

## IDENTIFICACIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DE BACTERIAS CULTIVABLES, DETERIORADORAS, AISLADAS DE QUESO RANCHERO FRESCO

M. S. Maldonado-López<sup>a,b</sup>, B. García-Almendarez<sup>c</sup>, R. Salcedo-Hernández<sup>a,d</sup>, J. E. Barboza-Corona<sup>a,d\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. <sup>b</sup> Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato Campus Guanajuato. <sup>c</sup> Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. <sup>d</sup> Posgrado en Biociencia, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. \*josebar@ugto.mx

### RESUMEN:

En este trabajo se analizaron muestras de queso ranchero fresco obtenido de Irapuato, Guanajuato, México, del cual se aislaron cerca de 200 colonias. De estas, se seleccionaron siete con base en su morfología y análisis bioquímico. De las siete colonias, cuatro fueron Gram-negativas y tres Gram-positivas. Se encontró que las bacterias Gram-negativas fueron resistentes a la amikacina y ampicilina, pero susceptible a la cefotaxima, ciproflaxina, gentamicina, nitrofurantoina, norfloxacin y sulfametoxazol-trimetoprim. Por otro lado, las 3 gram positivas fueron identificadas por 16S rDNA como *Corynebacterium flavescens*, *Escherichia fergusonii*, *Enterococcus faecium* y *Lactococcus lactis*, las cuales fueron resistentes a penicilina pero susceptible tetraciclina y a la vancomicina.

### ABSTRACT:

In this work, samples of fresh ranchero cheese obtained from Irapuato, Guanajuato, México, were analyzed and 200 bacterial colonies were isolated. Seven colonies were chosen based on morphology and biochemical tests, four were Gram-negative and three Gram-positive. It was found that Gram-negative bacteria were resistant to amikacin and ampicillin, but susceptible to cefotaxime, ciprofloxacin, gentamicin, nitrofurantoin, norfloxacin and sulfamethoxazole/trimethoprim. Alternatively, Gram-positive bacteria were identified by 16S rDNA as *Corynebacterium flavescens*, *Escherichia fergusonii*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis*, which were resistant to penicillin, but susceptible to tetracycline and vancomycin.

**Palabras clave:** Queso, bacterias deterioradoras, identificación

**Keywords:** Cheese, spoilage bacteria, identification

**Área:** Microbiología y Biotecnología

### INTRODUCCIÓN

El queso ranchero fresco, es de pasta blanda, elaborado con leche de vaca pasteurizada, no acidificada y de coagulación enzimática. Este queso contiene cerca de 46 a 57% de humedad, de 18 a 29% de grasa, 17 a 21 % de proteína y de 1 a 3% de sal, asimismo un pH mayor o igual 6.1 Tiene una vida de anaquel máxima de 10 días y su tecnología básica es la buena calidad de la leche, porque de ella dependen el sabor, el aroma, su textura y en general sus características alimenticias (Hwang y Gunasekaran, 2001). El queso artesanal es elaborado por un productor que normalmente hace su queso utilizando su propia leche con ganado propio. También

se le denomina queso artesanal ya que está libre de grasas vegetales, conservadores y emulsionantes. El deterioro del queso puede ocurrir en quesos frescos que tienen un pH suficientemente elevado. Las bacterias psicotrópicas como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter* y *Flavobacterium* son de interés primordial en su deterioro ya que estos organismos llegan al producto a través de agua contaminada usada para lavar la cuajada. Las bacterias como *Pseudomonas fluorescens*, *P. fragi* y *P. putida* causan amargura, putrefacción y el olor rancio, licuefacción, la gelatinización de la cuajada y la formación de moco en las superficies de queso. Otra bacteria como *Alcaligenes viscolactis* produce viscosidad y pegajosidad en el queso cottage, y *A. metacaligenes* aplanamiento, o sabor pobres en el queso cottage. Bacterias psicotrópicas del género *Bacillus* causan amargura y defectos proteolíticos. Las bacterias también pueden causar el deterioro por la producción de gas dentro del queso, lo que resulta en la formación de ranuras o agujeros pequeños (Arslan et al. 2011).

Para demostrar la susceptibilidad de las bacterias deterioradoras encontradas en queso se han hecho estudios con antibióticos contra bacterias como *Pseudomonas* spp., Estas presentaron resistencia a los antibióticos penicilina G (100%) y sulfametoxazol/trimetoprim (28,1%), pero son susceptibles aceftazidima, ciprofloxacina, amikacina, gentamicina, e imipenem. No se observaron patrones de resistencia a múltiples fármacos en estas cepas (Arslan et al. 2011). Asimismo, se ha realizado estudios de susceptibilidad antimicrobiana contra 176 bacilos gramnegativos no fermentadores inusuales recolectados de la región de América Latina a través del Programa SENTRY entre 1997 y 2002, por medio de la microdilución en caldo. En general, trimetoprim/sulfametoxazol fue el fármaco más potente seguido de levofloxacina, y gatifloxacina. Cuando se analizó la susceptibilidad de *Achromobacter* spp., se observó que el antibiótico más activo fue el meropenem (Gales et al., 2005). En este trabajo nuestro objetivo fue aislar e identificar bacterias deterioradoras a partir del queso ranchero artesanal, así como demostrar su susceptibilidad a diversos antibióticos. Estas bacterias serán posteriormente usadas para analizar su susceptibilidad a los péptidos antimicrobianos de diversas cepas de *Bacillus thuringiensis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo y aislamiento de las colonias

El queso ranchero artesanal no contenía conservadores fue obtenido de la ciudad de Irapuato, Gto. El queso se dejó a descomponer a temperatura ambiente durante una semana. 5 g del queso se homogenizaron en NaCl 0.9% (peso/volumen) estéril hasta un volumen de 50 mL, se realizaron diluciones decimales y se tomaron 100 µL para realizar el vaciado en placa de agar verde brillante (BD Bioxon) y soya tripticaseína (BD Bioxon). Se dejó incubar a en aerobiosis a 37°C por 18 horas. Posteriormente se seleccionaron cerca de 200 colonias a las cuales se les realizaron pruebas bioquímicas en medios movilidad-indol-ornitina (MIO) (BD Bioxon), agar de hierro triple azúcar (TSI) (BD Bioxon), agar de hierro y lisina (LIA) (BD Bioxon), agar citrato de Simmons (BD Bioxon), caldo urea Simmons (BD Bioxon) y además se les realizó prueba de catalasa con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% y tinción de Gram. Con

base a estas pruebas se seleccionaron 7 colonias (14, 43, 52, 58, 64, 70 y 145), con morfología y/o bioquímicas distintas.

### **Amplificación de 16S rDNA y análisis bioinformático**

Se realizó un cultivo de cada colonia en 3 mL de caldo de soya tripticaseína (BD Bioxon) que se dejó incubar a 37°C durante 16 horas y se realizó extracción de ADN total (Pospiech y Neumann, 1995) para realizar la amplificación de la región 16S rDNA usando los oligonucleótidos universales UBF 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3' y 1492 R5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'. Para la amplificación del 16S rDNA se empleó una Taq Pol recombinante (Invitrogen) bajo las siguientes condiciones: 5 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C, y 1:40 min a 68°C; y finalmente 5 min a 72°C (Gutiérrez-Chávez et al. 2016). Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% con una alícuota de 3 µL de los productos de PCR y se tiñó con bromuro de etidio para visualización de los amplicones. Posteriormente los amplicones se mandaron secuenciar al Langebio-CINVESTAV. Las secuencias fueron analizadas en el BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **Ensayo de susceptibilidad a los antibióticos**

Las colonias seleccionadas se suspendieron en 5 mL de caldo Muller-Hinton a una turbidez de 0.5 en una escala de McFarland y con un hisopo estéril se extendió sobre la placa con agar Muller-Hinton (MH) (Difco). La susceptibilidad a los antibióticos fue identificado utilizando el método por difusión en disco estándar para Gram-positivas y Gram-negativas (MultiBac I.D.). Los halos de inhibición fueron medidos después de ~ 18 h de incubación a 37 ° C. Las halos de inhibición (mm) y se compararon con los estándares del proveedor para determinar si la cepa era sensible (S), intermedio (I), o resistente (R).

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

De aproximadamente 200 colonias se seleccionaron 7, tres en forma de coco y cuatro de bacilo. Cuando se hicieron diferente prueba bioquímicas (Tabla 1), las bacterias en forma de bacilo presentaron al menos un ensayo diferente: Por otro lado, de las bacterias en forma de coco, 2 de ellas prácticamente presentaron los mismos resultados, por lo que podrían considerarse el mismo aislado. Tanto en el grupo de bacterias en forma de coco como las de bacilo, se presentaron bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Tabla I. Morfología y resultados de pruebas bioquímicas de las colonias seleccionadas									
				TSI					LIA
				MIO	FERMENTA				

COLONIA	MORFOLOGIA	TINCIÓN DE GRAM	CATALASA	ORNITINA DESCARBOXILASA	MOVILIDAD	GLUCOSA	LACTOSA Y/O SACAROSA	H <sub>2</sub> S	CITRATO PERMEASA	UREASA	LISINA DESCARBOXILASA	LISINA DESAMINASA
14	Bacilo	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
43	Bacilo	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
52	Coco	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
58	Coco	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
64	Coco	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
70	Bacilo	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
145	Bacilo	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-

Posteriormente se realizaron antibiogramas (Tabla 2) a las colonias Gram negativas, encontrándose que las 4 bacterias fueron resistentes a la amikacina y ampicilina pero susceptible a la cefotaxima, ciprofloxacina, gentamicina, nitrofurantoína, norfloxacina y sulfametoxazol/trimetoprim.

**Tabla 2.** Susceptibilidad a antibióticos de las colonias Gram negativas aisladas utilizando el método por difusión en disco estándar MULTIBAC I.D. Gram Negativas Serie 2

Antibiótico	Concentración (µg)	Colonias			
		14	43	64	145
Amikacina	30	R*	R	R	R
Ampicilina	30	R	R	R	R
Carbenicilina	100	S	I	I	I
Cefalotina	30	S	I	S	S
Cefotaxima	30	S	S	S	S
Ciprofloxacina	5	S	S	S	S
Cloranfenicol	30	I	I	S	I
Gentamicina	10	S	S	S	S
Netilmicina	30	S	S	I	S
Nitrofurantoína	300	S	S	S	S
Norfloxacina	10	S	S	S	S
Sulfametoxazol/Trimetoprim	25	S	S	S	S

\* R, resistente; S, susceptible; I, intermedio.

Igualmente, cuando se analizó la susceptibilidad de las colonias Gram positivas a los antibióticos (Tabla 3), se observó que las tres bacteria fueron resistentes a penicilina; sin embargo la 52, fue la que presentó la mayor resistencia (7 de 12 antibióticos). Por otro lado, las tres bacterias fueron susceptibles a la tetraciclina y a la vancomicina.

**Tabla 3.** Susceptibilidad a antibióticos de las colonias Gram positivas aisladas utilizando el método por difusión en disco estándar MULTIBAC I.D. Gram Positivas Serie 2

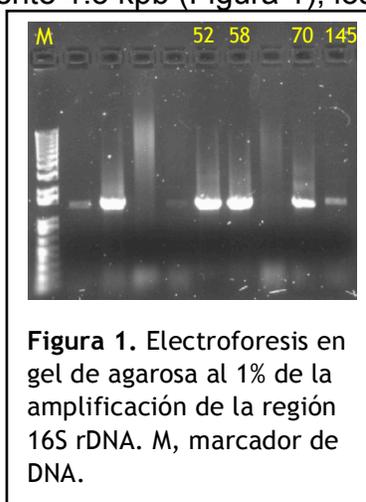
Antibiótico	Concentración	Colonias		
		52	58	70
Ampicilina	10 µg	R*	S	R
Cefalotina	30 µg	R	R	S
Cefotaxima	30 µg	R	S	S

## Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Ciprofloxacina	5 µg	R	R	S
Clindamicina	30 µg	I	I	I
Dicloxacilina	1 µg	R	S	R
Eritromicina	15 µg	R	S	S
Gentamicina	10 µg	I	S	S
Penicilina	10 U	R	R	R
Tetraciclina	30 µg	S	S	S
Sulfametoxazol/Trimetoprim	25 µg	S	R	S
Vancomicina	30 µg	S	S	S

\* R, resistente; S, susceptible; I, intermedio.

Posteriormente, a las siete colonias se les amplificó el 16S rDNA obteniéndose amplicones de aproximadamente 1.5 kpb (Figura 1), los cuales fueron secuenciados.



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación de la región 16S rDNA. M, marcador de DNA.

De las 7 bacterias seleccionadas, actualmente hemos identificado cuatro (Tabla 4). Dos de ellas fueron *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, bacterias comunmente encontradas en la microbiota del queso. Aunque *E. faecium* y *L. lactis*, se han encontrado en productos lacteos como parte de la microbiota “normal”, es probable que una vez entrado el proceso de descomposición tambien participen en dicho proceso. Por otro lado, la tercer bacteria fue identificada como *Corynebacterium flavescens*. Se ha reportado que bacterias de este género, son responsables de acelerar la descomposición de compuestos que ocasionan mal olor en alimentos y en otros compuestos (Bourque et al 1987; Brennan et al. 2002). Por otro lado, una de las bacterias, fue identificada como *Escherichia fergusonii*, bacteria a la cual se le ha con la producción de toxinas que afectan a los animales y seres humanos (Gaastra et al. 2014). Estamos en proceso de determinar la identidad de las tres bacterias restantes asi como su susceptibilidad a las bacteriocinas de *B. thuringiensis*.

Colonia	Resultado de análisis BLAST	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad
52	<i>Enterococcus faecium</i>	94	89
58	<i>Lactococcus lactis</i>	94	87
64	<i>Escherichia fergusonii</i>	86	84
70	<i>Corynebacterium flavescens</i>	92	96

## BIBLIOGRAFÍA

- Arslan S., Eyi A., and Özdemir F., 2011. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. *J. Dairy Sci.* 94 :5851–5856
- Bourque D., Bisailon J.G., Beaudet R., Sylvestre M., Ishaque M., Morin A. 1987. Microbiological Degradation of Malodorous Substances of Swine Waste under Aerobic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology.* 53: 137-141.
- Brennan N.M., Ward A.C., Beresford T.P., Fox P.F., Goodfellow M., Cogan T.M. 2002. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology.* 68: 820-830.
- Gaastra W., Kusters, J.G., van Duijkeren E., Lipman L.J. 2014. *Escherichia fergusonii*. *Veterinary Microbiology.* 172 (1-2): 7-12.
- Gales A.C., Jones R.N., Andrade S.S., Sander H.S., 2005. Antimicrobial susceptibility patterns of unusual nonfermentative gram-negative bacilli isolated from Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100(6): 571-577
- Gutiérrez-Chávez A.J., Martínez-Ortega E.A., Valencia-Posadas M., León-Galván M.F., de la Fuente-Salcido N.M., Bideshi D.K., Barboza-Corona J.E. 2016. Potential use of *Bacillus thuringiensis* bacteriocins to control antibiotic-resistant bacteria associate with mastitis in dairy goats. *Folia Microbiol (Praha).* 61(1):11-9. doi: 10.1007/s12223-015-0404-0.
- Hwang, C.H. and Gunasekaran, S. 2001. Measuring crumbliness of some comercial Queso Fresco-type Latin American cheeses. *Milchwissenschaft* 56: 446-450 (<http://www.dairyforall.com/cheese-microbial-defects.php>).
- Pospiech y Neumann. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends in Genetics.* 11(6) 217-218).