



PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO



Las bacterias probióticas en quesos artesanales

Dr. Adrián Hernández Mendoza |

Investigador del Laboratorio de Química y Biotecnología
de Productos Lácteos del CIAD

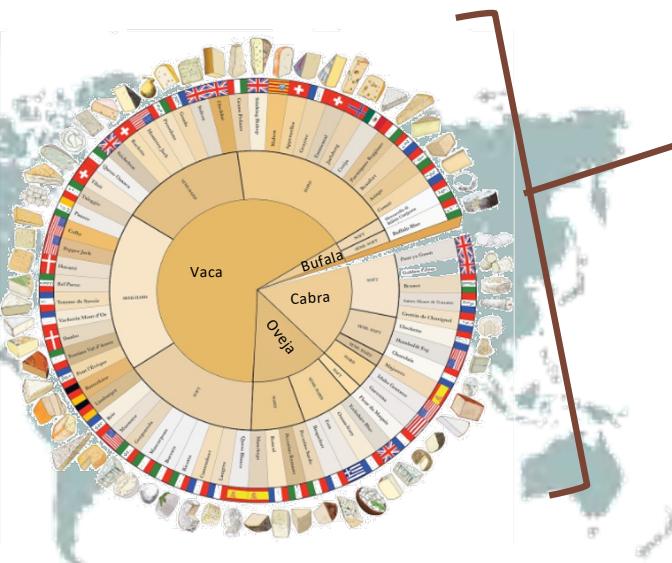


📞 +52 (662)289 24 00, 611

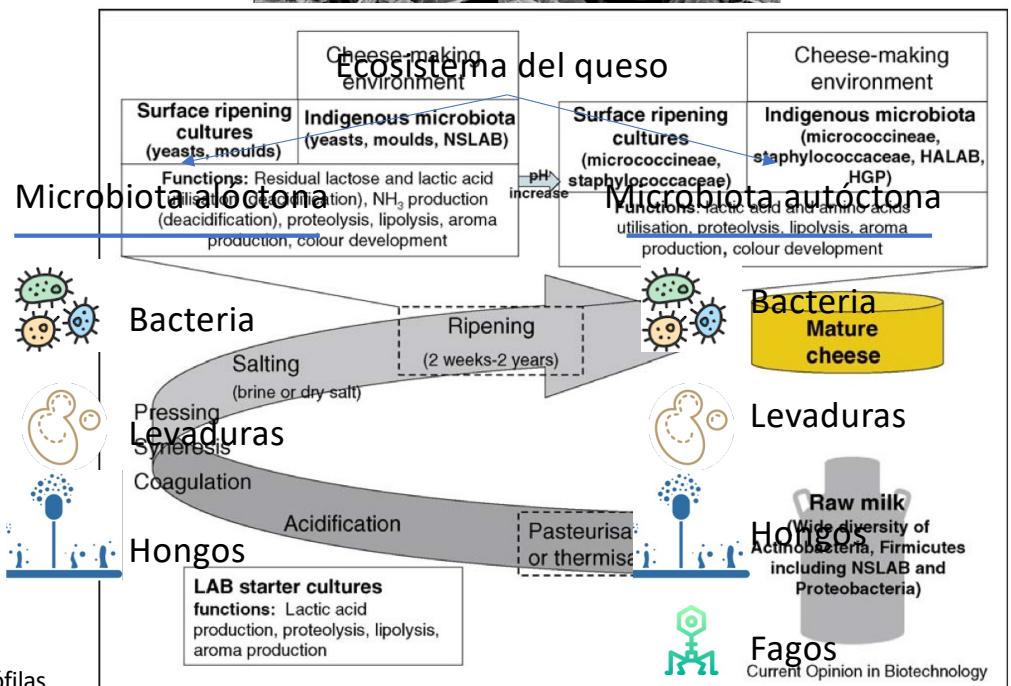
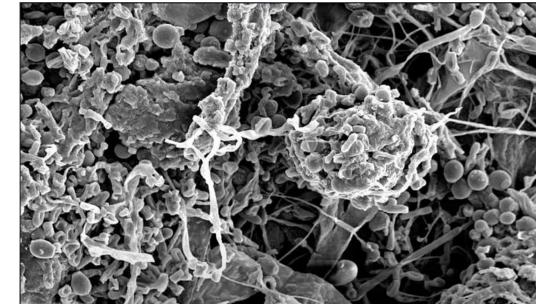
✉️ ahernandez@ciad.mx

Complejidad del ecosistema del queso

>1000 variedades de quesos producidos a escala artesanal e industrial al rededor de mundo



La mayoría de los quesos albergan una microbiota compleja



sLAB: bacterias lácticas iniciadoras;
NSLAB: LAB no iniciadoras;
HALAB: LAB halófilas y alcalifílicas;
HGP: *g*-Proteobacterias moderadamente halófilas.

Irlinger and Mounier, 2009; Labrie, 2021

Complejidad del ecosistema del queso

<5x10³ UFC/mL

Leche
cruda

Equipo

Suero natural
/cultivo en leche

Cuajada

Baja concentración
de sal

Maduración



≈ 10⁹ UFC/g



≈ 10⁹ UFC/g

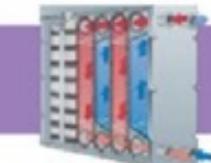
>biodiversidad

Microbiota del queso

<biodiversidad

10⁵×10⁷ UFC/mL

≈5 UFC/mL



Leche
pasteurizada

Equipo

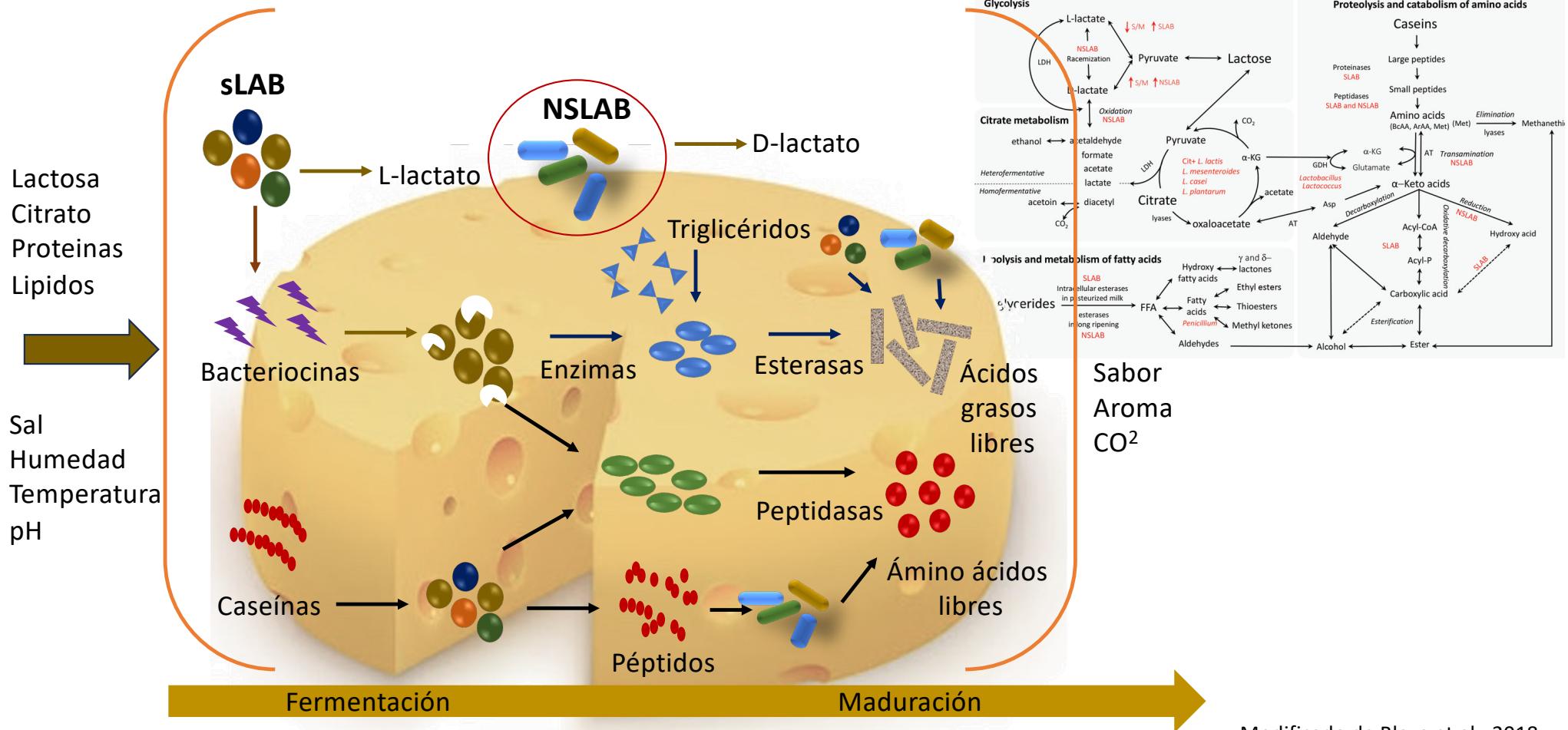
Cultivo
iniciador/adjunto

Maduración
de cuajada

Alta concentración
de sal

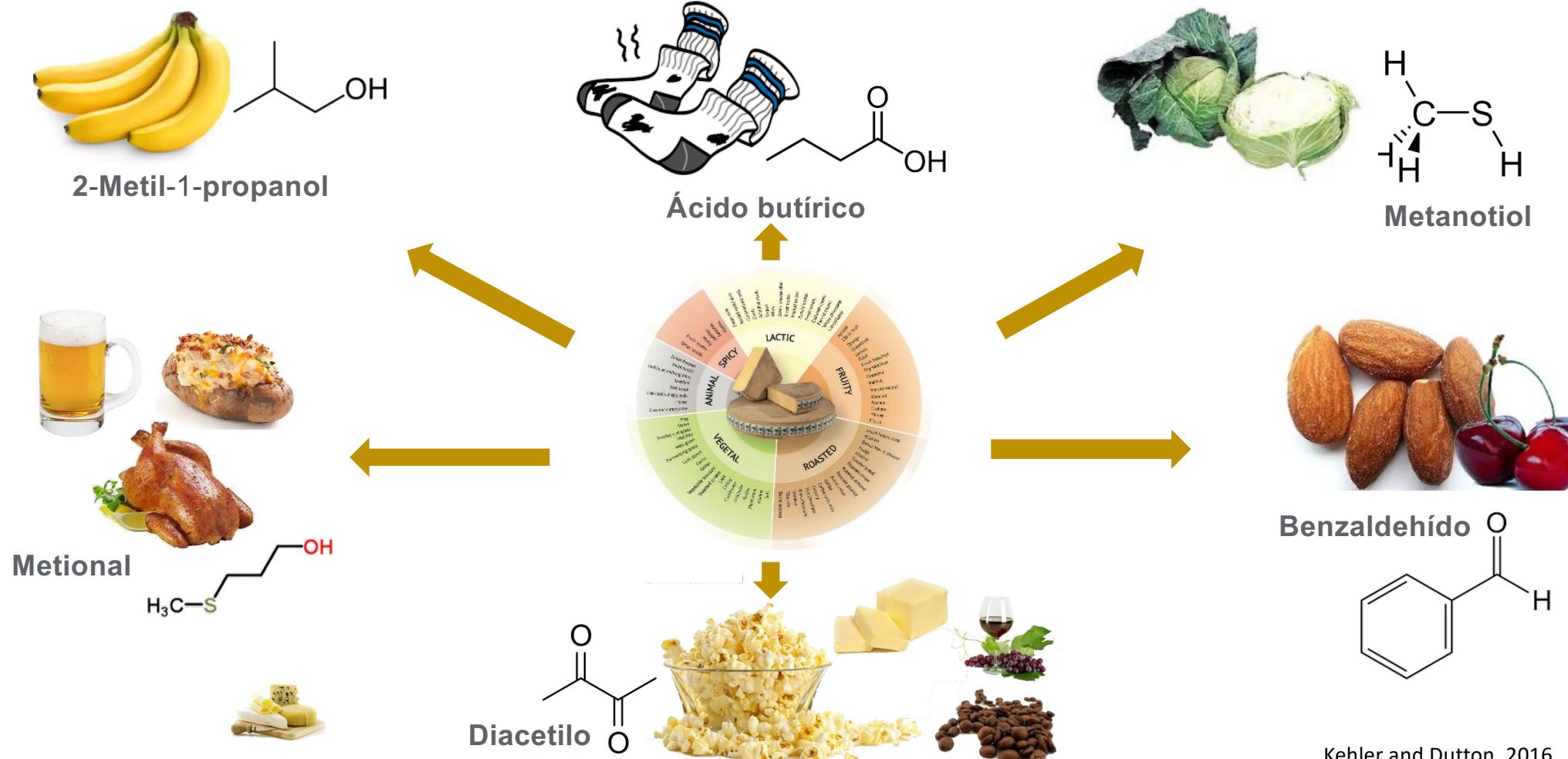
Maduración
corta

Los microorganismos contribuyen al sabor y el olor de los quesos



Modificado de Blaya et al., 2018

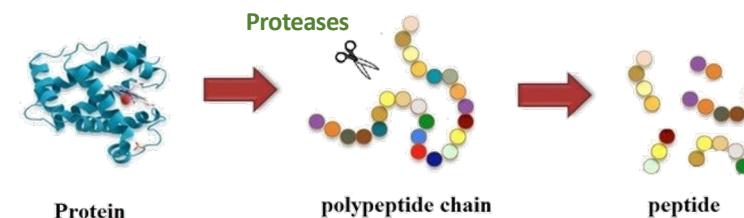
Los microorganismos contribuyen al sabor y el olor de los quesos



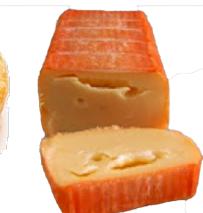
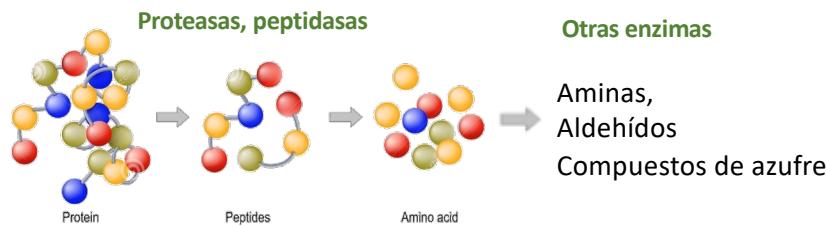
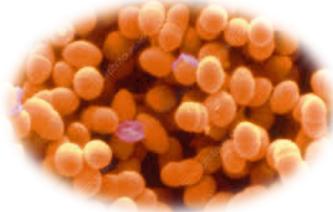
Kehler and Dutton, 2016

Los microorganismos contribuyen al sabor y el olor de los quesos

Penicillium camemberti var. "camemberti"



Brevibacterium linens



Propionibacterium freudenreichii

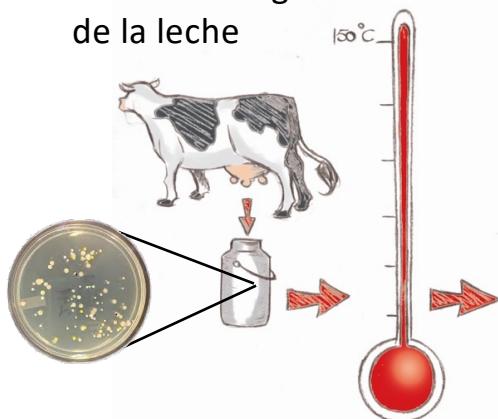


Fox, 2014; Kehler and Dutton, 2016

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Calidad microbiológica
de la leche



Intensidad del
tratamiento térmico

Bacterias contaminantes en quesos

Tipo de cultivo bacteriano



Condiciones higiénicas de
producción y comercialización



Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella enterica

*Estreptococos de los grupos A y C, Yersinia enterocolitica, Pseudomonas aeruginosa, Coxiella burnetii,
Aeromonas hydrophila y Clostridium botulinum*

de Oliveira et al., 2017

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Presencia de bacterias contaminantes en quesos

Country	Type of Cheese	Bacterial Species
Brazil	Semihard and soft cheese	LM
Brazil	Minas frescal cheese	LM
Brazil	Minas frescal cheese	LM
Brazil	Prato cheese ¹	LM
Brazil	Coalho cheese	EC
		SL
Brazil	Coalho cheese	SL
		EC
Brazil	Butter cheese	SL
		EC
Egypt	Karish cheese, Ras cheese	EC
France	Cheese (nonspecified)	EC
Greece	Hard cheese	LM
	Feta cheese	
	Soft cheese	
Ireland	Hard, semihard, and soft cheese	LM
Italy	Gorgonzola	LM
Italy	Sicilian fresh soft cheese	SA
		EC
Italy	Cheese (nonspecified)	SA
México	Cream cheese	SL
Turkey	Semihard cheese	LM

72 muestras de queso (Tianguis ciudad de México)

24 Panela, 24 Canasto y 24 Doble Crema



El 87.5% de los quesos presentaron baja calidad microbiológica,

1 muestra de cada tipo de queso superó los límites permitidos para ***Staphylococcus aureus***.



Salmonella, Listeria monocytogenes y todos los patotipos de *Escherichia coli* diarréogena, incluida la *E. coli* productora de toxina Shiga.

Se aislaron cepas de ***E. coli uropatógena*** el 43% de los quesos de Doble Crema cortados al momento; además, se identificaron 10 cepas de **micobacterias no tuberculosas** en 12.5% de las muestras

EC, *Escherichia coli*; LM, *Listeria monocytogenes*; SA, *Staphylococcus aureus*; SL, *Salmonella*.

de Oliveira et al., 2017; Rios-Muñiz et al., 2022

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?

Bacterias generalmente reconocidas como seguras (GRAS)

Las **bacterias ácido lácticas** (BAL) actúan como cultivos protectores para controlar el número de microorganismos contaminantes.

Actividad Antimicrobiana

Compuesto	Mecanismo	Imagen
Ácidos Orgánicos: (Láctico, acético, ácidos grasos de cadena corta)	Rompimiento del metabolismo celular	
Enzimas: (Lisozima, Glucosa-oxidasa, Lactoferrina)	Actividad lítica, Formación de H ₂ O ₂ , Capacidad quelante del hierro	
H ₂ O ₂	Capacidad oxidante, reacciona con grupos sulfidrilo y dobles enlaces en proteínas, lípidos y afectando por lo tanto la membrana citoplasmática.	
Bacteriocinas: (Nisin, pediocina, sacacina) Peptidos antimicrobianos	Destruye la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros y/o alteración de la tensión superficial de la membrana	
CO ₂	Ambiente anaeróbico y/o inhibición de la enzima descarboxilasa y/o rompimiento de la membrana celular	
Reuterina/Reutericina	Inhibe la ribonucleotido reductasa y la teorredoxina. Reacciona con los grupos sulfidrilo de las enzimas	

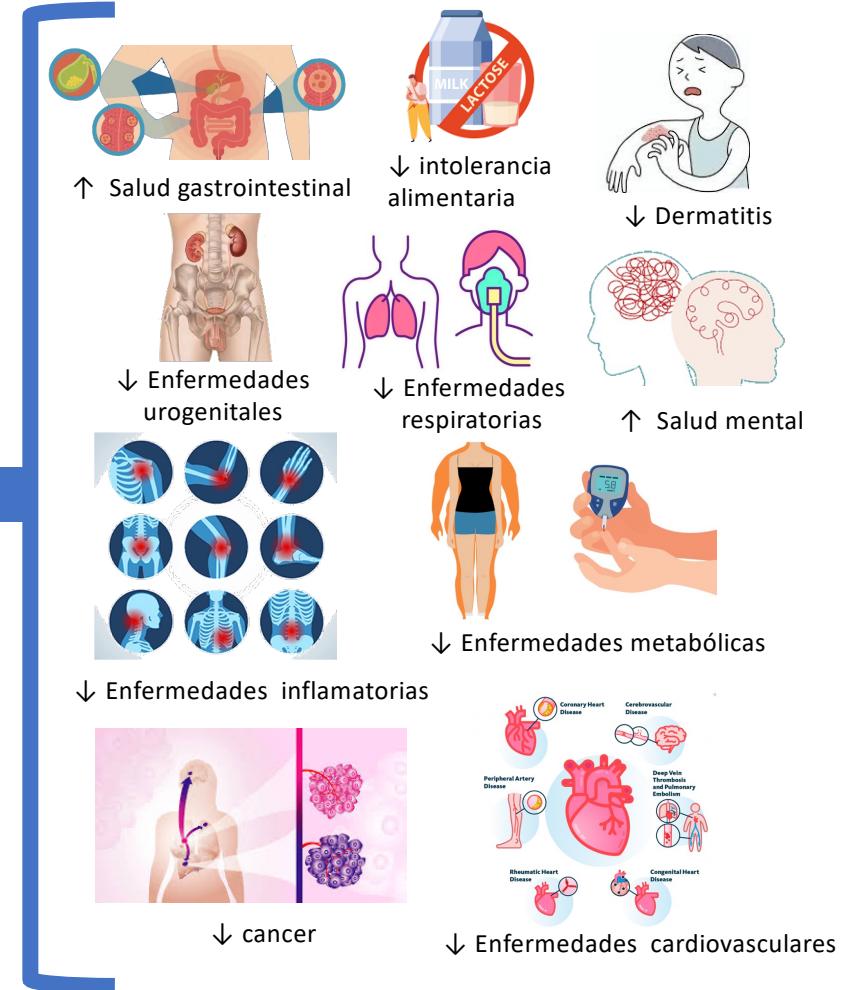
de Oliveira et al., 2017 | Riaño et al., 2020

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?

Bacterias con funciones fisiológicas benéficas para la salud y bienestar



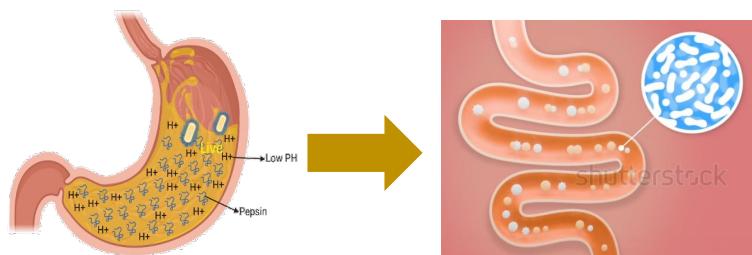
Abbott 2015



Neunez et al., 2020

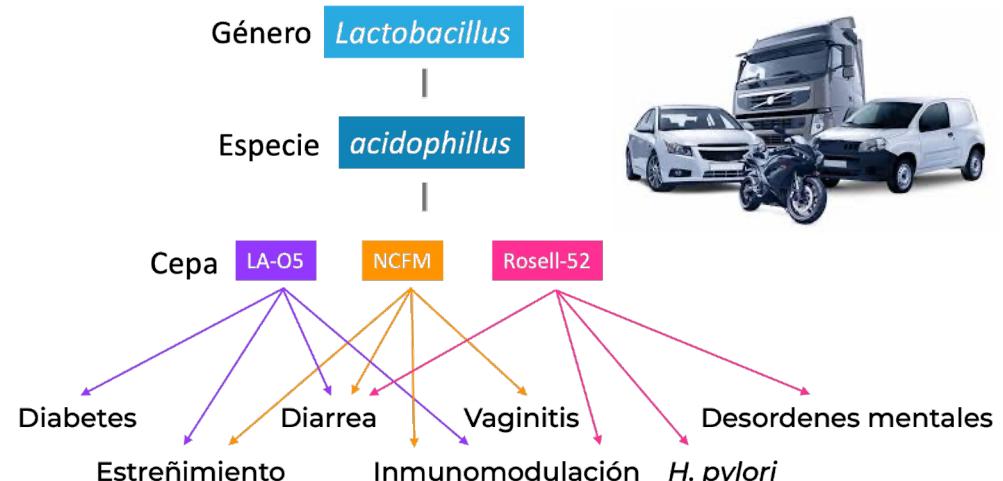
¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?

"Microorganismos vivos (que administrados en la cantidad adecuada confieren) un beneficio para la salud del hospedero"
(dosis determinada, demostrada con evidencia científica)
(atribuido a una cepa concreta)

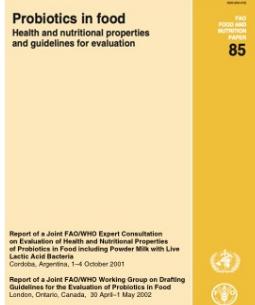


Probiótico ≠ Paraprobiótico ≠ Postbiótico

Reducción de la duración de episodios de diarrea	
Cepa	Dosis efectiva (UFC d ⁻¹)
<i>L. casei</i> Shirota	10 ⁹
<i>L. rhamnosus</i> GG	10 ¹⁰
<i>L. rhamnosus</i> DSM6594	10 ⁹
<i>L. plantarum</i> 299v	10 ⁸
<i>L. acidophilus</i> NCFB 1748	10 ¹¹
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	10 ⁸
<i>L. reuteri</i> DSM 12246	10 ¹⁰⁻¹¹
<i>S. boulardii</i> CNCM i-745	10 ⁹

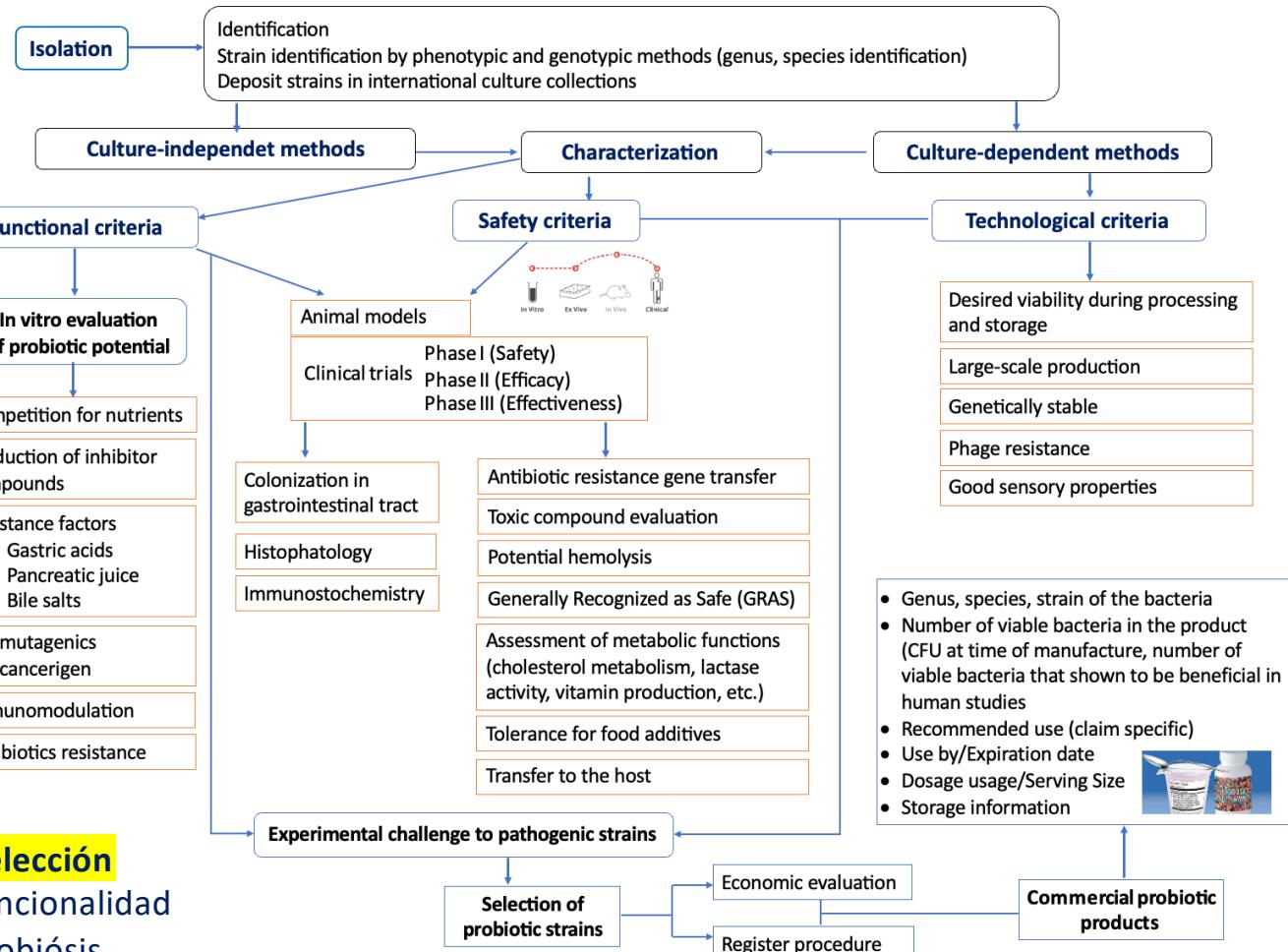


¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Criterios de selección

- Seguridad - Funcionalidad
- Tecnológicos - Probiótica



Adapted from FAO, 2021

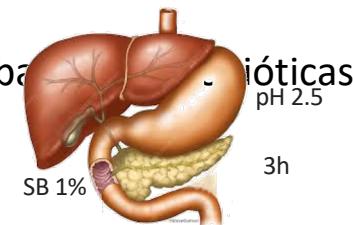
¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Queso tipo feta

Fuente de bacterias potencialmente probióticas

Vehículo de bacterias probióticas



3h

Establishment of Lactic Acid Bacteria strain collection

Recovery of new bacterial isolates from traditional Feta-type cheese
(5 samples x 6 isolation conditions)

First Screening (N=93)

- Preliminary gastrointestinal tolerance assessment (N=49)
- Evaluation of safety characteristics (N=18)

>50% de los aislados mostraron tasas de resistencia entre 84-98% (ca. 10^8 UFC/mL)



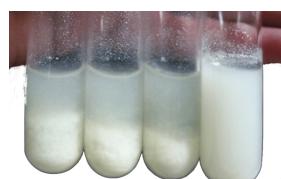
Second Screening (N=18)

- Molecular identification

Resistencia a pH ácido y sales biliares
Actividad hemolítica y susceptibilidad a antibióticos

Tertiary Screening (N=14)

- Evaluation of probiotic attributes



7 1
Lactiplantibacillus plantarum, *Limosilactobacillus fermentum*,
Lacticaseibacillus rhamnosus, *Lacticaseibacillus paracasei*

2 4

13/14
(14- 76%)

Resistencia a lisozima / fenol

Capacidad antimicrobiana (Sobrenadante)

Actividad sal biliar hidrolasa y α -glucosidasa

Adhesión a las células Caco-2

Potencial de acidificación de la leche

Supervivencia 96 %

/ 8/1

G 10.4%

G

G

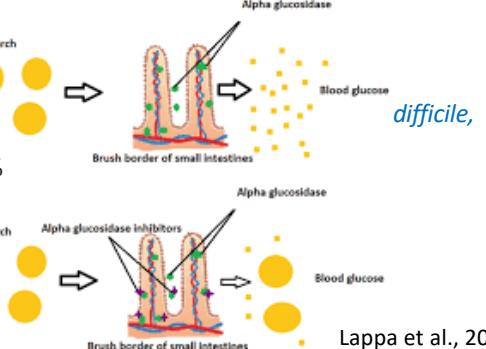
Starch



Bile salt hydrolase (BSH)

Alpha glucosidase

difficile



Lappa et al., 2024

LAB isolates	Antibiotic resistance ¹
<i>Lpb. plantarum</i> F16	-
<i>Llb. fermentum</i> F55	Kanamycin
<i>Lcb. parasacei</i> F70	-
<i>Lpb. plantarum</i> F89	-
<i>Lcb. rhamnosus</i> F107	-
<i>Lcb. rhamnosus</i> F122	-
<i>Lpb. plantarum</i> F162	-
<i>Lpb. plantarum</i> F180	-
<i>Lpb. plantarum</i> F194	Gentamycin, kanamycin
<i>Lcb. parasacei</i> F214	Tetracycline
<i>Lcb. parasacei</i> F216	-
<i>Lcb. parasacei</i> F220	-
<i>Lpb. plantarum</i> F222	-
<i>Lpb. plantarum</i> F254	-
<i>L. rhamnosus</i> GG	-

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Queso
Doble crema

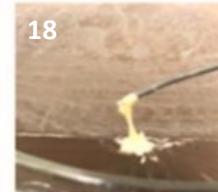


Pediococcus pentosaceus (16)
Pediococcus acidilactici (18)
Leuconostoc citreum (17)
Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides (19, 26)
Weissella viridescens (25),
Lacticaseibacillus casei (28)
Limosilactobacillus fermentum (29)
Lactococcus lactis (27)
Enterococcus faecium (21, 22)
Enterococcus faecalis (24)

Fuente de bacterias potencialmente probióticas



Patrón tipo «ropy» (viscoso)



Sensibilidad a los antibióticos

Strain	Gm	Pe	Vm	Cm	Te	Am	Er
4	<1	<0.25					
1.5	<0.5	2 R					
4	<1	<0.25					
0.19	<0.5						
1.5	<0.5	<1					
0.125	<0.5	2					
0.125	<0.5	8 R					
0.25	<0.5	2 R					
2	1	2 R					
0.094	<0.5	2 R					
4	<1	<0.25					
4	<0.5	0.5					

autoagregación baja (<20 %)

Gm: gentamycin, Pe: penicillin, Vm: vancomycin, Cm: chloramphenicol, Te: tetracycline.

Agn: ampicilin, Er: erythromycin; R: Resistencia NR: not required.

Alta capacidad inhibidora de bacterias antagonistas

Duodeno	Íleon	Yeyuno	Ciego	Colon	Recto	
					16, 18, 22, 26, 28	
					16, 18, 21, 26, 28, 29	
					16, 21, 26, 28	

Hidrofobicidad de la mucosa intestinal

16, 18, 21, 25, 26, 28

16, 18, 22, 26, 28
 16, 18, 21, 26, 28, 29
 16, 21, 26, 28
 16, 18, 21, 25, 26, 28

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC 14028,

Hidrofobicidad

Listeria monocytogenes ATCC 19111

Cepas

42% foto hid-

Baja (30%)

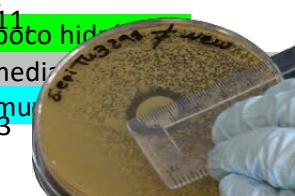
Média (3d/60%)

25922,33% medi-

Alta (>60 %)

25% mu-

Staphylococcus aureus ATCC 25923



Roldán-Pérez et al., 2023

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Queso Cocido

Bacterias ácido lácticas

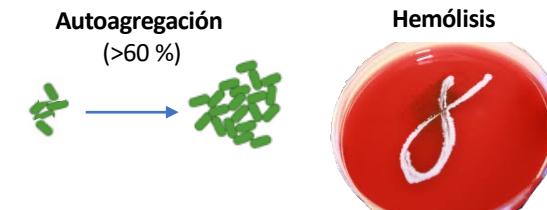
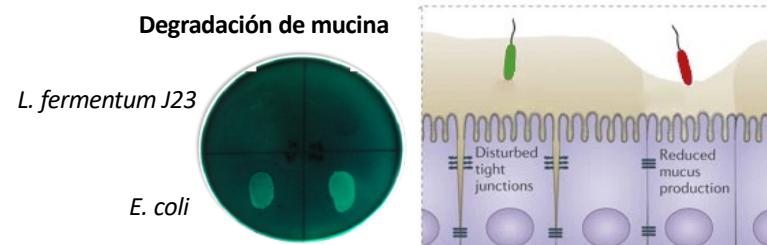
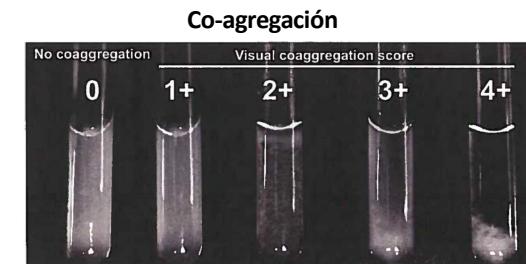
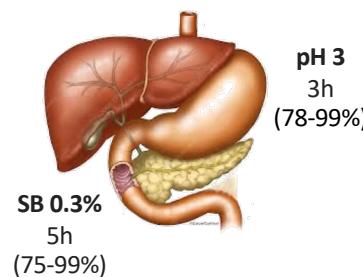
Isolation source	Identified bacteria	Code
Milk	<i>Lactobacillus fermentum</i>	J10
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	J20
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	J23
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	J24
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	J26
Whey	<i>Lactobacillus plantarum</i>	J25
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	J27
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	J28
Curd	<i>Lactobacillus pentosus</i>	J31
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	J32
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	J34
Cheese	<i>Lactobacillus pentosus</i>	J37
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	J38

Bacterias antagónicas

S. aureus ATCC 29213b
E. coli ATCC 25922
S. enterica serovar Typhimurium ATCC 14028
S. enterica subsp. enterica serovar Choleraeuis ATCC 10708
Listeria innocua ATCC 33090

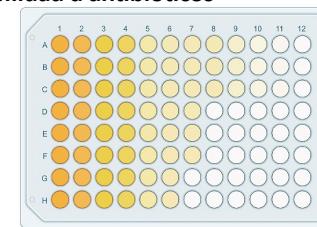


Fuente de bacterias potencialmente probióticas



Perfiles de susceptibilidad a antibióticos

Ampicilina, Amoxicilina, Cefalexinal, Cefalotina, Cefotaxime, Cefepime, Cefuroxima, Clindamicina, Ciprofloxacino, Dicloxacilina, Eritromicina, Gentamicina, Levofloksina, Limeciclina, Penicilina G, Tetraciclina, Trimetropina/sulfametoazol



*Valores de corte EFSA y ECAST

● Crecimiento visible
 ○ Crecimiento no visible

Santiago-López et al., 2018

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



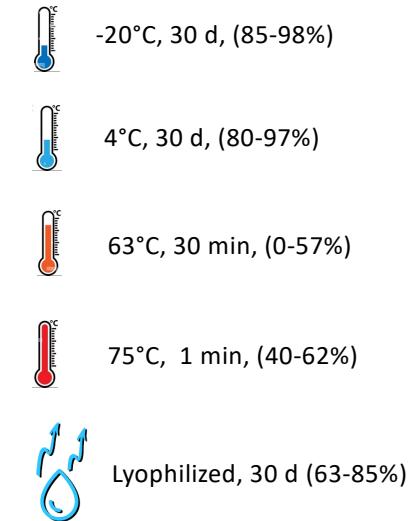
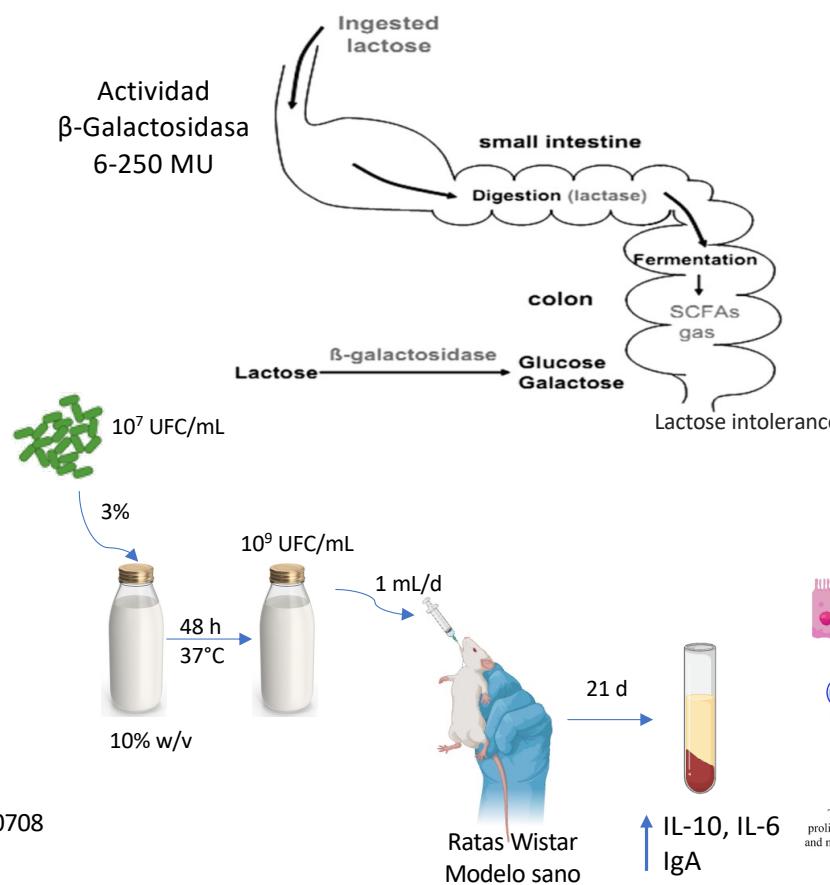
Queso Cocido

Bacterias ácido lácticas		
Isolation source	Identified bacteria	Code
Milk	<i>Lactobacillus fermentum</i>	J10
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	J20
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	J23
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	J24
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	J26
Whey	<i>Lactobacillus plantarum</i>	J25
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	J27
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	J28
Curd	<i>Lactobacillus pentosus</i>	J31
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	J32
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	J34
Cheese	<i>Lactobacillus pentosus</i>	J37
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	J38

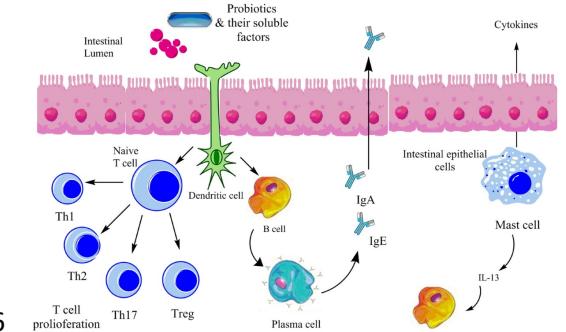


Bacterias antagonicas
S. aureus ATCC 29213b
E. coli ATCC 25922
S. enterica serovar Typhimurium ATCC 14028
S. enterica subsp. *enterica* serovar Choleraeuis ATCC 10708
Listeria innocua ATCC 33090

Fuente de bacterias potencialmente probióticas



Inmunomodulación



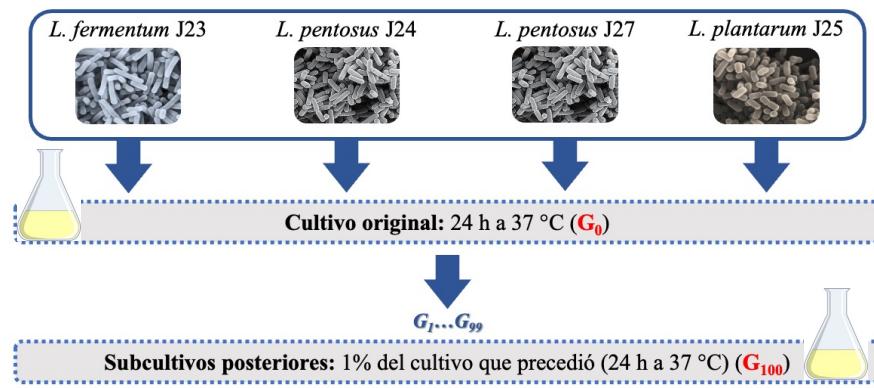
Santiago-López et al., 2018

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?

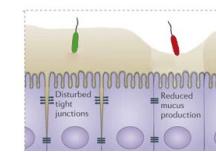


Fuente de bacterias potencialmente probióticas

Evaluación de la estabilidad fenotípica (100 subcultivos)



Parámetros morfométricos
(longitud, diámetro, radio,
superficie y volumen)



Degradación de mucina

Capacidad de
autoagregación



Actividad hemolítica

Producción de
exopolisacáridos (EPS)



Actividad antioxidante
(DPPH[•] y ABTS^{•+})



Capacidad fermentativa en leche
(pH, acidez titulable y actividad proteolítica)

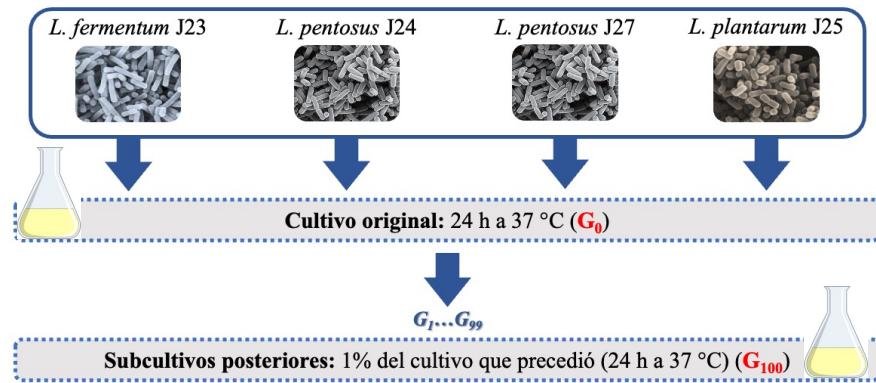


¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Fuente de bacterias potencialmente probióticas

Evaluación de la estabilidad fenotípica (100 subcultivos)



Parámetros morfométricos
(longitud, diámetro, radio,
superficie y volumen)



$$G_0 \neq G_{50} \quad G_0 = G_{100}$$

↑ Longitud (1.2-1.5 veces), diámetro/radio
(1.1-1.4 veces), superficie (1.5-1.8 veces)
volumen (1.4-2.4 veces)



Capacidad de
autoagregación

Cepa	Subcultivo	Autoagregación (%)
<i>L. fermentum</i> J23	G_0	6.67 (± 2.37) ^a
	G_{50}	8.61 (± 1.84) ^a
	G_{100}	9.50 (± 2.00) ^a
<i>L. pentosus</i> J24	G_0	17.69 (± 1.72) ^b
	G_{50}	18.27 (± 1.32) ^b
	G_{100}	13.10 (± 1.41) ^a
<i>L. plantarum</i> J25	G_0	24.26 (± 1.19) ^c
	G_{50}	13.46 (± 1.01) ^b
	G_{100}	9.96 (± 0.80) ^a
<i>L. pentosus</i> J27	G_0	18.97 (± 1.75) ^a
	G_{50}	20.64 (± 2.25) ^a
	G_{100}	26.59 (± 1.53) ^b

Castro-López et al., 2023

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?

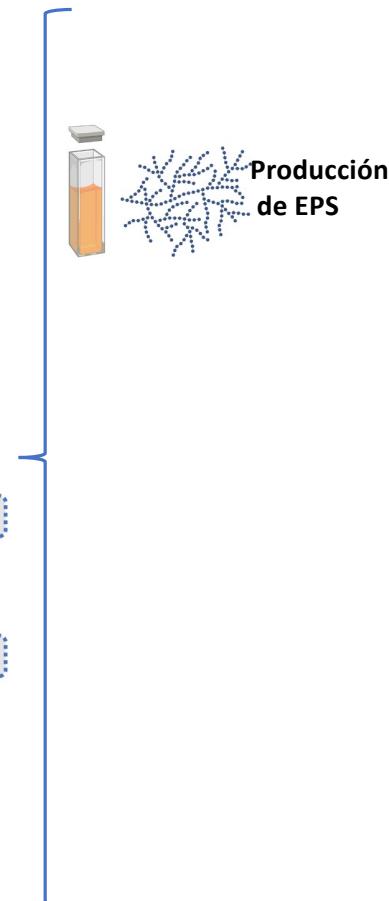
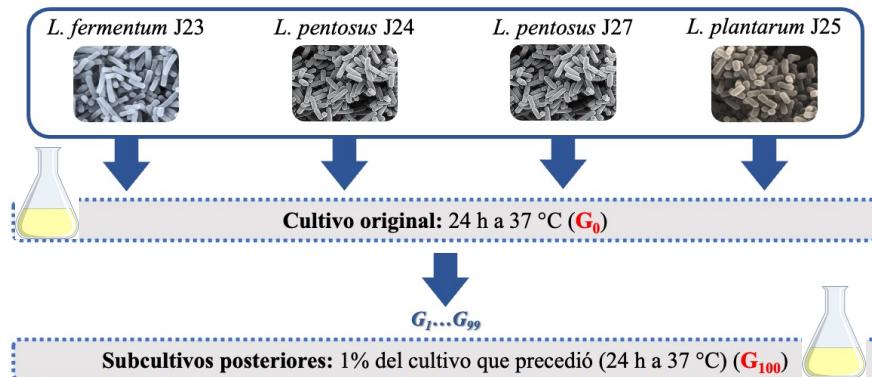


Queso Cocido



Fuente de bacterias potencialmente probióticas

Evaluación de la estabilidad fenotípica (100 subcultivos)

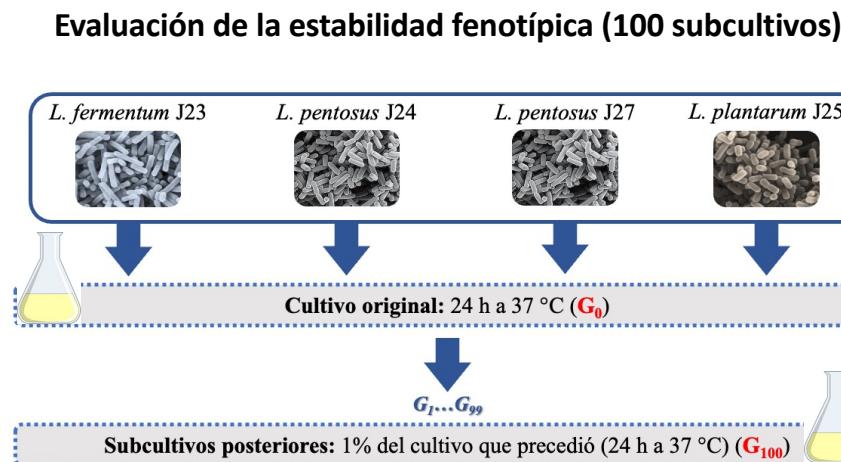


¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Queso Cocido

Fuente de bacterias potencialmente probióticas



Actividad antioxidante
(DPPH[•] y ABTS^{•+})

Cepa	Subcultivo	Actividad antioxidante	
		DPPH [•] ($\mu\text{g EAG mL}^{-1}$)	ABTS ^{•+} ($\mu\text{g ET mL}^{-1}$)
<i>L. fermentum</i> J23	G_0	6.22 (± 1.81) ^a	23.85 (± 3.58) ^a
	G_{50}	8.91 (± 3.04) ^a	25.80 (± 3.39) ^a
	G_{100}	12.09 (± 0.88) ^b	27.92 (± 2.80) ^a
<i>L. pentosus</i> J24	G_0	10.19 (± 1.68) ^b	33.42 (± 2.22) ^b
	G_{50}	7.15 (± 1.01) ^a	25.28 (± 2.57) ^a
	G_{100}	7.05 (± 1.20) ^a	22.93 (± 3.38) ^a
<i>L. plantarum</i> J25	G_0	6.08 (± 1.67) ^a	27.72 (± 2.41) ^a
	G_{50}	8.09 (± 1.65) ^a	32.54 (± 2.64) ^b
	G_{100}	8.43 (± 1.84) ^a	33.91 (± 2.21) ^b
<i>L. pentosus</i> J27	G_0	4.15 (± 1.30) ^a	27.30 (± 2.56) ^a
	G_{50}	9.26 (± 2.44) ^b	27.95 (± 1.26) ^a
	G_{100}	13.37 (± 1.46) ^c	33.68 (± 2.02) ^b

↑ 1.5 veces

↓ 1.4 veces

=

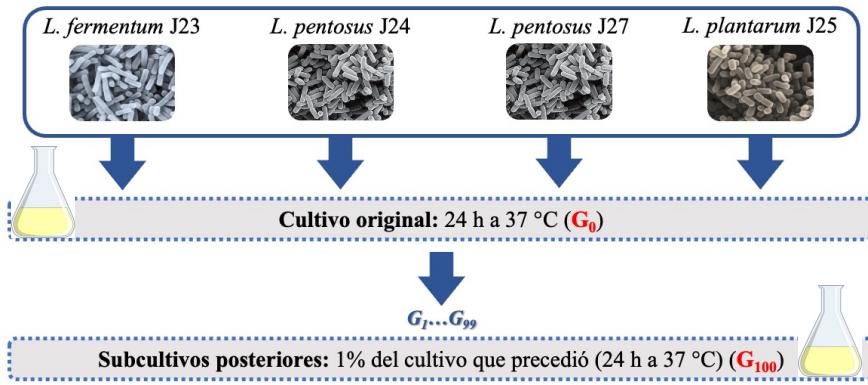
↑ 2.2 veces

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Fuente de bacterias potencialmente probióticas

Evaluación de la estabilidad fenotípica (100 subcultivos)



Actividad hemolítica

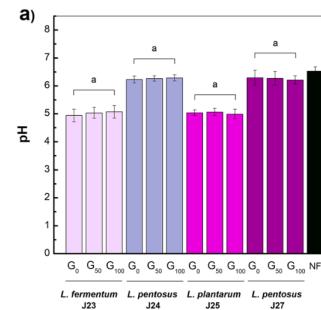
γ



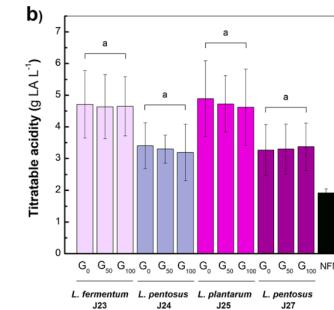
Capacidad fermentativa en leche



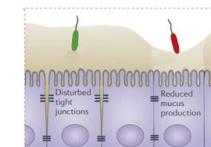
pH



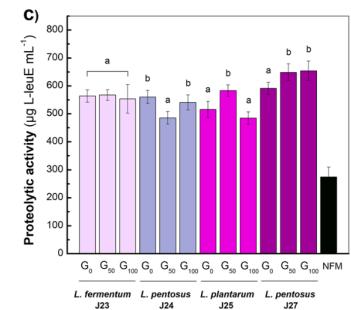
Acidez titulable



Degradación de mucina



Actividad proteolítica

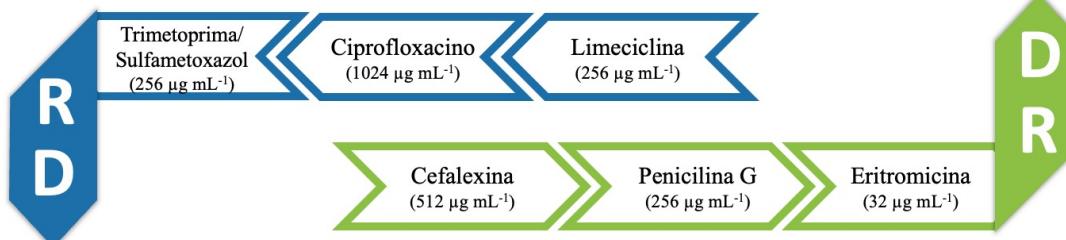


¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Fuente de bacterias potencialmente probióticas

Transferencias de resistencia a antibióticos

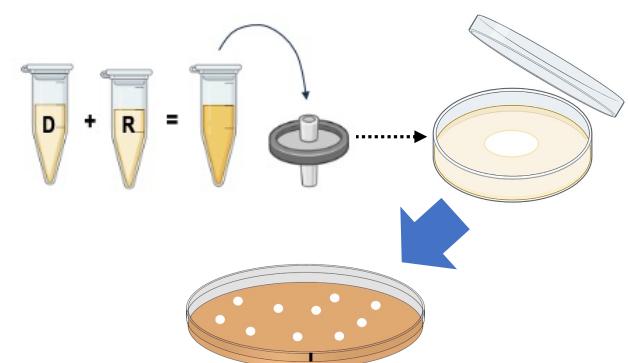


Cepas antagónicas

Escherichia coli ATCC 25922
Staphylococcus aureus subsp.
aureus ATCC 29213



Apareamiento por filtro (Conjugación)



Conteo de células
tranconjugantes (UFC mL⁻¹)



Cepas de estudio

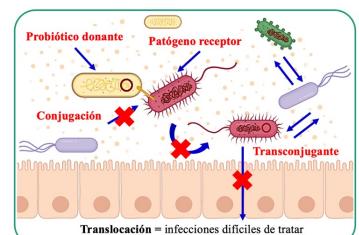
Lactobacillus fermentum J23
Lactobacillus pentosus J24 y J27
Lactobacillus plantarum J25

D, Donante; R, Receptor.

Donante	Resistencia antibiotica	Concentración celular después de la conjugación (UFC mL⁻¹)	Transconjugantes (UFC mL⁻¹)	Frecuencia de transferencia/célula donante (UFC mL⁻¹)
<i>L. fermentum</i> J23	TrS, Ci, Li	2.7×10^8 ($\pm 5.29 \times 10^7$)	ND	0
<i>L. pentosus</i> J24	TrS, Ci, Li	2.23×10^8 ($\pm 3.21 \times 10^7$)	ND	0
<i>L. pentosus</i> J27	TrS, Ci, Li	2.2×10^8 ($\pm 3.60 \times 10^7$)	ND	0
<i>L. plantarum</i> J25	TrS, Ci, Li	2.6×10^{10} ($\pm 5.13 \times 10^9$)	ND	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Cf, PnG, Em	1.14×10^{12} ($\pm 6.50 \times 10^{10}$)	ND	0
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 29213	Cf, PnG, Em	1.01×10^{12} ($\pm 6.50 \times 10^{10}$)	ND	0

Los resultados son expresados como media (\pm SD). ND, No detectado.

TrS, Trimetoprima/Sulfametoxazol; Ci, Ciprofloxacin; Li, Limeciclina; Cf, Cefalexina; PnG, Penicilina G; Em, Eritromicina.



Castro-López et al., 2023

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



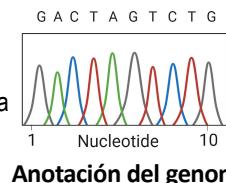
Fuente de bacterias potencialmente probióticas



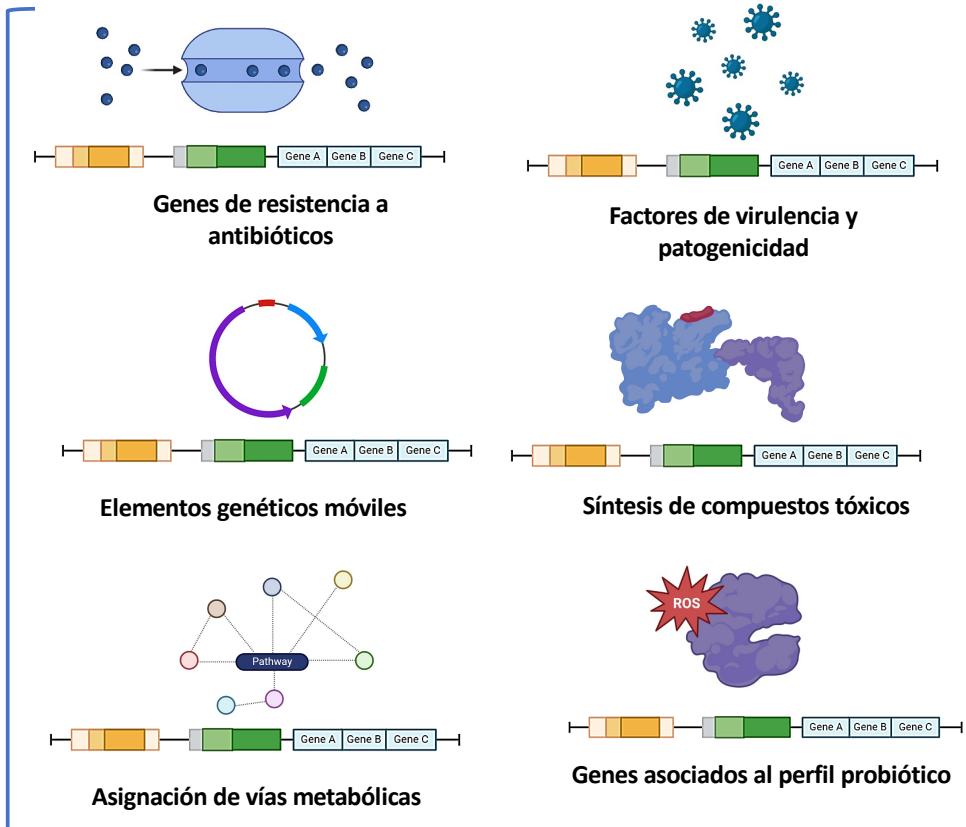
Extracción de ADN genómico



Calidad de lecturas
Ensamblaje del genoma



Anotación del genoma



Secuenciación

Castro-López, Méndez-Romero et al., 2024

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Fuente de bacterias potencialmente probióticas

Gen	Familia ARG	Clase de antibiótico	Mecanismo de resistencia	Identidad (%)	Longitud (%)
<i>EcoI_EFTu_PLV</i>	Elfamycin resistant EF-Tu	Elfamicinas	Alteración mutacional o modificación enzimática del sitio diana del antibiótico	71.68	96.82
<i>Saur_rpoB_RIF</i>	Rifamycin-resistant β-subunit of RNA polymerase (rpoB)	Rifamicinas	Alteración mutacional, modificación enzimática o reemplazo/sustitución del sitio diana del antibiótico	68.97	100.59
<i>Cdif_gyrB_FLO</i>	Fluoroquinolone resistant gyrB	Fluoroquinolonas	Alteración mutacional o modificación enzimática del sitio diana del antibiótico	59.84	101.88
<i>val(B)</i>	Streptogramin vat acetyltransferase	Estreptograminas, estreptogramina A	Inactivación enzimática del antibiótico	55.25	104.40
<i>ariR</i>	Major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump	Fluoroquinolonas	Transporte de antibióticos fuera de la célula (bombas de efujo)	56.86	43.40
<i>Afab_ACT_CHL</i>	Chloramphenicol acetyltransferase (cat)	Fenicos	Inactivación enzimática del antibiótico	56.52	54.72
<i>pmrA</i>	Major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump	Fluoroquinolonas	Transporte de antibióticos fuera de la célula (bombas de efujo)	55.51	104.11
<i>Cdif_gyrA_FLO</i>	Fluoroquinolone resistant gyrA	Fluoroquinolonas	Alteración mutacional o modificación enzimática del sitio diana del antibiótico	54.0	86.60
<i>Saur_LmrS</i>	Major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump	Macrolídos, aminoglucósidos, oxazolidinonas, fenicos, diaminopirimidinas	Transporte de antibióticos fuera de la célula (bombardeos de efujo)	53.57	28.32
9 genes				51.81	103.47
9 genes				50.75	20.00

Gen	Proteína	Factor de virulencia	Categoría	Organismo	Identidad (%)
<i>hasC</i>	UTP-glucose-1-phosphate-uridylyltransferase	UTP-glucose-1-phosphate-uridylyltransferase [Capsule]	Inmunomodulación	<i>Streptococcus</i> spp.	72.16
<i>eno</i>	Phosphopyruvate hydratase	Enolase 2	Exoenzima	<i>Streptococcus</i> spp.	71.65
<i>lisR</i>	Two-component response regulator [LisR/LisK]	Response regulator ArR	Regulación	<i>Listeria monocytogenes</i>	71.49
<i>galU</i>	UTP-glucose-1-phosphate-uridylyltransferase	UTP-glucose-1-phosphate-uridylyltransferase [Capsule]	Inmunomodulación	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	70.86
<i>tuf</i>	Elongation factor Tu (EF-Tu)	Elongation factor Tu	Adherencia	<i>Mycoplasma</i> spp.	70.58
<i>cipP</i>	ATP-dependent Cip protease proteolytic subunit [CipP]	ATP-dependent Cip protease proteolytic subunit	Supervivencia al estrés	<i>Listeria monocytogenes</i>	67.89
<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL	60 kDa chaperonin	Adherencia	<i>Clostridium</i> spp.	67.61
<i>cpsI</i>	UDP-galactopyranose mutase	UDP-galactopyranose mutase [Capsule]	Inmunomodulación	<i>Enterococcus faecalis</i>	65.04
<i>gndA</i>	NADP-dependent phosphogluconate dehydrogenase	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating [Capsule]	Inmunomodulación	<i>Klebsiella</i> spp.	64.75
<i>cpsA/uppS</i>	Undecaprenyl diphosphate synthase	Ditrans, polycis-undecaprenyl-diphosphate synthase [(2E,6E)-farnesyldiphosphate specific] [Capsule]	Inmunomodulación	<i>Enterococcus faecalis</i>	63.24
<i>msrA/B(pilB)</i>	Trifunctional thioredoxin/methionine sulfoxide reductase A/B protein	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB	Supervivencia al estrés	<i>Neisseria</i> spp.	61.48
<i>sigA/rpoV</i>	RNA polymerase sigma factor	RNA polymerase sigma factor SigA	Regulación	<i>Mycobacterium</i> spp.	60.72
12 genes					

Predicción de genes de resistencia a antibióticos (9 genes)

No se detectaron secuencias de resistencia a antibióticos relacionados a la transferencia/adquisición horizontal de genes.

Corroboration de perfil de resistencia *in vitro* → Resistencia intrínseca.

Predicción de factores de virulencia (12 genes)

No confieren virulencia → no corresponden a secuencias de toxinas.

Relación con la adaptación al estrés, plegamiento de enzimas, adaptación celular, biosíntesis y metabolismo.

No patógena para el humano con una probabilidad del 0.191 sobre 1.

Organismo patógeno: probabilidad de ~0.8-0.9.

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Queso Cocido

Predicción de genes para la síntesis de compuestos tóxicos y de elementos genéticos móviles

Confirmación de perfil de actividad hemolítica *in vitro*.

Compuestos tóxicos → eventos inflamatorios, apoptosis celular, daño a células epiteliales, hepatotoxicidad y neurotoxicidad.

Evolución bacteriana → reordenamiento, plasticidad y función del genoma

Predicción genes asociados a diferentes propiedades probióticas

Mecanismos subyacentes a la fisiología, funcionalidad y eficacia de la cepa
→ predicción de efectos benéficos.

Fuente de bacterias potencialmente probióticas

Compuesto tóxico	Gen	Proteína/metabolito	Descripción	Elemento genético móvil	Descripción
Aminas biógenas	<i>hdc</i>	Histidine decarboxylase	Ausencia	Isla genómica	13 islas, 484 genes: respuesta al estrés, adhesión celular, desintoxicación de metales, reguladores transcripcionales, proteínas hipotéticas
	<i>tdc</i>	Tyrosine decarboxylase			
	<i>ldc</i>	Lysine decarboxylase			
	<i>odc</i>	Ornithine decarboxylase			
	<i>aguB</i>	N-carbamoylputrescine amidase			
Otras toxinas	<i>speB</i>	Agmatinase	Transposasas		18 genes, familias IS3, IS30, IS982 y ISL3: adaptación (medio ambiente/hospedero) y resistencia al estrés
	<i>ldcc</i>	L-lysine decarboxylase			
	<i>hlyA</i>	Hemolysin			
	<i>nhe</i>	Non-hemolytic enterotoxin			
Lipopéptidos	<i>cytK</i>	Cytolysin K	Ausencia		
	<i>ldhd</i>	D-lactate dehydrogenase			
	<i>srfA</i> operon	Surfactin			
	<i>fenE</i>	Fengycin	Ausencia		
	<i>lchAA</i>	Lichenysin			

Propiedad probiótica	Gen	Proteína	Propiedad probiótica	Gen	Proteína
Resistencia al estrés (biliar, ácido, osmótico, oxidativo, térmico)	<i>atpB</i>	F0F1 ATP synthase subunit A	Supervivencia y adhesión	<i>mucBP</i>	MucBP domain-containing protein
	<i>grpE</i>	Heat shock protein GrpE		<i>tuf</i>	Elongation factor Tu
	<i>hrcA</i>	Heat-inducible transcription repressor HrcA		<i>srtA</i>	Sortase A, LPXTG specific
	<i>asp</i>	Alkaline shock protein		<i>ispA</i>	Lipoprotein signal peptidase
	<i>gtf</i>	Glycosyltransferase		<i>fnb/fbe</i>	Fibronectin
	<i>cbh</i>	Choloylglycine hydrolase		<i>eno</i>	Phosphopyruvate hydratase
	<i>dnaK</i>	Chaperone protein DnaK		<i>epsD</i>	Tyrosine-protein kinase EpsD
	<i>hsp20</i>	Heat shock protein Hsp20		<i>ldh</i>	L-lactate dehydrogenase
	<i>groEL</i>	Heat shock protein 60 kDa family chaperone		<i>lysM</i>	Peptidoglycan-binding LysM
	<i>infA1</i>	Translation initiation factor 1		<i>ltaS</i>	lipoteichoic acid synthase LtaS
	<i>gor</i>	Glutathione reductase	Inmunomodulación, mejora del metabolismo del hospedero, producción de nutrientes y otros procesos benéficos	<i>ccpA</i>	Catabolite control protein A
	<i>sod</i>	Superoxide dismutase		<i>luxS</i>	S-ribosylhomocysteine lyase
	<i>trx</i>	Thioredoxin		<i>ykcB</i>	Mannosyltransferase YkcB
	<i>ndh</i>	NADH dehydrogenase		<i>metE</i>	Methionine synthase II
	<i>gls24</i>	Universal stress protein			
	<i>lvsc</i>	Aspartate kinase			

ero et al., 2024

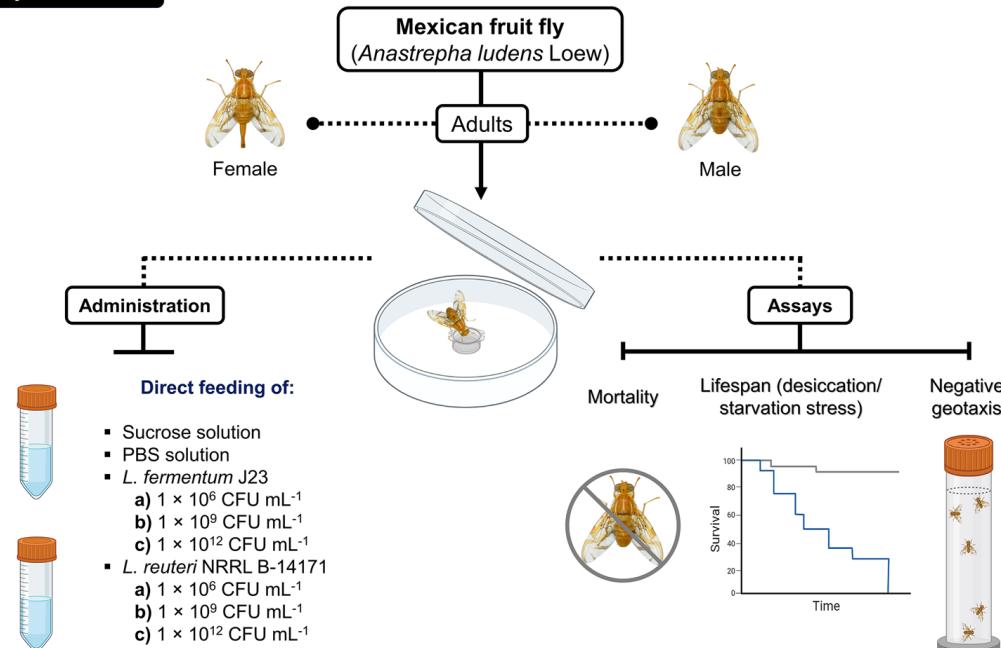
¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mí?



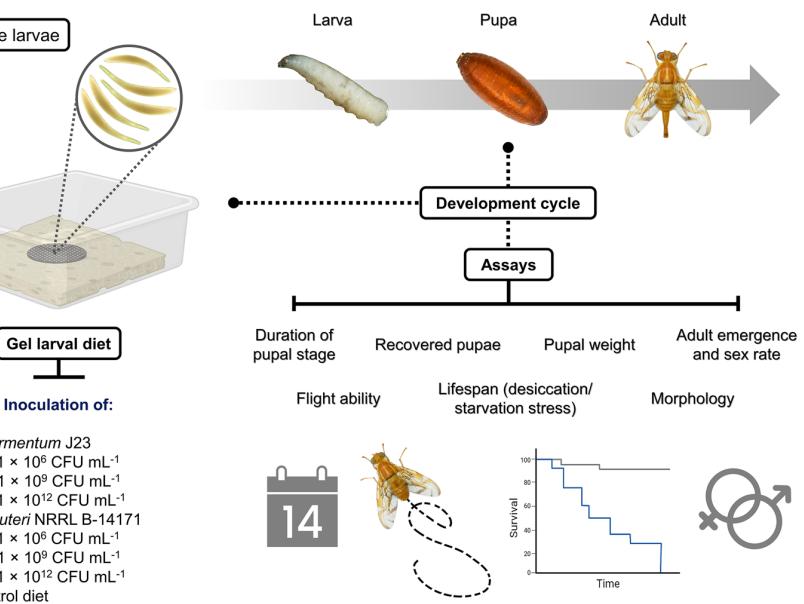
Fuente de bacterias potencialmente probióticas

Ensayo de bioseguridad en un organismo modelo (*Anastrepha ludens* Loew)

Experiment 1



Experiment 2



¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Queso Cocido

Fuente de bacterias potencialmente probióticas

Ensayo de bioseguridad en un organismo modelo (*Anastrepha ludens* Loew)

Experiment 1

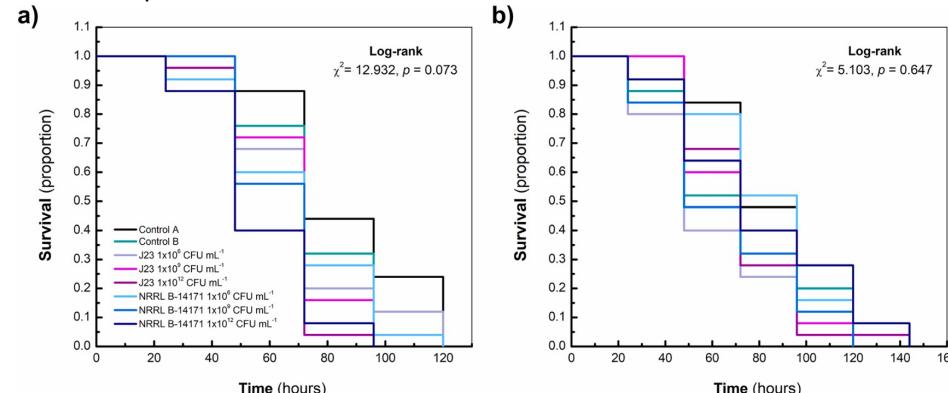
Mortalidad/toxicidad



En ninguno de los grupos de hembras/machos adultos tratados se observó:

- Incidencia de mortalidad
- Signos de toxicidad (cambios de aspecto o comportamiento alimentario, letargia, desorientación).

Esperanza de vida *A. ludens* adultos (a) machos y (b) hembras después del cese de los tratamientos bacterianos.



Los datos no mostraron diferencias significativas entre los testigos y los tratamientos bacterianos. Las poblaciones de hembras tratadas mostraron mayor longevidad que los machos tratados (120 h vs 144 h).

Actividad locomotora



L. fermentum J23 provocó una mejora considerable en la actividad locomotora

Los comportamientos positivos se correlacionan con la protección frente al envejecimiento neuronal y el estrés oxidativo, y efectos antiinflamatorios

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



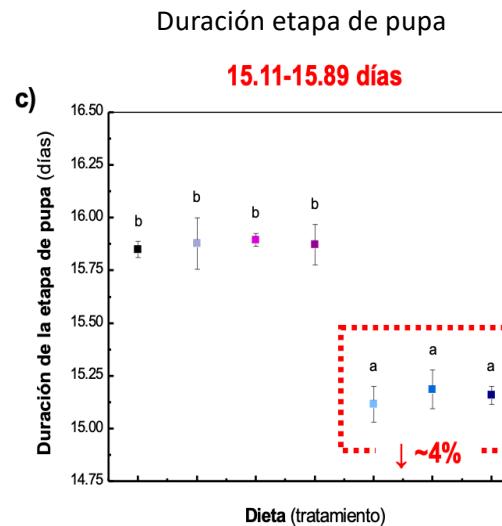
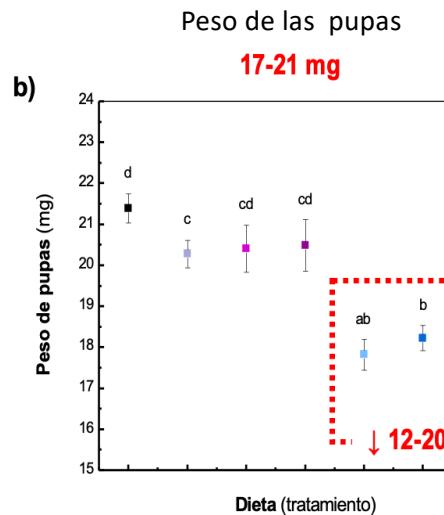
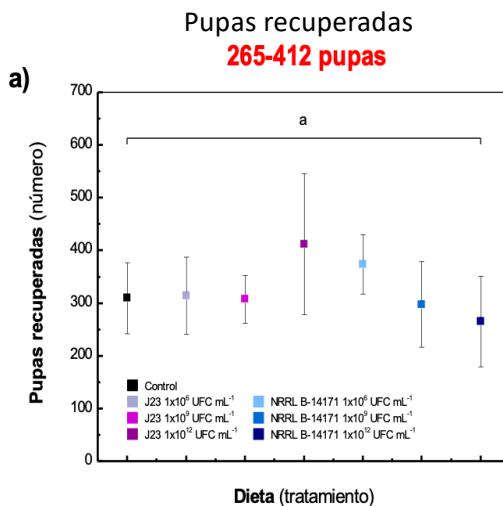
Queso Cocido

Fuente de bacterias potencialmente probióticas

Ensayo de bioseguridad en un organismo modelo (*Anastrepha ludens* Loew)

Experiment 2

Desarrollo larvario



Las larvas tratadas con *L. fermentum* J23 no mostraron efectos de infección bacteriana (cese de la alimentación, aparición de nódulos negros y lesiones epidérmicas), flacidez o muerte.

Castro-López, et al., 2022

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Queso Cocido

Fuente de bacterias potencialmente probióticas

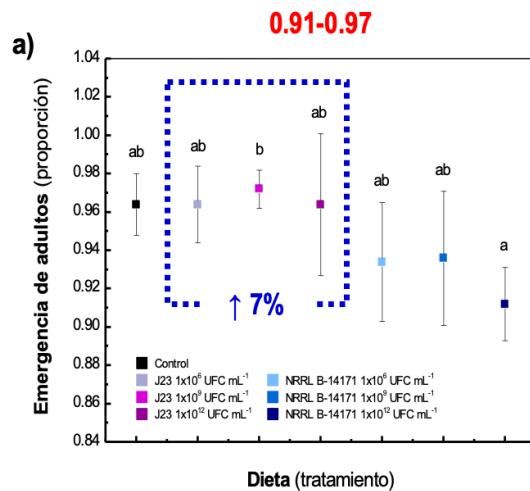
Ensayo de bioseguridad en un organismo modelo (*Anastrepha ludens* Loew)

Experiment 2

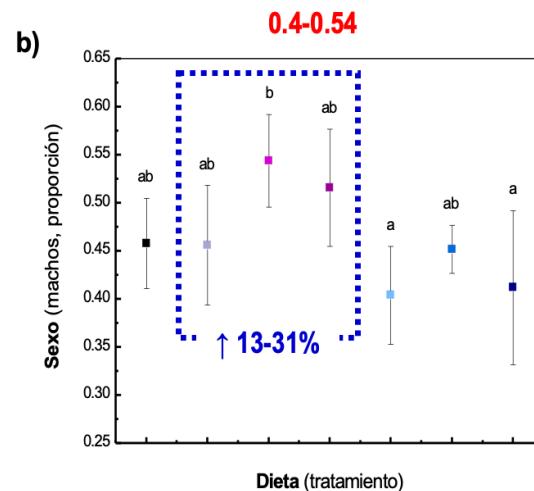
Eclosión de adultos, proporción de sexos y capacidad de vuelo



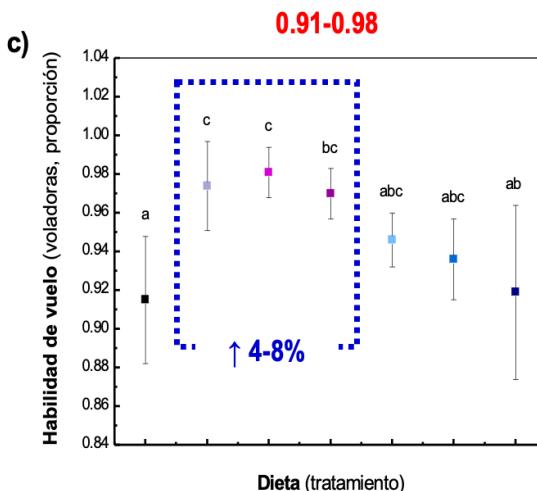
Eclosión de adultos



Proporción de machos



Capacidad de vuelo



L. fermentum J23 no afectó al desarrollo en estadios inmaduros (retraso en la metamorfosis o diferenciación sexual alterada)

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Queso Cocido

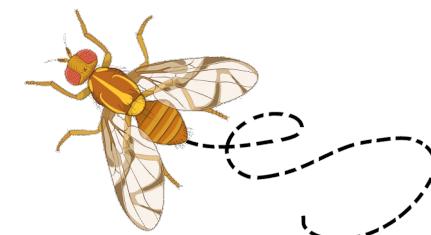
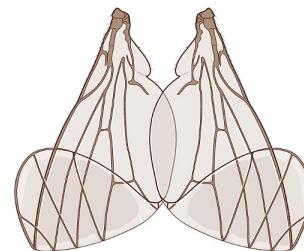
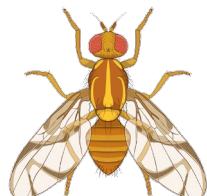


Fuente de bacterias potencialmente probióticas

Ensayo de bioseguridad en un organismo modelo (*Anastrepha ludens* Loew)

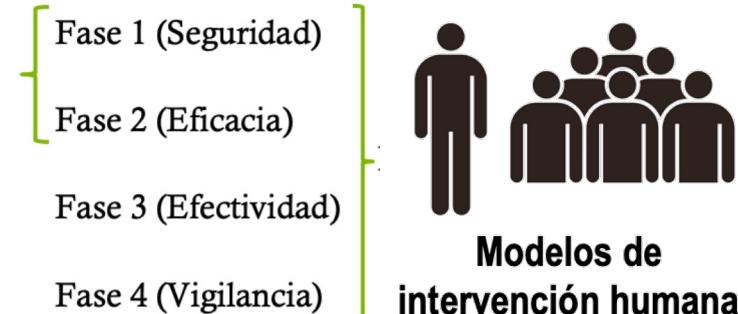
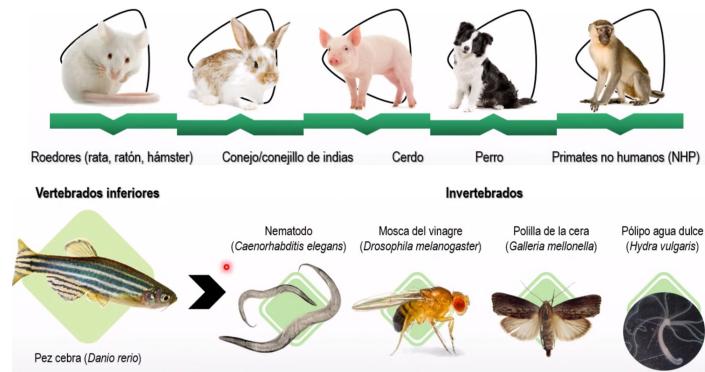
La administración oral de *L. fermentum* J23 no conduce a ningún efecto relacionado con toxemia o septicemia en los sujetos adultos ni durante el ciclo de crianza y desarrollo, lo que indica que la bacteria no es reconocida como un patógeno exógeno por el hospedero.

L. fermentum J23 presentó un perfil de bioseguridad equiparable al de una cepas probiótica comercial, lo que sugiere que no representa un riesgo para el consumo humano, aunque esto aún debe de corroborarse con estudios complementarios.



Castro-López, et al., 2022

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Fase 2 (Eficacia)

Asignación al azar
Ensayo aleatorizado, placebo-controlado, doble ciego (con tamaño muestral adecuado)
Descarta el efecto placebo y el sesgo del sujetos de experimentación y del investigador

Placebo = misma matriz del alimento sin el probiótico de prueba.
Diferentes diseños de estudio necesitan diferentes métodos de cálculo del tamaño de la muestra

Fase 3 (Efectividad)

Comparación de probióticos contra tratamiento estándar de una condición específica

Niveles de evidencia

Nivel III: Opinión de expertos o declaraciones de consenso, experiencia clínica. (Nivel mas bajo)

Nivel II: Evidencia obtenida de otros ensayos de comparación, estudios no aleatorios, de cohorte, casos de estudio o epidemiológicos (Sin aleatorización), preferentemente más de un estudio.

Nivel I: Evidencia obtenida de al menos un ensayo controlado aleatorizado, una revisión sistemática o un meta-análisis (Nivel mas alto).

Fase 4 (Vigilancia)

- Todos los interesados deben de desarrollar un sistema para monitorear los resultados en la salud por la administración prolongada de probióticos
- Registrar y documentar potenciales efectos secundarios y beneficios a largo plazo
- Contar con sistemas de trazabilidad apropiados posterior la comercialización

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?



Ringel et al., 2012; Kerry et al., 2018; Baccigalupi et al. 2015

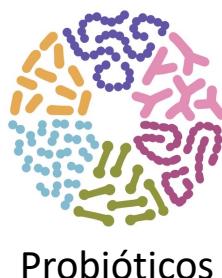
¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?

Quesos



Como vehículo de bacterias probióticas

Leche



Probióticos

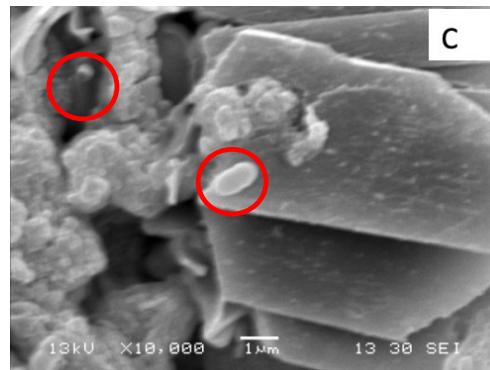
Queso Fresco o semi-madurado
(30 días)



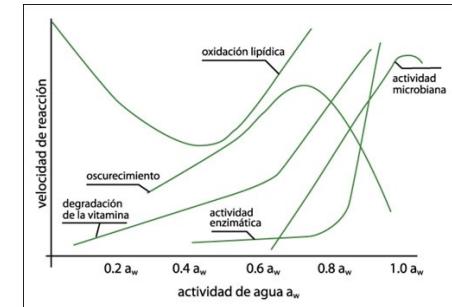
- Mayor capacidad amortiguadora
- pH alto (4.5 - 5.4)
- Interacción con caseínas del queso
- Mayor actividad de Agua (>0.9)
- Almacenamiento (4-8 °C)

↑
Viabilidad de los probióticos

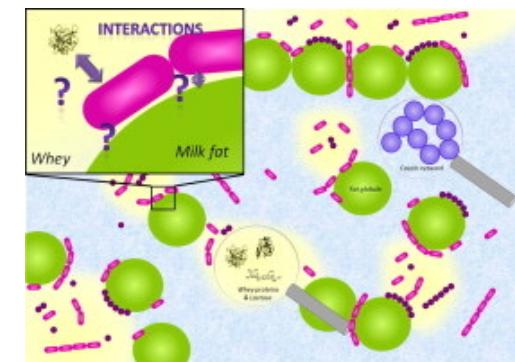
(10^7 a 10^9 UFC/mL)



Lactobacillus rhamnosus GG en queso
fresco-interacción con caseínas



Interacciones electrostáticas
Ácido/base
Hidrofóbicas

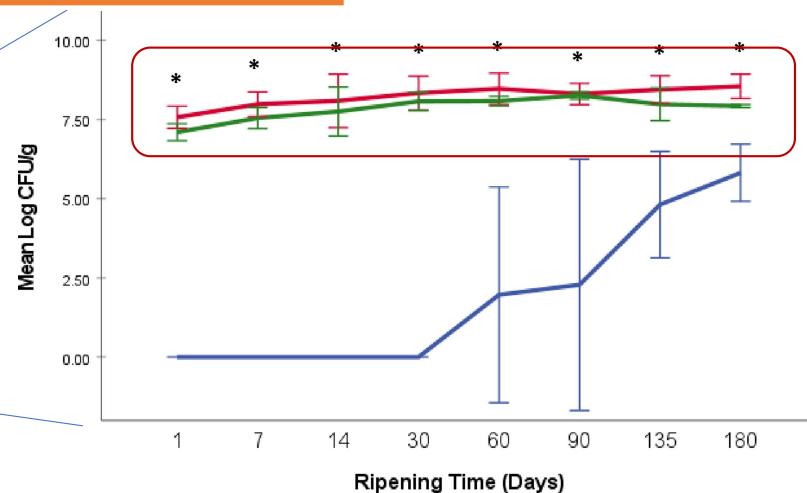
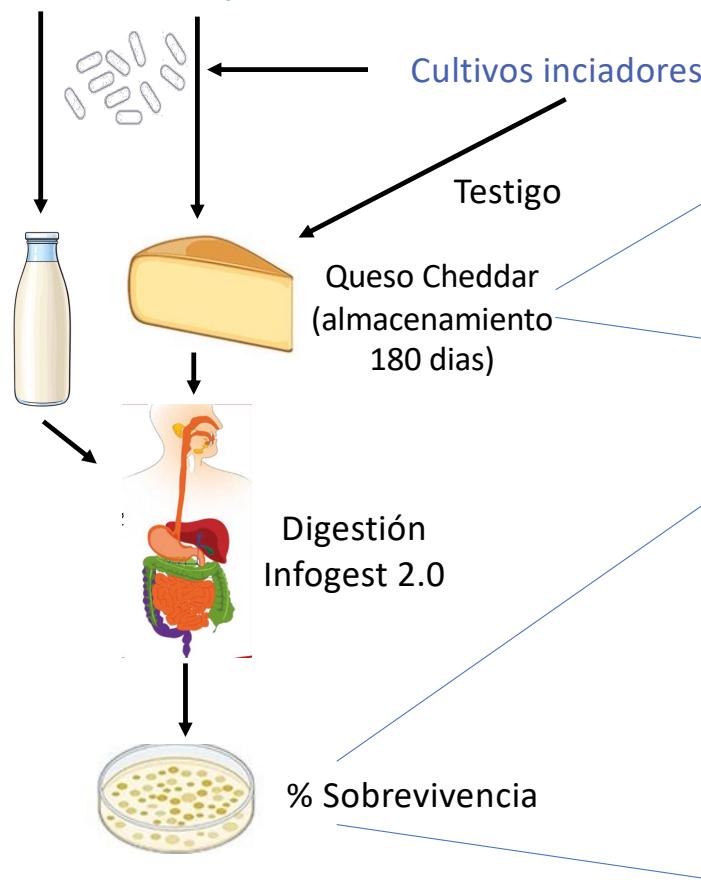


Widya et al., 2019; Rolim et al., 2020

¿Los microorganismos de los quesos son buenos para mi?

Lacticaseibacillus rhamnosus DPC7102
Lacticaseibacillus paracasei DPC7150

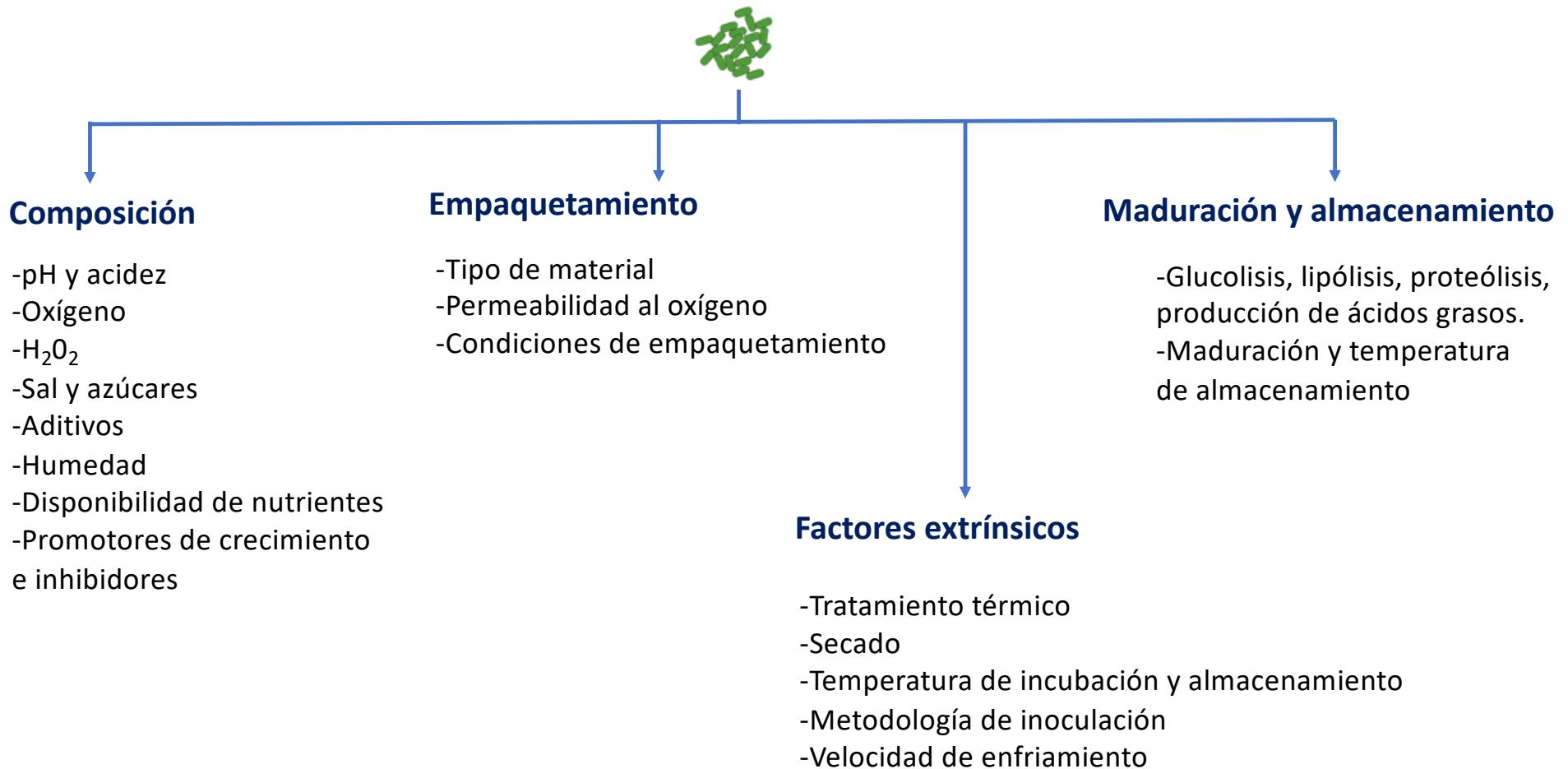
Como vehículo de bacterias probioticas



Strain	Matrix	Initial Log CFU/g	Final Log CFU/g	Log Reduction	% Survival
<i>Lc. rhamnosus</i> DPC7102	Cheddar	8.46±0.07	6.53±0.16	1.93	1.23±0.47
	Cheese				
<i>Lc. paracasei</i> DPC7150	Fermented Milk	9.03±0.16	6.03±0.13	3.00	0.12±0.08
	Cheese	7.71±0.25	6.85±0.09	0.86	14.33±5.35
	Fermented Milk	7.74±0.12	5.38±0.18	2.36	0.46±0.18

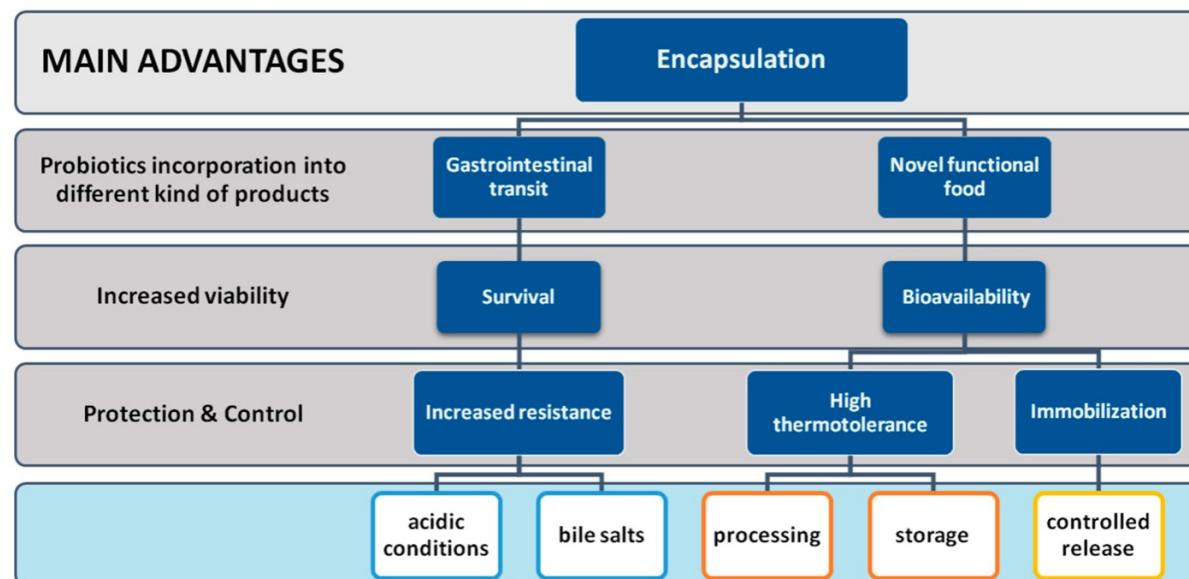
Leeuwendaal et al., 2022

Factores que influyen en la viabilidad de los probióticos



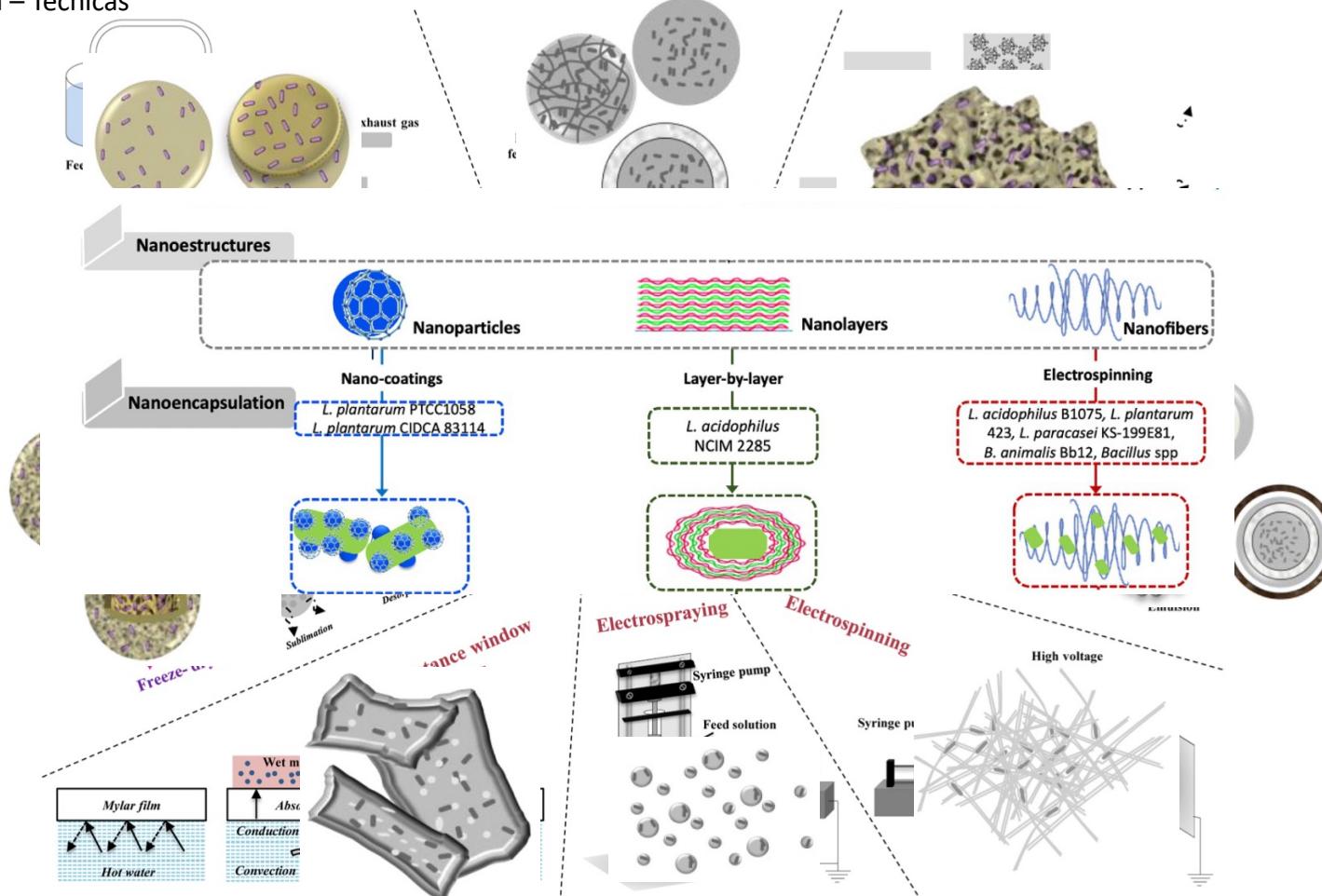
Estrategias para aumentar su estabilidad y supervivencia

- ✓ Selección de cepas ácido resistentes
- ✓ Fermentación en doble etapa
- ✓ Pre-adaptación
- ✓ Adición de micronutrientes y/o aditivos protectores
- ✓ Microencapsulación



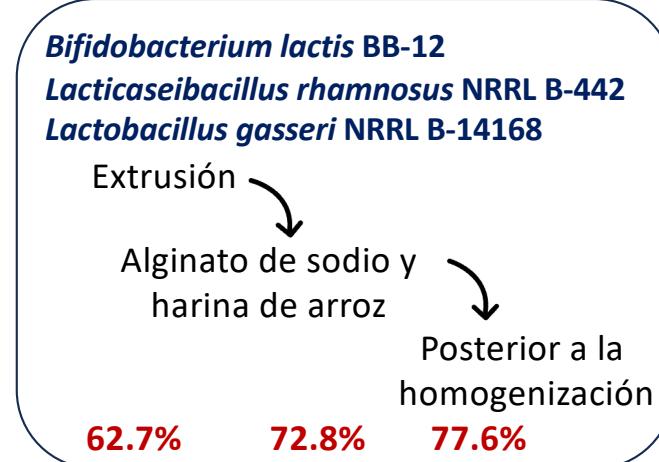
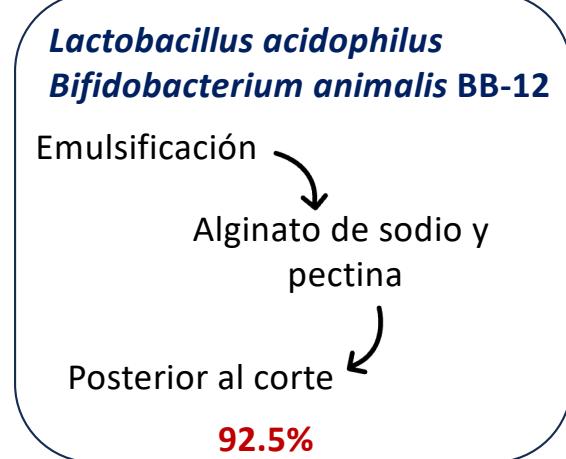
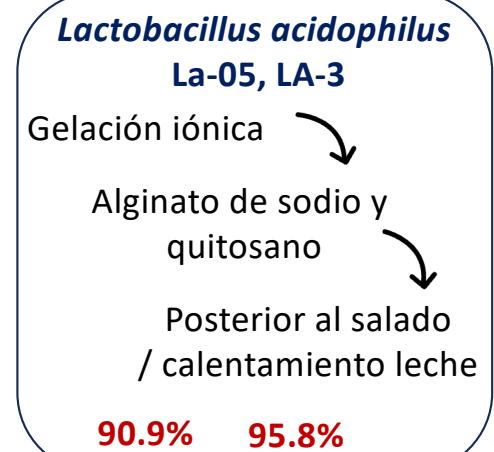
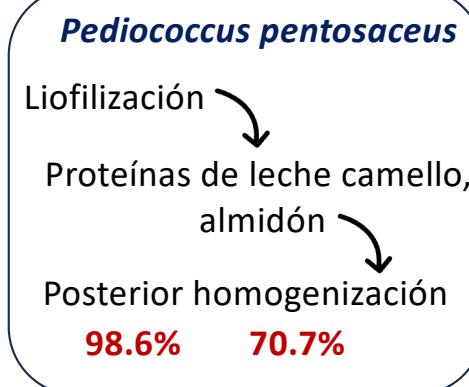
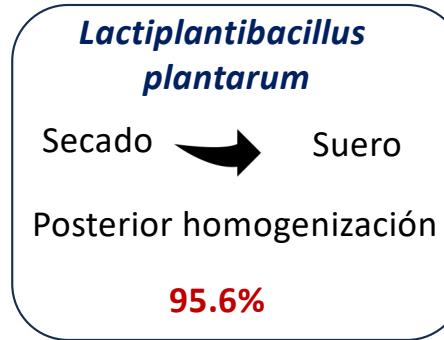
Estrategias para aumentar su estabilidad y supervivencia

Microencapsulación – Técnicas

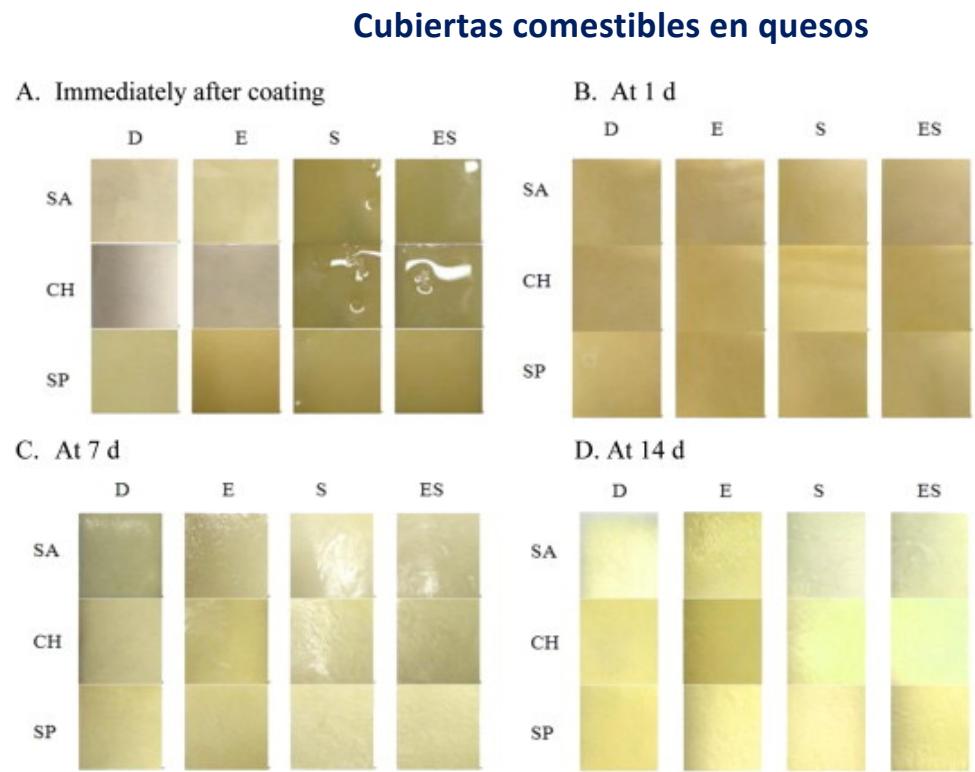
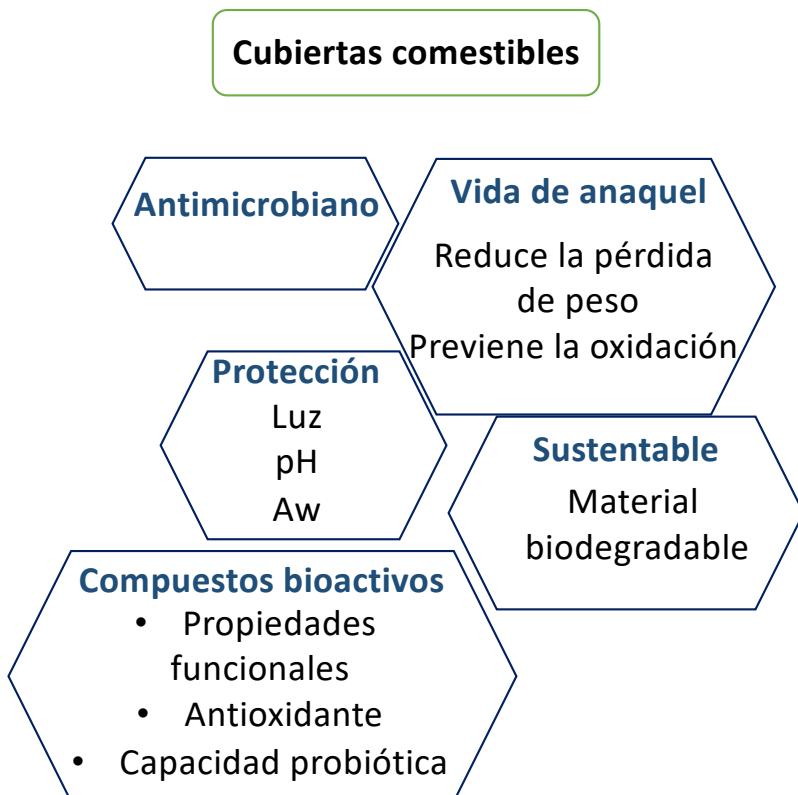


Estrategias para aumentar su estabilidad y supervivencia

Microencapsulación – Técnicas



Estrategias para aumentar su estabilidad y supervivencia



SA: Alginato de Sodio CH:Quitosano SP: Proteína de soya

Costa et al., 2018; Jafarzadeh et al., 2021; Fierro-Corona et al., 2023

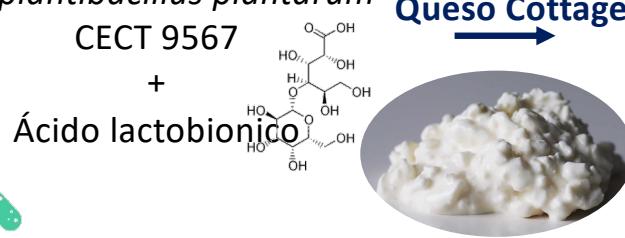
Estrategias para aumentar su estabilidad y supervivencia

Cubiertas comestibles

Lactiplantibacillus plantarum
CECT 9567

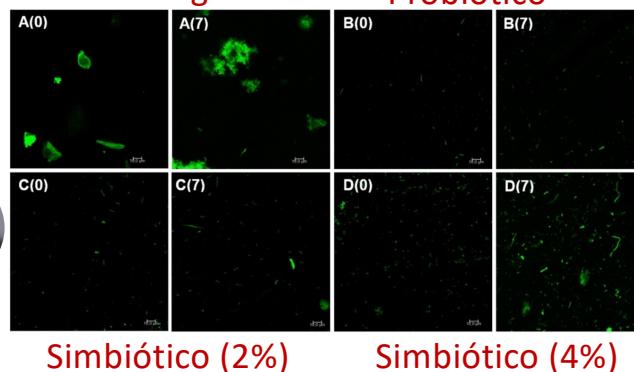
+

Ácido lactobionico



Queso Cottage

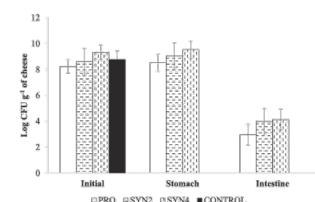
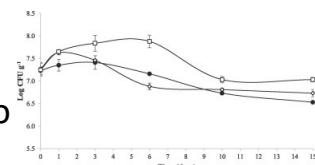
Testigo



Viabilidad

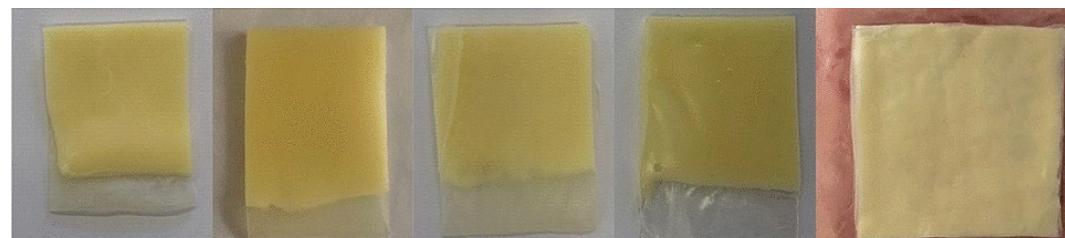
Almacenamiento

- Digestión gastrointestinal



Lactobacillus acidophilus (La)
Lacticaseibacillus rhamnosus (Lr) +
Almidón de papa, suero
Fermentado (SF) y no fermentado (USF)

Queso Manchego



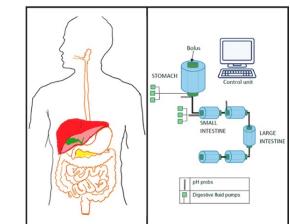
CCSFLa

CCSFLr

CCUSF

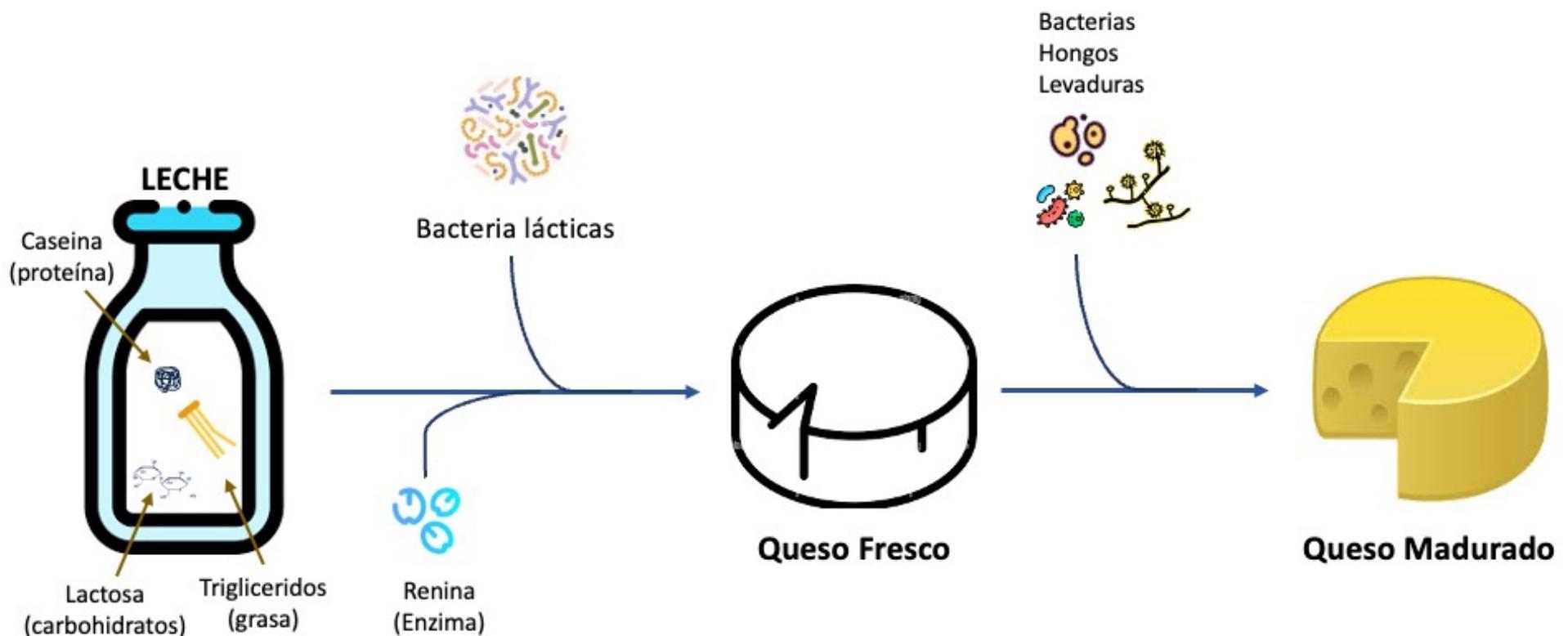
CC
(testigo)

CC
(Polietileno)



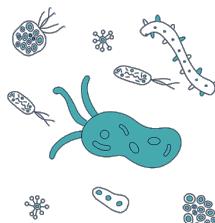
Viabilidad
>7 Log 14 días
almacenamiento

Microorganismo en la transformación de la leche a queso



Por su atención....

GRACIAS!!!



Dr. Adrián Hernández Mendoza

Laboratorio de Calidad y Autenticidad de los Alimentos y
Química y Biotecnología de Productos Lácteos



+52 (662)289 24 00, ext 611

ahernandez@ciad.mx



Las bacterias probóticas
en quesos artesanales