

Identificación de bacterias ácido lácticas en quesos artesanales de Baja California, México, por secuenciación del gen ARNr 16S

Silva, P.L.¹; López, V.G.¹; Montañó, G.M.¹; Villa, A.R.²; Herrera, R.J.¹; González, S.A.¹; Inzunza, A.F.¹; Gutiérrez, F.K.¹; Monge, N.F.¹; Martínez, A.C.¹; García, G.F.² y Medina, B.G.¹®

¹Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Mexicali. Baja California. México.

²Instituto de Ingeniería. Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Mexicali. Baja California. México.

RESUMEN

En este estudio, se identificaron 43 aislados de bacterias ácido lácticas (BAL) en distintos quesos elaborados con leche cruda de vaca a diferentes tiempos de maduración en dos estaciones del año. La identificación fue realizada por amplificación del gen bacteriano ARNr 16S por PCR y secuenciación. Las especies *Enterococcus faecalis* (27.9%) y *Lactobacillus plantarum* (32.6%) se encontraron durante todo el periodo de maduración de los quesos en invierno, en tanto en verano solo *L. plantarum* prevaleció durante todo el proceso de maduración. *Enterococcus faecium* (11.7%) y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (14%) perduraron en ambas estaciones en diferentes tiempos de maduración. *Weissella paramesenteroides* (2.3%) se encontró solo durante el periodo invernal, en tanto en verano se encontraron *Lactobacillus paracasei* (2.3%), *Lactobacillus rhamnosus* (2.3%), *L. lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetyllactis* (2.3%) y *Weissella viridescens* (11%). En el presente estudio las especies identificadas sugieren que el queso de esta región tiene características microbiológicas distintivas y que éstas varían en función de la estación del año, haciendo necesaria una estandarización en las prácticas de cuajado y maduración del queso, y en un futuro cercano, inocular cepas bacterianas deseables para mantener las características organolépticas de las distintas marcas durante todo el año.

Identification of lactic acid bacteria in artisanal cheeses from Baja California, Mexico, by sequencing the gene 16S rRNA

SUMMARY

In this study, 43 isolates of lactic acid bacteria (LAB) were identified in different cheeses made with raw cow's milk at different maturing times in two seasons of the year. The identification was made by amplification of the bacterial gene 16S rRNA by PCR and sequencing. The species *Enterococcus faecalis* (27.9%) and *Lactobacillus plantarum* (32.6%) were found throughout the period of maturation of the cheeses in winter, while in summer only *L. plantarum* prevailed during the whole maturation process. *Enterococcus faecium* (11.7%) and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (14%) persisted in both seasons at different maturation times. *Weissella paramesenteroides* (2.3%) was found only during the winter period, while in summer *Lactobacillus paracasei* (2.3%), *Lactobacillus rhamnosus* (2.3%), *L. lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetyllactis* (2.3%) and *Weissella viridescens* (11%). In the present study the identified species suggest that the cheese of this region has distinctive microbiological characteristics and that these vary depending on the season of the year, making it necessary to standardize the practices of curdling and maturation of cheese, and in the near future, inoculate desirable bacterial strains to maintain the organoleptic characteristics of the different brands throughout the year.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Diversidad bacteriana.
Bacterias ácido lácticas.
Queso artesanal.
Secuenciación ARNr 16S.
Región ojos negros.

ADDITIONAL KEYWORDS

Bacterial diversity.
Lactic acid bacteria.
Artisanal cheese.
Sequencing 16S rRNA.
Ojos negros region.

INFORMATION

Cronología del artículo.
Recibido/Received: 11.04.2019
Aceptado/Accepted: 10.04.2022
On-line: 15.04.2022
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:
gerardom@uabc.edu.mx

INTRODUCCIÓN

El queso denominado Real del Castillo, elaborado en la región de Ojos Negros, municipio de Ensenada, Baja California, México ha alcanzado una alta acepta-

ción en la región de la ruta del vino y otras partes del estado. Tradicionalmente su elaboración fue incorporada por inmigrantes europeos y ahora han adoptado una adaptación artesanal utilizada desde 1930. Actualmente en la elaboración de este producto se utiliza le-

che de vaca procedente de razas Holstein, Jersey, Pardo Suiza y sus cruza, bajo un sistema de libre pastoreo y estabulación (semi-extensivo) y riguroso control de tuberculosis y brucelosis por autoridades sanitarias. En promedio cada hato produce 450 litros diarios de leche cuyos parámetros de calidad oscilan en promedios de proteínas (32.98 g/l), grasa (36.62g/l), lactosa (47.74g/l), ac. láctico (1.72g/l) (Silva *et al.*, 2020).

Es un queso elaborado todo el año, a partir de leche sin pasteurizar y sin el agregado de cultivos bacterianos iniciadores de la fermentación, (Hernández, 2015). Se distingue de otros quesos de la región por ser prensado, de pasta semidura a dura, con o sin corteza, y su comercialización ocurre en diferentes días de maduración de acuerdo a la demanda y capacidad de producción, siendo generalmente entre 1 y 21 días (Silva *et al.*, 2017). Al igual que otros quesos, el proceso de elaboración implica manipulación directa de los ingredientes en el quebrado, salado y moldeado de la cuajada, y distinto tiempo y peso en el prensado y maduración de la pasta, careciendo de estandarización en estos procesos. Al parecer estos factores influyen en que se desarrollen diferentes bacterias ácido lácticas (BAL) y con ello las características finales del queso sean muy variables (Domingos *et al.*, 2017). Uno de los géneros de BAL más comunes en quesos no pasteurizados es *Lactococcus*, el cual constituye parte de la microbiota natural de la leche y de la mayoría de los cultivos iniciadores comerciales con actividad acidificante y ligeramente proteolítica en la industria láctea (Terzic *et al.*, 2014). Por otro lado, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* confieren gran variedad de sabores y texturas a los quesos (Domingos *et al.*, 2017). Es importante señalar que las BAL nativas pueden determinar las características del queso de una región geográfica (González *et al.*, 2016), en consecuencia diferentes autores han distinguido genotípicamente BAL mediante secuenciación del gen ARNr 16S en distintos quesos mexicanos, como el Cotija (Escobar *et al.*, 2016; Chombo *et al.*, 2016), queso Chihuahua (Renyé *et al.*, 2011), así como quesos Europeos como el Pico de Portugal (Domingos *et al.*, 2017), Manchego de España (Sánchez *et al.*, 2006) y Raschera del Valle Piedmont en Italia (Dolci *et al.*, 2008). Debido a que se desconocían las especies de BAL en el queso de Ojos Negros, en este estudio se identificaron 43 aislados en distintos quesos elaborados con leche cruda de vaca a diferentes tiempos de maduración en dos estaciones del año.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio, se seleccionaron dos quesos de tres unidades productoras por estación del año y se fraccionaron en dos piezas cada uno para obtener finalmente 24 piezas correspondientes a los días 1, 21, 42 y 63 días de maduración. Las muestras se mantuvieron en un rango de temperatura de 12 a 17°C y 72-87% de humedad relativa (HR) simulando condiciones de las salas de oreo de origen, utilizando un refrigerador convencional con un dispositivo aireador y humidificador colocado en su interior. Al término de maduración adecuado, cada muestra se analizó para bacterias ácido lácticas (BAL), cultivando en agar Man Rogosa Sharpe (MRS: Difco, USA) y medio sólido M17 suplementado

con lactosa para determinar su presencia (Sánchez *et al.*, 2006). Posteriormente se seleccionaron colonias que concordaran con tinción Gram-positiva y morfología (coco, bacilo, cocobacilo), catalasa-negativa (H₂O₂, 3% vol / vol) y citocromo-oxidasa-negativa según Caraffa *et al.* (2015) y Østlie *et al.* (2016). Una vez caracterizados los aislados, se cultivaron en 4 ml de los mismos medios utilizados para el aislamiento durante 24 horas a 35°C, tomando una alícuota para agregarle 10% v/v de glicerol para su mantenimiento a -20°C, en tanto al resto del volumen se le procedió a extraer ADN utilizando el paquete comercial DNeasy blood & Tissue Kit (QIAGEN, USA) siguiendo el protocolo para bacterias Gram positivas descrito por el proveedor. El ADN fue resuspendido en 100 µl de agua grado molecular, se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X, se tiñó con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, se observó en luz ultravioleta y se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm. La amplificación del gen ARNr 16S se realizó utilizando los oligonucleótidos universales UNI 8F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y UNI 53SR 3'-GTATTACC GCGGCTGCTGG-5', que amplifican un fragmento de aproximadamente 527 pb. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de pre-desnaturalización a 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 30 s, alineación a 55°C durante 60 s, extensión a 72°C por 30 s, y un ciclo de extensión final a 72°C por 3 min (Negoro *et al.*, 2013). 10 µl de los productos de PCR fueron observados en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X, teñidos con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio y visualizados en luz ultravioleta. Posteriormente los productos de PCR se dializaron utilizando filtros de 0.025µm (millipore, USA), se prepararon alícuotas con 400ng de ADN y 10 pmol de oligonucleótido UNI 8F en un volumen total de 12 µl y se enviaron a secuenciar a Eurofins Microbiology (CA, USA). Las secuencias obtenidas fueron introducidas en el programa BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) seleccionando aquellas con una identidad del 96 al 100 % (Rossetti *et al.*, 2005). Los datos de aislados de BAL en los medios de cultivo (MRS y M17), días de maduración (1, 21, 42 y 63) y estación del año (invierno y verano) se analizaron utilizando el paquete Statistix 9.1 de Windows, para obtener las proporciones de cada variable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla I**, se presentan los 43 aislados de BAL obtenidos e identificados por secuenciación del gen ARNr 16S en muestras recuperadas en medios de cultivo MRS y M17. Es interesante notar que los géneros *Lactobacillus* (16/43 37.2%) y *Weisella* (3/43 7%) crecieron solamente en agar MRS, aunque también se recuperaron en este medio *Enterococcus spp* (8/43 18.6%) y *Lactococcus spp*. (1/43 2.3%). Estos resultados son similares a los trabajos de Renyé *et al.* (2011), Fusco *et al.* (2015) y Avnikirmaci *et al.* (2016) quienes señalaron que el medio MRS es el sustrato preferido por *Lactobacillus*, coincidiendo además en su baja selectividad, ya que también pueden crecer algunos aislados de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella* y *Pseudomonas*. El medio de cultivo M17 solo favoreció el crecimiento de *Enterococ-*

Tabla I. Porcentaje de aislados de BAL obtenidos por secuenciación del gen ARNr 16S en muestras recuperadas de dos medios de cultivo seleccionados (Percentage of BAL isolates obtained by 16S rRNA gene sequencing in samples recovered from two selected culture media).

Identificación molecular de aislados de BAL - n (%) ²										
Medio ¹	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Total n (%)
MRS	5(11.6)	3(7)	1(2.3)	ND	1(2.3)	2(4.7)	14(32.6)	1(2.3)	1(2.3)	28 (65.1)
M17	7(16.3)	2(4.7)	5(11.7)	1(2.3)	ND	ND	ND	ND	ND	15 (34.9)
	12 (27.9)	5 (11.7)	6 (14)	1 (2.3)	1 (2.3)	2 (4.7)	14 (32.6)	1 (2.3)	1 (2.3)	43 (100)

Total 43 aislados (n) de BAL analizados por amplificación del gen bacteriano ARNr 16S por PCR
¹ Agar Man Rogosa Sharpe (MRS) a 37 °C ± 2 °C por 24 h, y agar M17 supl. glucosa 1%, a 37 °C ± 2 °C por 48 horas.
² *Enterococcus faecalis* (A), *Enterococcus faecium* (B), *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (C), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *Diacetyllactis* (D), *Weissella paramesenteroides* (E), *Weissella viridescens* (F), *Lactobacillus plantarum* (G), *Lactobacillus paracasei* (H), *Lactobacillus rhamnosus* (I).
 ND – no detectado

cus spp. (9/43 21%) y *Lactococcus* spp. (6/43 14%) siendo este sustrato el preferido en varios estudios para el aislamiento de estos géneros en queso (Carvalho et al., 2003; Dolci et al., 2008; Renye et al., 2011; Domingos et al., 2017).

En la **Tabla II** se muestran las proporciones de aislados de BAL obtenidos en quesos en dos estaciones del año. Las especies encontradas en la estación invernal fueron *E. faecalis* (10/25 40%), *L. plantarum* (8/25 32%), *E. faecium* (4/25 16%), *L. lactis* subsp. *Lactis* (2/25 8%) y *W. paramesenteroides* (1/25 4%), en tanto en verano las especies encontradas fueron *L. plantarum* (6/18 33.2%), *L. lactis* subsp. *Lactis* (4/18 22.2%), *E. faecalis* (2/18 11.1%) y *W. viridescens* (2/18 11.1%), encontrándose también *E. faecium*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* y *L. lactis* subsp. *Lactis* bv. *Diacetyllactis*, cada una con un solo aislado (5.6%). Al comparar nuestros resultados, con los obtenidos por Terzic et al. (2014), para un queso artesanal, elaborado todo el año con leche cruda y

madurado por 15 días en la región de Bosnia- Herzegovina, se aprecian similitudes, ya que reportaron 40% de aislados del género *Enterococcus*, 38% de *Lactococcus* y 10% de *Lactobacillus*, en tanto en nuestro estudio si bien *Enterococcus* fue el más representado (56%), el género *Lactobacillus* también estuvo bien representado (32%), en tanto el género *Lactococcus* solo representó el 8% del total de aislados. En verano, los mismos autores señalan variaciones en el comportamiento de las BAL, con una disminución en *Enterococcus* (18%) e incremento de *Lactococcus* (43%) y *Lactobacillus* (30%); si bien estas proporciones difieren con los hallazgos presentados en este estudio, se aprecia un comportamiento similar al incrementarse *Lactobacillus* (44%) y *Lactococcus* (28%), y disminuir *Enterococcus* (17%). Una posible explicación en las variaciones de *Lactobacillus*, sería su capacidad de multiplicarse a temperaturas de entre 30 hasta 45 °C, así como su tolerancia a ambientes ácidos menores a 5.3 de pH (Renye et al., 2011), mientras que las variaciones en la frecuencia de *Enterococcus* pueden

Tabla II. Distribución del número de aislados de BAL obtenidos en dos estaciones del año y diferentes días de maduración (Distribution of BAL isolates obtained in two seasons of the year and different maturation days).

No. aislados por Cepa ¹	día maduración invierno					día maduración verano					
	1 n(%)	21 n(%)	42 n(%)	63 n(%)	Total n(%)	1 n(%)	21 n(%)	42 n(%)	63 n(%)	Total n(%)	
<i>Enterococcus</i> 14(56)						<i>Enterococcus</i> 3(17)					
<i>E. faecalis</i>	3(12)	3(12)	2(8)	2(8)	10(40)	ND	1(5.6)	ND	1(5.6)	2(11.1)	
<i>E. faecium</i>	ND	ND	ND	4(16)	4(16)	ND	1(5.6)	ND	ND	1(5.6)	
<i>Lactobacillus</i> 8(32)						<i>Lactobacillus</i> 8(44)					
<i>Lb. plantarum</i>	2(8)	1(4)	3(12)	2(8)	8(32)	1(5.6)	1(5.6)	2(11)	2(11)	6(33.2)	
<i>Lb. Paracasei</i>	ND	ND	ND	ND	ND	1(5.6)	ND	ND	ND	1(5.6)	
<i>Lb. Rhamnosus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1(5.6)	ND	ND	1(5.6)	
<i>Lactococcus</i> 2(8)						<i>Lactococcus</i> 5(28)					
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	ND	2(8)	ND	ND	2(8)	1(5.6)	2(11)	1(5.6)	ND	4(22.2)	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetyllactis</i>	ND	ND	ND	ND	ND	1/5.6%	ND	ND	ND	1(5.6)	
<i>Weissella</i> 1(4)						<i>Weissella</i> 2(11)					
<i>W. paramesenteroides</i>	ND	1(4)	ND	ND	1(4)	ND	ND	ND	ND	ND	
<i>W. viridescens</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2(11.1)	ND	ND	ND	2(11.1)	
Total n(%)	5(20)	7(28)	5(20)	8(32)	25(100)	6(33)	6(33)	3(17)	3(17)	18(100)	

ND - no detectado

depender del tipo de queso, estación del año en la que se elabora, de su actividad halotolerante y proteolítica (Vallejo et al., 2008). El género *Lactococcus* es el principal responsable de la acidificación del queso, sin embargo su frecuencia depende de su incapacidad de tolerar concentraciones elevadas de sal ($> 6.5\%$), un suceso que comúnmente ocurre en quesos artesanales conforme transcurre su maduración (Terzic et al., 2014).

En cuanto a la proporción de especies de BAL por días de maduración (Tabla II), se observó que *L. plantarum* fue la especie que más perduro del día 1 al 63 de maduración en los quesos de invierno (8/25 32%) y verano (6/18 33.2%). Esta especie se ha encontrado en diferentes quesos tradicionales elaborados con leche cruda en proporciones del 30% en queso Manchego (Sánchez et al., 2006), 38.74% en queso Cotija Mexicano (Escobar et al., 2016) y 19.3% en queso Pico Portugués (Domingos et al., 2017), siendo los dos primeros casos similares en proporción a los resultados obtenidos en este estudio. *L. plantarum* es una especie cuyo rasgo fisiológico característico es su tolerancia al ácido y altas concentraciones de sal, como consecuencia de su metabolismo heterofermentador, por lo que es una especie comúnmente encontrada en muestras de queso madurado durante 3 a 4 meses, produciendo además acetoina debido al incremento en la proteólisis secundaria durante el envejecimiento del queso, ocasionando el desarrollo e intensidad en sus sabores y aromas (Dolci et al., 2008). Otras especies de este género con menor presencia fueron *L. paracasei* (1/18 5.6%) y *L. rhamnosus* (1/18 5.6%), presentes hasta los 21 días de maduración en verano. *L. paracasei* se ha reportado en quesos semiduros como el Manchego, Noruego y Pico (Sánchez et al., 2006; Østlie et al., 2016; Domingos et al., 2017) en 11.5 %, 20 % y 13.15% de los aislados respectivamente.

E. faecalis, una especie reportada en quesos elaborados con leche cruda en otros estudios, se encontró durante todo el periodo de maduración en este estudio como población dominante (10/25 40%) y en menor medida se observó *E. faecium* (4/25 16%) a los 63 días de maduración en época de invierno, difiriendo la frecuencia de estas especies con la observada en verano, la cual fue menor. La permanencia de *E. faecalis* se puede deber a su capacidad de subsistir cuando el ácido láctico se consume y el pH disminuye como lo señalan Carvalho et al. (2003) y Carrafa et al. (2015), condición que afecta al desarrollo de *E. faecium*, especie poco tolerante a pH ácido. Una posible explicación del comportamiento de estas dos especies en nuestro trabajo, pudieran ser las condiciones de acidez que se desarrollaron en los quesos durante su maduración, resultando los quesos en invierno con menor acidez (5.83 ± 0.32) y porcentaje de ácido láctico (0.935 ± 0.33) en contraste con los quesos de verano, que tuvieron un pH de (5.37 ± 0.32) y 0.492 ± 0.17 de porcentaje de ácido láctico (datos no mostrados). De todas las BAL, el género *Enterococcus* es el más controversial para usarse en alimentos, y su presencia ha sido cuestionada debido a su potencial asociación con problemas de salud, ya que su existencia precisa deficiencias de higiene como fuentes de agua contaminada y rutinas de ordeña sin buenas prácticas durante la elaboración y procesamiento de quesos. Aun así, se ha encontrado

en alta proporción en muchos quesos elaborados con leche cruda mejorando su sabor, siendo *E. faecalis*, y *E. faecium* especies fuertemente ligadas a quesos semiduros como el queso Travník elaborado en la región de Bosnia y Herzegovina, y señalado por Terzic et al. (2014) con 11.3 a 25% respectivamente en los aislados recuperados y en el queso Urfa de la región de Turquía, donde se reportó un 40% de aislados de *E. faecium* y 18.57% de *E. faecalis* (Avnikirmaci et al., 2016). En el queso llamado Pico elaborado en la región de Portugal, se reportó una frecuencia de 71% de *E. faecalis* por Domingos et al., (2017), quienes además señalaron que el género *Enterococcus* degrada la caseína y genera compuestos como el diacetilo durante la maduración, mejorando el sabor y aroma en los quesos. Por otra parte *E. faecium* en queso Cotija (Escobar et al., 2016; Chombo et al., 2016), ha sido señalado como promotor del desarrollo de cambios fisicoquímicos deseados y producción de bacteriocinas.

En cuanto a *Lactococcus lactis subsp. lactis*, su presencia solo se observó a los 21 días en invierno (2 / 8%) y en verano se observó desde el día 1 al 42 (4 / 22.2%). *L. lactis subsp. lactis* bv. *Diacetylactis* fue recuperada solamente al principio de la maduración en verano (1 / 5.6%). Una condición que caracteriza a esta especie con metabolismo homofermentador obligado y tolerante al ácido, es su falta de adaptación a condiciones de salinidad, siendo inhibida en ambientes por arriba de 4 % de NaCl como lo explican Terzic et al. (2014) y Avnikirmaci et al. (2016), a diferencia de otros géneros que están adaptados a vivir por arriba de concentraciones de 6.5% de sal como son *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Weissella* que también fueron aislados en este trabajo. La baja frecuencia de aislados del género *Lactococcus* pudo deberse a la falta de control sobre la cantidad de sal añadida a la cuajada durante el proceso de salado del queso Ojos Negros o a la concentración de sal que aumenta en el queso a medida que va perdiendo agua durante su maduración. Dado que no se analizó el contenido de sal en este trabajo, es importante considerar esta variable en futuros trabajos. *L. lactis subsp. lactis* es una BAL comúnmente utilizada en la industria láctea como cultivo iniciador por su capacidad de acidificar en corto tiempo y su actividad proteolítica, su presencia predomina antes y durante la maduración en quesos y ha sido reportada en la producción y maduración de quesos artesanales con 33% en el queso Pico (Domingos et al., 2017) y 60% en queso Chihuahua (Renyé et al., 2011). *L. lactis subsp. lactis* bv. *Diacetylactis*, es una biovariedad utilizada comúnmente en diversos quesos por su alta capacidad de producción de diacetilo al comienzo de la maduración en quesos de pasta dura y prensada, siendo el compuesto constituyente de los aromas cremosos y mantecosos del queso Cheddar, Cambembert, Edam y Gouda (Passerini et al., 2013).

El género *Weissella* fue el menos frecuente en los quesos al comienzo de la maduración, aislándose *W. paramesenteroides* (1/4%) en invierno y *W. viridescens* (2/11.1%) en verano. Este género no es tan común en quesos, pero sí en animales, vegetales y forrajes fermentados (Fusco et al., 2015). La presencia del género *Weissella* generalmente no ha sido señalada como población dominante en quesos madurados, sin embargo *W.*

paramesenteroides representó el 26.8% en queso Cotija madurado, originario de la Sierra de Jalmich entre Jalisco y Michoacán (Escobar *et al.*, 2016) siendo el género *Weissella* propuesto como promotor de textura deseada en queso Cheddar sin afectar su aroma (Lynch *et al.*, 2014).

CONCLUSIÓN

Las especies aisladas durante la maduración del queso en el presente trabajo han sido aisladas en otros quesos, sin embargo, se observaron características propias en cuanto a las especies encontradas y su proporción por estación del año y días de maduración, razón por la cual probablemente tiene unas características organolépticas tan especiales. Es importante reconocer que, a pesar de los años elaborando quesos, y de haber mantenido márgenes óptimos en buenas prácticas de higiene y manufactura, los productores deban enfocar ahora su atención a la uniformidad en la maduración del queso, lo cual les plantea desafíos en su adopción para mantener semejanzas en su elaboración diaria, con el fin de dar mayor valor agregado a sus productos, obtener una posible denominación de queso artesanal y acceder a un mercado más amplio. Para lo anterior, es importante que se revisen las prácticas que afectan la población de bacterias, su interacción con el ambiente natural y su impacto en las características organolépticas, aconsejándose primeramente elaborar el queso inmediatamente al recibir la leche y vigilar el incremento en la temperatura de coagulación lentamente hasta los 38 °C /20 min para permitir la supervivencia de *Lactococcus spp.* y *Enterococcus spp.* Por otra parte, la práctica de salar la cuajada con sal refinada sin cuantificar su concentración, es una actividad muy común, siendo un factor que influye en que *Lactococcus spp.* por ejemplo sean inhibidas a concentraciones mayores a 4%, en tanto *Lactobacillus spp.* y *Enterococcus spp.*, que toleran concentraciones por arriba de 6%, se ven beneficiadas, modificando las características organolépticas y dificultando estandarizar un producto deseable.

Finalmente, para mantener el desarrollo de especies bacterianas deseables tanto en verano como en invierno se deben vigilar factores como tiempo de coagulación, temperatura de maduración, mantenimiento de pH y en su caso inoculación de bacterias locales, para mantener la calidad y características entre diferentes productores y proteger el patrimonio cultural de estos quesos.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Instituto Nacional para el Desarrollo de Capacidades del Sector Rural, A.C. y Servicio Nacional de Capacitación y Asistencia Técnica Rural Integral (SENACATRI), bajo el folio PIIEX-E-02-2015-001. Queseros del municipio de Ojos Negros en Ensenada BC por el apoyo brindado, al Laboratorio de Calidad de Leche y Biología Molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California por brindar instalaciones y equipo.

BIBLIOGRAFÍA

- Avnikirmaci, H, Hamdiozer, B, Akcelik, M, Akcelik, N 2016, 'Identification and characterisation of lactic acid bacteria isolated from traditional Urfa cheese', *International Journal of Dairy Technology*, vol. 69, pp 301-307.
- Caraffa, I, Nardin, T, Larcher, R, Viola, R, Tuohy, K, Franciosi, E 2015, 'Identification and characterization of wild *Lactobacilli* and *Pediococci* from spontaneously fermented Mountain Cheese', *Food Microbiology*, vol 48, pp 123-132.
- Carvalho, AS, Silva, J, Ho1, P, Teixeira, P, Malcata, FX, Gibbs, P 2003 'Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*', *Journal of Applied Microbiology*, vol 94, pp 947-952.
- Chombo, MMP, Kirchmayr, M, Gschaedler, A, Lugo, CE, Villanueva, RS 2016 'Effects of controlling ripening on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE, LW', *Food Science and Technology*, vol 6, pp 1153-1161.
- Domingos, LMFP, Stanton, C, Ross, PR, Dapkevicius, MLE, Silva, CCG 2017 'Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese', *Food Microbiology*, vol 63, pp 178 - 190.
- Dolci, P, Alessandria, V, Zeppa, G, Rantsiou, K, Cocolin, L 2008 'Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria', *Food Microbiology*, vol 25, pp 392-399.
- Escobar, ZA, Sánchez, FA, Quirasco, BM 2016 'Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota', *Food Microbiology*, vol 57, pp 116-127.
- Fusco, V, Quero, GM, Cho, GS, Kabisch, J, Meske, D, Neve, H, Bockelmann, W, Franz CMA 2015 'The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. Front', *Frontiers in Microbiology*, vol 6, pp 1-22.
- González, RA, Carro, S, Cal, K, Giacaman, S, Aldrovandi, A 2016 '*Lactococcus lactis* autóctono: evaluación del efecto antilisterial y propiedades sensoriales en quesos tipo Cuartirolo', *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*, vol 12, pp 15-26.
- Hernández, SA 2015, 'Caracterización del Queso Real del Castillo en Valle de Ojos Negros, Baja California', Tesis de Maestría. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma de Chihuahua. México.
- Lynch, KML, McSweeney, PLH, Arendt, EK, Lowe, TU, Galle, S, Coffey, A 2014, 'Isolation and characterization of exopolysaccharide-producing *Weissella* and *Lactobacillus* and their application as adjunct cultures in Cheddar cheese', *International Dairy Journal*, vol 34, pp 125-134.
- Negoro, E, Hiromichi, I, Katsunori, T, Satoshi, I, Kazutaka, T, Shinji, K, Takahiro, Y, Akira, Y, Yoshimasa, U, Mitsunobu, S, Takanori, U 2013, 'Utility of PCR amplification and DNA microarray hybridization of 16S rDNA for rapid diagnosis of bacteremia associated with hematological diseases', *International Journal of Infectious Diseases*, vol 17, pp 271-276.
- Østlie, MH, Kraggerud, H, Longva, AB, Abrahamsen, RK 2016, 'Short communication Characterisation of the microflora during ripening of a Norwegian semi-hard cheese with adjunct culture of propionic acid bacteria', *International Dairy Journal*, vol 54, pp 43-49.
- Passerini, D, Laroute, V, Coddeville, M, Bourgeois, PL, Loubiere, P, Ritzenthaler, P, Coccagn, BM, Daveran, MML 2013, 'New insight into *Lactococcus lactis* diacetyl- and acetoin-producing strains isolated from diverse origins', *International Journal of Food Microbiology*, vol 160, pp 329-336.
- Renye, JJA, Somkuti, GA, Van, Hekken, DL, Guerrero, PVM 2011, 'Short communication: Characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese', *Journal of Dairy Science*, vol 94, pp 3311-3315.
- Rossetti, L, Giraffa, G 2005, 'Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint database', *Journal of Microbiological Methods*, vol 63, pp 135-144.
- Sánchez, I, Seseña, S, Poveda, JM, Cabezas, L, Palop, LL 2006, 'Genetic Diversity dynamics and activity of *Lactobacillus* community involved

- in traditional processing of artisanal Manchego cheese', *International Journal of Food Microbiology*, vol 107, pp 265-273
- Silva, PL, Medina, BG, López, VG, Montañó, GM, Villa, AR, Herrera, RJ, González, SA, Monge, NF, Cueto, GS, Felipe, GG 2020, Caracterización de la leche y queso artesanal de la región de Ojos Negros, Baja California, México, *Rev Mex Cienc Pecu*, vol 11, pp 553-564
- Silva, PL, López, VG, Medina, BG, Montañó, GM, Herrera, RJ, Villa, AR, Alday, MC, González, SA, Inzunza, F, López, SA, Felipe, GG 2017, 'Dinámica poblacional y tipificación de bacterias ácido lácticas en la maduración del queso de ojos negros, Ensenada B.C, México (resultados preliminares)', Sección de poster presentado en la XXVII reunión internacional sobre producción carne y leche en climas cálidos. Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, México, pp 326-330.
- Terzic, VA, Mihajlovic, S, Uzelac, G, Veljovic, K, Tolinacki, M, Nikolic, M, Topisirovic, L, Kojic, M 2014, 'Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Travnik Young cheeses, sweet cream and sweet kajmaks over four seasons', *Food Microbiology*, vol 39, pp 27-38.
- Vallejo, M, Marguet, E, Etchehoury, Valeria 2008, 'Características de α -acetolactato sintetasa y producción de diacetilo por *Enterococcus faecium* ETw7 y *Enterococcus faecalis* ETw23', *Revista Peruana de Biología*, vol 15, pp 97-100.