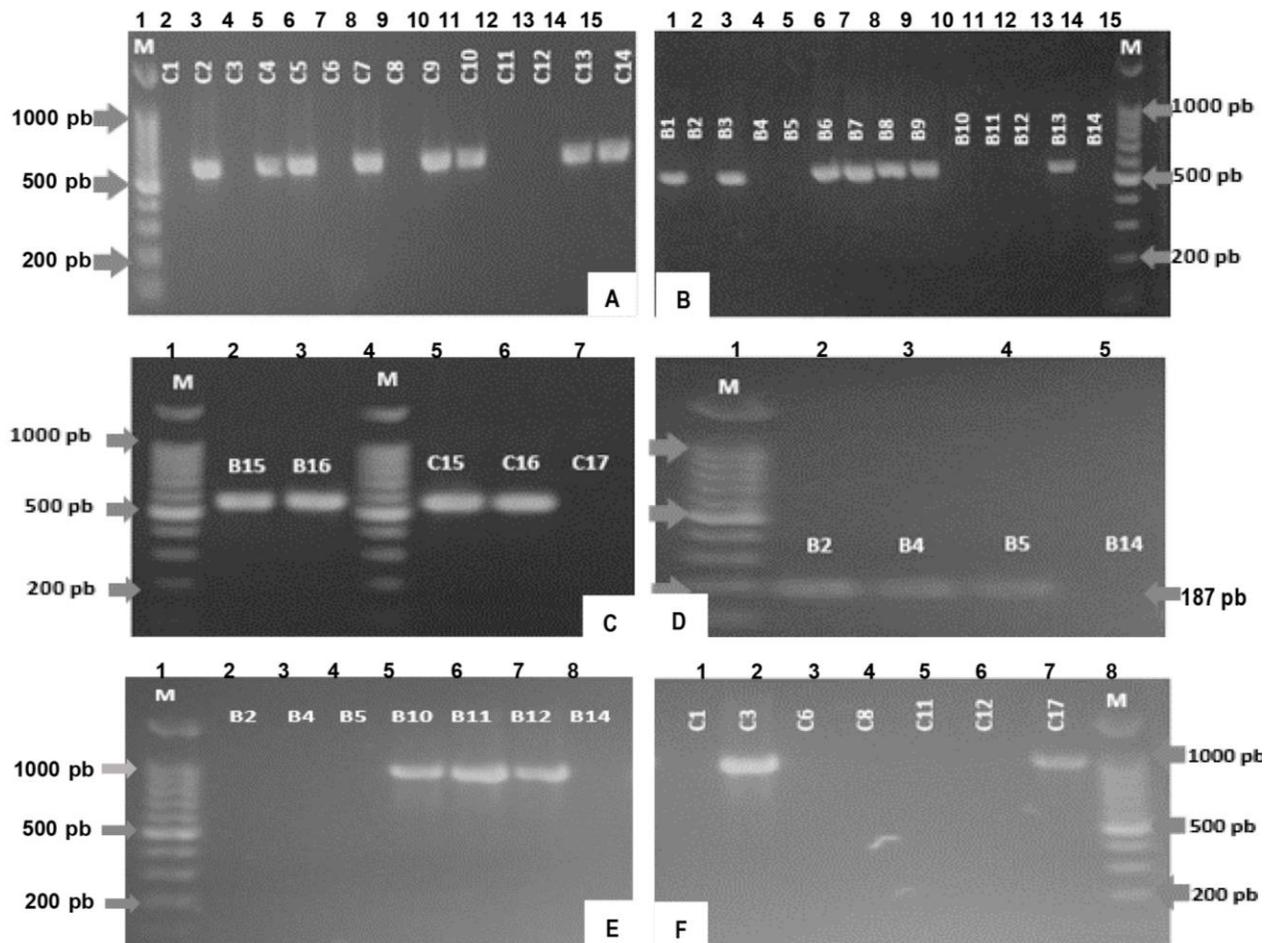
Las bacterias incapaces de reducir el TTC en agar KF, y con capacidad de producir ácido por la fermentación de sacarosa y manitol se clasificaron como *E. faecium* (Tabla 1). El desarrollo de *Enterococcus* a temperaturas de 10 °C es típico de este grupo, aunque varias cepas de *E. faecalis* y *E. Durans* aisladas en este trabajo no presentaron esa característica. Al respecto, Hawaz *et al.* (2016) también reportaron cepas de *E. faecalis* y *E. casseliflavus* en leche de camella sensibles a temperaturas frías, incapaces de crecer a 10 °C. Las especies identificadas aquí, coinciden con las reportadas por Quillama *et al.* (2020), quienes caracterizaron cepas de *Enterococcus* únicamente por métodos fenotípicos a partir de quesos artesanales de Perú, encontrando principalmente *E. faecium* (38 cepas), *E. durans* (dos cepas), y *E. faecalis* (una cepa), pero no lograron discernir la especie de 27 cepas de *Enterococcus* aisladas; por ello es importante la caracterización molecular. En el presente trabajo, los resultados de algunas pruebas fenotípicas generaron ambigüedad,

como la reducción de TTC y la producción de ácido con manitol, por lo que no fueron útiles para asignar la especie por lo que se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para confirmar la identidad de las cepas. En la Tabla 2 se muestran los iniciadores utilizados en la PCR de punto final para determinar el género (16S rRNA) y la especie (Ecium, VanC1, E1 y E2, DuHi y Du). Los resultados de la PCR 16SrRNA confirmaron el género *Enterococcus* para los 33 microorganismos aislados. Los oligonucleótidos 16S rRNA fueron diseñados y utilizados por Yean *et al.* (2007) para identificar al género *Enterococcus* en muestras clínicas con una especificidad del 100%.

**Tabla 2.** Iniciadores utilizados para la determinación de género y especie en *Enterococcus*.

Nombre del iniciador	Región amplificada	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia
16SrRNA-F	16S rRNA	AGGGGATAACACTTGGAACA	1 128 pb	Yean <i>et al.</i> 2007
16SrRNA-R	<i>Enterococcus</i> sp.	TTCGCGACTCGTTGTACTTC		
Ecium-F	ddl <i>E. faecium</i>	CGCAGAGCATGAAGTGCCA	557 pb	Yean <i>et al.</i> 2007
Ecium-R2		CTTCTCGTTTTCTGCTTTTGTGA		
C <sub>1</sub> F	VanC1	GGTATCAAGGAAACCTC	822 pb	Dutka-Malen <i>et al.</i> 1995 Alves <i>et al.</i> 2009
C <sub>2</sub> R	<i>E. gallinarum</i>	CTTCCGCCATCATAGCT		
E <sub>1</sub> F	ddl <i>E. faecalis</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCTT	941 pb	Dutka-Malen <i>et al.</i> 1995 Alves <i>et al.</i> 2009
E <sub>2</sub> R		ACGATTCAAAGCTAACTG		
DuHiF	ddl <i>E. durans</i>	TTATGTCCAGTATTGAAAAATCAA	187 pb	Knijff <i>et al.</i> 2001
DuR		TGAATCATATTGGTATGCAGTCCG		

Diversos autores han resuelto la especie secuenciando una fracción del gen ARNr 16S (Olvera-García *et al.* 2017, Dosuky *et al.* 2022, Marasco *et al.* 2022), sin embargo, para algunas especies de este género no es suficiente esta comparación debido a que la identidad podría ser mayor o igual a 99.8% entre ellas para esta región de ADN (Ludwig *et al.* 2009). Por ello, también se utilizó PCR específica de especie y se amplificaron los genes que codifican ligasas D-alanina:D-alanina (ddl) para *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. durans*, además la secuencia VanC1 específica para *E. gallinarum* debido a que han sido útiles para la especiación de *Enterococcus* en muestras clínicas (Dutka-Malen *et al.* 1995, Knijff *et al.* 2001, Yean *et al.* 2007, Alves *et al.* 2009) y alimentarias como la leche pasteurizada (Nasiri *et al.* 2022). Mediante el ensayo de PCR específica se caracterizó a 19 cepas como *E. faecium* (Figura 1A, 1B y 1C), 6 como *E. faecalis* (Figura 1E, 1F) y 4 como *E. durans* (Figura 1D). Estos resultados coinciden con los trabajos de varios autores que han caracterizado la microbiota de quesos fabricados con leche cruda de vaca encontrando a *E. faecium* como especie dominante, seguida de *E. faecalis* y *E. durans* en productos lácteos (Torres-Llañez *et al.* 2006, Quillama *et al.* 2020), por ello se estima que la misma población microbiana estaría presente en el lactosuero de quesos elaborados con leche sin pasteurizar.



**Figura 1.** PCR específica para determinar la especie de *Enterococcus*. M: marcador de peso molecular 100 pb. (Promega) A), B) y C) Amplificación del gen *ddl* de *E. faecium* (557 pb). Cepas C2, C4, C5, C7, C9, C10, C13, C14, B1, B3, B6, B7, B8, B9, B13, B15, B16, C15, C16 resultaron positivas para *E. faecium*. D) Amplificación del gen *ddl* de *E. durans* (187 pb). Cepas B2, B4, B5 resultaron positivas para *E. durans*. E) y F) Amplificación del gen *ddl* de *E. faecalis* (941 pb). Cepas B10, B11, B12, C3, C3, C17 resultaron positivas para *E. faecalis*.

En estudios donde se caracterizaron bacterias ácido lácticas no iniciadoras (BAL-Ns) en quesos mediterráneos y quesos brasileños, se ha encontrado que una tercera parte de ésta población está formada por *Enterococcus* (Margalho et al. 2020, Terzic-Vidojevic et al. 2021) los ensayos moleculares del presente trabajo, confirman lo anterior, ya que partiendo de 89 BAL aisladas, 37% de ellas son *Enterococcus*, se asignó la especie a 29 de estas cepas utilizando la PCR pero no fue posible distinguir la especie de las cepas B14, C1, C8 y C12; sin embargo, de acuerdo al perfil fenotípico, se infiere que podrían ser *E. casseliflavus*, ya que los resultados de pruebas fenotípicas son similares a los publicados por Hawaz et al. (2016). Las muestras con la mayor cantidad de cepas aisladas fueron las del lactosuero mixto, probablemente a que proceden de establecimientos donde elaboraban productos como quesillo, queso fresco, queso panela y requesón, principalmente, y es una mezcla de lactosueros ácidos y dulces (Tabla 3). La alta incidencia de cepas de *Enterococcus* en subproductos lácteos y alimentos fermentados sugieren que este género tiene un papel importante como BAL-Ns en el proceso de desarrollo del sabor y aroma durante la elaboración de quesos, debido a ciertas características metabólicas como la

producción de enzimas proteolíticas y lipolíticas, así como la producción de diacetilo a partir de citrato (Centeno *et al.* 2022).

**Tabla 3.** Cepas de *Enterococcus* aislados del lactosuero de distintas localidades de Puebla

Localidad	Origen del lactosuero	Cepas aisladas	Identificación de especies por PCR	Total de cepas aisladas por origen del lactosuero
Chipilo	Mixto	B1,B3,B9	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i> (9) <i>E. faecalis</i> (3) <i>E. durans</i> (1) <i>Enterococcus</i> sp. (2)
		B2	<i>E. durans</i>	
		B10	<i>E. faecalis</i>	
Cholula	Mixto	B12	<i>E. faecalis</i>	
		B13,B15,C16	<i>E. faecium</i>	
		B14	<i>Enterococcus</i> sp.	
Sta. Ana Xalmimilulco	Mixto	C1	<i>Enterococcus</i> sp.	
		C2,C13,C14	<i>E. faecium</i>	
		C3	<i>E. faecalis</i>	
Chipilo	Quesillo	B4,B5	<i>E. durans</i>	<i>E. faecium</i> (3) <i>E. durans</i> (2) <i>Enterococcus</i> sp. (1)
		C7,C9, C15	<i>E. faecium</i>	
Sta. Ana Xalmimilulco		C8	<i>Enterococcus</i> sp.	
Chipilo	Queso fresco	B6	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i> (7) <i>E. faecalis</i> (2)
		B11	<i>E. faecalis</i>	
Cholula		B7,B8,B16,C4,C5	<i>E. faecium</i>	
		C6	<i>E. faecalis</i>	
Nealtican		C10	<i>E. faecium</i>	
Nealtican	Panela	C11	<i>E. durans</i>	<i>E. durans</i> (1) <i>Enterococcus</i> sp. (1)
		C12	<i>Enterococcus</i> sp.	
Cholula	Requesón	C17	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> (1)

( ) número de cepas aisladas

Los resultados, indican que en 3 de las 4 localidades analizadas se detectó la presencia de *E. faecalis*, hallazgo que comúnmente se considera como contaminación fecal, principalmente por que *Enterococcus* se encuentran entre los patógenos nosocomiales más comunes que pueden causar infecciones y enfermedades importantes (Almeida-Santos *et al.* 2021, Rangel-Ortega *et al.* 2023), pero muchos estudios han informado que esta ocurrencia no siempre está relacionada con la contaminación, y que las cepas nosocomiales son diferentes a las cepas de *Enterococcus* presentes en alimentos y lactosuero. Un ejemplo, de estas diferencias es que algunas cepas como *E. faecium* M74, *E. faecium* SF-68, *E. faecalis* Symbioflor se incluyen en productos medicinales o alimenticios como probióticos siendo eficaces y seguros (Braïek *et al.* 2019). Las enterocinas son en gran parte las moléculas responsables del efecto probiótico de *Enterococcus*, el microorganismo completo se aplica en el tratamiento y/o prevención de enfermedades humanas y animales, como el alivio de los síntomas del síndrome del intestino irritable, la diarrea provocada por antibióticos y la prevención de diferentes afecciones intestinales en humanos, animales de granja y mascotas.

Las enterocinas son bacteriocinas, péptidos con actividad antimicrobiana que han tomado interés como alternativa a los antibióticos, por ello, el negocio de las bacteriocinas es importante y tiene altas expectativas de crecimiento (Kasimin *et al.* 2022). Con respecto a la nisina, primera bacteriocina en ser comercializada, se espera que abarque un mercado de 553 millones de dólares para 2025. El queso mexicano también se estudia como fuente de probióticos, se han reportado bacteriocinas como la Pediocina PA-1 que se aisló del queso Cotija, del estado de Michoacán, además *E. durans* 41D que produce Duracin GL que se aisló de muestras de queso mexicano (Trejo-González *et al.* 2022). En las muestras de lactosuero de las 4 localidades analizadas en Puebla se aislaron 89 bacterias ácido lácticas de las cuales 33 fueron caracterizadas como del género *Enterococcus*, la especie mayoritaria fue *E. faecium*, seguida de *E. faecalis* y en tercer lugar *E. durans*. Para cuatro cepas no se determinó la especie. Hace falta una legislación apropiada para diferenciar entre cepas de *Enterococcus* patógenas y cepas seguras, con la finalidad de promover en productores y consumidores la aceptación de cepas seguras como candidatas potenciales para aplicaciones útiles y benéficas como probióticos. Lo anterior, contribuye a revalorizar el lactosuero como una fuente de beneficios para la salud y evitar desecharlo al ambiente.

### CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

### LITERATURA CITADA

- Almeida-Santos AC, Novais C, Peixe L, Freitas, AR (2021) *Enterococcus spp.* as a Producer and Target of Bacteriocins: A DoubleEdged Sword in the Antimicrobial Resistance Crisis Context. *Antibiotics* 10: 1215. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101215>
- Alves DAP, D Souza SKA, Campos FGH, Batista XD, Campos PAC, Titze DAR (2009) Rapid detection of vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE) in rectal samples from patients 12 de la biotecnología. *Agroindustrial Science* 11: 105–116. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702009000400010>
- Asas C, Llanos C, Matavaca J, Verdezoto D (2021) El lactosuero: impacto ambiental, usos y aplicaciones vía mecanismos de la biotecnología. *Agroindustrial Science* 11: 105–116. <https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2021.01.13>
- Asunis F, Gioannis GD, Dessì P, Isipato M, Lens PNL, Muntoni A, Poletini A, Pomi R, Rossi A, Spiga D (2020) Review: The dairy biorefinery: Integrating treatment processes for cheese whey valorisation. *Journal of Environmental Management* 276: 111240. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111240>
- Bettera L, Levante A, Bancalari E, Bottari B, Gatti M (2023) Lactic acid bacteria in cow raw milk for cheese production: Which and how many? *Frontiers in Microbiology* 13: 1092224. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1092224>
- Braïek OB, Smaoui S (2019) *Enterococci*: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics, *BioMed Research International* 13 <https://doi.org/10.1155/2019/5938210>
- Buchanan D, Martindale W, Romeih E, Hebishy E (2023) Recent advances in whey processing and valorisation: Technological and environmental perspectives. *International Journal of Dairy Technology* 76(2): 291-312. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12935>
- Caro I, Quinto EJ, Fuentes L, Alessandria V, Cocolin LS, Redondo-del-Río MP, Mayo B, Flores AB, Mateo J (2020) Characterization of *Lactococcus* strains isolated from artisanal Oaxaca cheese. *LWT-Food Science and Technology* 122: 109041. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109041>

- Centeno JA, Lorenzo JM, Carballo J (2022) Effects of autochthonous *Kluyveromyces lactis* and commercial *Enterococcus faecium* adjunct cultures on the volatile profile and the sensory characteristics of short-ripened acid-curd Cebreiro cheese. *Food Microbiology* 108: 104101. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104101>.
- Davis BC, Keenum I, Calarco J, Liguori K, Milligan E, Pruden A, Harwood VJ (2022) Towards the standardization of *Enterococcus* culture methods for waterborne antibiotic resistance monitoring: A critical review of trends across studies. *Water Research X* 17: 100161. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2022.100161>.
- De-Sousa MA, Muller MP, Berghahn E, De-Sousa CFV, Granada CE (2020) New *Enterococci* isolated from cheese whey derived from different animal sources: High Biotechnological potential as starter cultures. *LWT-Food Science and Technology* 131: 109808. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109808>.
- Decadt H, Weckx S, De-Vuyst L (2023) The microbial and metabolite composition of Gouda cheese made from pasteurized milk is determined by the processing chain. *International Journal of Food Microbiology* 110557. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110557>.
- Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W (2003) Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology* 88: 165-188. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00178-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00178-8).
- Dosuky AS, Elsayed TR, Yousef ET, Barakat OS, Nasr NF (2022) Isolation, identification, and application of lactic acid-producing bacteria using salted cheese whey substrate and immobilized cells technology. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 20: 26. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-03316-5>.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P (1995) Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant *Enterococci* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 24-27. <https://doi.org/10.1128/JCM.33.5.1434-1434.1995>.
- Georges M, Odoyo E, Matano D, Tiria F, Kyany'a C, Mbwika D, Mutai WC, Musila L (2022) Determination of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* antimicrobial resistance and virulence factors and their association with clinical and demographic factors in Kenya. *Journal of Pathogens* Article ID 3129439. <https://doi.org/10.1155/2022/3129439>
- González-Córdova AF, Yescas C, Ortiz-Estrada AM, DLRosa-Alcaraz MDLA, Hernández-Mendoza A, Vallejo-Cordoba B (2016) Invited review: Artisanal Mexican cheeses. *Journal of Dairy Science* 99: 3250-3261. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10103>
- Hawaz E, Guesh T, Kebede A, Menkir S (2016) Characterization of lactic acid bacteria from camel milk and their technological properties to use as a starter culture. *East African Journal of Sciences* 10: 49-60
- Kasimin ME, Shamsuddin S, Molujin AM, Sabullah MK, Gansau JA, Jawan R (2022) Enterocin: Promising biopreservative produced by *Enterococcus* sp. *Microorganisms* 10: 684. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040684>
- Knijff E, Dellaglio F, Lombardi A, Andrighetto C, Torriani S (2001) Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *ddl* genes. *Journal of Microbiological Methods* 47: 35-40.
- Li C, Ding J, Chen D, Shi Z, Wang L (2020) Bioconversion of cheese whey into a hetero-exopolysaccharide via a one-step bioprocess and its applications. *Biochemical Engineering Journal* 165: 107701. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107701>.
- Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB (2009) Genus I *Enterococcus*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 3. The firmicutes. 2nd ed. Springer. Dordrecht, Heidelberg, London and New York. pp: 594-606.
- Marasco R, Gazzillo M, Campolattano N, Sacco M, Muscariello L (2022) Isolation and identification of lactic acid bacteria from natural whey cultures of buffalo and cow milk. *Foods* 11: 233. <http://dx.doi.org/10.3390/foods11020233>.
- Margalho PL, Van Schalkwijk S, Bachmann H, Sant'Ana SA (2020) *Enterococcus* spp. in Brazilian artisanal cheeses: Occurrence and assessment of phenotypic and safety properties of a large set of strains through the use of high throughput tools combined with multivariate statistics. *Food Control* 118: 107425. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.104425>.
- Mazorra-Manzano MA, Moreno-Hernández JM (2019) Propiedades y opciones para valorizar el lactosuero de la quesería artesanal. *Ciencia UAT* 14: 133-144.

- Metz M, Sheehan J, Feng PCH (2020) Use of indicator bacteria for monitoring sanitary quality of raw milk cheeses—A literature review. *Food Microbiology* 85: 103283. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2019.103283>.
- Murugesan S, Reyes-Mata MP, Nirmalkar K, Chavez-Carbajal A, Juarez-Hernandez JI, Torres-Gomez RE, Pina-Escobedo A, Maya O, Hoyo-Vadillo C, Ramos-Ramírez EG, Salazar-Montoya JA, Garcia-Mena J (2018) Profiling of bacterial and fungal communities of Mexican cheeses by high throughput DNA sequencing. *Food Research International* 113: 371-381. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.023>.
- Nasiri M, Hanifian S (2022) *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in pasteurized milk: Prevalence, genotyping, and characterization of virulence traits. *LWT-Food Science and Technology* 153: 112452 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112452>.
- Olvera-García M, Sanchez-Flores A, Quirasco BM (2017) Genomic and functional characterisation of two *Enterococcus* strains isolated from Cotija cheese and their potential role in ripening. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 2251-2267. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8765-3>.
- Park E, Ha J, Lim S, Kim G, Yoon Y (2021) Development of postbiotics by whey bioconversion with *Enterococcus faecalis* M157 KACC81148BP and *Lactococcus lactis* CAU2013 KACC81152BP for treating periodontal disease and improving gut health. *Journal of Dairy Science* 104: 12. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20616>.
- Quillama PE, Cruz PL, Gandolfo NG (2020) Selection and characterization of native *Enterococcus* Strains with antimicrobial potential isolated from artisanal manufactured cheeses. *Ecología Aplicada* 19: 25-34. <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v19i1.1443>.
- Rabaioli RG, Kuhn D, Beux S, Jachetti MM, Volken DSCF (2019) Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. *International Dairy Journal* 98: 25-37. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.06.012>.
- Rangel-Ortega SDC, Campos-Múzquiz LG, Charles-Rodriguez AV, Chavez-Gonzalez ML, Palomo-Ligas L, Contreras-Esquivel JC, Solanilla-Duque JF, Flores-Gallegos AC, Rodríguez-Herrera R (2023) Review: Biological control of pathogens in artisanal cheeses. *International Dairy Journal* 140: 105612. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105612>.
- Rivera-de-la-Cruz JF, Villegas DGA, Luis Alberto Miranda RLA, García CJL (2017) Identificación de bacterias acidolácticas antagónicas de *Salmonella enterica* var. Typhimurium aisladas de queso artesanal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4: 785-797. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i4.7>.
- Rocha-Mendoza D, Kosmerl E, Krentz A, Zhang L, Badiger S, Miyagusuku-Cruzado G (2020) Invited review: Acid Whey trends and health benefits. *Journal of Dairy Science* 104: 1262-1275. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19038>.
- SCFI (1977) Norma Mexicana NMX-F-285-1977. Muestreo y Transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. <http://www.conadesuca.gob.mx/eficienciaproductiva/normas/2013/nmx-f-285-1977.pdf>. Fecha de consulta: 16 de enero de 2024.
- SIAP (2023) Panorama agroalimentario-2023: Leche de bovino. México. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/panorama-agroalimentario-258035>. Fecha de consulta: 16 de enero de 2024.
- Song D, Lee HB, Kim GB, Kang SS (2022) Whey fermented by *Enterococcus faecalis* M157 exhibits antiinflammatory and antibiofilm activities against oral pathogenic bacteria. *Journal of Dairy Science* 105: 1900–1912. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21233>.
- Terzić-Vidojević, A, Veljović K, Popović N, Tolinački M, Golić N (2021) *Enterococci* from Raw-Milk Cheeses: Current Knowledge on Safety, Technological, and Probiotic Concerns. *Foods* 10: 2753. <https://doi.org/10.3390/foods10112753>
- Torres-Llanez MJ, Vallejo-Cordoba B, Díaz-Cinco ME, Mazorra-Manzano MA, González-Córdova AF (2006) Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control* 17: 683–690. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.04.004>.
- Trejo-González L, Gutiérrez-Carrillo AE, Rodríguez-Hernández AI, López-Cuellar MR, Chavarría-Hernández N (2022) Bacteriocins Produced by LAB Isolated from Cheeses within the Period 2009–2021: a Review. *Probiotics & Antimicrobial Proteins* 14: 238–251 <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09825-0>.
- Yean YC, Su YL, Lalitha P, Ravichandran M (2007) A nanoplex PCR assay for the rapid detection of vancomycin and bifunctional aminoglycoside resistance genes in *Enterococcus* species. *BMC Microbiology* 7: 112-120. doi: 10.1186/1471-2180-7-112 <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/7/112>.