

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA  
ALIMENTARIA**

**“Estudio de las interacciones entre  
poblaciones microbianas en una leche  
fermentada natural”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER  
POR**

**EVA ARMINDO RIVERO**

**JULIO, 2022**



*En primer lugar, quisiera agradecer el trabajo realizado por mis tutores la Dra. Ana Belén Flórez y el Dr. Baltasar Mayo Pérez. Su guía constante e implicación directa durante todos estos meses, sumadas a su excelente capacidad de transmisión de conocimiento y a la paciencia, templanza y dedicación que han demostrado tener con cada duda, titubeo o dificultad encontrada, han sido la base fundamental de consecución del presente trabajo. Les doy gracias por la oportunidad que me han brindado al poder formar parte del grupo de Cultivos Lácteos Funcionales durante estos meses y por su interés genuino en mi formación completa a todos los niveles. Ambos me han transmitido tanto su profesionalidad y sabiduría como valores que mueven a un investigador científico: resiliencia, esfuerzo y superación, entre otros.*

*En segundo lugar, quiero agradecer la acogida que me han dado el resto de integrantes del grupo. A la doctora Lucía Vázquez Iglesias por ser un apoyo constante y una ayuda imprescindible. Al doctorando Javier Rodríguez Álvarez por su inquebrantable disposición positiva y su estoica confianza en mí. Al doctorando José Alejandro Valenzuela por su paciencia infinita y su preocupación sincera. A Cristina Lobato Flecha, por acompañarme en la novedad y por su buen hacer. Les doy las gracias a los cuatro por haber sido un soporte en el laboratorio, y por el resto de horas del día, ya que la convivencia ha sido profunda y cautivadora.*

*También agradezco al resto del personal del IPLA el ambiente de trabajo extraordinario y cada plan en el que me han tenido en cuenta, amenizando y aportando ligereza en los momentos duros.*

*Por último, agradecer a mis padres, Javi y Merce, por sus ánimos, por ser mis pilares incondicionales y por hacer de mis alegrías y penas, las suyas. Y a mi hermano Saúl, por ser mi compañero de vida. Sin ellos, no tendría sentido.*

# ÍNDICE

Resumen .....	4
Listado de Figuras.....	6
Listado de Tablas .....	7
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>2 CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y/O EXPERIMENTALES</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Fundamentos teóricos</b> .....	<b>12</b>
2.1.1 Leches fermentadas .....	12
2.1.2 Bacterias del ácido láctico (BAL).....	13
2.1.3 Cultivos iniciadores .....	17
2.1.4 Relaciones microbianas .....	19
<b>2.2 Consideraciones experimentales</b> .....	<b>22</b>
2.2.1 Métodos clásicos para la detección y cuantificación de BAL .....	22
2.2.2 Métodos moleculares para la detección y cuantificación de BAL ..	24
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1 Cepas bacterianas</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2 Preparación de stocks</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3 Ensayo de medios selectivos y diferenciales</b> .....	<b>29</b>
3.3.1 Utilización del citrato .....	29
3.3.2 Hidrólisis de arginina.....	30
<b>3.4 Extracción del ADN total</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5 Secuenciación y análisis genómico</b> .....	<b>31</b>
<b>3.6 PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)</b> .....	<b>31</b>
3.6.1 Diseño de cebadores (primers) específicos.....	32
3.6.2 Elaboración de rectas standard .....	33
<b>3.7 Cultivos individuales y mixtos en leche</b> .....	<b>33</b>
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>34</b>

<b>4.1 Determinación de un medio de cultivo diferencial para <i>L. lactis</i> Y <i>L. cremoris</i></b> .....	34
4.1.1 Utilización del citrato .....	34
4.1.2 Hidrólisis de arginina.....	35
<b>4.2 Evaluación de la especificidad y sensibilidad del medio de cultivo TTC</b> .....	37
<b>4.3 Estudio de la evolución de las tres cepas de BAL en leches fermentadas mediante técnicas de cultivo</b> .....	39
4.3.1 Tasas de crecimiento.....	39
4.3.2 Acidificación: evolución del pH.....	40
<b>4.4 Análisis genómico para definir marcadores específicos de cepa ....</b>	43
<b>4.5 Desarrollo de un método de PCR cuantitativa para la detección específica de cepas</b> .....	44
4.5.1 Puesta a punto de los oligonucleótidos .....	44
4.5.2 Optimización del método de qPCR .....	46
<b>4.6 Estudio de la evolución de las tres cepas de BAL en leches fermentadas mediante qPCR</b> .....	47
<b>5 CONCLUSIONES</b> .....	50
<b>6 LISTADO DE SÍMBOLOS</b> .....	51
<b>7 BIBLIOGRAFÍA</b> .....	52
<b>8 ANEXOS</b> .....	57

## RESUMEN

El proceso de fermentación involucra el crecimiento y actividad de microorganismos que modifican las propiedades organolépticas y nutritivas de la leche, y entre los que destacan las bacterias del ácido láctico. Si bien, existe un gran conocimiento sobre la composición y diversidad de la microbiota de las leches fermentadas, todavía se desconocen las interacciones microbianas que tienen lugar en estos productos. Con el objetivo de profundizar en el estudio de las interacciones, en este trabajo se ha seleccionado una leche fermentada natural compuesta por una comunidad sencilla y estable que incluye dos cepas de lactococos (una de cada especie *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris*) y una cepa de *Lactiplantibacillus plantarum*.

Para evaluar el crecimiento de las cepas de lactococos en las fermentaciones se necesitó implementar un medio diferencial que discriminase las especies *L. lactis* y *L. cremoris*. Tras la evaluación de distintos medios de cultivo reportados en la bibliografía, se seleccionó el medio de cultivo TTC, que permitía la diferenciación morfológica de las colonias de ambas cepas. Mediante el análisis microbiológico se determinó que el crecimiento de la cepa de *L. lactis* 3LA1 se ve favorecido significativamente por la presencia de la cepa *L. cremoris* 3LA10, y no se ve afectado por la presencia del *L. plantarum*. La cepa de *L. cremoris* manifiesta un crecimiento análogo en todas las condiciones fermentativas. La cepa de *L. plantarum* alcanza concentraciones menores que las cepas de lactococos, y su crecimiento fue mayor en los cultivos individuales que en los cultivos mixtos. Complementariamente, se puso a punto una técnica de qPCR para la detección específica de cada cepa en las fermentaciones. Esto fue posible gracias a la secuenciación genómica previa de las cepas, que permitió diseñar sondas para amplificar genes de copia única y específicos de cepa. Los datos obtenidos mediante qPCR coinciden con los obtenidos mediante cultivo microbiano, a excepción de los recuentos de *L. plantarum*, para los que se observó un crecimiento muy similar tanto en los cultivos individuales como mixtos. Las técnicas de recuento en cultivo y las moleculares son herramientas válidas para el estudio de esta comunidad microbiana. No obstante, la qPCR demostró ser un método más rápido y sensible que los recuentos microbianos.

La caracterización de los mecanismos de interacción microbiana de comunidades sencillas como la del presente trabajo proporciona información con la que abarcar en el futuro el estudio de comunidades más complejas.

## ABSTRACT

The fermentation process involves the development and activity of microorganisms that modify milk organoleptic and nutritional properties, among which lactic acid bacteria (BAL) species are pivotal. Although the microbiota composition and diversity of fermented milk has been established, the microbial interactions taking place in these products are rather unknown. The aim of this project was to acquire knowledge regarding the microbial interactions present in a naturally fermented milk (NFM). To this respect, a NFM composed of a stable community composed of two lactococcal strains (one each of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus cremoris*) and a *Lactiplantibacillus plantarum* strain was selected to evaluate their microbial relationships.

To evaluate the growth of the lactococcal strains in the fermentations, a differential medium discriminating *L. lactis* from *L. cremoris* was implemented. After the evaluation of different culture media reported in the literature, the TTC culture medium, which includes tetrazolium salts, was selected. Microbiological analysis revealed that the *L. lactis* 3LA1 strain growth was significantly favoured by the presence of *L. cremoris* 3LA10, and not affected by the presence of *L. plantarum* 3LA30. Whether alone or combined with other, *L. cremoris* 3LA10 showed similar growth in all fermentative conditions. The *L. plantarum* 3LA30 strain reached a lower concentration than the lactococcal strains, and its growth was higher when grown individually than in co-cultures. In addition to the cultures, a qPCR method was developed and optimized to detect and quantify the three BAL strains along fermentations. This was possible, by the previous genome sequencing of the strains, which allowed the design of oligonucleotide primers to amplify single-copy, strain-specific genes. The results obtained by qPCR were similar to those from culturing, except for the *L. plantarum* strain, for which very similar growth was observed in both individual and mixed cultures. In general, both analytical techniques can be valid tools for the study of this microbial community. Although this, qPCR proved to be a faster and more sensitive method than microbial counts.

The characterization of the microbial interactions occurring in small-size communities, such as the one of the present study, provides information with which to study more complex communities, such as those in the cheese microbiota.

## LISTADO DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
Fig. 1	Árbol filogenético de las bacterias del ácido láctico.	14
Fig. 2	Metabolismo del citrato. Adaptado de Swindell y colaboradores.	16
Fig. 3	Fermentos específicos diseñados para el queso de Cabrales diseñados por el grupo de Cultivos Lácteos Funcionales del IPLA, comercializados en forma liofilizada por Biogés Starters SA.	18
Fig. 4	Esquema representativo de las posibles relaciones que se establecen entre individuos de una comunidad microbiana. Adaptado de Mayo y colaboradores.	20
Fig. 5	Placas de cultivo de diferentes medios selectivos. En la izquierda, medio KM con bacterias utilizadoras del citrato. En el centro, medio TTC con lactococos que hidrolizan la arginina (morados) y que no (rosas). En la derecha, medio Reddy con colonias amarillas que no hidrolizan la arginina.	23
Fig. 6	Esquema representativo de la reacción en cadena de la polimerasa PCR (Andy Vierstraete, 1999).	25
Fig. 7	Secuenciación Illumina. Adaptado de Metzker y colaboradores.	28
Fig. 8	Esquema representativo de las diferentes condiciones fermentativas.	33
Fig. 9	Placas de cultivo en aerobiosis de medio TTC con colonias de <i>L. cremoris</i> rosas, <i>L. lactis</i> moradas y <i>L. plantarum</i> blancas.	36
Fig. 10	Comparación del crecimiento en los medios TTC y GM17. A) Representación del promedio de recuentos microbianos obtenidos de la cepa <i>L. lactis</i> 3LA1 de forma individual y en co-cultivo con <i>L. plantarum</i> durante las fermentaciones en leche. B) Representación del promedio de recuentos microbianos obtenidos de la cepa <i>L. cremoris</i> 3LA10 de forma individual y en co-cultivo con <i>L. plantarum</i> durante las fermentaciones en leche.	37
Fig. 11	Curvas de crecimiento obtenidas para <i>L. lactis</i> 3LA1 (A) y <i>L. cremoris</i> 3LA10 (B) en medio de cultivo TTC individuales y en co-cultivo. Las curvas de crecimiento de <i>L. plantarum</i> (C) se obtuvieron en medio MRS.	39
Fig. 12	Comparación entre el crecimiento y la evolución del pH para <i>L. lactis</i> 3LA1 (A), <i>L. cremoris</i> 3LA10 (B) y <i>L. plantarum</i> (C).	41
Fig. 13	Acidificación observada en las fermentaciones lácteas.	42
Fig. 14	Curva estándar de qPCR para los genes diana de cada cepa, utilizando diluciones seriadas de ADN procedente de inóculos de concentración conocida. La regresión lineal se obtuvo al representar los valores de ciclos umbral Ct frente el logaritmo en base 10 de los recuentos microbianos. Las ecuaciones y los valores de R <sup>2</sup> se indican en cada caso.	45
Fig. 15	Curva estándar obtenida para la pareja de cebadores <i>malA</i> .	45
Fig. 16	Curvas estándar de qPCR para los cebadores MANIA2 de <i>L. lactis</i> (A), <i>galF</i> de <i>L. cremoris</i> (B) y <i>rhaA</i> de <i>L. plantarum</i> (C). Se utilizaron diluciones acuosas 1/2 de diluciones seriadas de inóculos en leche de las cepas de concentración conocida. La regresión lineal se obtuvo al representar los valores de ciclos umbral Ct frente el logaritmo en base 10 de los recuentos microbianos. Las ecuaciones y los valores de R <sup>2</sup> se indican en cada caso.	46
Fig. 17	Valores de concentraciones microbianas obtenidos mediante qPCR para <i>L. lactis</i> (A), <i>L. cremoris</i> (B) y <i>L. plantarum</i> (C). Como molde en las reacciones se utilizaron diluciones acuosas 1/2 de las muestras en leche. Los valores de concentraciones bacterianas se obtuvieron mediante la extrapolación de los valores de ciclos umbral Ct usando las rectas de regresión.	48

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
Tabla 1	<i>Parejas de oligonucleótidos diseñados.</i>	32
Tabla 2	<i>Datos de la secuenciación de los genomas de las cepas de interés con los programas SPAdes y Unicycler.</i>	43
Tabla 3	<i>Valores de Ct obtenidos mediante qPCR en el estudio de amplificación y especificidad de las parejas de oligonucleótidos diseñadas. Cada ensayo se hizo por triplicado.</i>	44



# 1 INTRODUCCIÓN

El consumo de productos fermentados se remonta a miles de años atrás en la historia, mucho antes incluso del desarrollo de la microbiología y, por tanto, del descubrimiento de los microorganismos. Los productos fermentados es posible que surgieran a partir de accidentes inadvertidos por contaminaciones microbianas, que en ocasionalmente originaban productos menos perecederos y con buenas propiedades organolépticas (1). Aunque inicialmente se producían como método para la preservación de alimentos, fue evidente que los productos fermentados tienen sabores, texturas y apariencias únicas. Así pues, desde antes de la aparición de la ciencia de la Nutrición, estos alimentos se producen intencionadamente como fuente de vitaminas, minerales, calorías y nutrientes (2).

Los productos lácteos fermentados se originaron principalmente en Europa e India, lugares donde el pastoreo y las actividades agrícolas han sido predominantes. En estas regiones fue precisamente donde los primeros animales fueron domesticados por las civilizaciones de Sumeria, Babilonia, Egipto e India (3). El consumo masivo y generalizado de leche, también se debe en parte a la aparición de la persistencia de la lactasa en la población adulta, debido a un cambio genético asociado a las regiones agricultoras europeas (4). Posteriormente, dicha variante genética (mutación *-13910\*T*) se distribuyó a nivel mundial (5). No es de extrañar, por tanto, que se desarrollaran alimentos a partir de la leche procedente de vacas, ovejas y cabras, entre otros animales.

El consumo de leche animal es diferente según la cultura: es común entre las comunidades europeas, indias, semitas y centroasiáticas, mientras que es inusual en Mongolia y las comunidades del este de Asia (6). Existen varias definiciones de este producto alimentario. Según el Codex Alimentarius, *“la leche es la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenida mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración ulterior”* (7).

Desde un punto de vista fisicoquímico, se trata de una mezcla homogénea de sustancias, algunas en emulsión (grasa y sustancias asociadas), otras en suspensión (caseínas) y otras en disolución verdadera (lactosa, proteínas, vitaminas hidrosolubles y sales minerales). Dada la naturaleza nutritiva de este producto, y teniendo en cuenta que las sustancias antimicrobianas presentes en la misma –lacteninas, inmunoglobulinas y el

sistema de la lactoperoxidasa– son escasas, la leche es un medio de cultivo excelente para muchos tipos microbianos (3). Por ello, la fermentación se presenta como la mejor forma de preservar la leche y sus nutrientes.

La producción de leche fermentada natural a partir de leche cruda se extiende por todo el mundo: África, este de Asia y Europa. Existen más de 400 nombres genéricos que se aplican a productos tradicionales o industrializados (8). Ejemplos de productos son: *ergo* de Etiopia, *amisi* de Zimbabwe, *roub* de Sudán, *rayeb*, *lban*, *kad*, *zabady* y *zeer* de Magreb, *filmjölkk*, *långfil* de Suiza, etc. En el norte de España se siguen produciendo a pequeña escala leches fermentadas como *leite callado* (Galicia) o *lleche presa* (Asturias).

La fermentación espontánea está mediada por bacterias del ácido láctico (BAL). El crecimiento de estas bacterias en leche promueve la producción de ácido láctico a partir de la lactosa, provocando un rápido descenso del pH (acidificación), lo que resulta en una inhibición de microorganismos patógenos. Dadas sus propiedades, las BAL han sido ampliamente estudiadas para su aplicación en la industria alimentaria y en la preservación de alimentos, así como su combinación con técnicas tecnológicas emergentes que permitan la optimización de los procesos fermentativos (9). Se trata de un grupo heterogéneo de bacterias, filogenéticamente no relacionadas, cuya característica común es la producción de ácido láctico a partir de carbohidratos.

La necesidad de llevar a cabo fermentaciones microbiológicamente seguras y controladas ha conducido a la implementación de nuevas prácticas de higienización y procesos de estandarización en la industria entre los que se incluye el desarrollo de cultivos iniciadores o fermentos. Esto implica la adición deliberada de microorganismos bien caracterizados a la leche, para la obtención de productos lácteos de propiedades organolépticas específicas. Las BAL más utilizadas en la industria para la fermentación de la leche pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Las dos especies mayoritarias en los fermentos mesófilos son *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris*. Además de causar la acidificación de la leche, contribuyen también al desarrollo del flavor a través de sus diversas actividades metabólicas.

El diseño de los fermentos es un aspecto clave para reducir la variabilidad entre lotes y mantener las cualidades sensoriales y de seguridad deseadas. La identificación y caracterización de los microorganismos presentes en las fermentaciones es crucial, si bien

el análisis individualizado de los mismos no es suficiente para conocer todos los procesos que ocurren en ambientes complejos como son los productos lácteos.

A pesar del gran conocimiento existente sobre la composición y diversidad de la microbiota de las leches fermentadas y, en general, de los productos lácteos, todavía se desconocen muchas de las interacciones inter- e intra-especie que tienen lugar en estos productos y que, en último término, pueden influir en sus características sensoriales y de seguridad alimentaria. Las interacciones microbianas pueden ser muy variadas y en ellas están implicados multitud de mecanismos moleculares y fisiológicos, si bien se clasifican principalmente como interacciones positivas (comensalismo, sinergismos y mutualismo) o negativas (competencia y amensalismo). La reproducción *in vitro* de comunidades microbianas, de forma sintética, puede ayudar a comprender mejor los mecanismos subyacentes que gobiernan dichas interacciones. De esta manera, se espera que los posibles cultivos iniciadores desarrollados sean más resilientes.

En este contexto, se ha trabajado con una leche fermentada natural de origen desconocido del este de Europa. Si bien su origen es incierto, la producción de lotes en el noroeste de España es conocido: se hacían lotes mediante ‘backslopping’, inoculando leche UHT semidesnatada cada 3-5 días, seguidos de una incubación a temperatura ambiente (20-25°C) durante 18-24 h. Una vez coagulada, la leche se conservaba a 7°C para su consumo, hasta la producción de un nuevo lote.

En trabajos previos realizados por Alegría y colaboradores (2010), se llevó a cabo una caracterización microbiológica de esta leche fermentada reproduciendo las condiciones de elaboración en el laboratorio durante 15 meses. Las propiedades sensoriales de la leche no se alteraron durante este tiempo, por lo que los microorganismos responsables de la fermentación tienen potencial para su uso como cultivos iniciadores industriales. El análisis microbiológico reveló que la microbiota de la leche fermentada estaba compuesta por una comunidad sencilla y estable, constituida únicamente por tres cepas: una de *L. lactis* subsp. *lactis* (en adelante *L. lactis*), una de *L. cremoris* subsp. *cremoris* (en adelante *L. cremoris*) y una de *Lactiplantibacillus plantarum* (*L. plantarum*). Las cepas de lactococos se encontraban a unos niveles aproximados de  $1 \times 10^8$  ufc/mL y la cepa de *L. plantarum* de  $1 \times 10^6$  ufc/mL (10). Las cepas se aislaron y caracterizaron fenotípicamente en trabajos posteriores (datos no publicados).

Por ello, y teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el objetivo principal del presente Trabajo Fin de Master ha sido evaluar las interacciones de los constituyentes de la microbiota de la leche fermentada durante los procesos de elaboración y conservación. Para alcanzar este objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollo de un método de diferenciación fenotípica de las cepas: búsqueda y optimización de medios selectivos y diferenciales.
- Seguimiento del crecimiento en leche de las cepas aisladas y en co-cultivo mediante recuentos microbianos.
- Secuenciación y análisis genómico de las cepas de la comunidad microbiana.
- Diseño de oligonucleótidos para la detección específica de cada cepa.
- Desarrollo de un método de PCR cuantitativa (qPCR) para la cuantificación de las cepas.
- Seguimiento del crecimiento en leche de las cepas aisladas y en co-cultivo mediante qPCR.

## 2 CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y/O EXPERIMENTALES

### 2.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

A continuación, se exponen los aspectos teóricos a tener en cuenta para la correcta contextualización del trabajo que se ha llevado a cabo en este PFM.

#### 2.1.1 Leches fermentadas

Las leches fermentadas naturales (*Naturally Fermented Milk* o NFM) constituyen productos lácteos fermentados en los que se produce el crecimiento de BAL mesófilas. Como ya se comentó, provocan la bajada de pH de la leche, causando su coagulación. Además, producen los compuestos sensoriales característicos del producto final. Las leches fermentadas constituyen una de las clases de productos lácteos más simple y seguramente la más antigua.

En función de los microorganismos que llevan a cabo la fermentación, se pueden distinguir leches fermentadas inoculadas y no inoculadas. Las no inoculadas se elaboran dejando leche cruda a temperatura ambiente hasta que aparecen coágulos y acidez. Se pueden almacenar durante días para que se desarrollen sabores más intensos. Las NFMs inoculadas se elaboran habitualmente siguiendo la técnica de back slopping: una porción de la leche fermentada previa se añade a un nuevo lote de leche fresca. En ambos casos, la microbiota dominante está constituida por bacterias mesófilas entre las que predominan *L. lactis* y *L. cremoris*. Cuando la incubación se lleva a cabo en ambientes más cálidos o tras un calentamiento, los microorganismos dominantes son *L. delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus*. Es común encontrar también otras especies como *L. plantarum* y *Lacticaseibacillus casei*, y otras pertenecientes a los géneros *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Pediococcus*.

Según la microbiota dominante durante la fermentación se pueden distinguir dos clases de leches fermentadas (11):

- Fermentaciones lácticas mediadas por BAL. Dentro de las fermentaciones ácidas, las NFMs pueden ser de tipo mesófilo (por ejemplo, leches acidificadas, *filmjölk* o *långfil*) o termófilo (yogur, *zabadi* o *dahi*). Existen NFMs de uso terapéutico, por su actividad probiótica (leches con bifidobacterias, *yakult*).
- Fermentaciones lácticas mediadas por la cooperación entre BAL y levaduras. Dentro de esta clase, se pueden distinguir leches alcohólicas como el kéfir o el *koumiss*; y leches enmohecidas como el *viili*.

### **2.1.2 Bacterias del ácido láctico (BAL)**

Las BAL son los microorganismos responsables de la acidificación espontánea de la leche, y son ampliamente utilizados en la industria alimentaria como fermentos.

Generalmente son bacterias inmóviles, no esporuladas, no formadoras de pigmentos, variadas morfológicamente (cocos, bacilos, cocobacilos) y catalasa negativas. Son bacterias Gram-positivas, anaerobias facultativas o microaerófilas, aerotolerantes, con capacidades biosintéticas limitadas. Esto hace que requieran un medio rico para su multiplicación, así como factores de crecimiento: vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos y precursores de los mismos (12). Están distribuidas de forma extensa en la naturaleza, apareciendo en sustratos con alto contenido en carbohidratos como las plantas, la leche, los alimentos fermentados y las mucosas del hombre y los animales (13).

La clasificación tradicional divide este grupo de bacterias en función del metabolismo de los hidratos de carbono en tres grupos: homofermentadoras estrictas, heterofermentadoras facultativas o heterofermentadoras estrictas. Por otra parte, se puede hacer la distinción entre BAL que metabolizan hexosas por la vía Embden-Meyerhoff hasta convertirlas en piruvato y posteriormente a lactato, y BAL que siguen la ruta de las fosfoctetas que tiene como productos finales el piruvato y el acetilfosfato (14), y a partir de estos se produce además de lactato, etanol y CO<sub>2</sub>.

El crecimiento de BAL promueve una bajada rápida del pH y la producción de metabolitos (ácido láctico, ácido acético, etanol, bacteriocinas, y otros) que inhiben la proliferación de microorganismos no deseados y patógenos (15). La producción de ácidos orgánicos y compuestos antimicrobianos hacen que las BAL puedan actuar como alternativa a aditivos químicos (16).

La presencia de estas bacterias permite la digestión de los constituyentes de la leche: la lactosa se transforma en ácido láctico, las proteínas se hidrolizan en péptidos y aminoácidos, y, en menor medida, los lípidos se degradan en ácidos grasos libres. De esta manera, se incrementa la biodisponibilidad y la formación de compuestos de interés organoléptico. Los productos obtenidos adquieren propiedades reológicas y sensoriales características: sabor ácido, textura suave y viscosidad elevada, entre otros (17,18). Además, algunas cepas de BAL poseen características funcionales y por tanto se clasifican como microorganismos probióticos, definidos como ‘microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren un efecto beneficioso en la salud

del hospedador' (19). La mayoría de los microorganismos probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque también se han descrito efectos probióticos en cepas de otros géneros de BAL.

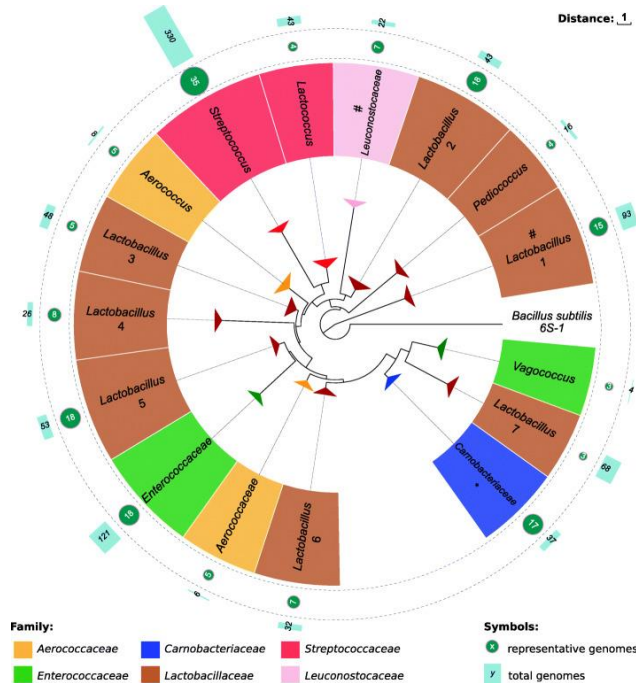


Figura 1. Árbol filogenético de las bacterias del ácido láctico (71)

Desde el punto de vista higiénico-sanitario, las BAL están avaladas por el sello GRAS (*Generally Regarded as Safe*) de acuerdo con la FDA (*US Food and Drug Administration Agency*) y por el estatus QPS (*Qualified Presumption of Safety*) de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria.

Los principales géneros que constituyen las BAL presentados en la Figura 1 son *Lactococcus*, *Lactobacillus* (recientemente reclasificado en 23 géneros diferentes), *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus* y *Oenococcus* (20). Todos ellos, pertenecen al filo *Bacillota* (antes *Firmicutes*) y presentan un bajo contenido de G+C (entre el 30 y el 50%) en sus genomas. También se incluye el género *Bifidobacterium*, perteneciente al filo *Actinomycetota* (antes *Actinobacteria*), con un contenido de G+C mayor del 50% en su genoma. (3).

### 2.1.2.1 Lactococos

Pertenecientes a la familia *Streptococcaceae*, son BAL mesófilas con una temperatura óptima de crecimiento de 30°C, homofermentadoras, de morfología cocoide, que se disponen de forma aislada o en pequeñas cadenas. Generalmente no son patógenos. Todas las especies que pertenecen a este género producen ácido a partir de lactosa, glucosa, fructosa, manosa y N-acetilglucosamina.

En este género se incluye la especie *L. lactis*, la mejor caracterizada de todas las BAL debido a su uso en la industria quesera por llevar a cabo la fermentación homoláctica de la lactosa y otros azúcares. Se trata de una bacteria relativamente simple, con un genoma de 2,4 Mbp, y un contenido de G+C del 38%. La especie se subdividía en cuatro subespecies, a saber: *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *hordniae*, y *L. lactis* subsp. *tructae*. Sin embargo, disparidades en el fenotipado al tener en cuenta el genotipado de las cepas (21) han hecho que la clasificación sea revisada. Recientemente, *L. lactis* subsp. *cremoris* ha adquirido categoría de especie, pasando a llamarse *L. cremoris* subsp. *cremoris* y *L. lactis* subsp. *tructae* se reclasifique como *L. cremoris* subsp. *tructae* (22).

Tradicionalmente, la clasificación taxonómica de estas especies se basaba en pruebas fenotípicas: se consideraba que las cepas de *L. lactis* eran capaces de hidrolizar arginina, fermentar maltosa y crecer a 4°C con un contenido de NaCl del 4%, soportando un pH de 9,2 mientras que las cepas de *L. cremoris* no. Sin embargo, como ya se comentó, la distinción es difícil, ya que no hay una clara correspondencia entre estas características fenotípicas y las identificaciones genotípicas llevadas a cabo (23), existiendo una gran variabilidad incluso entre cepas.

Son precisamente *L. lactis* y *L. cremoris* los principales componentes de los cultivos iniciadores definidos para la producción de queso como el Cheddar, Edam y Gouda (24). La primera, considerada acidificadora rápida, es más versátil que la segunda a la hora de utilizar diversos azúcares, si bien las cepas de *L. cremoris* son conocidas por causar proteólisis, lo que lleva a menos amargura y defectos en el producto final (25).

Un tipo particular de *L. lactis* lo constituye la biovariedad *diacetylactis*. Estas cepas se caracterizan por sintetizar diacetilo y su forma reducida, la acetoína, a partir de citrato, cuya metabolización se presenta en la Figura 2. Se trata de compuestos que aportan sabor y aroma a mantequilla, muy deseados en varios productos lácteos



fermentados, incluyendo algunos tipos de queso. Las cepas de la biovariedad *dicacetylactis* tienen una permeasa específica que permite la toma de citrato del medio (26). Dicho citrato se rompe en oxalacetato y ácido acético por la acción de la enzima citrato liasa. Mediante descarboxilación enzimática, el oxalacetato se transforma en piruvato, que a su vez forma el compuesto intermediario  $\alpha$ -acetolactato, del que se obtiene finalmente el diacetilo (27).

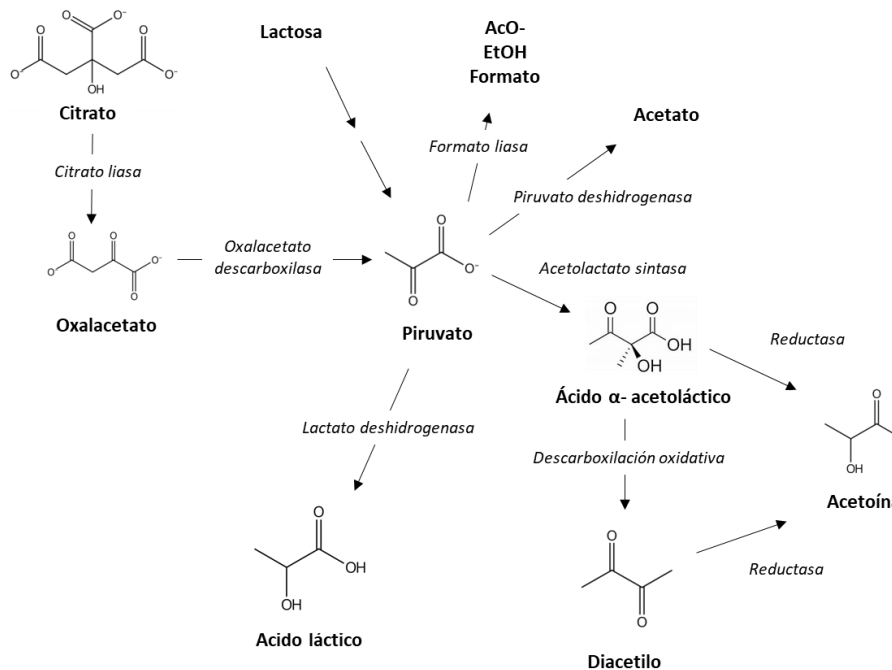


Figura 2. Metabolismo del citrato. Adaptado de Swindell y colaboradores (72)

### 2.1.2.2 Lactobacilos

Los lactobacilos son bacterias no esporuladas, de morfología bacilar, mesófilas o termófilas. Es un grupo que presenta una diversidad genética muy elevada, ya que engloba 261 especies de diversidad fenotípica, ecológica y genotípica, y por esos motivos se han dividido recientemente en 23 géneros (28). Varios géneros y especies están presentes en productos fermentados y en el tracto gastrointestinal. El tamaño del genoma oscila entre 1,8 y 3,3 Mpb, y el contenido G+C entre 33 y 51% (29). Las especies más utilizadas para la producción de lácteos son *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lacticaseibacillus casei*.

Una de las especies más versátiles y prometedoras de los lactobacilos es *L. plantarum*. Durante décadas, esta especie se ha utilizado en la industria para la producción de quesos, olivas y bebidas, entre otros alimentos fermentados. Aquellas cepas de *L. plantarum* aisladas de alimentos han demostrado poseer propiedades similares a las cepas

seleccionadas como probióticas de uso terapéutico (30). La plasticidad y adaptabilidad que presenta permite que esta especie se adhiera fácilmente al tracto gastrointestinal, afectando positivamente al hospedador mediante actividades antimicrobianas, antioxidativas, antígenotóxicas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Produce exopolisacáridos de interés farmacológico y alimentario, así como bacteriocinas, conocidas como plantaricinas, con propiedades bioconservadoras. El genoma de la especie tiene un tamaño grande (3,0-3,7 Mbp) y un contenido G+C del 44%.

#### 2.1.2.3 Otras BAL de interés industrial: *Leuconostoc* y *Streptococcus*

Las bacterias del género *Leuconostoc* son heterofermentadoras estrictas que producen CO<sub>2</sub>, etanol y ácido acético en cantidades equimolares al ácido láctico de tipo D (-). Están presentes en leches fermentadas naturales y en el kéfir, y su contribución al flavor de los productos hace que se hayan utilizado como componente en varios cultivos mesófilos comerciales. A diferencia de los lactococos, no pueden hidrolizar la arginina. Aunque su capacidad productora de ácido láctico es baja, algunas especies como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* y *Leuconostoc lactis* contribuyen a la producción de diacetilo y otros compuestos aromatizantes mediante la fermentación del citrato, de forma similar a *L. lactis* biov. *diacetyllactis* (31).

Por otra parte, de todas las especies caracterizadas dentro del género *Streptococcus*, solo *S. thermophilus* es utilizada como cultivo iniciador en la industria láctea. Se emplea en la elaboración del yogur, leches fermentadas como el kéfir y variedades de quesos como Mozzarella, Cheddar o Cottage. *S. thermophilus* es una bacteria homofermentadora y produce ácido láctico y metabolitos secundarios como acetaldehído. Está relacionada evolutivamente con *Streptococcus salivarius*, una especie patógena. La adaptación de *S. thermophilus* a los productos lácteos se debe a una reducción genómica en la que los genes de patogenicidad y virulencia se han perdido. Además, las cepas han ganado otros genes para la producción de exopolisacáridos, tolerancia al estrés e inmunidad ante bacteriófagos (32).

#### 2.1.3 **Cultivos iniciadores**

Las fermentaciones se pueden llevar a cabo empíricamente por la acción de microorganismos presentes en las materias primas, o como ya se ha comentado, por la contaminación a través del ambiente, herramientas empleadas o los propios productores. La microbiota natural de la leche es de diversidad y composición variable, y se ve afectada por los procesos a los que se somete para su higienización. Por tanto, para evitar productos

finales con características poco uniformes, con defectos y alteraciones organolépticas y de seguridad, las fermentaciones espontáneas se han sustituido por procedimientos controlados en los que se añaden deliberadamente microorganismos seleccionados y bien caracterizados. De esta manera, se aumenta el control sobre la fermentación de leches tanto pasteurizadas o esterilizadas, como leches crudas.



Figura 3. Fermentos específicos diseñados para el queso de Cabrales diseñados por el grupo de Cultivos Lácteos Funcionales del IPLA, comercializados en forma liofilizada por Biogés Starters SA.

Los cultivos iniciadores se definen como ‘una cepa o un conjunto de cepas de una o más especies microbianas que se utilizan en una materia prima para iniciar o controlar la fermentación’. El término cultivo iniciador o ‘fermento’ incluye a todos los microorganismos que se añaden a la leche (18).

Los cultivos iniciadores tienen varias funciones esenciales:

- Contribuyen al sabor de los productos mediante la transformación de los componentes básicos de la leche (glúcidos, proteínas y lípidos).
- Contribuyen al aroma de los productos mediante la síntesis de compuestos orgánicos volátiles y ácidos grasos de cadena corta.
- Inhiben el crecimiento de microorganismos indeseados alterantes o patógenos, a través de diferentes mecanismos: producción de ácido láctico, producción de antimicrobianos como peróxido de hidrógeno o bacteriocinas, producción de ácidos orgánicos, competencia por nutrientes etc.
- En algunos casos, producen CO<sub>2</sub>, característica que proporciona la formación de ojos en los quesos, lo que influye en su aspecto y favorece el desarrollo de hongos como *Penicillium roqueforti* en los quesos azules.

Dependiendo de la función principal, se distinguen cultivos primarios ‘cultivos iniciadores’, que participan en la acidificación de la leche, y cultivos adjuntos o

secundarios, que participan en el aroma y en la maduración. También se pueden clasificar según la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos que los componen (termófilos y mesófilos) o su composición microbiológica (definidos e indefinidos, cepa única o mixtos, etc.). Esta última es la clasificación más común, basada en la complejidad del cultivo.

Existen fermentos compuestos por una sola cepa bacteriana. Sin embargo, a escala industrial su aplicabilidad es limitada, ya que el riesgo de que pierdan efectividad por la acción de bacteriófagos es muy alto. Los cultivos de composición indefinida o ‘*natural starters*’ (NS) se recuperan de una elaboración anterior, aplicando técnicas de back slopping (33), es decir, como inóculo se utiliza una porción de un producto que ha tenido fermentación exitosa.

Existen mezclas no definidas de BAL, que tienen una variabilidad intrínseca reducida al compararlas con los fermentos naturales, que se clasifican como iniciadores mixtos o ‘*mixed-strain starters*’ (MSS). Por otra parte, están los cultivos iniciadores definidos o ‘*defined-strain starters*’ (DSS) que se componen de 5-15 cepas de BAL conocidas y caracterizadas (34).

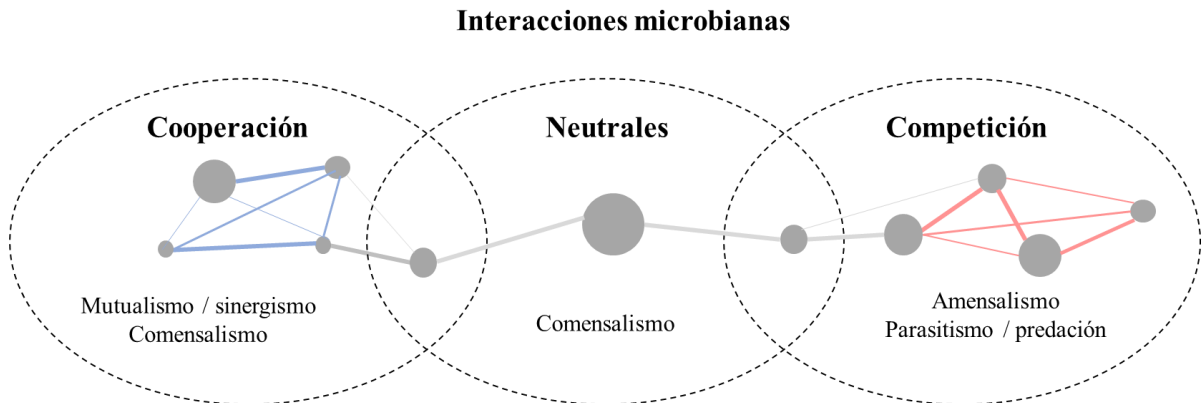
La presentación de los cultivos iniciadores también es variada: pueden estar en polvo, congelados, liofilizados o líquidos. Los cultivos líquidos tienen una corta vida útil. La congelación aumenta la viabilidad y actividad, pero a su vez son más caros y requieren una cadena de frío continua.

Los fermentos específicos son un tipo de cultivo iniciador desarrollado específicamente para un producto concreto y está constituido por cepas presentes de forma natural en la microbiota autóctona, siendo un ejemplo el del queso Cabrales (Figura 3). Estos fermentos específicos compuestos por microorganismos adaptados al ambiente reproducen de forma fiel las cualidades típicas y diferenciadoras del producto tradicional de interés y están en equilibrio con los bacteriófagos endémicos de la zona de elaboración (33).

#### **2.1.4 Relaciones microbianas**

En la naturaleza, los microorganismos viven en comunidades más o menos complejas en las cuales tienen lugar interacciones directas e indirectas (Figura 4). Las interacciones microbianas están mediadas por varios mecanismos moleculares y fisiológicos, siendo las interacciones tróficas y el intercambio de metabolitos los más

extendidos (35). Las cadenas tróficas alimentarias permiten aumentar la diversidad cuando los recursos son limitados, y, a la vez, la presencia de ciertas sustancias producidas por integrantes de una comunidad puede inhibir el crecimiento de otros microorganismos. En general, las interacciones que tienen lugar entre los microorganismos influirán en la composición y diversidad microbiana final del producto y también en su funcionalidad.



*Figura 4. Esquema representativo de las posibles relaciones que se establecen entre individuos de una comunidad microbiana. Adaptado de Mayo y colaboradores (35).*

En la fermentación láctica, las interacciones directas se reducen al parasitismo, donde se incluye la relación entre bacteriófagos y bacterias. La presencia de bacteriófagos, virus específicos que infectan a bacterias, afecta considerablemente al proceso fermentativo, ya que limita el crecimiento microbiano (36). Entre las interacciones indirectas más frecuentes entre microorganismos que se desarrollan en los productos lácteos, destacan las siguientes:

**Competición.** Dos o más microorganismos compiten por los nutrientes y las fuentes de energía, de tal manera que ambos salen perjudicados. Para crecer en leche, los microorganismos deben tener métodos efectivos de transporte y degradación de la lactosa, un disacárido poco común fuera de los ambientes lácteos. También deben ser capaces de degradar caseínas y aprovechar los productos de esa degradación. Estos dos factores son limitadores del crecimiento, así como la escasa concentración de micronutrientes como el zinc o el hierro en la leche. Algunas especies del género *Corynebacterium* y de levaduras producen sideróforos que les ayudan a ingerir los elementos traza esenciales, mientras que otras bacterias como *Brevibacterium* tienen mecanismos moleculares que les ayudan a recuperar sideróforos de otras especies.

**Amensalismo.** En estas interacciones, un tipo de microorganismo afecta negativamente al crecimiento de otro microorganismo, sin verse afectado. Esto es común

en las fermentaciones lácticas debido a los compuestos producidos por las BAL, que inhiben el crecimiento de otros grupos bacterianos. Un ejemplo de ello son las cepas productoras de bacteriocinas, que inhiben el desarrollo de patógenos y bacterias alterantes, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. y *Clostridium* sp. En ciertos casos, el efecto antimicrobiano puede asociarse a un consorcio, y no a única cepa. Las BAL también producen compuestos con acción antifúngica.

**Comensalismo.** Este fenómeno ocurre cuando un microorganismo se ve favorecido por la interacción que ocurre en una población, mientras que el resto de los organismos no experimentan efectos positivos ni negativos. Este tipo de interacción ha sido reportado en un cultivo iniciador alemán denominado *Ur*, compuesto de cinco cepas de *L. cremoris*, dos de *L. lactis* biovar. *diacetylactis* y una de *Leuc. mesenteroides*. Un ejemplo es la facilitación del crecimiento de organismos no proteolíticos por la presencia de BAL proteolíticas, o la utilización del ácido láctico producido por las BAL para la generación de ácido propiónico por las bacterias del ácido propiónico (PAL) formar los ‘ojos’ característicos de los quesos suizos.

**Mutualismo.** Todos los microorganismos involucrados en este tipo de interacción salen beneficiados. Es lo más común entre las BAL presentes en productos lácteos, y el ejemplo más representativo es la protooperación existente entre *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. El primero abastece al segundo con CO<sub>2</sub> y ácido fórmico, y *L. delbrueckii* realiza la proteólisis de la caseína. En los quesos existe una cooperación clara y ampliamente descrita entre BAL y levaduras, en la que ambos tipos microbianos aportan sustancias nutritivas para el crecimiento durante el proceso de maduración.

Los tipos de interacción anteriormente descritos no son excluyentes: en matrices complejas como los quesos ocurren a la vez diferentes interacciones durante la elaboración y maduración, y lo mismo se puede aplicar al resto de productos lácteos fermentados.

## 2.2 CONSIDERACIONES EXPERIMENTALES

### 2.2.1 Métodos clásicos para la detección y cuantificación de BAL

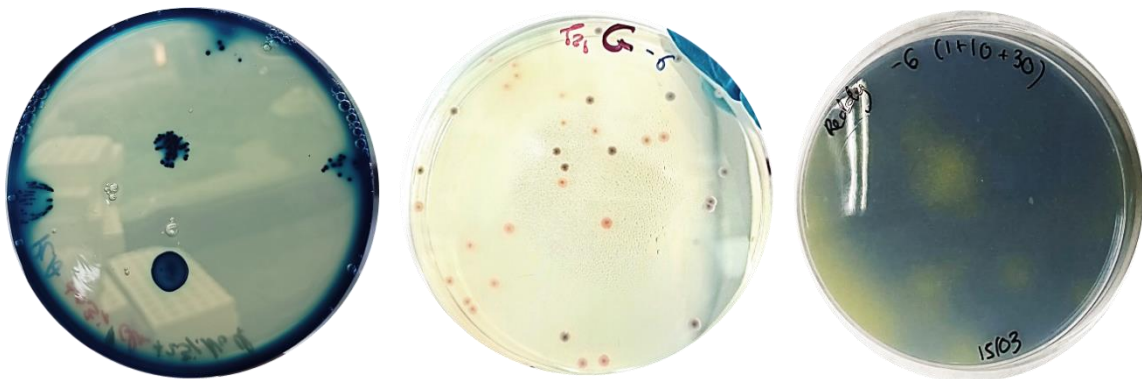
Tradicionalmente, la forma de determinar la composición de las microbiotas asociadas a alimentos era mediante técnicas de cultivo. Este procedimiento requiere del aislamiento y el cultivo previo a la identificación y tipificación de los integrantes de las comunidades microbianas de los productos lácteos. Esto requiere un conocimiento extenso sobre las condiciones ideales de crecimiento de los microorganismos de interés.

A la hora del estudio de poblaciones microbianas complejas, se debe hacer uso de medios de cultivo que permitan distinguir los diferentes componentes de la comunidad entre sí. Para ello, se pueden utilizar medios selectivos, que por su diseño permiten el crecimiento específico de un determinado microorganismo, impidiendo el desarrollo de los demás. Por otra parte, hay medios diferenciales, que permiten distinguir grupos bacterianos en función del comportamiento respecto de algún componente del medio (Figura 5). Generalmente, esto se traduce en un cambio de color debido a la utilización de componente específico del medio (37).

En este contexto, el medio desarrollado por de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) es selectivo para el género *Lactobacillus* (38). Inicialmente se ideó como un medio definido sustituto del medio complejo a base de jugo de tomate que se utilizaba para aislar lactobacilos. La adición de ácido sórbico a la fórmula, así como sales de sodio, magnesio y manganeso, inhiben el crecimiento de algunos microorganismos. Otro factor selectivo hacia el crecimiento de las BAL es la presencia de acetato y un pH entre 5,5 y 5,9.

Para diferenciar morfológicamente las cepas de *L. lactis* y *L. cremoris* de interés, se pueden utilizar medios en los que se ponga de manifiesto las diferencias metabólicas de ambas especies. Un ejemplo de ello es la utilización del citrato. En un medio que contenga hierro y ferrocianuro de potasio, la presencia del citrato en el medio de cultivo inhibe la reacción entre estos compuestos. En consecuencia, las colonias que retiren el citrato del medio llevan a cabo la reacción y adquieren una pigmentación intensa azulada (azul de Prusia). Por otra parte, las colonias que sean incapaces de utilizar el citrato se mantendrán blancas (39).

La producción de amoníaco por los lactococos es otra de las características empleadas a la hora de diferenciar especies dentro del género. Se sabe que la especie *L. lactis* hidroliza la arginina mientras que *L. cremoris* generalmente es incapaz de hidrolizarla (40). Mediante la detección del amonio liberado, se puede distinguir ambas cepas por la coloración de las colonias.



**Figura 5.** Placas de cultivo de diferentes medios selectivos. En la izquierda, medio KM con bacterias utilizadoras del citrato. En el centro, medio TTC con lactococos que hidrolizan la arginina (morados) y que no (rosas). En la derecha, medio Reddy con colonias amarillas que no hidrolizan la arginina.

Una posibilidad es el uso de sales de tetrazolio en el medio de cultivo. La presencia de estos compuestos inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas y actinomicetos. Las bacterias Gram positivas reducen las sales de tetrazolio dando lugar a derivados del formazán, de color rojo intenso (41). Las cepas capaces de hidrolizar arginina liberan amonio, que reduce el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC), de manera que se colorean de tonalidades rosáceas, cuya intensidad depende del amonio liberado. Las cepas que no hidrolizan la arginina se mantienen con una coloración blanca (42). Es fundamental mantener un pH de 6,0, puesto que valores inferiores inhiben la reducción y valores superiores reducen de forma espontánea el compuesto, coloreando todas las cepas.

Para limitar la difusión de los compuestos por el medio, alterando el pH y por tanto el éxito de la diferenciación, se pueden utilizar tampón  $\text{CaCO}_3$ , de manera que el cambio de pH sea localizado y solo alrededor de las colonias (43). En este caso, utilizando un indicador de pH basado en el púrpura de bromocresol que confiere una coloración morada al medio (44), las colonias de *L. cremoris* se verían amarillas, por el cambio de pH inducido por la producción de ácido láctico, mientras que las colonias de *L. lactis* se verían blancas, debido a la neutralización causada por la liberación de amoníaco en la hidrólisis de arginina.



## 2.2.2 Métodos moleculares para la detección y cuantificación de BAL

Las técnicas moleculares son herramientas que, desde el siglo pasado, se emplean para identificar y cuantificar microorganismos. La constante evolución en este campo, sumada a la alta sensibilidad, especificidad y rapidez que presentan frente a los métodos tradicionales, permite la utilización de estas técnicas para el análisis de cepas y/o comunidades microbianas. Estas técnicas evitan los problemas asociados con las metodologías de cultivo (necesidades de nutrientes, condiciones de cultivo, etc.).

### 2.2.2.1 Extracción DNA bacteriano

Para la aplicación de técnicas independientes de cultivo basadas en la amplificación de ácidos nucleicos, es esencial aislar estas moléculas, extrayéndolas de la matriz compleja que suponen las muestras de productos lácteos. Para extraer el ácido desoxirribonucleico (ADN) de una célula bacteriana se deben romper la pared celular y desorganizar las membranas, después se tiene que separar el ADN del resto de componentes celulares y por último se tiene que concentrar y purificar.

Las primeras metodologías desarrolladas se basan en extracciones líquido-líquido en las que se usan solventes orgánicos e inorgánicos con alta toxicidad, como es el caso del método de fenol-cloroformo. Otras técnicas más actuales se basan en procesos físicos como son el uso de perlas magnéticas o membranas de celulosa que atrapan el ADN durante la purificación, separándolo del resto de componentes bacterianos (45). Para escoger cuál de estas metodologías se puede aplicar, es crucial tener en cuenta la calidad y la cantidad del ADN que necesitamos y que variará según la aplicación posterior.

Para la extracción de ADN bacteriano utilizando kits comerciales, se suele realizar un proceso previo de lisis celular enzimática y/o mecánica. Las enzimas lisozima y mutanolisina hidrolizan las uniones entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina, degradando el peptidoglicano de la pared bacteriana. La solución de lisis contiene además sales caotrópicas que aseguran la desnaturalización de las macromoléculas. El EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) secuestra cationes divalentes como el calcio y el magnesio, aumentando la desestabilidad de las membranas. La lisis mecánica se realiza mediante la utilización de bolas de vidrio y agitación con equipos específicos. La adición de etanol o alcohol isopropílico causa la precipitación del ADN. Este, se une a la membrana de sílice contenida en una columna de microcentrífuga, para después llevar a cabo la elución con un tampón a un pH elevado.

### 2.2.2.2 PCR

Una de las herramientas indispensables en biología molecular es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Permite obtener múltiples copias de un fragmento de ADN específico por medio de la actividad del enzima ADN polimerasa. En la mezcla de reacción de PCR deben estar presentes el ADN que se utiliza como muestra, los cebadores u oligonucleótidos, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), el enzima ADN polimerasa termorresistente y un tampón o buffer con iones  $MgCl_2$ .

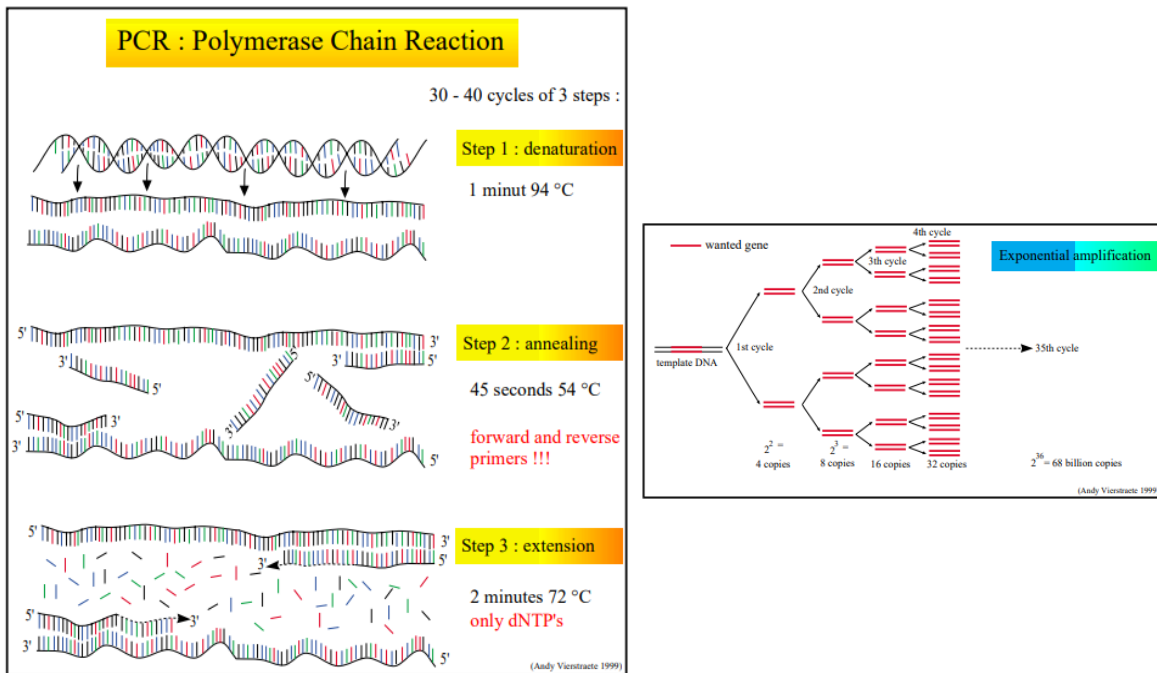


Figura 6. Esquema representativo de la reacción en cadena de la polimerasa PCR (Andy Vierstraete, 1999)

Inicialmente, la PCR comienza con la desnaturalización del ADN molde a una temperatura de 95°C durante un tiempo dependiente del porcentaje de G+C presente en las hebras complementarias (Figura 6). Generalmente, suele ser un proceso de 5 min. A continuación, tienen lugar entre 35 y 40 ciclos que consisten en: una primera fase de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos; después la fase de anillamiento o unión de los cebadores a una temperatura específica -entre 40 y 68°C- durante 20-40 segundos para permitir la hibridación con el ADN complementario; y finalmente una etapa de extensión o elongación a 72°C. En esta última fase, la ADN polimerasa incorpora los dNTPs complementarios, con el fin de generar cadenas completas de ADN. El tiempo que requiere la extensión varía en función de la longitud del fragmento que se quiere amplificar: de forma aproximada, se necesita un minuto por cada mil bases. Tras los ciclos tiene lugar una etapa final de extensión de 5-10 minutos para asegurar que todo el ADN tiene doble cadena.

### 2.2.2.3 PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) es una variante de la PCR utilizada para amplificar y cuantificar el producto de la amplificación de DNA. Por ello, se trata de un método adecuado para seguir el crecimiento de los microorganismos en una fermentación (46). De igual modo que la PCR convencional, el ADN se amplifica mediante los 3 pasos de desnaturalización, anillamiento y elongación, pero en este caso se monitoriza el progreso de la reacción, recolectando datos durante la reacción en tiempo real y no solo al final del proceso de amplificación. En las amplificaciones mediante qPCR se caracteriza porque la cuantificación del ADN inicial se realiza en función al valor de Ct. Este es el ciclo en el que se inicia la detección de la fluorescencia y se conoce como ciclo umbral (*threshold cycle*). El Ct es directamente proporcional a las copias iniciales del segmento de DNA que se está amplificando (47).

La detección de la amplificación se lleva a cabo con sustancias emisoras de fluorescencia. Los métodos de detección pueden ser no específicos, donde se emplean fluoróforos que se unen al ADN de doble cadena amplificado; o específicos de la secuencia de los amplicones, mediante el empleo de sondas fluorescentes diseñadas.

El tipo de qPCR más simple y utilizado se basa en el uso de fluorocromos con alta afinidad a la doble cadena de ADN, como es el caso de la molécula de SYBR Green. Perteneciente a la familia de las cianinas asimétricas, sólo emite fluorescencia cuando está asociada al ADN (48). La optimización del método y el análisis de las curvas de desnaturalización (*melting curves*) permite el uso de estos fluoróforos no específicos para la identificación de microorganismos.

### 2.2.2.4 Secuenciación y análisis genómico

El desarrollo de técnicas de secuenciación masiva de ácidos nucleicos durante las últimas décadas ha incrementado exponencialmente la capacidad de caracterizar los microbiomas de matrices complejas asociadas a alimentos, dadas las limitaciones de las técnicas dependientes de cultivo. Se puede hablar de tres etapas tecnológicas marcadas: las técnicas de primera generación WHOS (*Whole genome shotgun sequencing*), las técnicas NGS (*Next Generation Sequencing*) y las técnicas de tercera generación (49).

La primera estrategia de secuenciación fue el método de Sanger por electroforesis convencional o capilar. Se basa en sintetizar una hebra de ADN complementaria a una hebra de cadena simple, de forma secuencial. En la mezcla de reacción se incluyen

desoxirribonucleótidos (ddNTPs) marcados con radiactividad o fluorocromos distintos, que causan la terminación de la síntesis al carecer de extremo 3' OH. Los fragmentos de ADN obtenidos se separan por electroforesis de alta resolución, y el marcaje permite la identificación de la base nucleotídica correspondiente (50).

Las técnicas NGS requieren la construcción de una librería genómica y la clonación *in vitro* de los fragmentos de ADN. Son multiplexadas, lo que implica la determinación de la secuencia basándose en métodos paralelos y cíclicos, analizando moléculas distintas simultáneamente (51). Existen cuatro plataformas NGS:

- Roche 454 FLX (2004), basada en la pirosecuenciación en soporte sólido; ya no se encuentra en uso.
- Illumina Solexa Genome Analyzer (2006), basada en la secuenciación por síntesis con terminadores reversibles.
- Applied Biosystems SOLiD System (2007), que emplea secuenciación por ligación.
- Ion Torrent Life Tech (2010), basado en la secuenciación por síntesis y detección del H<sup>+</sup> liberado.

Actualmente, la técnica de secuenciación genómica de alto rendimiento HTS (del inglés, *high-throughput sequencing* más utilizada –empleada durante este trabajo– es Illumina (Figura 7). Se emplean ADN polimerasas diseñadas por la empresa y dNTPs de terminación fluorescentes. Se genera una librería mediante la fragmentación de la muestra y la unión de las hebras de ADN resultantes a adaptadores. A continuación, tiene lugar una PCR en puente, generando agrupaciones de ADN. En cada ciclo, la amplificación se para con la unión de un dNTP marcado, cuya fluorescencia se recoge para determinar el nucleótido de la posición. Antes de comenzar un nuevo ciclo, se hace un lavado que elimina el terminal de bloqueo de síntesis. El proceso se repite hasta completar toda la cadena de ADN (52). Los datos obtenidos son analizados con softwares en función del objetivo del ensayo: las técnicas HTS se pueden aplicar para la secuenciación gen-

específica (*targeted sequencing*) o bien para la secuenciación del ADN total presente en una muestra (*shotgun sequencing*).

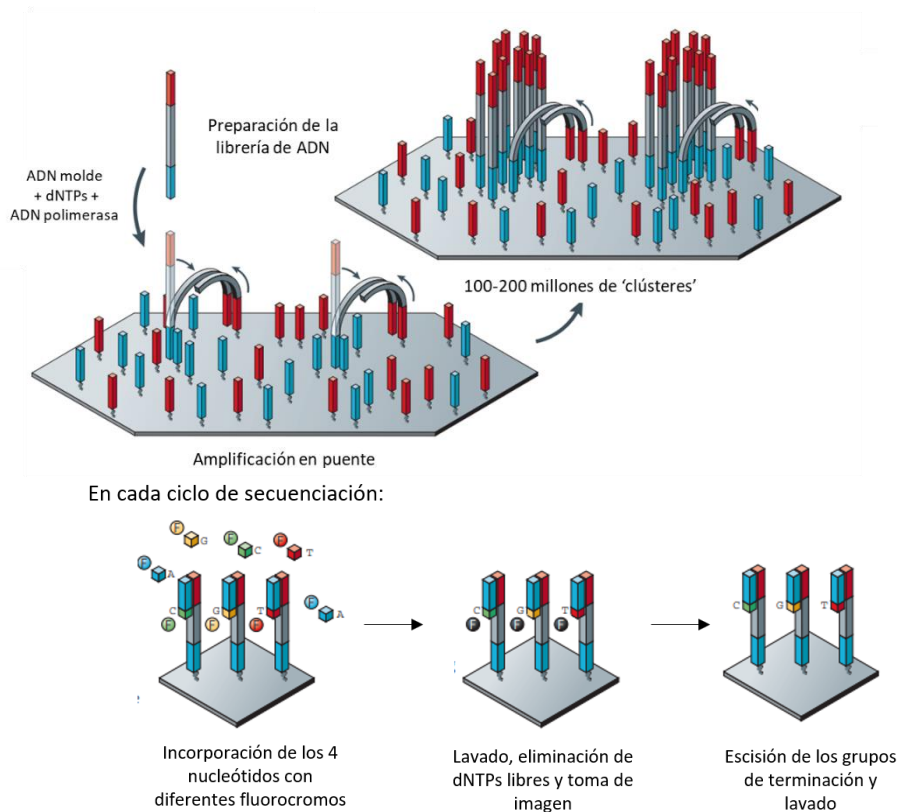


Figura 7. Secuenciación Illumina. Adaptado de Metzker y colaboradores (73)

Por último, los métodos de tercera generación determinan la secuencia directamente de una única molécula de ácido nucleico, sin necesidad de amplificación. La técnica más utilizada es la de PacBio, en la que se obtiene información de la secuencia de una molécula única a medida que se va sintetizando por la acción de la ADN polimerasa con dNTPs marcados con fluoróforos (53). También existe la tecnología nanopore (MiniION), en la que una membrana con poros de 1 nm introducida en un fluido conductor fuerza el paso del ADN en cadena sencilla a través de la misma. La aplicación de un voltaje crea una corriente de iones diferente con cada nucleótido que puede ser detectada y cuantificada.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 CEPAS BACTERIANAS

Se trabajó con 3 cepas de bacterias ácido lácticas: *L. lactis* subsp. *lactis* (en adelante *L. lactis*) 3LA1, *L. cremoris* subsp. *cremoris* (en adelante *L. cremoris*) 3LA10 y *L. plantarum* 3LA30, aisladas a partir de una leche fermentada natural por Alegría y colaboradores (2010). Las cepas de *L. lactis* y *L. cremoris* se crecieron en medio M17 (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) suplementado con glucosa al 1% (GM17) y agar al 2% cuando se necesitó. La cepa de *L. plantarum* se creció en medio MRS líquido o agar al 2% (Oxoid).

#### 3.2 PREPARACIÓN DE STOCKS

Para la conservación de las cepas a -80°C, se partió de cultivos en placa frescos con colonias aisladas. Varias colonias de cada microorganismo se inocularon en 10 mL de medio líquido, incubándolas a 32°C durante 24 h.

Para los stocks en medio de cultivo se tomaron 1,5 mL del cultivo de una noche y se transfirieron a un criovial estéril, y tras una centrifugación, el pellet se resuspendió en medio de cultivo fresco y glicerol al 20%. Para realizar los stocks en leche, el pellet se resuspendió en 10 mL de leche UHT semidesnatada (CAPSA, Siero, España), y se repartió en crioviales (1 mL) correctamente etiquetados para su congelación a -80°C. Se realizaron recuentos previos y posteriores al proceso de congelación para la estandarización de los inóculos de los ensayos posteriores.

#### 3.3 ENSAYO DE MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES

Con el objetivo de diferenciar la morfología de las cepas de *L. lactis* y *L. cremoris* en las placas de cultivo, se optimizaron y preparados varios medios diferenciales basados en las diferentes capacidades metabólicas de estas dos especies, cuya base teórica ha sido previamente expuesta.

##### 3.3.1 Utilización del citrato

**Medio KM.** Siguiendo las indicaciones de Kempler y McKay, (1980) (54), se disolvió peptona (0,25%) y glucosa (0,5%) en agua destilada. La solución se ajustó a un pH de 6,6, y tras añadir agar (2%) se autoclavó (121°C, 15 min). Se dejó atemperar a 45°C y se añadió leche UHT semidesnatada (1%). Paralelamente se prepararon dos soluciones: una de ferricianuro de potasio (10%) y otra de citrato férrico (2,5%) y citrato sódico (2,5%), autoclavadas (100°C, 30 min). Se añadió 10 mL de cada solución por cada litro

de medio preparado. Tras un agitado suave, el medio se dispuso en placas Petri, dejándolo secar en oscuridad a 32°C durante 24 h.

**Medio Alsan.** Según Al- Zoreky *et al.* (55), se disolvieron agar de feniletanol (3,55%), glicina anhidra (1%), fosfato de potasio monobásico (0,5%), citrato amónico dibásico (0,2%), monohidrocloreto de arginina (0,2%), lactosa (0,5%) y púrpura de bromocresol (0,002%) en agua destilada. Se ajustó el pH a 5,9, se autoclavó (121°C, 15 min) y se dejó atemperar a 45°C. Se añadieron las mismas soluciones descritas por Kempler y McKay de citrato férrico y citrato sódico (concentración final: 0,025%) y de ferricianuro de potasio a una concentración final del 0,1%. Las placas con el medio solidificado se incubaron a 32°C en oscuridad durante 24 h antes de su uso.

### 3.3.2 Hidrólisis de arginina

**Medio Reddy.** Basándose en el medio descrito por Reddy *et al.* (43), se preparó una solución de triptona (0,5%), extracto de levadura (0,5%), hidrocloreto de L-arginina (0,4%), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1%), CaCO<sub>3</sub> (0,3%), glucosa (0,6%), almidón soluble (0,6%) y agar (2%), ajustando el pH final a 6,8. El medio se autoclavó (121°C, 15 min) y posteriormente, se añadió leche semidesnatada (0,55%) y púrpura de bromocresol (0,002%). Las placas con el medio solidificado se incubaron a 32°C durante 24 h.

**Medio TTC.** A partir de las indicaciones de Turner *et al.* (42), se disolvieron triptona (0,5%), extracto de levadura (0,5%) L-arginina (0,2%), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,2%), glucosa (0,05%) y agar (2%) en agua destilada. El pH se ajustó a 6,3 y se autoclavó (121°C, 15min). Tras atemperar el medio a 45°C, se añadió cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio a una concentración final de 0,005%. Las placas solidificadas se incubaron a 32°C en oscuridad durante 24 h, previamente a su uso.

## 3.4 EXTRACCIÓN DEL ADN TOTAL

La extracción se realizó a partir de cultivos líquidos de las cepas crecidas a 32°C durante 24 h, e inoculados a partir de varias colonias aisladas en placa. Los pellets resultantes se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización. La extracción de ADN total se llevó a cabo por triplicado, siguiendo las recomendaciones del fabricante del Kit Gen Elute Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich, Darmstad, Alemania). El ADN obtenido se guardó a -20°C hasta su posterior utilización.

El resultado de la extracción y purificación del ADN se comprobó mediante la visualización de una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, utilizando tampón 1 x

TAE (40mM Tris, 20mM acetato de etilo y 1mM EDTA). Se utilizó EZ Vision (VWR Life Science) como agente fluorescente de unión al ADN y tampón de carga; y el marcador GRS Universal Ladder (Grisp, Oporto, Portugal) como control del tamaño de banda del ADN. La electroforesis se realizó durante 60 min aproximadamente, a 75 V. El resultado se reveló tras la electroforesis, exponiendo el gel de agarosa a la luz UV empleando el equipo G-Box (Syngene, Reino Unido).

### 3.5 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS GENÓMICO

Para poder realizar un estudio mediante técnicas moleculares, el primer paso es conocer los genomas de los integrantes de la comunidad microbiana. Se realizó una secuenciación mediante la tecnología Illumina, obteniendo secuencias cuya calidad se analizó utilizando el programa FastQC (Braham Bioinformatics) (Anexo I). Se ensamblaron utilizando la interfaz PATRIC (*Pathosystems Resource Integration Center*) con dos programas: Unicycles y SPAdes, sin trimear las secuencias (sin quitar nada de los extremos). La anotación y la búsqueda de genes únicos se hizo con la plataforma RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*). La selección de genes únicos para su posterior utilización se hizo en base a su localización cromosómica y a la presencia de una única copia en el genoma del mismo.

### 3.6 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (QPCR)

Las muestras para las reacciones de qPCR fueron diluciones 1/2 de la leche fermentada obtenida para cada condición de la curva de crecimiento. Para la amplificación se usó un equipo QuantStudio 3 (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA., USA) y el software de análisis QuantStudio Design 2 Analysis. La reacción de amplificación se llevó a cabo en placas ópticas de 96 pocillos (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, Applied Biosystems). El fluoróforo utilizado para la cuantificación de ADN fue SYBR-Green (Applied Biosystems). Todas las amplificaciones se hicieron al menos por triplicado, en un volumen final de 20  $\mu$ L, conteniendo 10  $\mu$ L de SYBR Green PCR Master Mix, que incluye ROX como referencia pasiva (Applied Biosystems), 0,7  $\mu$ L de cada primer (forward y reverse), 7,6  $\mu$ L de agua libre de nucleasas (Sigma-Aldrich) y 1  $\mu$ L de muestra. Para la amplificación, se utilizó el protocolo estándar del termociclador QuantStudio 3 (Applied Biosystems) que consiste en: un ciclo inicial a 95°C de 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C de 15 s y un min a 60°C.



### 3.6.1 Diseño de cebadores (primers) específicos

A partir de la secuencia genómica de las cepas objeto de estudio se diseñaron tres parejas de primers que tenían como diana genes únicos para cada cepa. El diseño de parejas de oligonucleótidos específicos para ensayos de PCR cuantitativa de los genes únicos seleccionados se hizo con el programa Primer3Plus. Se especificó una temperatura óptima de fusión (melting) de 60°C, y una longitud máxima de amplicón de 120 pares de bases. En la Tabla 1 se indica la secuencia, el tamaño de amplificación y el gen diana.

Tabla 1. Parejas de oligonucleótidos diseñados.

	Nombre	Primers <sup>1</sup>	Tm <sup>2</sup>	Gen (función)	Pb <sup>3</sup>
<i>L. lactis</i> 3LA1	<i>mef</i>	5' cttggaaccttggtgatgga 3'	59,4	Macrolide efflux protein	84
		3' tggaataaacgcaatgacca 5'	54,3		
	<i>MANIA2</i>	5' catggaattgccttcctta 3'	56,4	Alpha-1,2-mannosidase	93
		3' atgaaaccaccaagctccac 5'	58,4		
	<i>xyIT</i>	5' aagcgcagctttacttgctc 3'	58,4	D-xylose proton	101
		3' gcatccaccgacgattaact 5'	58,4	symporter	
<i>L. cremoris</i> 3LA10	<i>galf</i>	5' ttagcagcagggttctctgt 3'	58,4	Galactofuranose	130
		3' cctctgaaatttccgcaatc 5'	56,4	transferase	
	<i>gmhB</i>	5' ggcttgattaatatggctgtga 3'	58,4	D-glycero-D-manno-heptose 1,7-bisphosphate phosphatase	129
<i>fbaA</i>	3' tcgctcacctatccctactgt 5'	61,3	Fructose-bisphosphate aldolase class II	82	
	5' ttggtcaattggtggtgaa 3'	54,3			
<i>L. plantarum</i> 3LA30	<i>rhaA</i>	3' ttagccattgcaactgcatc 5'	56,4	L-rhamnose isomerase	85
		5' tcggtcattggtcgtgata 3'	56,4		
<i>malA</i>	5' gccagtgatcagatgcaaac 3'	58,4	Maltodextrose utilization protein	116	
	3' agatcgaagccagcaacatt 5'	56,4			
	5' tctccgaaggctttatcgaa 3'	56,4			
<i>larA</i>	3' gaatggtcgcataatcgt 5'	56,4	implicated in lactate racemization	106	

1. Secuencia nucleotídica de primers forward (F) y reverse (R)

2. Temperatura de fusión (°C)

3. Longitud en pares de bases (pb) del amplicón

La especificidad de la amplificación se determinó mediante la utilización de todas las parejas de primers con los ADNs de las tres cepas, comprobando que amplifican específicamente en la cepa deseada. Y también, mediante la evaluación de la temperatura de fusión (Tm) de los amplicones obtenidos, que se traduce en la presencia de un único pico de amplificación.

### 3.6.2 Elaboración de rectas standard

Para evaluar la eficiencia de las parejas de primers específicos se prepararon curvas estándar usando diluciones seriadas de ADN procedente de muestras con concentraciones bacterianas conocidas (UFC/mL), previamente calculados mediante recuentos en medio de cultivo. También se evaluó la eficiencia de los primers utilizando curvas estándar a partir de inóculos en leche de las cepas de interés, también de concentración conocida. La eficiencia de los primers se calculó a partir de la pendiente de las curvas estándar de cada pareja, usando la fórmula  $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ . Se consideró que hubo amplificación positiva cuando se obtuvo un valor de  $Ct \leq 30$  (lo que corresponde con una concentración bacteriana límite detectable de  $< 10^2$  UFC/mL). Se considera que hay una saturación por exceso de DNA cuando  $Ct \leq 12$ .

### 3.7 CULTIVOS INDIVIDUALES Y MIXTOS EN LECHE

A partir de los stocks en leche de las cepas 3LA1, 3LA10 y 3LA30, se inocularon 120 mL de leche UHT semidesnatada (concentración final de  $10^5$  UFC/mL) para cada condición, es decir, cultivos individuales o mixtos (Figura 8). Se realizó un seguimiento del crecimiento de cada cepa desde el tiempo 0 hasta las 48 horas, recogiendo muestras de 1 mL cada dos horas (2 h, 4 h, 8 h, 10 h, 12 h), posteriormente cada tres horas (15 h, 18 h, 21 h y 24 h) y una muestra final a las 48 h mediante técnicas dependientes de cultivo (recuentos en medio selectivo o diferenciales) y mediante la técnica independiente de cultivo qPCR. Además, se midió el pH de forma directa en cada muestra.

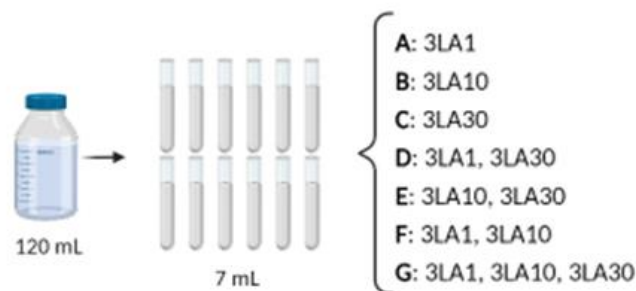


Figura 8. Esquema representativo de las diferentes condiciones fermentativas.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 DETERMINACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO DIFERENCIAL PARA *L. lactis* Y *L. cremoris*

Para poder estudiar la evolución del crecimiento de las tres cepas de bacterias del ácido láctico durante la elaboración de la leche fermentada mediante técnicas de cultivo, es imprescindible poder discriminar las cepas en las placas de recuento. Los medios selectivos para los lactococos y lactobacilos son el M17 suplementado con un 1% de glucosa (GM17) y el medio MRS, respectivamente. Estos medios permiten diferenciar perfectamente la cepa de lactobacilo 3LA30 de las cepas de lactococos 3LA1 y 3LA10. Sin embargo, en el medio GM17, las colonias de *L. lactis* y *L. cremoris* eran indistinguibles, presentando la misma morfología: colonias blancas, redondas y brillantes. Por ello, se hizo una búsqueda bibliográfica de los medios de cultivo descritos para la diferenciación de estas especies y se evaluó su especificidad con las cepas 3LA1 y 3LA10.

#### 4.1.1 Utilización del citrato

*L. lactis* utiliza el citrato en presencia de un carbohidrato fermentable (p. ej., lactosa) como vía secundaria para la generación de fuerza motriz de protones. Esta se ha descrito que promueve el crecimiento celular aumentando el potencial redox intracelular de las células (56,57). Basándose en la capacidad teórica de utilización del citrato por *L. lactis*, y la incapacidad de *L. cremoris*, se hicieron diferentes aproximaciones.

Se preparó el medio KM desarrollado por Kempler y McKay (54), de coloración amarillenta. Se inocularon las cepas por separado y en co-cultivo. Tras 72 horas de incubación a 32°C, las colonias eran muy pequeñas en todos los casos. Si bien, en los cultivos individuales en placa la cepa 3LA1 de *L. Lactis*, las colonias mostraron una coloración azul tenue y las de la cepa 3LA10 de *L. cremoris* eran blancas, no se pudo establecer una diferenciación clara en el co-cultivo; es decir, cuando las dos cepas se crecían en la misma placa. Con el paso del tiempo todas las colonias adquirían coloración azulada, llegándose a teñir la placa por completo, probablemente por la precipitación de ferrocianuro de potasio.

Dado el resultado prometedor, se introdujeron variaciones para intentar optimizar el crecimiento de las cepas. Para ello, se utilizaron los medios definidos Plate Count Agar (PCA) y GM17 suplementados con las soluciones férricas (ferrocianuro de potasio; citrato férrico y citrato sódico) descritas para el medio KM. En ambos medios de cultivo

(PCA y GM17), el tamaño de las colonias fue superior al observado previamente en el medio KM. Aun así, la diferencia de tonalidades entre colonias era demasiado sutil como para establecer con seguridad a qué cepa se correspondían. Además, se observó que una mayor concentración de las soluciones férricas que pudiese incrementar la diferencia de tonalidad entre las colonias inhibía el crecimiento de las cepas.

De acuerdo con la bibliografía, la diferenciación entre las cepas utilizadoras del citrato y las que no es más pronunciada cuando se incuba el medio previamente y se hace el cultivo en anaerobiosis (54). Sin embargo, en estas condiciones sólo hubo crecimiento muy leve de la cepa 3LA10, tanto individual como en co-cultivo.

Las dificultades enfrentadas, sumadas a la complejidad de preparación del medio y los tiempos elevados necesarios para poder observar colonias (se requerían mínimo 48h de incubación y otras 24h a temperatura ambiente para la adquisición de color), hicieron que se descartase como medio diferencial a utilizar en el presente trabajo.

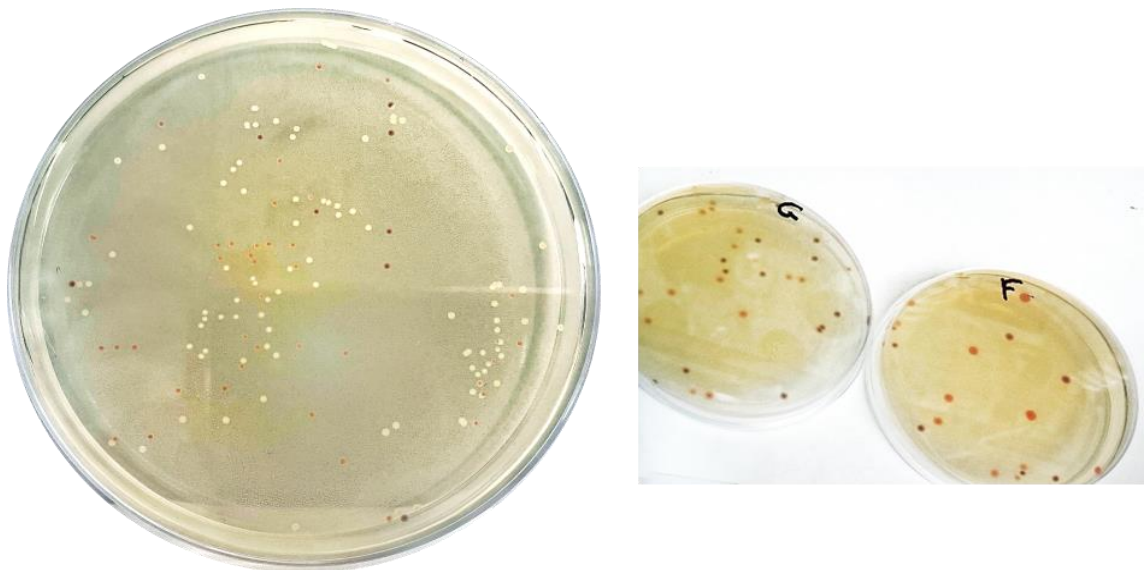
Basándose también en la capacidad de utilización del citrato, se preparó el medio Alsan (55), utilizando las soluciones de citrato férrico. Los iones férricos y el púrpura de bromocresol aportaron un color verde marronáceo al medio sin cultivar. Cuando se repitió el ensayo llevado a cabo en el medio KM, se observó un crecimiento mínimo de colonias blancas correspondientes con *L. cremoris*, pero no se observó crecimiento de la cepa de *L. lactis* tanto en aerobiosis como anaerobiosis. El hecho de que las colonias observadas fueran blancas es consistente con el hecho de que *L. cremoris* no puede utilizar el citrato. Aun así, los resultados obtenidos no concuerdan con la literatura, donde se describe que este medio inhibe el crecimiento de *L. cremoris* y permite la diferenciación de cepas de *L. lactis* y *L. lactis* biov. *diacetylactis*. Esta disparidad puede deberse, en parte, a la posible clasificación errónea las subespecies cuando se desarrolló el medio (1990), basada únicamente en pruebas fenotípicas.

#### **4.1.2 Hidrólisis de arginina**

La vía de la arginina deiminasa cataliza la degradación de L-arginina a L-ornitina, amoníaco y dióxido de carbono y genera 1 mol de ATP por mol de L-arginina consumido. La vía está ampliamente distribuida entre las bacterias y sirve como fuente de energía, carbono y/o nitrógeno (58,59) y como mecanismo de supervivencia en ambientes ácidos como puede ser el lácteo (60). En *L. lactis*, los genes que codifican enzimas de la ruta arginina deiminasa están localizados en un clúster (9 genes) (61). Esta propiedad de *L.*

*lactis* diferenciadora de *L. cremoris* puede permitir la diferenciación morfológica de las colonias de ambas cepas. En el medio Reddy se detecta la hidrólisis de arginina en presencia de púrpura de bromocresol, un indicador de pH, como ya se indicó anteriormente. En un principio, la presencia de carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ) debería impedir la difusión de sustancias ácidas y viraje de toda la superficie de las placas de morado a amarillo. Tras varios intentos y modificaciones del protocolo original, o bien varios componentes de medio precipitaban, o bien toda la placa se volvía amarilla, impidiendo la correcta observación de las colonias.

El medio TTC desarrollado por Turner y colaboradores (42) tiene como principal elemento diferenciador respecto del medio Reddy el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC). En un ensayo similar a los llevados a cabo con el resto de los medios, sembrando las cepas 3LA1 y 3LA10 por separado y en co-cultivo, en aerobiosis se obtuvieron colonias moradas correspondientes con la cepa 3LA1 de *L. lactis*, consecuencia de la hidrólisis de arginina, y colonias rosas pálidas correspondientes con la cepa 3LA10 de *L. cremoris*. En anaerobiosis se observó crecimiento, pero las cepas resultaron ser indistinguibles, ya que, todas las colonias eran moradas intensas. En concordancia con lo reportado en la bibliografía el valor de pH del medio resultó ser crucial para el éxito de los experimentos: si era inferior a 6 no se observaba coloración e incluso se inhibía el crecimiento microbiano. Por tanto, este medio se postuló como un método válido para la diferenciación morfológica de las colonias de *L. lactis* y *L. cremoris* (Figura 9).

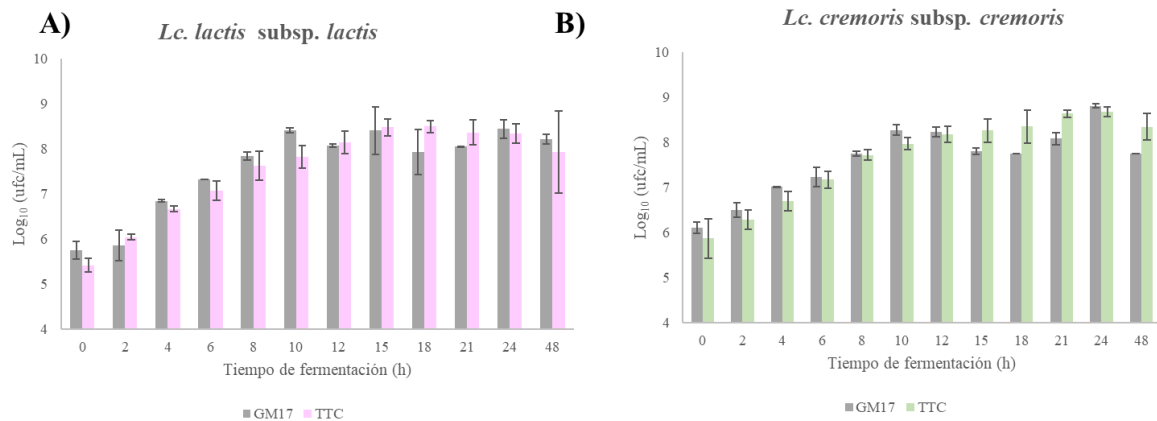


**Figura 9.** Placas de cultivo en aerobiosis de medio TTC con colonias de *L. cremoris* rosas, *L. lactis* moradas y *Lb. platarum* blancas.

Según la bibliografía, el medio está diseñado para la diferenciación entre lactococos pero no es selectivo para lactococos, por lo que se observó crecimiento del lactobacilo en las muestras que procedían del co-cultivo con dicha cepa. Las colonias de esta cepa resultaron ser completamente blancas, de lo que se deduce que la cepa de *L. cremoris* tiene cierta capacidad de hidrolizar la arginina en pequeñas cantidades, de ahí su coloración rosácea (Figura 9).

## 4.2 EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO TTC

Una vez seleccionado el medio TTC y optimizada su preparación, se procedió a evaluar su idoneidad para evaluar el crecimiento de las cepas objeto de estudio a lo largo de la fermentación. Se trata de un paso esencial para poder llevar a cabo el seguimiento del crecimiento microbiano adecuadamente, ya que, la presencia de sales y las condiciones requeridas de preparación ( $\text{pH} < 6$ ) pueden afectar el crecimiento de los microorganismos. No sería de extrañar que el empleo de un medio de compleja composición causara un sesgo en la detección de los microorganismos de interés, lo que se traduce en la inhibición parcial o total de su desarrollo. Por ello, se prepararon fermentaciones de las cepas aisladas y en co-cultivo con la cepa de lactobacilo, comparando el crecimiento en el medio TTC y en el medio genérico GM17.



**Figura 10.** Comparación del crecimiento en los medios TTC y GM17. A) Representación del promedio de recuentos microbianos obtenidos de la cepa *L. lactis* 3LA1 de forma individual y en co-cultivo con *L. plantarum* durante las fermentaciones en leche. B) Representación del promedio de recuentos microbianos obtenidos de la cepa *L. cremoris* 3LA10 de forma individual y en co-cultivo con *L. plantarum* durante las fermentaciones en leche.

Como se puede observar en la Figura 10, la concentración de cada cepa, expresada en unidades formadoras de colonias por mL de leche fermentada (UFC/mL), detectadas en el medio TTC diferencial y en el medio GM17 -específico para lactococos aislados de productos lácteos- son equiparables. Si bien, los recuentos fueron ligeramente inferiores

en las placas de TTC respecto de las placas de GM17, la diferencia no fue superior a 0,25 unidades logarítmicas (Figura 10).

Cabe destacar que la pigmentación morada y rosa de las colonias perdía intensidad a mayor concentración celular inoculada. Esto se puede deber a una competición por los sustratos disponibles. Para una correcta visualización, el número de colonias por placa de cultivo debía ser menor a 100, para evitar sesgos en los recuentos. Este hecho, puede favorecer la variabilidad estadística ya que el error introducido con recuentos en placas con pocas colonias es más elevado.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, el medio TTC con sales de tetrazolio se mostró como una herramienta ideal, sensible y específica para seguir el crecimiento de las cepas de lactococos de forma individual o en co-cultivos de las dos cepas de lactococos o con la cepa de lactobacilo. Para el seguimiento del crecimiento de *L. plantarum* 3LA30 se utilizó el medio selectivo MRS.

### 4.3 ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS TRES CEPAS DE BAL EN LECHE FERMENTADAS MEDIANTE TÉCNICAS DE CULTIVO

#### 4.3.1 Tasas de crecimiento

Se realizó un estudio comparativo de las tasas de crecimiento de las cepas 3LA1, 3LA10 y 3LA30 individualmente y bajo la influencia de la presencia del resto de cepas, en leche UHT. Dada la opacidad del medio lácteo, la medida de la densidad óptica no se pudo realizar, por lo que se llevó a cabo el seguimiento del crecimiento mediante recuentos microbianos utilizando el medio selectivo para lactobacilos MRS en la cepa 3LA30, y el medio diferencial TTC para *L. lactis* y *L. cremoris* en las cepas 3LA1 y 3LA10.

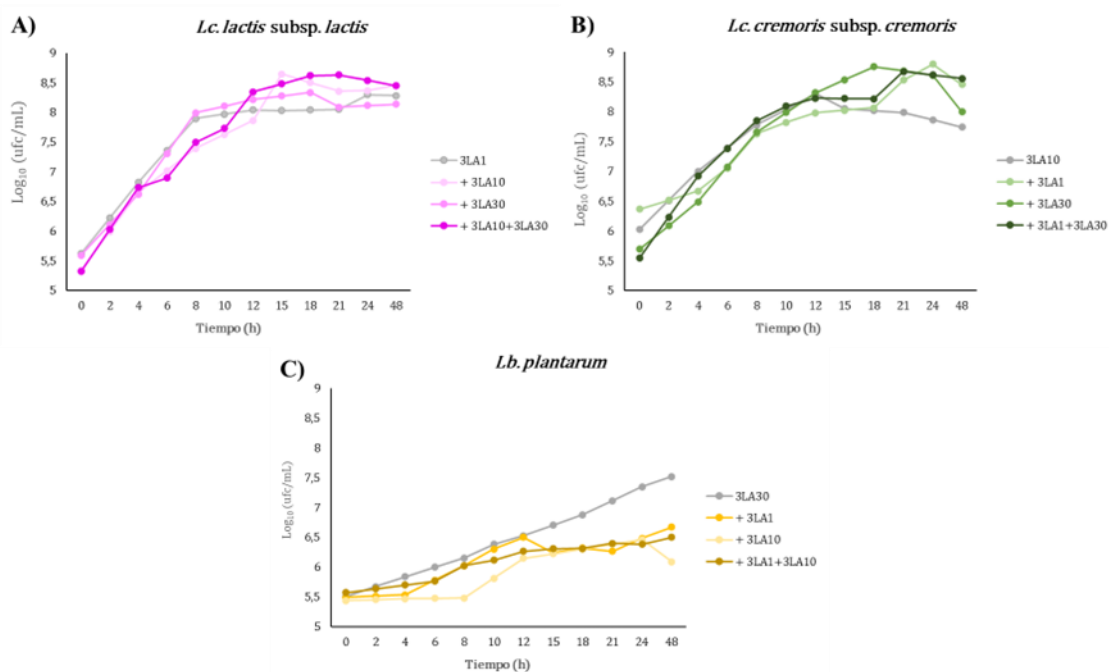


Figura 11. Curvas de crecimiento obtenidas para *L. lactis* 3LA1 (A) y *L. cremoris* 3LA10 (B) en medio de cultivo TTC individuales y en co-cultivo. Las curvas de crecimiento de *L. plantarum* (C) se obtuvieron en medio MRS.

En el caso de *L. lactis* 3LA1, se observa una fase de crecimiento exponencial entre las 2 y las 8-10 horas, y una fase estacionaria a partir de ese tiempo que se alarga hasta las 48h (Figura 11, A). En las etapas de conservación de la leche fermentada, establecida con un seguimiento del crecimiento microbiano a los 7, 15 y 30 días (datos no mostrados), no se observó un descenso en la concentración celular. Aparentemente, la presencia del lactobacilo no afecta significativamente al crecimiento de la cepa 3LA1, algo que se infiere del co-cultivo con esta cepa (Figura 11, A). La presencia de *L. cremoris*, por su parte, parece ralentizar ligeramente el crecimiento de *L. lactis* durante las primeras etapas



del cultivo. Sin embargo, al final de la fermentación se observan concentraciones celulares más altas de la cepa 3LA1 en los co-cultivos en los que está presente la cepa de *L. cremoris* 3LA10 (Figura 11, A).

La curva de crecimiento de *L. cremoris* 3LA10 presenta una fase de crecimiento exponencial entre las 2 y las 10 horas; una fase estacionaria entre las 10 y las 21 horas; y el inicio de una etapa de muerte celular a las 24 h (Figura 11, B). Aunque las concentraciones celulares de esta cepa disminuyeron, no llegó a desaparecer en la etapa de conservación de la leche a 4°C (datos no mostrados). La presencia de *L. lactis* retrasa la etapa de muerte celular de *L. cremoris*, habiendo una diferencia en los últimos tiempos de hasta un orden de magnitud. La presencia de *L. plantarum* causa el mismo efecto, de forma más pronunciada, si bien a las 48h ya se observa un claro descenso en la densidad celular en la cepa 3LA10. Las concentraciones celulares bacterianas más elevadas se observaron en el co-cultivo de las tres cepas (Figura 11, B).

Por último, el crecimiento de *L. plantarum* 3LA30 es menor que en el caso de las dos cepas anteriores. La curva de crecimiento de la cepa 3LA30 alcanza valores de entre  $10^6$ - $10^7$  UFC/mL, inferiores a las observadas para los lactococos ( $10^8$ - $10^9$  UFC/mL) (Figura 11, C). Además, la fase de crecimiento exponencial está más retrasada en el tiempo. El co-cultivo con cualquiera de las cepas de lactococos o con ambas, en base a los resultados obtenidos, parece afectar negativamente al crecimiento del lactobacilo (Figura 11, C). Este resultado está en coherencia con lo observado con anterioridad durante el estudio de estabilidad de las cepas en la leche fermentada a lo largo de un año y medio, donde se observaron niveles de lactobacilos de aproximadamente  $10^6$ - $10^7$  UFC/mL (10).

#### 4.3.2 Acidificación: evolución del pH

Además del seguimiento del crecimiento microbiano se realizó la medida del pH en las distintas fermentaciones. Una bajada del pH de la leche fermentada se asocia con la producción de ácido láctico, llevada a cabo por las BAL a partir de la lactosa presente en la leche. Como se puede ver al comparar los datos la tasa de crecimiento de cada cepa frente a los datos de pH el descenso más pronunciado del pH se produce durante la fase exponencial del crecimiento (Figura 12). Los niveles más bajos de pH (~4,5) se obtuvieron en los cultivos en los que estaba presente la cepa *L. cremoris* 3LA10 (Figura 12, B). En los cultivos con la cepa *L. lactis* 3LA1 o de esta con la cepa de *L. plantarum* 3LA30 el descenso de pH es muy inferior al alcanzado en los cultivos con la cepa 3LA10

(Figura 13), alcanzando valores de aproximadamente 6,5. la producción de ácido láctico por parte de *L. plantarum* 3LA30 no es significativa, alcanzando un valor de pH ligeramente inferior al del control (leche sin inóculo).

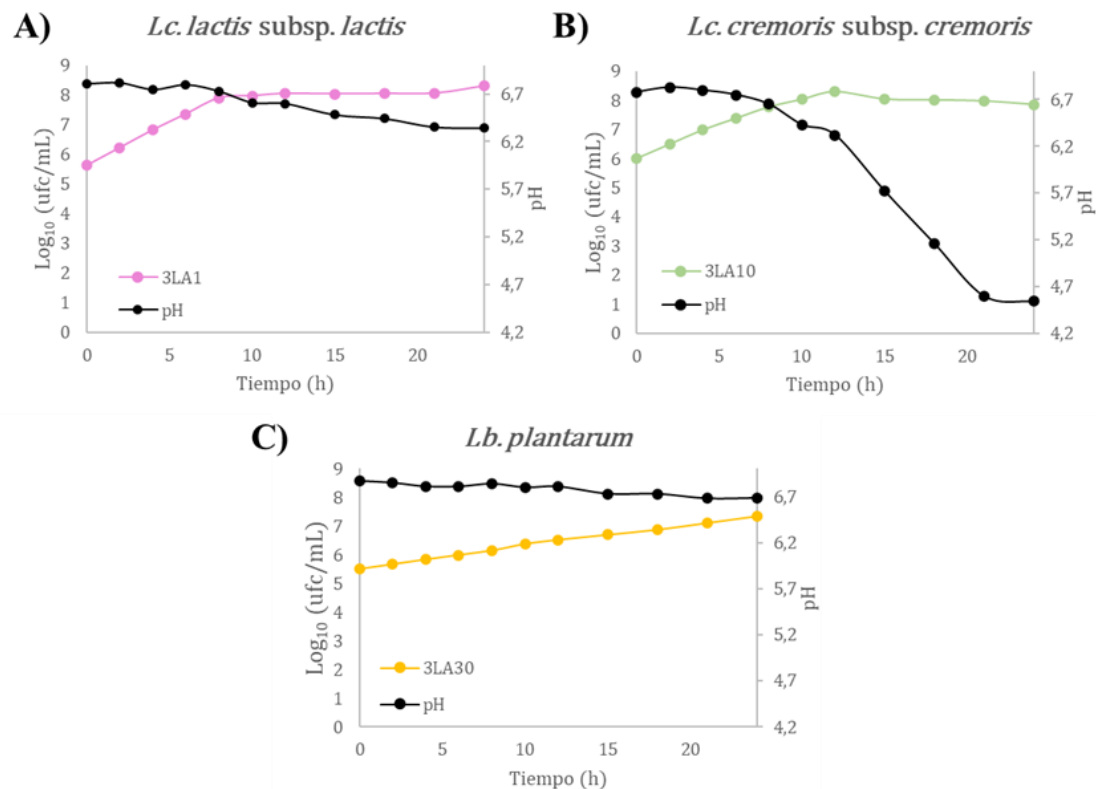


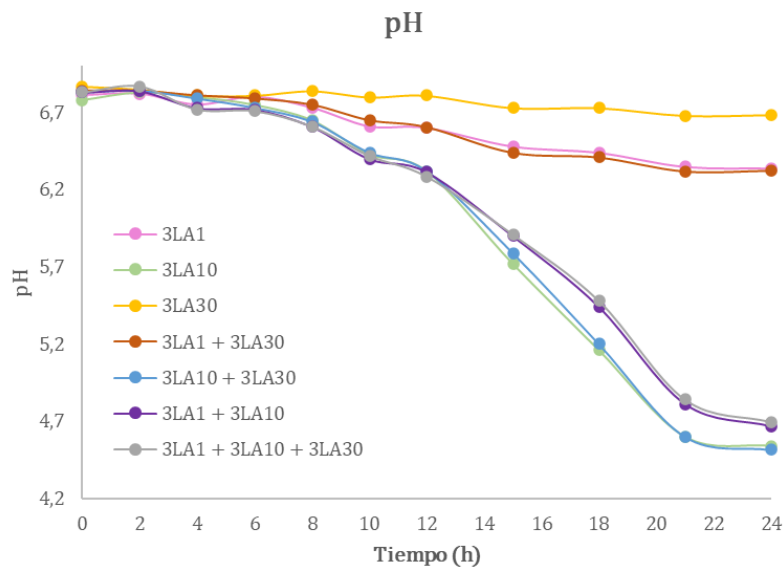
Figura 12 Comparación entre el crecimiento y la evolución del pH para *L. lactis* 3LA1 (A), *L. cremoris* 3LA10 (B) y *Lb. plantarum* (C).

La bajada de pH más pronunciada se corresponde con las condiciones en las que está presente la cepa de *L. cremoris*. Sólo en aquellas combinaciones en las que estuvo presente esta cepa hubo coagulación, proceso que ocurre con la precipitación de la caseína, de punto isoeléctrico 4,6 (Figura 13). En general, la cepa *L. cremoris* tiene un crecimiento más eficiente en leche, siendo la única que ha sido capaz de formar un coágulo consistente. Esta mayor eficiencia puede ser debido a la presencia de proteasas capaces de degradar la caseína, proteína mayoritaria de la leche, para cubrir la demanda celular de nitrógeno.

El hecho de que se alcancen concentraciones bacterianas más altas de *L. cremoris* en co-cultivo puede deberse a la menor producción de ácido láctico, que supone una bajada de pH menor y por tanto unas condiciones de crecimiento menos restrictivas.

No se aprecian diferencias en la acidificación entre las fermentaciones llevadas a cabo por los lactococos de forma individual y aquellas en las que se encontraban

acompañados por el lactobacilo. De hecho, la fermentación llevada a cabo por el lactobacilo de forma individual presenta unos valores de pH superiores a cualquier otra condición, indicando que esta cepa no juega un papel importante como productora de ácido láctico en la comunidad microbiana, y que la presencia de este en grandes cantidades puede inhibir parcialmente su desarrollo. Se deduce que el pH de crecimiento óptimo de la cepa 3LA30 es superior al pH de la leche fermentada natural, lo que puede



*Figura 13. Acidificación observada en las fermentaciones lácteas*

ser parte de la explicación de las bajas concentraciones celulares observadas.

Se hizo un seguimiento de la conservación de la leche fermentada a 4°C durante 1 mes, y se observó que el pH apenas varió, bajando ligeramente pero no de forma significativa (datos no mostrados).

#### 4.4 ANÁLISIS GENÓMICO PARA DEFINIR MARCADORES ESPECÍFICOS DE CEPA

A la hora de ensamblar el genoma se utilizaron dos programas: el programa SPAdes que está diseñado para ensamblar genomas pequeños como los bacterianos y el programa Unicycler que es una herramienta que optimiza los algoritmos del ensamblaje de SPAdes.

Tabla 2. Datos de la secuenciación de los genomas de las cepas de interés con los programas SPAdes y Unicycler.

	3LA1		3LA10		3LA30	
	SPAdes	Unicycler	SPAdes	Unicycler	SPAdes	Unicycler
Long. total	2444855	2433628	2411527	2388068	3269824	3225998
GC (%)	34.99	35.00	35.50	35.52	44.35	44.40
Nº Contigs	112	104	198	202	176	153
Contigs ≥ 50000 bp	14	15	6	6	26	25
Contigs ≥ 25000 bp	34	30	41	42	35	34
Contigs ≥ 10000 bp	51	47	80	81	51	50
Contigs ≥ 5000 bp	61	59	107	101	64	62
Contigs ≥ 1000 bp	89	79	160	157	113	106
N50	52888	61997	27679	27520	81195	82412

Excepto para el genoma de la cepa 3LA10 se obtuvieron menos contigos en el ensamblaje realizado con Unicycler (Tabla 2). Una de las medidas de calidad del ensamblaje es el N50, indicativo de la longitud de pares de bases del contigo más pequeño con el que se cubre el ensamblaje del 50% del genoma. A mayor N50, mayor calidad, puesto que indica que con menos contigos se alcanza la mitad del proceso, y en dos de los tres casos corresponde con Unicycler.

Después del ensamblaje de las lecturas en contigos, se realizó la anotación funcional con los programas PATRIC y RAST. Posteriormente, se llevó a cabo la comparación basada en la secuencia de los genomas, encontrando 349 genes únicos para *L. lactis*, 455 genes únicos para *L. cremoris* y 1440 genes únicos para *L.*

*plantarum*. De entre ellos, se seleccionaron tres genes para cada una de las cepas que tuviesen una función metabólica conocida y que presumiblemente se ubicasen en el cromosoma bacteriano y, por tanto, fuesen de copia única (Anexo II).

#### 4.5 DESARROLLO DE UN MÉTODO DE PCR CUANTITATIVA PARA LA DETECCIÓN ESPECÍFICA DE CEPAS

##### 4.5.1 Puesta a punto de los oligonucleótidos

Para la detección y cuantificación mediante qPCR utilizando como diana marcadores específicos de cada cepa, se ha de evaluar en primer lugar la especificidad y eficiencia de las parejas de cebadores diseñadas. Estas deben amplificar únicamente los genes de interés en las cepas para la que se han diseñado y su eficiencia debe ser  $>0,997$  (62).

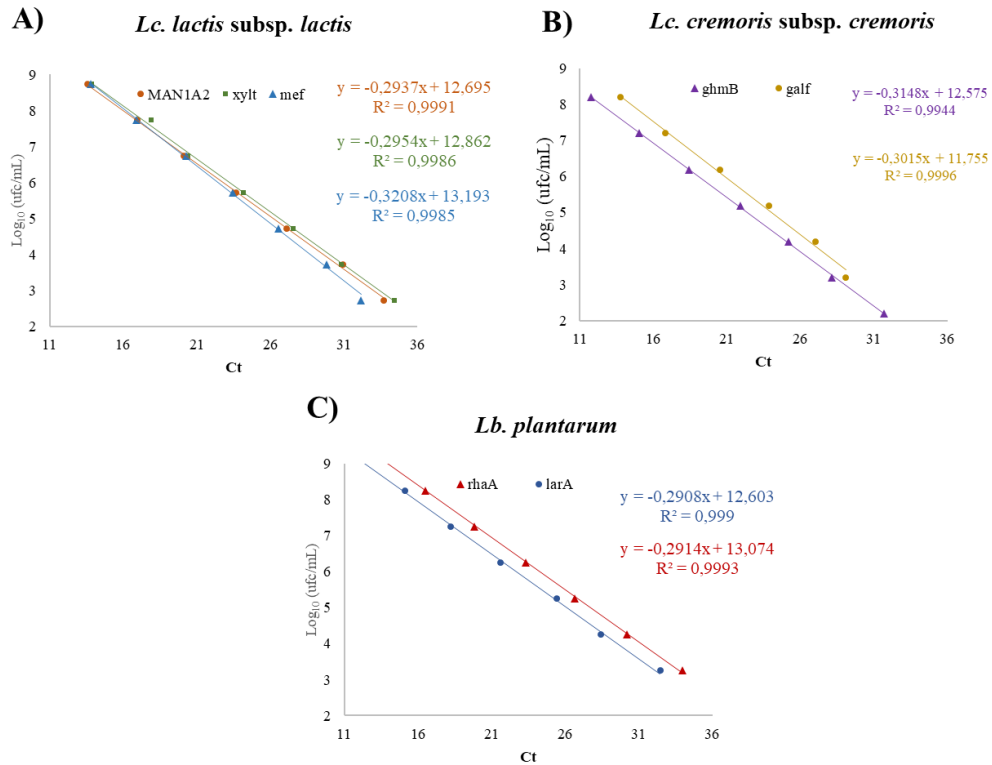
La amplificación y la especificidad se comprobaron mediante ensayos de qPCR en los que se enfrentó ADN purificado de las tres cepas a las diferentes parejas de oligonucleótidos.

**Tabla 3.** Valores de Ct obtenidos mediante qPCR en el estudio de amplificación y especificidad de las parejas de oligonucleótidos diseñadas. Cada ensayo se hizo por triplicado.

	3LA1	3LA10	3LA30
<i>mef</i>	15.96 ± 0.20	-	-
<i>MANIA2</i>	16.85 ± 0.18	-	-
<i>xylT</i>	16.64 ± 0.64	-	-
<i>galf</i>	-	13.33 ± 0.15	-
<i>gmhB</i>	-	15.33 ± 0.26	-
<i>fbaA</i>	10.16 ± 0.21	10.82 ± 0.08	25.31 ± 0.24
<i>rhaA</i>	-	-	12.80 ± 3.29
<i>malA</i>	-	-	11.40 ± 0.68
<i>larA</i>	-	-	11.24 ± 0.31

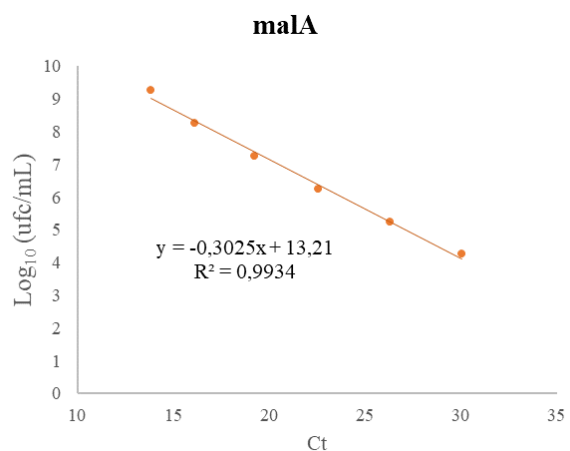
En vista de los valores de Ct presentados en la Tabla 3 los oligonucleótidos que amplifican los genes *MANIA2*, *xylT* y *mef* resultaron ser específicos para la cepa 3LA1, obteniendo amplificación positiva únicamente con el ADN de esta cepa. Lo mismo ocurrió con los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes *rhaA*, *malA* y *larA*, específicos de la cepa 3LA30. Por otra parte, mientras que los oligonucleótidos que amplifican los genes *galf* y *gmhB* fueron específicos para la cepa de lactococos 3LA10, los oligonucleótidos para el gen *fbaA* resultaron amplificar también con el ADN

de la cepa de lactococos 3LA1. Una búsqueda posterior en el genoma de la cepa *L. lactis* 3LA1 confirmó el hecho de que el gen de *fbxA* que codifica para el enzima Fructosa bisfosfato aldolasa class II no era un gen único de la cepa *L. cremoris* 3LA10. Aun así, ocho de las nueve parejas diseñadas se mostraron como opciones válidas para la detección específica de las cepas de la leche fermentada.



**Figura 14.** Curva estándar de qPCR para los genes diana de cada cepa, utilizando diluciones seriadas de ADN procedente de inóculos de concentración conocida. La regresión lineal se obtuvo al representar los valores de ciclos umbral Ct frente el logaritmo en base 10 de los recuentos microbianos. Las ecuaciones y los valores de R<sup>2</sup> se indican en cada caso.

La eficiencia de las parejas de cebadores se evaluó mediante qPCR, utilizando como molde diluciones seriadas del ADN purificado de la cepa específica (63). En la Figura 14 se muestran las rectas de regresión y las ecuaciones obtenidas para los genes de cada microorganismo. Los oligonucleótidos específicos para el gen *malA* diseñado para *L. plantarum* 3LA30 no presentó valores de eficiencia superiores al

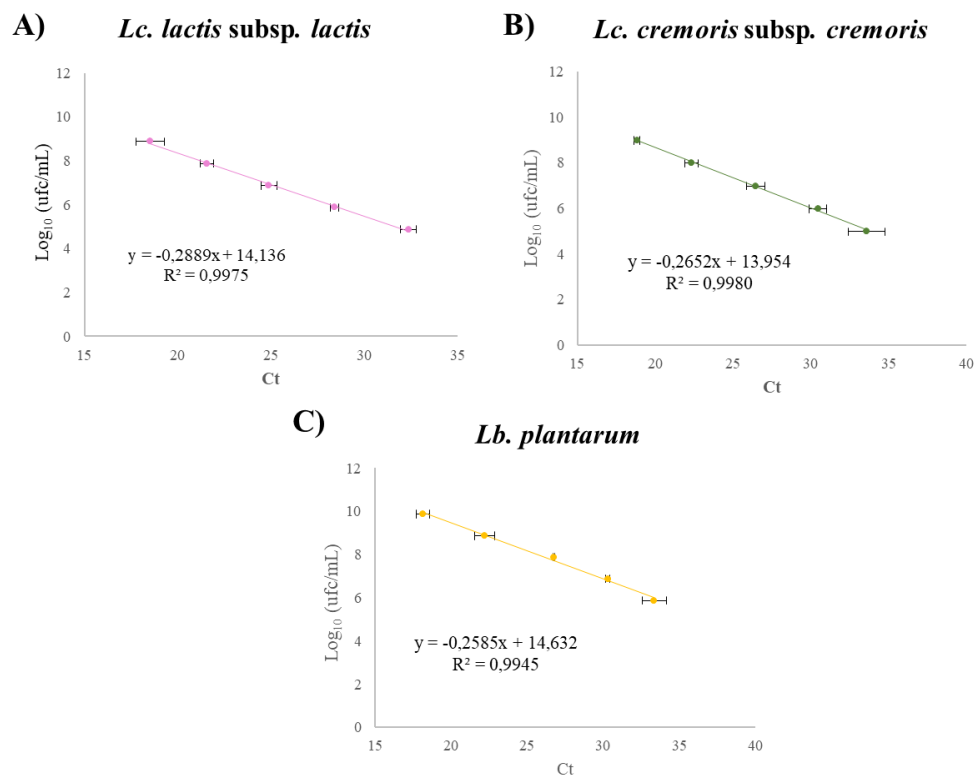


**Figura 15.** Curva estándar obtenida para la pareja de cebadores *malA*.

recomendable  $>0,997$ . Como se aprecia en la Figura 15, el valor de  $R^2$  de la recta es 0,995 inferior al aceptable. Tras varias repeticiones, el resultado no se alteró, descartando la posibilidad de que hubiera errores experimentales y no se hubiese añadido la muestra a la reacción de qPCR. La pareja de oligos que amplifican el gen *ghmB* también presentan un valor de  $R^2$  por debajo del valor recomendable (0,994). Por tanto, estas parejas de oligonucleótidos se descartaron para su uso en la evaluación del crecimiento de la cepa de lactobacilo en las fermentaciones.

#### 4.5.2 Optimización del método de qPCR

El seguimiento del crecimiento microbiano mediante la técnica de qPCR se llevó a cabo directamente en las distintas muestras de leches fermentadas. En primer lugar, se procedió a preparar rectas estándar que permitiesen la extrapolación de los valores Ct durante el seguimiento de las fermentaciones a concentraciones microbianas, dadas las condiciones de la reacción de qPCR anteriormente comentadas (Figura 16).



**Figura 16.** Curvas estándar de qPCR para los cebadores MAN1A2 de *L. lactis* (A), *galf* de *L. cremoris* (B) y *rhaA* de *Lb. plantarum* (C). Se utilizaron diluciones acuosas 1/2 de diluciones seriadas de inóculos en leche de las cepas de concentración conocida. La regresión lineal se obtuvo al representar los valores de ciclos umbral Ct frente al logaritmo en base 10 de los recuentos microbianos. Las ecuaciones y los valores de  $R^2$  se indican en cada caso.

Para la detección y cuantificación mediante qPCR de las tres cepas objeto de estudio, se escogió aquellas parejas de oligonucleótidos que presentaban especificidad y los mayores valores de eficiencia: MAN1A2 ( $R^2= 0,9991$ ) para *L. lactis* 3LA1, *galf*

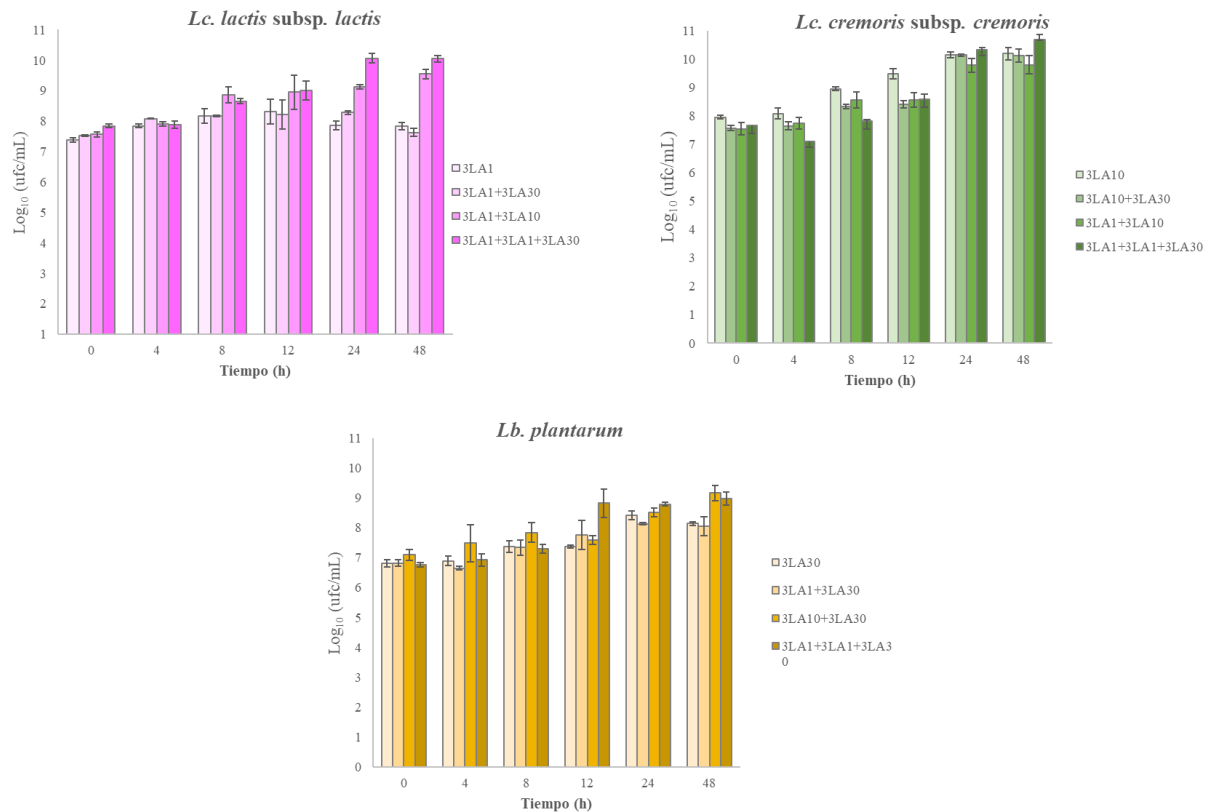
( $R^2=0,9996$ ) para *L. cremoris* 3LA10 y rhaA ( $R^2= 0,9993$ ) para *L. plantarum*. En las amplificaciones se utilizó como muestra de ADN una dilución  $\frac{1}{2}$  de una leche inoculada con una concentración bacteriana conocida ( $10^9$ - $10^4$  ufc/mL). En la Figura 16 se observan las rectas estándar obtenidas. Como puede observarse los valores de eficiencia para los oligos son ligeramente inferiores a los obtenidos cuando se utilizaba directamente una muestra de ADN purificado. Este hecho, puede ser debido a la presencia en la leche de sustancias inhibitoras de la PCR. Además, los valores de eficiencia más bajos se han obtenido en las amplificaciones de la cepa de lactobacilo. En este ensayo, y a diferencia del realizado para evaluar la eficiencia de los oligonucleótidos, se añaden las bacterias directamente a la muestra de leche sin ningún paso previo de lisis ni de purificación del ADN. Por tanto, es lógico que el proceso de lisis que debe tener lugar durante la amplificación de la qPCR reduzca la eficiencia del proceso y más si cabe en los oligonucleótidos que amplifican el lactobacilo ya que este posee mayor resistencia a la lisis celular.

#### **4.6 ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS TRES CEPAS DE BAL EN LECHES FERMENTADAS MEDIANTE QPCR**

Aplicando el procedimiento descrito anteriormente, se hizo un seguimiento del crecimiento de cada cepa individualmente y en combinaciones en leche, reproduciendo el ensayo realizado mediante técnicas de cultivo.

En la Figura 17 A se observa como el crecimiento de la cepa *L. lactis* 3LA1 se ve favorecido significativamente por la presencia de la cepa 3LA10, y en la condición en la que se encuentran las tres cepas presentes se alcanza un ligero incremento en la concentración celular respecto a la combinación de los dos lactococos. No solo afectan positivamente a su crecimiento, sino también a su conservación, algo que se puede inferir de los datos obtenidos a las 48h, donde se observa una diferencia de más de dos órdenes de magnitud entre la fermentación individual y la fermentación en conjunto. En este punto, se ve que la presencia de *L. plantarum* 3LA30 es la que menos influye en la evolución de este lactococo. En cuanto a la cepa *L. cremoris* 3LA10, manifiesta un crecimiento análogo en las diferentes condiciones fermentativas, sin apreciar alteraciones significativas causadas por la presencia o ausencia del resto de los integrantes de la comunidad microbiana (Figura 17, B). Estos resultados concuerdan y apoyan los obtenidos mediante cultivo microbiano, de los cuales se puede obtener la misma información.





**Figura 17.** Valores de concentraciones microbianas obtenidos mediante qPCR para *L. lactis* (A), *L. cremoris* (B) y *Lb. plantarum* (C). Como molde en las reacciones se utilizaron diluciones acuosas 1/2 de las muestras en leche. Los valores de concentraciones bacterianas se obtuvieron mediante la extrapolación de los valores de ciclos umbral Ct usando las rectas de regresión.

A diferencia de lo observado mediante las técnicas de cultivo, el crecimiento de *L. plantarum* 3LA30 no se ve afectado por la presencia de los lactococos en la leche. En algunos casos se aprecia ligeros incrementos en el crecimiento en presencia de la cepa de *L. lactis* 3LA10, o bien, cuando están las tres cepas presentes (Figura 17, C).

Al ser la PCR cuantitativa un método más sensible y robusto, los datos obtenidos mediante esta técnica son más fiables que en el caso de los recuentos microbianos, un hecho que se ha reportado en estudios similares (64). Los resultados en ambos ensayos son similares: existe una cooperación que favorece el crecimiento de las tres bacterias, siendo el mutualismo la relación microbiana predominante. La condición en la que mejor crecen y se desarrollan es aquella en la que están presentes todos los integrantes de la comunidad microbiana, como pasa con consorcios semejantes (65).

Es probable que la cepa de *L. lactis* 3LA1 aporte metabolitos secundarios al consenso, gracias a su habilidad para fermentar el citrato, de tal manera que afecte positivamente al crecimiento y no sólo a las propiedades organolépticas del producto

final. Esta hipótesis es respaldada por el comportamiento de otras cepas de la especie de *L. lactis*, que en co-cultivo aumentan la viabilidad de otras bacterias del ácido láctico (66–68). Mientras tanto, la cepa que domina la coagulación es *L. cremoris* 3LA10 causando la coagulación y la bajada de pH, posiblemente debido a su capacidad de utilizar la caseína como fuente de nitrógeno mediante proteasas (69,70). Por otra parte, el papel de *L. plantarum* 3LA30 en el consorcio es actualmente desconocido, puesto que no parece verse afectado por la presencia de los otros dos microorganismos, ni afectar al crecimiento de estos. Estudios transcriptómicos posteriores podrían ayudar a dilucidar su papel en la comunidad, profundizando en las rutas metabólicas presentes en esta cepa y en la producción de compuestos.

## 5 CONCLUSIONES

1.- Se evaluaron diferentes medios de cultivo diferenciales, y solamente el medio TTC permitió discriminar adecuadamente la morfología de las colonias pertenecientes a las especies *L. lactis* y *L. cremoris* cuando se encontraban en co-cultivo.

2.- La comparación del crecimiento de las cepas 3LA1 y 3LA10 en el medio selectivo y de referencia para lactococos GM17 y en TTC reveló que este último es un medio diferencial, que permite distinguir las cepas de las dos especies sin afectar negativamente al crecimiento de ninguna ellas.

3.- El análisis microbiológico reveló que la cepa de *L. cremoris* 3LA10 es la que conduce la coagulación de la leche y favorece el crecimiento de la cepa *L. lactis* 3LA1. Mientras tanto, el crecimiento de *L. plantarum* no parece verse afectado por la presencia de ninguna cepa de lactococos.

3.- La secuenciación y análisis genómico de las cepas nos permitió obtener información sobre sus capacidades metabólicas y, además, diseñar estrategias de detección específica de cepa mediante la identificación de genes únicos.

4.- El diseño y aplicación de un método de qPCR permitió la detección y cuantificación del crecimiento de las cepas que componen la microbiota de la leche fermentada a lo largo de la fermentación.

5.- Los resultados obtenidos mediante qPCR fueron muy similares a los obtenidos mediante cultivos microbianos, por lo que ambas técnicas son válidas para la evaluación del crecimiento microbiano de esta leche fermentada. Si bien, la técnica de qPCR demostró ser un método más rápido y sensible que los recuentos microbianos.

## 6 LISTADO DE SÍMBOLOS

<b><math>\alpha</math></b>	Alfa	<b>Mpb</b>	Mega pares de bases
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>MRS</b>	De Man, Rogosa y Sharpe
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato	<b>MSS</b>	<i>Mixed-Strain Starters</i>
<b>BAL</b>	Bacterias del ácido láctico	<b>NFM</b>	<i>Naturally Fermented Milk</i>
<b>Biovar.</b>	Biovariedad	<b>NGS</b>	<i>Next Generation Sequencing</i>
<b>C</b>	Citosina	<b>NS</b>	Natural Starters
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	Carbonato de calcio	<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono	<b>PAL</b>	Bacterias del ácido propiónico
<b>CSIC</b>	Consejo Superior de Investigaciones Científicas	<b>PATRIC</b>	<i>Pathosystems Resource Integration Center</i>
<b>Ct</b>	<i>threshold cycle</i>	<b>Pb</b>	pares de bases
<b>dNTPs</b>	desoxinucleótidos trifosfato	<b>PCA</b>	<i>Plate Count Agar</i>
<b>DSS</b>	<i>Defined-Strain Starters</i>	<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético	<b>QPS</b>	<i>Qualified Presumption of Safety</i>
<b>Etc.</b>	Etcétera	<b>RAST</b>	<i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
<b>FDA</b>	<i>US Food and Drug Administration Agency</i>	<b>Subsp.</b>	Subespecie
<b>G</b>	Guanina	<b>Tm</b>	Temperatura de fusión
<b>GRAS</b>	<i>Generally Regarded as Safe</i>	<b>TTC</b>	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
<b>HTS</b>	<i>high-throughput sequencing</i>	<b>Ufc</b>	unidades formadoras de colonias
<b>IPLA</b>	Instituto de Productos Lácteos de Asturias	<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramos
<b>KM</b>	Kempler y McKay	<b>WHOS</b>	<i>Whole genome shotgun sequencing</i>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloruro de magnesio		
<b>mL</b>	Mililitro		

## 7 BLIOGRAFÍA

1. Tamang JP, Cotter PD, Endo A, Han NS, Kort R, Liu SQ, et al. Fermented foods in a global age: East meets West. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020;19(1):184–217.
2. Steinkraus KH. Nutritional significance of fermented foods. *Food Research International*. 1994;27(3):259–67.
3. Das AJ, Deka SC. Fermented foods and beverages of the North-East India. *International Food Research Journal*. 2012;19(2):377–92.
4. Itan Y, Powell A, Beaumont MA, Burger J, Thomas MG. The origins of lactase persistence in Europe. *PLoS Computational Biology*. 2009;5(8):17–9.
5. Gerbault P, Liebert A, Itan Y, Powell A, Currat M, Burger J, et al. Evolution of lactase persistence: An example of human niche construction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011;366(1566):863–77.
6. Laufer B. Some Fundamental Ideas of Chinese Culture. *The Journal of Race Development*. 1914;5(2):160.
7. González P. Definiciones de Leche y Queso. 2018;2.
8. Kurmann JA, Rasic JL, Kroger M. *Encyclopedia of fermented fresh milk products: an international inventory of fermented milk, cream, buttermilk, whey, and related products*. Springer Science & Business Media; 1992.
9. Peng K, Koubaa M, Bals O, Vorobiev E. Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. *Food Research International*. 2020;137:109544
10. Alegría Á, Fernández M elena, Delgado S, Mayo B. Microbial characterisation and stability of a farmhouse natural fermented milk from Spain. *International Journal of Dairy Technology*. 2010;63(3):423–30.
11. Robinson RK, Richard K. *Dairy microbiology handbook*. 765 p.
12. Carr FJ, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 2002;28(4):281-370.
13. De Vuyst L, Vandamme EJ. Lactic Acid Bacteria and Bacteriocins: Their Practical Importance. *Genetics and Applications*. 1994; 1–11.
14. Gänzle MG. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*. 2015;2:106–17.
15. Arqués JL, Rodríguez E, Langa S, Landete JM, Medina M. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria in Dairy Products and Gut: Effect on Pathogens. *BioMed Research International*. 2015;2015:584183.
16. Agriopoulou S, Stamatelopoulou E, Sachadyn-Król M, Varzakas T. Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: Quality and safety aspects. *Microorganisms*. 2020;8:1–23.
17. Clark S, Costello M, Drake MA, Bodyfelt F. *The Sensory Evaluation of Dairy Products*. 2009; 23:1–573.
18. Smit G, Smit BA, Engels WJM. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005; 29:591–610.

19. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2014; 11(8):506–14.
20. Saranraj P, Khalid K. An overview of lactic acid bacteria-IJB Related papers Lactic Acid Bacteria and its Antimicrobial Properties: A Review. *International Journal of Biosciences*. 2011;1(3):1–13.
21. Cavanagh D, Casey A, Altermann E, Cotter PD, Fitzgerald GF, McAuliffe O. Evaluation of *Lactococcus lactis* isolates from nondairy sources with potential dairy applications reveals extensive phenotype-genotype disparity and implications for a revised species. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015;81(12):3961–72.
22. Li TT, Tian WL, Gu CT. Elevation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* to the species level as *Lactococcus cremoris* sp. nov. and transfer of *Lactococcus lactis* subsp. *tractae* to *Lactococcus cremoris* as *Lactococcus cremoris* subsp. *tractae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;71(3).
23. Tanigawa K, Kawabata H, Watanabe K. Identification and typing of *Lactococcus lactis* by matrix-assisted laser desorption ionization - Time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76(12):4055–62.
24. McAuliffe O. Symposium review: *Lactococcus lactis* from nondairy sources: Their genetic and metabolic diversity and potential applications in cheese1. *Journal of Dairy Science*. 2018;101(4):3597–610.
25. Gaudu P, Yamamoto Y, Jensen PR, Hammer K, Lechardeur D, Gruss A. Genetics of *Lactococci*. *Microbiology Spectrum*. 2019;7(4).
26. Seitz, EW, Sandine WE, Elliicer PR, Day EA. Studies on diacetyl biosynthesis by *Streptococcus diacetilactis*. *Canadian Journal of Microbiology*. 1963; 9(4):431-441.
27. Goupy S, Croguennec T, Gentil E, Robins RJ. Metabolic flux in glucose/citrate co-fermentation by lactic acid bacteria as measured by isotopic ratio analysis. *FEMS Microbiology Letters*. 2000;182(2):207–11.
28. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020;70(4):2782–858.
29. Kant R, Blom J, Palva A, Siezen RJ, de Vos WM. Comparative genomics of *Lactobacillus*. *Microbial Biotechnology*. 2011;4(3):323–32.
30. Garcia-Gonzalez N, Battista N, Prete R, Corsetti A. Health-promoting role of *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from fermented foods. *Microorganisms*. 2021; 9:1–30.
31. Björkroth J, Holzapfel W. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *The Prokaryotes*. 2006; 4: 267–319.
32. Markakiou S, Gaspar P, Johansen E, Zeidan AA, Neves AR. Harnessing the metabolic potential of *Streptococcus thermophilus* for new biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2020; 61:142–52.
33. Mayo B, Ammor M, Delgado S, Alegría Á. Fermented Milk Products. *Fermented Foods and Beverages of the World*. 2010: 263–88.

34. Parente E, Cogan TM, Powell IB. Starter Cultures: General Aspects. *Cheese*. 2017; 201–26.
35. Mayo B, Rodríguez J, Vázquez L, Flórez AB. Microbial interactions within the cheese ecosystem and their application to improve quality and safety. *Foods*. 2021; 10 (3): 602.
36. Mahony J, McDonnell B, Casey E, van Sinderen D. Phage-Host Interactions of Cheese-Making Lactic Acid Bacteria. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2016;7(1):267–85.
37. Schlegel HG, Zaborosch C. *General microbiology*. Cambridge university press; 1993.
38. De Man JC, Rogosa M, Sharpe M. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*. 1960; 23.
39. Kneteman A. Enrichment and isolation of streptococcus citrophyllus an Beynum et Pette. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1952;18(4):275-90.
40. Niven CF, Smiley KL, Sherman JM. The Hydrolysis of Arginine by Streptococci. *Journal of Bacteriology*. 1942;43(6):651–60.
41. Weinberg E. Selective inhibition of microbial growth by the incorporation of triphenyl tetrazolium chloride in culture media. *Journal of Bacteriology*. 1953;66(2):240–2.
42. Turner N, Sandine WE, Elliker PR, Day EA. Use of Tetrazolium Dyes in an Agar Medium for Differentiation of Streptococcus Lactis and Streptococcus Cremoris. *Journal of Dairy Science*. 1963;46(5):380–5.
43. Reddy MS, Vedamuthu ER, Washam CJ, Reinbold GW. Differential agar medium for separating Streptococcus lactis and Streptococcus cremoris. *Applied Microbiology*. 1969;18(5):755–9.
44. Mikolajcik EM. Single Broth for the Differentiation of Streptococcus lactis from Streptococcus cremoris. *Journal of Dairy Science*. 1964;47(4):437–8.
45. J Shetty P. The Evolution of DNA Extraction Methods. *American Journal of Biomedical Science & Research*. 2020;8(1):39–45.
46. Agrimonti C, Bottari B, Sardaro MLS, Marmiroli N. Application of real-time PCR (qPCR) for characterization of microbial populations and type of milk in dairy food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019; 59:423–42.
47. Logan J, Kirstin E. Real-time PCR: current technology and applications. 2009;2: 284.
48. Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ. SYBR Green I: Fluorescence properties and interaction with DNA. *Journal of Fluorescence*. 2012;22(4):1189–99.
49. Loman NJ, Pallen MJ. Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nature Reviews Microbiology*. 2015;13(12):787–94.
50. Fanning S, Proos S, Jordan K, Srikumar S. A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8:.
51. Levy SE, Boone BE. Next-generation sequencing strategies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2019;9(7).
52. Mengoni A, Bacci G, Fondi M. *Bacterial Pangenomics Methods and Protocols Second Edition Methods in Molecular Biology* 2242

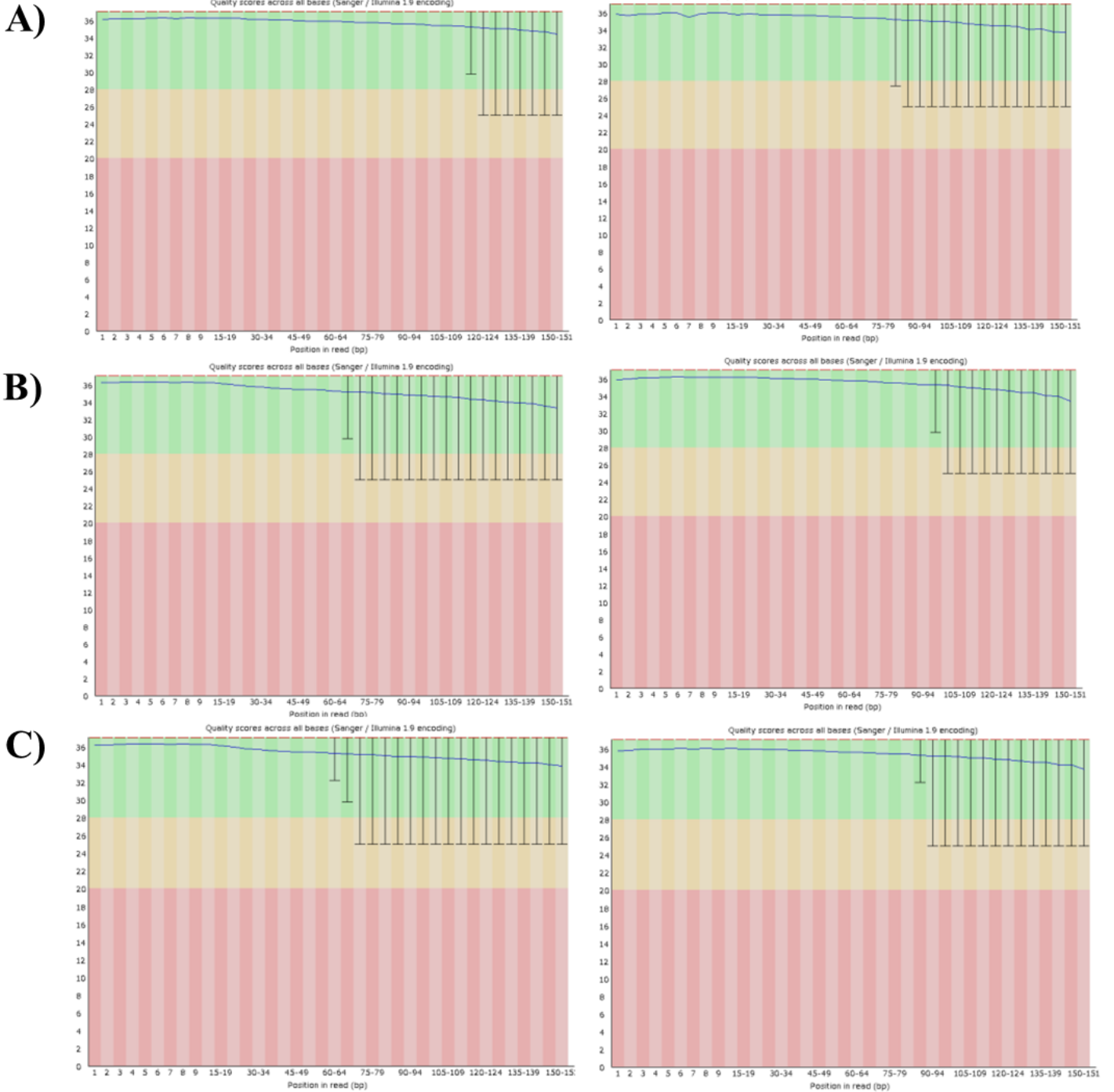
53. Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. 2015; 13:278–89.
54. Kempler GM, McKay LL. Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1980;39(4):926–7.
55. Al-Zoreky N, Sandine W. *Lactococcus* Genus: A selective and Differential Agar Medium. *Journal of Food Science*. 1991;56(6):1729–30.
56. Drider D, Bekal S, Prévost H. Genetic organization and expression of citrate permease in lactic acid bacteria. *Genetics and Molecular Research Journal*. 2004;3(2):273–81.
57. Waché Y, Riondet C, Diviès C, Cachon R. Effect of reducing agents on the acidification capacity and the proton motive force of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* resting cells. *Bioelectrochemistry*. 2002;57(2):113–8.
58. Crow VL, Thomas TD. Arginine metabolism in lactic streptococci. *Journal of Bacteriology*. 1982;150(3):1024–32.
59. Cunin R, Glansdorff N, Piérard A, Stalon V. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiological Reviews*. 1986;50(3):314–52.
60. Marquis RE, Bender GR, Murray DR, Wong A. Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 1987;53(1):198–200.
61. Noens EEE, Kaczmarek MB, Żygo M, Lolkema JS. ArcD1 and ArcD2 Arginine/Ornithine Exchangers Encoded in the Arginine Deiminase Pathway Gene Cluster of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 2015;197(22):3545–53.
62. Basu Editor C. PCR Primer Design Second Edition *Methods in Molecular Biology* 1275
63. Kavanagh I, Jones G, Nayab S. Significance of Controls and Standard Curves in PCR. *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide*. 2011. 67–78.
64. Grattepanche F, Lacroix C, Audet P, Lapointe G. Quantification by real-time PCR of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in milk fermented by a mixed culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;66(4):414–21.
65. Hadj Saadoun J, Calani L, Cirlini M, Bernini V, Neviani E, del Rio D. Effect of fermentation with single and co-culture of lactic acid bacteria on okara: evaluation of bioactive compounds and volatile profiles. *Food & Function*. 2021;12(7):3033–43.
66. Wang SY, Huang RF, Ng KS, Chen YP, Shiu JS, Chen MJ. Co-Culture Strategy of *Lactobacillus kefiranofaciens* HL1 for Developing Functional Fermented Milk. *Foods*. 2021;10(9):2098.
67. Odamaki T, Xiao JZ, Yonezawa S, Yaeshima T, Iwatsuki K. Improved viability of bifidobacteria in fermented milk by cocultivation with *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. *Journal of Dairy Science*. 2011;94(3):1112–21.
68. Kimoto-Nira H, Aoki R, Mizumachi K, Sasaki K, Naito H, Sawada T. Interaction between *Lactococcus lactis* and *Lactococcus raffinolactis* during growth in milk: Development of a new starter culture. *Journal of Dairy Science*. 2012;95(4):2176–85.
69. Leenhouts KJ, Gietema J, Kok J, Venema G. Chromosomal stabilization of the proteinase genes in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991;57(9):2568–75.



70. Bruinenberg PG, Vos P, de Vos WM. Proteinase overproduction in *Lactococcus lactis* strains: regulation and effect on growth and acidification in milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992;58(1):78–84.
71. Cataldo PG, Klemm P, Thüring M, Saavedra L, Hebert EM, Hartmann RK, et al. Insights into 6S RNA in lactic acid bacteria (LAB). *BMC Genomic Data*. 2021;22(1):29.
72. Swindell SR, Benson KH, Griffin HG, Renault P, Ehrlich SD, Gasson MJ. Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62(7):2641–3.
73. Metzker ML. Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 2010; 11:31–46.

## 8 ANEXOS

**ANEXO I.** Gráficos de calidad de las secuencias obtenidas con el programa FastQC de *L. lactis* (A), *L. cremoris* (B) y *L. plantarum* (C).



**ANEXO II.** Primera selección de genes únicos de candidatos como diana en el ensayo de PCR cuantitativa.

<i>L. lactis</i> 3LA1					
Tamaño contig	Contig	Gen	Longitud (pb)	Gene ID	Función
38 kb	57	882	73	fig 1360.569.peg.882	lactococcin A ABC transporter permease protein
195 kb	67	1397	288	fig 1360.569.peg.1397	Macrolide-efflux protein
23 kb	73	1544	163	fig 1360.569.peg.1544	Glycosyl transferase CpsG
117 kb	78	1660	440	fig 1360.569.peg.1660	Xylose isomerase (EC 5.3.1.5)
	78	1669	718	fig 1360.569.peg.1669	Alpha-1,2-mannosidase
	78	1672	900	fig 1360.569.peg.1672	alpha-mannosidase (EC 3.2.1.24)
5 kb	93	2048	367	fig 1360.569.peg.2048	Agmatine deiminase (EC 3.5.3.12)
117 kb					D-xylose proton-symporter XylT (busqueda Roary)

<i>L. cremoris</i> 3LA10					
Tamaño contig	Contig	Gen	Longitud (pb)	Gene ID	Función
60 kb- prot ribosomales	112	1104	338	fig 1359.261.peg.1104	<b>Galactofuranose transferase</b>
27 kb-prot ribosomales	117	1312	265	fig 1359.261.peg.1312	<b>D-glycero-alpha-D-manno-heptose 7-phosphate kinase (EC 2.7.1.168)</b>
	117	1314	182	fig 1359.261.peg.1314	<b>D-glycero-D-manno-heptose 1,7-bisphosphate phosphatase (EC 3.1.1.-)</b>
21 kb	127	1619	190	fig 1359.261.peg.1619	<b>Glutamate synthase [NADPH] large chain (EC 1.4.1.13)</b>
8 kb	175	2534	223	fig 1359.261.peg.2534	<b>Xylan alpha-1,2-glucuronosidase (EC 3.2.1.131)</b>
	175	2535	290	fig 1359.261.peg.2535	<b>Xylan alpha-1,2-glucuronosidase (EC 3.2.1.131)</b>
	175	2536	153	fig 1359.261.peg.2536	<b>Xylan alpha-1,2-glucuronosidase (EC 3.2.1.131)</b>
36 kb	176	2537	141	fig 1359.261.peg.2537	<b>Mannose-6-phosphate isomerase</b>

<b><i>L. plantarum</i> 3LA30</b>					
Tamaño contig	Contig	Gen	Longitud (pb)	Gene ID	Función
79 kb	74	634	53	fig 1590.1720.peg.634	<b>bacteriocin precursor peptide PlnF (putative)</b>
	74	635	57	fig 1590.1720.peg.635	<b>bacteriocin precursor peptide PlnE (putative)</b>
	74	638	109	fig 1590.1720.peg.638	<b>integral membrane protein PlnT, membrane-bound protease CAAX family</b>
	74	639	38	fig 1590.1720.peg.639	<b>integral membrane protein PlnT, membrane-bound protease CAAX family</b>
	74	640	98	fig 1590.1720.peg.640	<b>integral membrane protein PlnU, membrane-bound protease CAAX family</b>
24 kb	130	2026	284	fig 1590.1720.peg.2026	<b>Rhamnulose-1-phosphate aldolase (EC 4.1.2.19)</b>
	130	2027	428	fig 1590.1720.peg.2027	<b>L-rhamnose isomerase (EC 5.3.1.14)</b>
	130	2028	105	fig 1590.1720.peg.2028	<b>L-rhamnose mutarotase (EC 5.1.3.32)</b>
	130	2030	72	fig 1590.1720.peg.2030	<b>Predicted L-rhamnose permease RhaY *</b>
21 kb	134	2096	189	fig 1590.1720.peg.2096	<b>Chloramphenicol O-acetyltransferase</b>
21 kb	136	2271	651	fig 1590.1720.peg.2271	<b>alpha-L-rhamnosidase (EC 3.2.1.40)</b>
	136	2273	526	fig 1590.1720.peg.2273	<b>alpha-L-rhamnosidase (EC 3.2.1.40)</b>
93 kb	199	3397	277	fig 1590.1720.peg.3397	<b>Maltodextrose utilization protein MalA</b>
89 kb	11	66	425	fig 1590.1720.peg.66	<b>LarA: implicated in lactate racemization</b>