



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO
LÁCTICAS MEDIANTE PERFILES
DE FERMENTACIÓN Y
RIBOTIPIFICACIÓN**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN QUÍMICA EN
ALIMENTOS**

PRESENTA

JUAN ANTONIO GARCÍA IBARRA

ASESORES:

DRA. EVA MARIA SANTOS LÓPEZ

DRA. ARMIDA ZÚÑIGA ESTRADA



PACHUCA DE SOTO, HIDALGO, 2007.



Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y en el Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Burgos en España bajo la dirección de las Dras. Eva Maria Santos López y Armida Zúñiga Estrada.

Él autor y asesores agradecen al Departamento de Alimentos e Higiene Medioambiental de la Universidad de Helsinki en Finlandia y en especial a la Dra. Johanna Björkroth por el apoyo en el análisis de los resultados obtenidos en la ribotipificación.

Esta investigación fue financiada por los siguientes proyectos:

- “Obtención de cultivos iniciadores productores de bacterias de aplicación en la industria láctea” apoyado por SAGARPA-CONACyT con clave SAGARPA-2003-C 01-144.
- “Aislamiento y caracterización de bacterias lácticas bacteriocinogénicas a partir de alimentos y su aplicación como cultivos iniciadores en alimentos fermentados del estado de Hidalgo” apoyado por la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo a través del Programa Institucional de Investigación PII-UAEH 2004-2005 con clave UAEH-DIP-ICBI-AAQ-011.
- “Establecer interacciones de docencia e investigación con CA consolidados de diferentes Universidades e incrementar las interacciones de investigación entre las LGAC del CA de Química en Alimentos de la UAEH” apoyado por PROMEP 2004-2005 con clave UAEHGO-CA-18.



Esta tesis formó parte del proyecto “Establecer interacciones de docencia e investigación con CA consolidados de diferentes Universidades e incrementar las interacciones de investigación entre las LGAC de CA de Química en Alimentos de la UAEH” apoyados por PROMEP 2004-2005 con clave UAEHGO-CA-18.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por haberme brindado la ayuda necesaria para completar un objetivo más en mi vida. Su incansable esfuerzo y tenaz perseverancia fue lo que me ha impulsado a seguir todo este tiempo.

A mis amigos, por haber compartido conmigo todo tipo de experiencias, por acompañarme en los momentos de felicidad y apoyarme en instantes de desesperación.

Alguien dijo alguna vez, "La ignorancia es la noche de la mente; pero una noche sin luna y sin estrellas". Por lo que siempre estaré agradecido con la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y con todos los catedráticos que compartieron conmigo sus invaluable conocimientos, para ayudarme a superar la oscuridad de la ignorancia...

A las Dras. Armida Zúñiga y Eva Santos, por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de titulación bajo su asesoría. Gracias por su apoyo, paciencia y sobre todo, por el tiempo dedicado para la finalización de mi trabajo.

Seguramente me habré olvidado de personas que me han ayudado en este largo camino, a todos ustedes, mi más sincero agradecimiento.

"El futuro pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños"

E. Roosevelt

CONTENIDO

	Paginas
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Características generales de las bacterias ácido lácticas	2
2.2 Metabolismo de azúcares	2
2.3 Géneros representativos de las bacterias ácido lácticas	7
2.3.1 <i>Streptococcus</i>	7
2.3.2 <i>Enterococcus</i>	7
2.3.3 <i>Pediococcus</i>	8
2.3.4 <i>Lactobacillus</i>	8
2.3.5 <i>Lactococcus</i>	9
2.3.6 <i>Leuconostoc</i>	9
2.3.7 <i>Vagococcus</i>	10
2.3.8 <i>Carnobacterium</i>	10
2.3.9 <i>Tetragenococcus</i>	11
2.3.10 <i>Weissella</i>	11
2.3.11 <i>Aerococcus</i>	11
2.3.12 <i>Oenococcus</i>	12
2.4 Usos tecnológicos de las bacterias ácido lácticas	12
2.4.1 Cultivos iniciadores	12
2.4.2 Preservación de alimentos	15
2.4.3 Compuestos antimicrobianos producidos por bacterias ácido lácticas	15
2.4.3.1 Ácidos orgánicos	16
2.4.3.2 Peróxido de hidrógeno	17
2.4.3.3 Dióxido de carbono	17
2.4.3.4 Diacetilo	18
2.4.3.5 Acetaldehído	18
2.4.3.6 Ácidos grasos	18
2.4.3.7 Bacteriocinas	18
2.3.4 Probióticos	19
2.5 Métodos de identificación microbiana	22
2.5.1 Métodos fenotípicos	22
2.5.1.1 Análisis de la composición de la pared celular	23
2.5.1.2 Determinación de los ácidos grasos celulares	24
2.5.1.3 Determinación de quinonas isoprenoides	25
2.5.1.4 Análisis de proteínas celulares	25

2.5.1.5 Micrométodos	26
2.5.2 Métodos genotípicos	29
2.5.2.1 Determinación del porcentaje de Guanina-Citosina	29
2.5.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
2.5.2.3 Secuenciación de ADN	33
2.5.2.4 Secuenciación de ARN 16S	34
2.5.2.5 Análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción de satélites (SFLP)	35
2.5.2.6 Análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP)	36
2.5.2.7 Ribotipificación	36
2.5.2.8 Identificación polifásica	38
3. Justificación	41
4. Objetivos	42
5. Materiales y métodos	43
5.1 Reactivación de las cepas de estudio	43
5.2 Pruebas de fermentación de carbohidratos	47
5.2.1 Selección de colonias	47
5.2.2 Preparación de la tira de sustratos	47
5.2.3 Preparación del inóculo	47
5.2.4 Inoculación de la tira de sustratos	49
5.2.5 Lectura e interpretación de la tira de sustratos	49
5.3 Clasificación mediante ribotipificación	49
5.3.1 Reactivación de las cepas y aislamiento de ADN	49
5.3.2 Cuantificación del ADN	51
5.3.3 Digestión Enzimática del ADN cromosómico	52
5.3.4 Electroforesis de los productos de restricción	52
5.3.5 Transferencia Southern	53
5.3.6 Prehibridación e hibridación	53
5.3.7 Lavado y revelado	54
5.3.8 Análisis de los productos de bandas	54
6. Resultados y discusión	55
6.1 Identificación primaria	55
6.2 Identificación mediante perfiles de fermentación de carbohidratos	57
6.3 Identificación mediante ribotipificación	67
7. Conclusiones	77
8. Bibliografía	78
9. Anexos	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Pagina
1	Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.	4
2	Vía Heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.	6
3	Análisis de colecciones microbianas aisladas de alimentos fermentados mediante el RAPD.	32
4	Resolución taxonómica de técnicas empleadas actualmente en la clasificación bacteriana.	40
5	Diagrama del procedimiento para la reactivación de las cepas de estudio.	45
6	Diagrama del procedimiento para la identificación mediante API 50 CH TM .	48
7	Diagrama del procedimiento para la ribotipificación.	50
8	Puntos de corte la enzima de restricción <i>HindIII</i> .	52
9	Distribución de cepas identificadas bajo pruebas de identificación primaria.	56
10	Porcentaje de cepas por especie identificadas mediante perfiles de fermentación de carbohidratos.	62
11	Distribución de cepas por género identificadas mediante perfiles de fermentación de carbohidratos.	65
12	Patrones de bandas obtenidos tras la digestión del genoma con <i>HindIII</i> , electroforesis, transferencia Southern e hibridación con la sonda de ADNc que codifica la región 16S del ARNr.	68
13	Patrones de bandas obtenidos tras la digestión del genoma con <i>HindIII</i> , electroforesis, transferencia Southern e hibridación con la sonda de ADNc que codifica la región 16S del ARNr.	69
14	Patrones de bandas obtenidos tras la digestión del genoma con <i>HindIII</i> , electroforesis, transferencia Southern e hibridación con la sonda de ADNc que codifica la región 16S del ARNr.	70
15	Porcentaje de cepas por especie identificadas mediante ribotipificación.	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Pagina
1	Cultivos que se utilizan en los principales productos lácteos fermentados.	14
2	Efectos identificados y los probables mecanismos subyacentes de los probióticos.	21
3	Relación de cepas empleadas para los estudios de identificación mediante perfiles de fermentación y ribotipificación.	44
4	Relación de cepas identificadas bajo pruebas de identificación primaria.	56
5	Patrones de fermentación de las cepas identificadas.	58-59
6	Relación de cepas identificadas mediante perfiles de fermentación de carbohidratos.	62
7	Relación de cepas identificadas mediante ribotipificación.	72
8	Comparación entre la identificación fenotípica y genotípica de BAL aisladas de productos lácteos de elaboración artesanal.	75

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) están distribuidas extensamente en la naturaleza y presentes naturalmente en la microflora de una variedad de alimentos; son bacterias que desempeñan un papel importante en diversos tipos de fermentación. En este grupo están incluidos los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Weisella*, *Aerococcus* y *Oenococcus*. Por muchos siglos han servido para proporcionar una forma eficaz de preservación natural. Además, determinan fuertemente el sabor, la textura y, con frecuencia, el valor nutricional de los productos alimenticios (Aarnikunnas, 2006).

Actualmente las BAL se identifican como cocos o bacilos Gram positivas, no esporuladas, que presentan en su ADN un porcentaje de G-C menor del 55 mol%, fermentan los hidratos de carbono dando ácido láctico como producto único (homofermentadoras) o mayoritario (heterofermentadoras), tolerantes a los ácidos, catalasa y oxidasa negativas y microaerófilos (Jay, 1992; Muñoz, 2006).

La identificación clásica a nivel de bacterias lácticas en los productos alimenticios, depende principalmente de métodos fenotípicos, que son el conjunto de características celulares observables o cuantificables, como su morfología, propiedades fisiológicas, bioquímicas y por la estructura de sus componentes celulares. La identificación a nivel especie, sin embargo, conlleva un exceso de tiempo y grado de incertidumbre en los resultados al existir cepas atípicas o nuevas que no comparten ciertas características con el resto del grupo (Amann y Kühn, 1998).

Los métodos modernos de taxonomía incluyen análisis fenotípicos y genotípicos, lo que ha mejorado los resultados obtenidos disminuyendo el tiempo de análisis, más importante aún, aumentando la precisión en la clasificación taxonómica.

El propósito del presente trabajo fue la identificación de bacterias ácido lácticas mediante el empleo de técnicas de identificación fenotípica y genotípica para proporcionar mayor precisión a la caracterización de las bacterias. Las bacterias muestra fueron aisladas por Clavel (2006) de productos lácteos de producción artesanal en el estado de Hidalgo.

2. ANTECEDENTES

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

La interacción de las bacterias ácido lácticas en los alimentos fue descrita en un principio por Pasteur en 1857 en sus trabajos sobre fermentación ácido láctica, seguida del aislamiento del primer cultivo bacteriano puro de *Bacterium lactis* obtenido por Lister en 1873 (Stiles y Holzapfel, 1997).

El concepto de bacterias ácido lácticas como grupo de organismos se desarrolló a principios de 1900 precedido de científicos pioneros y desarrollos técnicos durante la última parte del siglo XIX (Stiles y Holzapfel, 1997).

Las bacterias ácido lácticas constituyen un grupo de bacterias Gram positivas, generalmente inmóviles, no esporuladas, con forma de cocos o bacilos. Son microorganismos fermentadores de carbohidratos con producción de ácido láctico como producto principal o único del metabolismo de las hexosas (Stiles y Holzapfel, 1997). Si bien son mesófilas, algunas son capaces de crecer a temperaturas inferiores a 5°C y otras a temperaturas tan altas como 45°C. Con respecto al pH de crecimiento, la mayoría desarrollan en una escala comprendida entre 4 y 4.5 aunque un grupo de ellas son capaces de crecer a pH tan bajo como 3.2 y otras a pH tan alto como 9.6; en cuanto a sus exigencias nutricionales, además de una fuente de energía como carbohidratos, las BAL necesitan aminoácidos preformados, vitaminas del grupo B, bases púricas y pirimidínicas (Stamer, 1976)

2.2 METABOLISMO DE AZÚCARES

Si bien el grupo de BAL no forma una familia bien definida, está integrado por diferentes géneros que comparten la propiedad de producir ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares. Desde el punto de vista bioquímico, la fermentación es el proceso catabólico anaeróbico en el que los carbohidratos y los compuestos afines son oxidados con liberación de energía en ausencia de aceptores externos de electrones. Los aceptores finales de electrones son compuestos orgánicos producidos directamente en el desdoblamiento de los carbohidratos. En la fermentación se produce la oxidación incompleta del compuesto inicial y solamente una pequeña cantidad de la energía es liberada durante el proceso (Jay, 2000).

Las BAL tienen dos rutas metabólicas para realizar la fermentación de monosacáridos, principalmente hexosas; éstas son la fermentación homoláctica, en otras palabras, la glucólisis (Vía Embden-Meyerhof-Parnas) (EMP) y la fermentación heteroláctica, vía del 6-fosfogluconato (6-FG) o la vía de las pentosas. Basado en estas vías principales de fermentación, las BAL han sido divididas en tres categorías metabólicas: homofermentativas obligadas, heterofermentativas obligadas y heterofermentativas facultativas. Las BAL homofermentativas poseen las enzimas aldosa y hexosaisomerasa, pero carecen de fosfoctolasa; por lo que sólo pueden fermentar azúcares mediante la vía EMP. Por otra parte las heterofermentativas, tienen fosfoctolasa pero no poseen ni aldosa ni hexosaisomerasa y, en lugar de degradar la glucosa por vía EMP, estos microorganismos utilizan la vía 6-fosfogluconato o la vía de las pentosas. Las cepas heterofermentativas facultativas tienen la capacidad de utilizar tanto la vía EMP como la vía 6-fosfogluconato o la vía de las pentosas (Axelsson, 2004).

Mientras que la fermentación homoláctica es útil para la industria agroalimentaria, siendo empleada para la fabricación de muchos productos lácteos, productos cárnicos y vegetales fermentados, la fermentación heteroláctica, en cambio, representa una de las causas más frecuentes en la producción de malos sabores en los mismos productos (Casp y Abril, 1999).

Homofermentativas (Vía Embden-Meyerhof-Parnas)

Se designan así a aquellos microorganismos que producen del 90 al 97% de ácido láctico a partir de la glucosa; e incluyen los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus* (Jay, 1992; Aarnikunnas, 2006).

En la glucólisis, bajo condiciones normales donde los azúcares no son limitados y el oxígeno es limitado, una molécula de glucosa teóricamente es fermentada a dos moléculas de ácido láctico con una ganancia neta de energía de dos moléculas de ATP, siendo el doble de energía de la que son capaces de extraer las bacterias heterofermentativas. Los primeros pasos del proceso, son la fosforilación e isomerización de glucosa a fructosa-1,6-difosfato y su división en dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato (G3F), después de varias reacciones el G3F es transformado en piruvato y finalmente, el piruvato es reducido a ácido láctico (Figura 1) por la enzima lactato deshidrogenasa usando NADH como cofactor. En la glucólisis el cofactor reducido NADH es oxidado de nuevo a NAD^+ y así se obtiene el equilibrio redox (Axelsson, 2004).

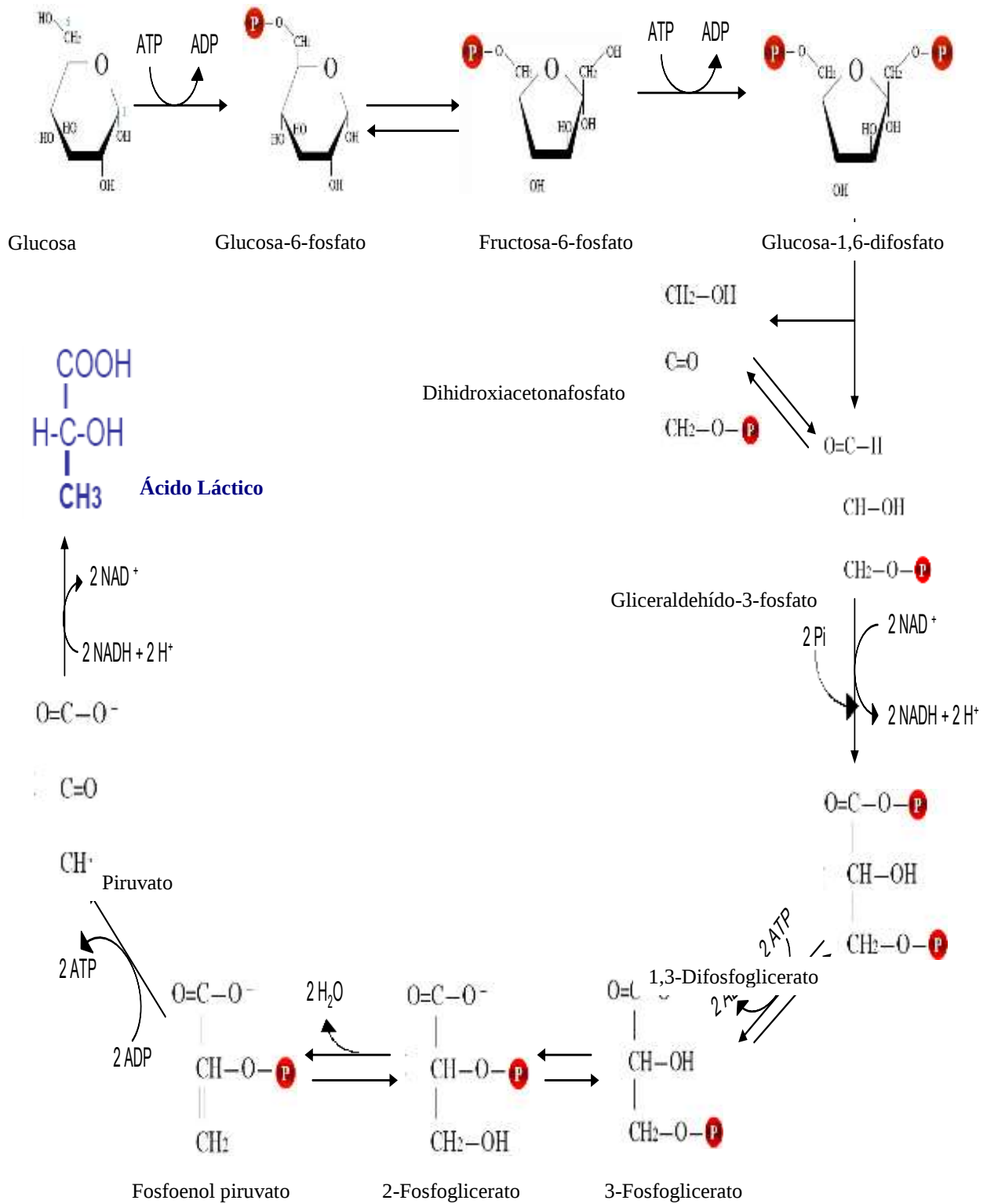


Figura 1. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Adaptada de Stryer, 1990)

Heterofermentativas (Vía del 6-fosfogluconato)

Se designan así a aquellas bacterias que producen un 50% de ácido láctico y cantidades apreciables de otros compuestos como: alcoholes, aldehídos y dióxido de carbono (CO₂); es decir, que producen cantidades equimolares de lactato, etanol y CO₂, a partir de las hexosas. Dentro de los microorganismos heterolácticos, los géneros más importantes son: *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, así como algunos *Lactobacillus* (Jay, 1992; Aarnikunnas, 2006). La vía del 6-fosfogluconato (Figura 2) comienza con la fosforilación de la glucosa a Glucosa-6-fosfato (siendo también la primera reacción en la glucólisis) las reacciones clave en esta vía son: la deshidrogenación de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato, su descarboxilación, seguida de epimerización y división de xilulosa-5-fosfato a gliceraldehído-3-fosfato y acetil-fosfato por medio de la fosfocetolasa. El G3F es metabolizado a ácido láctico por las mismas reacciones que en la vía EMP. Sin un aceptor adicional de electrones disponible, reducen el acetil-fosfato a etanol vía acetil-CoA. En teoría, la ganancia neta de energía en ATP's es un mol de ATP por cada mol de glucosa, que es sólo la mitad de lo obtenido en la glucólisis (Axelsson, 2004).

En la vía de las pentosas, los sustratos son transportados al interior de la célula y fosforilados a xilulosa-5-fosfato siguiendo después las reacciones de la vía 6-fosfogluconato (6-FG); sin la obtención de CO₂ y etanol. Mediante reacciones no oxidativas, esta vía cataliza también la interconversión de azúcares de tres, cuatro, cinco y siete carbonos (Stryer, 1990). Pocas especies de BAL pueden utilizar pentitales (p. e. ribitol, xilitol y D-arabitol); estos compuestos son introducidos a la célula y convertidos a sus respectivos pentitales-5-fosfato para ser oxidados y posteriormente entrar a la vía de 6-FG (Aarnikunnas, 2006).

Heterofermentativas facultativas

Son bacterias capaces de utilizar la vía EMP, 6-FG para dar como producto único o mayoritario ácido láctico; pudiendo utilizar también la vía de las pentosas empleando una fosfocetolasa inducida que les permite transformar las pentosas en ácido láctico y etanol/ácido acético (Sneath *et al.*, 1986; Aarnikunnas, 2006). El mayor número de especies que presenta este tipo de fermentación pertenecen al género de *Lactobacillus* con un aproximado de 12 especies; dentro del género *Pediococcus* existen 5 especies identificadas con la capacidad de realizar la fermentación mediante las rutas metabólicas mencionadas (Stiles y Holzapfel, 1997).

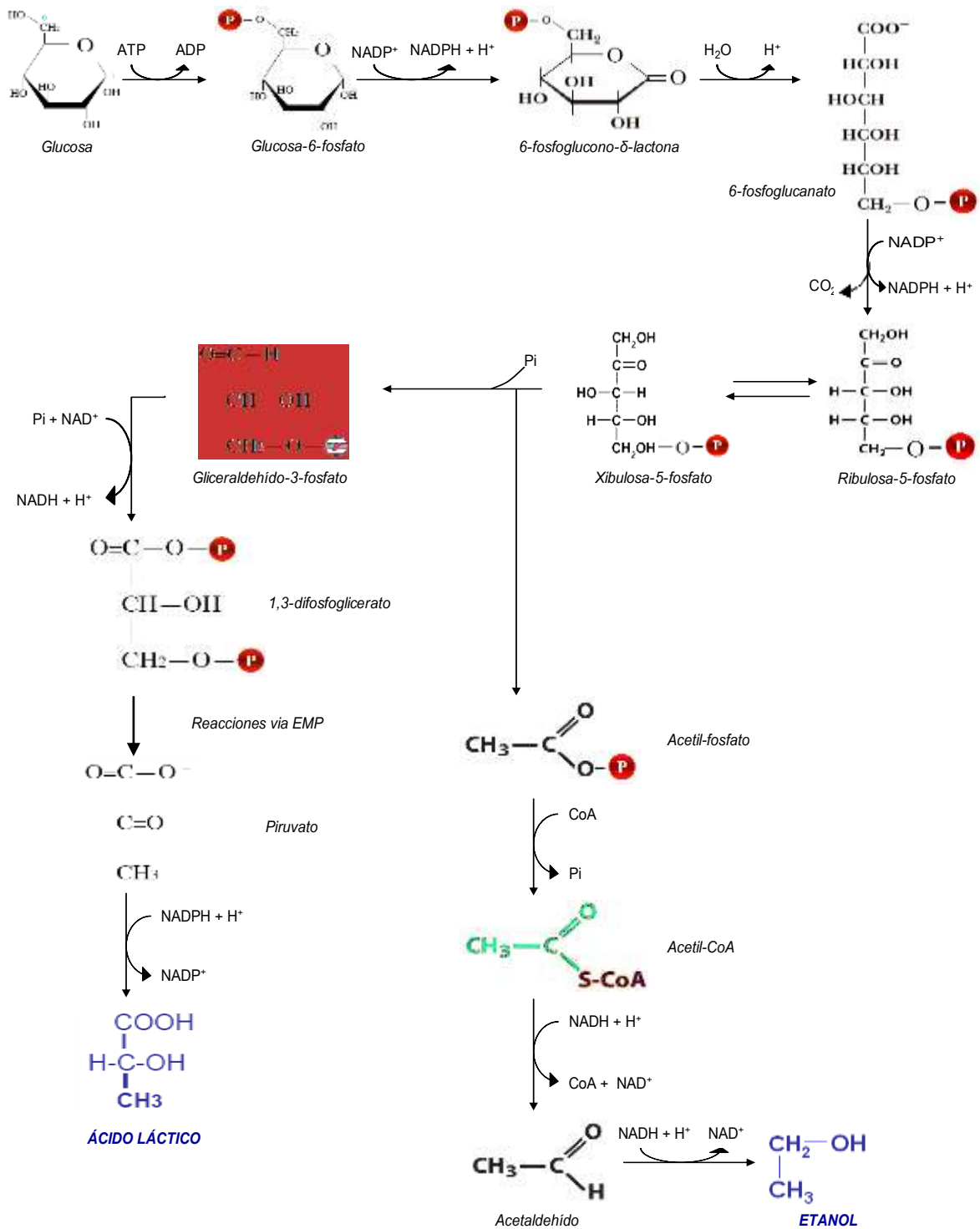


Figura 2. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Adaptada de Stryer, 1990)

2.3 GÉNEROS REPRESENTATIVOS DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las BAL son un grupo bacteriano heterogéneo que comprende alrededor de 20 géneros, de los cuales, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Weisella*, *Aerococcus* y *Oenococcus*; son los que tienen mayor incidencia en alimentos (Axelsson, 2004).

2.3.1 *Streptococcus*

Consiste en un grupo de bacterias Gram positivas, con forma esférica u ovoide de 0.8-1.2 μm , no presentan motilidad, típicamente dispuestos en pares o cadenas, catalasa negativas, crecen en condiciones anaeróbicas o microaerofílicas, las especies anaerobias no son de importancia en la microbiología de alimentos. Producen fermentaciones de tipo homoláctico, crecen a 37°C a concentraciones de NaCl menores a 4% (Wood y Holzapfel, 1995; FSANZ, 2006). Tienen un contenido de Guanina-Citosina (G-C) en el ADN de 34-46 mol% (Bascomb y Manafi, 1998).

2.3.2 *Enterococcus*

Comprende un aproximado de 30 especies de bacterias que fueron separadas del género *Streptococcus* al encontrar diferencias genéticas significativas entre las cepas. Son Gram positivas, con células esféricas, dispuestas individualmente, en pares o en cadenas cortas, catalasa negativas, no esporuladas, algunas cepas presentan motilidad. Crecen entre 10-45°C a concentraciones de 6.5 % de NaCl. Son bacterias anaerobias facultativas, homofermentativas produciendo como compuesto principal ácido láctico L (+). Tienen un contenido de G-C en el ADN de 37 a 40 mol% (Wood y Holzapfel, 1995).

Se han utilizado varias técnicas moleculares para identificar a este género a niveles de especie y cepa, tales como: análisis de perfiles de ADN por amplificación aleatoria (RAPD), polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), electroforesis en gel con campos pulsados (PFGE) y secuenciación de ARNr 16S. El análisis de AFLP y la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) están entre las técnicas más confiables para la identificación de las especies de *Enterococcus* (Naser *et al.*, 2005).

2.3.3 *Pediococcus*

Comprende bacterias pertenecientes al grupo de cocos, Gram positivas, catalasa negativas, de tamaño uniforme con 0.36-1.43 μm de diámetro, sin motilidad, no esporulados y un contenido de G-C en el ADN de 34 a 44 mol%. Se trata de bacterias esféricas cuya división tiene lugar en dos planos en ángulo recto con lo que se forman tétradas. Crecen bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas facultativas, fermentan la glucosa produciendo ácido láctico D o L (+), algunas especies utilizan diferentes carbohidratos como fuente de carbono (ribosa, xilosa, fructosa, manosa, maltosa, maltotriosa y almidón). Son generalmente acidófilos o acidúricos, disminuyendo el pH de los sustratos en los que crecen hasta por debajo de 4 (Dos Santos, 1993; Wood y Holzapfel, 1995).

El género consiste aproximadamente de 8 especies, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. parvulus*, *P. dextrinicus*, *P. damnosus*, *P. inopinatus*, *P. halophilus*, y *P. urinaeequi* (Simpson *et al.*, 2002). Para diferenciar entre cepas dentro del género *Pediococcus* se han usado varias técnicas moleculares. Éstas incluyen pruebas de secuenciación de ADN, ribotipificación, hibridación de DNA-DNA, secuenciación de genes ARNr 16S, análisis de perfiles de ADN por amplificación aleatoria (RAPD), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y electroforesis en gel con campos pulsados (PFGE) (Simpson *et al.*, 2002).

2.3.4 *Lactobacillus*

Son bacterias Gram positivas con forma de bacilos o cocobacilos no esporulados, aerotolerantes o anaerobios, acidúricos o acidófilos, con un G-C en el ADN de 33 a 50 mol% (Coeuret *et al.*, 2003), con requerimientos nutricionales complejos. Está integrado por alrededor de 124 especies (Koort, 2006) que incluyen especies homofermentativas obligadas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligadas. Utilizando la glucosa como fuente de carbono, los *Lactobacillus* pueden producir más de 85% de ácido láctico por la vía EMP; las especies heterofermentativas producen ácido láctico, CO_2 , etanol y/o ácido acético en cantidades equimolares. Las necesidades individuales de aminoácidos varían de dos a 15; en general, se requiere piridoxina, tiamina, riboflavina, biotina, ácido fólico y ácido nicotínico, variando las necesidades en cada caso.

Se encuentran en una gran variedad de ambientes ricos en carbohidratos, se han aislado de mucosas humanas y animales, productos vegetales, cárnicos y lácteos principalmente. Las especies homofermentativas están asociadas con el hombre y animales. Las especies heterofermentativas se asocian con alimentos, en donde llevan a cabo fermentaciones controladas o causan deterioro especialmente bajo refrigeración en productos empacados.

Para la identificación y caracterización de este género se han usado diferentes técnicas tanto moleculares como fenotípicas, siendo el análisis de la composición de ADN o de ARN (hibridación o secuenciación) la base para la clasificación taxonómica a nivel género. A nivel especie se han usado técnicas basadas en PCR que proporcionan datos sumamente confiables (Coeuret *et al.*, 2003).

2.3.5 *Lactococcus*

Se presentan en forma de cocos, dispuestos en pares o en cadena de longitud variable. Son bacterias Gram positivas, no esporuladas, sin flagelo, homofermentativas, que producen sólo ácido láctico L (+), anaerobias facultativas y microaerófilas. Su temperatura óptima de crecimiento es próxima a 30°C. Estas bacterias son termosensibles, no pueden crecer a concentraciones de NaCl de 6.5 % o cuando el pH es superior a 9.6 (Dellaglio *et al.*, 1994). Tienen un contenido de G-C en el ADN de 38-40 mol% (Bascomb y Manafi, 1998).

Se encuentran en productos como leche y cremas fermentadas, así como en los quesos donde son la microflora predominante y en los cuales desempeñan un papel irremplazable contribuyendo a la textura, sabor, y asegurando la conservación y la salubridad de los productos. El género *Lactococcus* tiene varias especies y subespecies, de las cuales los tres tipos siguientes son utilizados en la fabricación de quesos: *Lactococcus lactis* sbp. *lactis*, *Lactococcus lactis* sbp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* sbp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Doleyres, 2003).

2.3.6 *Leuconostoc*

Son bacterias Gram positivas en forma de cocobacilos, anaerobias facultativas, catalasa negativa, dispuestas en pares y cadenas (Facklam y Elliott, 1995). Tienen un contenido de G-C en el ADN de 38-44 mol%, algunas especies son acidotolerantes, reaccionan con el antisuero D de Lancefield, son bacterias heterofermentativas que producen ácido láctico D (+), etanol y CO₂.

Tienen una temperatura óptima de crecimiento de 20-30°C (Bascomb y Manafi, 1998). Las especies más importantes son: *L. cremoris*, *L. dextranicum*, *L. carnosum*, *L. argentinum*, *L. fallax*, *L. citreum*, *L. lactis*, *L. gelidum*, *L. mesenteroides*, *L. pseudomesenteroides* y *L. gasicomitatum*; que pueden ser aisladas de vegetales, leche y otros productos fermentados (Bascomb y Manafi, 1998).

Este género está involucrado en el deterioro de alimentos empacados al vacío, ricos en carbohidratos simples; sin embargo, son utilizados en forma controlada para la fabricación de algunos quesos debido a la generación de aromas apreciables. Su desarrollo es más lento que otras BAL, por lo que suelen ser desplazadas por otros cultivos iniciadores (Wood y Holzapfel, 1995).

Para identificar y caracterizar a cepas de éste género se han usado técnicas fenotípicas, sin embargo, debido a la similitud con otras especies de BAL, las técnicas moleculares de hibridación de ADN y secuenciación del ARNr 16S han sido de mayor utilidad para la correcta clasificación taxonómica de especies de *Leuconostoc* (Bascomb y Manafi, 1998).

2.3.7 *Vagococcus*

El género comprende bacterias Gram positivas, con células ovoides dispuestas individualmente, en pares y cadenas, son catalasa negativas, anaerobias facultativas. (Bascomb y Manafi, 1998). Presentan motilidad, reaccionan con antisuero grupo N, tienen un contenido de G-C en el ADN de aproximadamente 34 mol%. Crecen en caldo con NaCl a 6.5 % con temperatura óptima de 10 °C presentando poco desarrollo a temperaturas mayores de 40°C (Facklam y Elliott, 1995).

2.3.8 *Carnobacterium*

Comprende bacterias Gram positivas, en forma de bacilos dispuestos individualmente o en pares; que fueron separadas del género *Lactobacillus* al observarse diferencias significativas en cepas aisladas de algunos productos cárnicos. El tamaño de la célula varía de 0.5 a 0.7 µm, son psicrótrofos con metabolismo predominante homofermentativo, tienen menores exigencias nutricionales y son menos intolerantes al oxígeno.

Las especies más importantes, pueden diferenciarse de *Lactobacillus* por su capacidad de crecimiento a pH de 9.0, ausencia de crecimiento en agar acetato y un contenido bajo de G-C en el ADN de 32-36 mol%: *C. alterfunditum*, *C. funditum*, *C. mobile*, *C. divergens*, *C. inhibens*, *C. gallinarum* y *C. piscicola* (Wood y Holzapfel 1995; Rachman *et al.*, 2004).

2.3.9 *Tetragenococcus*

Consiste de bacterias Gram positivas, con células ovoides dispuestas en pares o tétradas, son catalasas negativas, anaerobias facultativas. Se diferencian del género *Pediococcus* por su incapacidad para crecer en medios con vancomicina; sin embargo comparten diferentes características fisiológicas (Facklam y Elliot, 1995). Tienen un contenido de G-C en el ADN de 34-36 mol% (Bascomb y Manafi, 1998).

2.3.10 *Weissella*

El género comprende bacterias Gram positivas, catalasa negativas, anaerobias facultativas, que fueron separadas de otros géneros por diferencias genéticas. Siendo las siguientes, las especies más importantes: *Weissella confusa*, *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica*, *Weissella kandleri*, *Weissella minor*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella thailandensis* y *Weissella viridescens* (Björkroth *et al.*, 2002).

2.3.11 *Aerococcus*

Consiste en un grupo de bacterias Gram positivas en forma de cocos. La división celular tiene lugar en dos planos en ángulo recto, resultando en disposiciones de tétradas, y de racimos; aunque también se pueden encontrar individualmente y por pares. Son bacterias anaerobias facultativas, catalasa negativas, aunque algunas cepas puedan producir débilmente una reacción positiva (Facklam y Elliott, 1995). Poseen un contenido de G-C en el ADN de 35-40 mol% (Bascomb y Manafi, 1998).

Para la identificación específica del género, se han usado pruebas de tolerancia de crecimiento como: el crecimiento a 45°C, crecimiento en presencia de bilis al 40%, y el crecimiento en pH 9.6; simultáneamente se realizan pruebas enzimáticas como: hidrólisis de esculina, y arginina. Para la identificación a nivel genético se ha usado la secuenciación del ARNr 16S (Facklam y Elliott, 1995).

2.3.12 *Oenococcus*

Bacterias Gram positivas, con células ovoides dispuestas en pares o cadenas. Heterofermentativas, catalasa negativas, no esporuladas, sin motilidad, anaerobias facultativas. Comparten ciertas características fisiológicas y genéticas con el género *Leuconostoc* del cual fueron separadas debido a que *Oenococcus* desarrolla en condiciones acidófilas, por la tolerancia a concentraciones de etanol de 10% y diferencias de tipo genético como el contenido de C-G en el ADN que en este género es de 38-42 mol%. Debido a la tolerancia a etanol y pH bajo, se emplean en la elaboración del vino para realizar la fermentación maloláctica subsiguiente a la fermentación alcohólica (Dicks *et al.*, 1995; Aixalà, 2002; Wagner *et al.*, 2005).

2.4 USOS TECNOLÓGICOS DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las BAL son utilizadas ampliamente en la industria para realizar procesos de fermentación en un gran número de productos de origen animal o vegetal. Sin embargo la adición de estos microorganismos tiene diferentes propósitos. Los géneros de BAL más empleados son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* (Champagne, 1998).

2.4.1 CULTIVOS INICIADORES

Son microorganismos inoculados en productos alimenticios con el objetivo de reemplazar la flora microbiana endógena de la materia prima para mejorar los procesos de fermentación y desarrollar procesos metabólicos deseados que resulten en compuestos generadores de sabor, aroma o textura. En productos lácteos, los cultivos iniciadores se seleccionan teniendo en cuenta su estabilidad y capacidad para producir de forma eficaz los alimentos o las modificaciones deseadas. Las funciones esenciales por las que se utilizan los cultivos pueden resumirse de la siguiente forma: (Frazier y Westhoff, 1993; ICMSF 1980).

- Producción de ácido láctico, la acumulación de este compuesto proporciona un típico sabor y olor a ácido durante la fabricación de leches fermentadas. En el caso del queso, el ácido láctico adquiere importancia en la coagulación de la leche y formación de la cuajada.
- Producción de componentes volátiles como diacetilo y acetaldehído que contribuyen al sabor y aroma de productos lácteos.

- Pueden poseer actividades proteo y/o lipolíticas que son deseables, especialmente durante la maduración de ciertos tipos de quesos.
- Producción de otros compuestos como etanol por cepas de bacterias heterofermentativas, teniendo importancia la elaboración de Kéfir y Kumiss.
- Producción de compuestos con capacidad antimicrobiana previniendo el crecimiento de patógenos y otros microorganismos alterantes de los alimentos.

Anteriormente, los cultivos iniciadores existentes en el mercado eran concentrados celulares congelados en nitrógeno líquido, que permitían una siembra directa en las cubas de fermentación. Este método de conservación, elimina la necesidad de realizar las resiembras sistemáticas inherentes al mantenimiento de una colección de microorganismos, evitando así, riesgos de contaminación de los cultivos lácteos. Si bien este sistema ha funcionado a lo largo de los años, la forma más sofisticada para comercializar los cultivos es en forma liofilizada; el proceso de liofilización consiste en eliminar el agua a un medio acuoso congelado sometiéndolo a un alto vacío que hace pasar el agua del estado sólido al estado gaseoso sin pasar por un estado líquido, con este proceso se obtienen productos de una mayor calidad y al eliminar la necesidad de mantener en congelación las cepas, se obtienen productos de vida útil prolongada (Frazier y Westhoff, 1993; Leveau y Bouix, 2000).

Los cultivos iniciadores más empleados suelen estar compuestos por una o más cepas de bacterias ácido lácticas, entre las cuales destacan los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (Tabla 1) (Frazier y Westhoff, 1993).

CULTIVO	MISIÓN DEL CULTIVO	APLICACIÓN
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Sabor y formación de orificios	Queso Emmental (suizo)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sbp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. brevis</i>	Acidez y sabor	Yogurt, kumiss y quesos Emmental e italiano Kéfir
<i>L. acidophilus</i>	Acidez	Suero de mantequilla ácido, queso Emmental, Cheddar e italiano y yogurt
<i>Streptococcus termophilus</i>	Acidez	Nata agria, suero de mantequilla madurada, queso y suero de mantequilla
<i>S. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	Acidez y sabor	Suero de mantequilla cultivado, nata agria, requesón, quesos
<i>S. lactis</i> sbp. <i>lactis</i>	Acidez	Suero de mantequilla cultivada, nata agria, requesón, quesos
<i>S. faecium</i> <i>S. faecalis</i>	Acidez y sabor	Quesos blandos italianos, Cheddar y suizo
<i>Leuconostoc cremoris</i>	Sabores	Suero de mantequilla cultivado y mantequilla madurada

Tabla 1. Cultivos que se utilizan en los principales productos lácteos fermentados (Frazier y Westhoff, 1993).

2.4.2 PRESERVACIÓN DE ALIMENTOS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Todos nuestros alimentos derivan de plantas o de animales, son por lo tanto de naturaleza biológica y es, precisamente, esta naturaleza biológica la causa del desarrollo de una serie de transformaciones que no sólo modifica sus características originales, sino que llegan a producir su deterioro. En estas transformaciones se incluyen reacciones químicas y bioquímicas, pero además, los alimentos que consumimos, son también adecuados para muchos microorganismos exógenos que intervienen en el deterioro de los alimentos (Casp y Abril, 1999).

Debido a su metabolismo, las BAL desempeñan un papel importante en la obtención de alimentos fermentados. Además de conferir características organolépticas diferentes y deseables; las BAL también desempeñan una función conservadora en los alimentos, debido a la competencia por los nutrientes y a la producción de metabolitos que inhiben el desarrollo de bacterias alterantes y patógenas. Es conocido que la utilización de BAL bacteriocinogénicas en los alimentos es una práctica que se lleva realizando, intencionada o inadvertidamente, durante siglos; por lo que sin duda, la utilización de BAL o sus metabolitos como bioconservantes o bioconservadores en conjunto con otros sistemas de conservación de los alimentos permitiría incrementar la vida útil de los alimentos, compatibilizar la obtención de alimentos más seguros con una reducción considerable de las cantidades de aditivos químicos empleados habitualmente y/o la intensidad de los tratamientos aplicados (Gutiérrez, 2005).

2.4.3 COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

El efecto antimicrobiano primario ejercido por BAL es la producción del ácido láctico y de la reducción del pH (Daeschel 1989). Además, este proceso reduce la cantidad de carbohidratos disponibles produciendo compuestos antimicrobianos que se pueden clasificar como moléculas de bajo peso molecular, siendo las más comunes el ácido láctico ($C_3H_6O_3$), acético ($C_2H_4O_2$) y propiónico ($C_3H_6O_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dióxido de carbono (CO_2), diacetilo ($C_4H_6O_2$), acetaldehído (C_2H_4O); y moléculas de alto peso molecular denominadas bacteriocinas y algunos compuestos sin caracterizar (Piard y Desmazeaud, 1991; 1992; Ouwehand, 1998).

2.4.3.1 ÁCIDOS ORGÁNICOS

La fermentación realizada por BAL se caracteriza por la acumulación de ácidos orgánicos, originando la reducción de pH. Los niveles y los tipos de ácidos orgánicos producidos durante el proceso de fermentación dependen de la especie de microorganismo, de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de crecimiento (Lindgren y Dobrogosz, 1990). El efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos está en la reducción de pH, así como en la forma no disociada de las moléculas (Gould, 1991; Podolak *et al.*, 1996). Se ha propuesto que el pH bajo externo cause la acidificación del citoplasma de la célula, mientras el ácido no disociado, siendo lipofílico, puede difundirse de forma pasiva a través de la membrana (Kashket, 1987). El ácido no disociado actúa colapsando el gradiente electroquímico, o alterando la permeabilidad de la membrana celular que causa la interrupción de los sistemas de transporte de sustrato (Smulders *et al.*, 1986; Earnshaw, 1992).

Ácido láctico

El ácido láctico es el metabolito principal de la fermentación realizada por BAL donde está en equilibrio con sus formas no disociadas y disociadas, el grado de disociación depende del pH. En pH bajo, una cantidad grande de ácido láctico está en forma no disociada, y es tóxico para muchas bacterias, hongos y levaduras; sin embargo los microorganismos varían bastante en su sensibilidad frente al ácido láctico (Woolford, 1975).

Ácidos acético y propiónico

Estos ácidos producidos por BAL mediante procesos heterofermentativos, pueden interactuar con la membrana celular causando acidificación intracelular y la desnaturalización de proteínas (Huang *et al.*, 1986). Son antimicrobianos más eficaces que el ácido láctico debido a su alto pKa (el ácido láctico 3.08, el ácido acético 4.75, y el ácido propiónico 4.87), y por el porcentaje más alto de ácido no disociado en un dado pH (Earnshaw, 1992). El ácido acético produce mayor inhibición que el ácido láctico y cítrico hacia *Listeria monocytogenes* (Ahamad y Marth, 1989; Richards *et al.*, 1995) y hacia el crecimiento de *Bacillus cereus* (Wong y Chen, 1988). El ácido acético actúa de manera sinérgica con el ácido láctico; el ácido láctico disminuye el pH del medio, aumentando la capacidad antimicrobiana del ácido acético (Adams y Hall, 1988).

2.4.3.2 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Es producido por BAL en presencia de oxígeno como consecuencia de la acción enzimática de la flavoproteína oxidasa o hidroxinicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y de la peroxidasa. El efecto antimicrobiano del H_2O_2 puede ser resultado de la oxidación de grupos sulfhidrilo que causan la desnaturalización de ciertas enzimas, y la peroxidación de lípidos de la membrana celular aumentando la permeabilidad (Kong y Davison, 1980). El H_2O_2 también puede ser un precursor para la producción de radicales libres bactericidas como el superóxido (O_2^-) e hidroxilo ($OH^\cdot$) radicales que pueden dañar el ADN (Byczkowski y Gessner, 1988).

Se tienen reportes de la producción de H_2O_2 por *Lactobacillus* y *Lactococcus* inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. y varios microorganismos psicrótrofos en alimentos (Davidson *et al.*, 1983; Cords y Dychdala, 1993).

En la leche cruda, el H_2O_2 activa el sistema lactoperoxidasa, produciendo hipocianato ($OSCN^-$), oxiácidos más altos (O_2SCN^- y O_3SCN^-) y productos de oxidación intermedios que inhiben un amplio espectro de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Reiter y Härnult, 1984; Conner, 1993).

2.4.3.3 DIÓXIDO DE CARBONO

El dióxido de carbono (CO_2) es producido principalmente por BAL heterofermentativas. El mecanismo exacto de su acción antimicrobiana es todavía desconocido. Sin embargo, el CO_2 puede desempeñar un papel en la creación de un ambiente anaerobio que inhibe la descarboxilación enzimática, y la acumulación de CO_2 en la bicapa lipídica de la membrana celular, originando una disfunción en la permeabilidad (Eklund, 1984).

El CO_2 puede inhibir con eficacia el crecimiento de varios microorganismos esporulados presentes en alimentos, especialmente bacterias psicrótrofas Gram negativas (Farber, 1991; Hotchkiss *et al.*, 1999). El grado de inhibición por CO_2 varía bastante entre los microorganismos. Con una concentración de CO_2 de 10% podría bajar las cuentas bacterianas totales en 50% (Wagner y Moberg, 1989), y a una concentración de 20-50%, muestra una fuerte actividad inhibitoria contra hongos (Lindgren y Dobrogosz, 1990).

2.4.3.4 DIACETILO

El diacetilo es producido por cepas de todos los géneros de BAL por la fermentación de citrato. El efecto antimicrobiano del diacetilo se conoce desde 1930 (Jay, 1982). Este compuesto inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas contrarrestando la utilización de la proteína fijadora de arginina. La mayor resistencia de las bacterias lácticas Gram positivas parece ser debida a que carecen de proteínas periplásmicas fijadoras similares y a que poseen mayor reserva de aminoácidos (Jay, 2000)

2.4.3.5 ACETALDEHÍDO

El acetaldehído es producido por *L. delbrueckii* sbp. *bulgaricus* por la acción de la enzima treonina aldolasa, desdoblando la treonina en acetaldehído y el glicina. Puesto que *L. delbrueckii* sbp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* no pueden metabolizar el acetaldehído en yogurt, éste se acumula en el producto a una concentración cercana de 25 ppm. El acetaldehído en concentraciones de 10-100 ppm inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y de *Escherichia coli*, en los productos lácteos (Piard y Desmazeaud, 1991).

2.4.3.6 ÁCIDOS GRASOS

En ciertas condiciones, algunas especies de *Lactobacillus* y *Lactococcus* que poseen actividad lipolítica pueden producir cantidades significativas de ácidos grasos, por ejemplo en la salchicha seca fermentada (Sanz *et al.*, 1988) y leche fermentada (Rao y Reddy, 1984). La actividad antimicrobiana de los ácidos grasos ha sido reconocida desde hace varios años. Los ácidos grasos insaturados son activos contra bacterias Gram positivas, la actividad de los ácidos grasos en contra de hongos depende de la longitud de cadena, la concentración, y pH del medio (Gould, 1991). La acción antimicrobiana de los ácidos grasos, como se ha pensado, es debido a la molécula no disociada y no al anión, ya que pH tenía efectos profundos sobre su actividad, con un efecto de inhibición más rápido en pH bajo (Kabara, 1993).

2.4.2.7 BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas son péptidos cortos de origen microbiano, con propiedades antimicrobianas y un gran potencial como agentes conservantes naturales en alimentos. Las más conocidas son la nisina, la pediocina y la lactococcina.

Son sustancias biológicamente activas, ejerciendo efecto microbicida contra especies estrechamente relacionadas con la cepa productora de la bacteriocina. También actúan frente a otros microorganismos entre los que se encuentran muchas bacterias alterantes y patógenas frecuentes en los productos. Su mecanismo de acción consiste en destruir la membrana plasmática microbiana mediante la formación de poros. Para ello, estos péptidos se unen a los fosfolípidos de la membrana con interacciones electrostáticas. Posteriormente se insertan en ella y originan agregados proteicos a partir de los cuales se forman los poros. A través de dichos poros se produce la salida de una multitud de compuestos imprescindibles para la célula (protones y otros iones, ATP, aminoácidos) lo que desencadena su muerte debido a la inhibición de la síntesis de macromoléculas y la producción de energía (González-Martínez *et al.*, 2003).

Entre las características de las bacteriocinas destacan su resistencia a altas temperaturas, a la acidez y a la baja actividad de agua, lo que amplía el número de productos donde serían aplicables. Así mismo, cuando se utilizan bacteriocinas parcialmente purificadas, se minimizan los cambios de textura y sabor en los alimentos. En un futuro próximo los aditivos químicos podrían reemplazarse por estas sustancias naturales que producen microorganismos considerados seguros para la salud. Además, se trata de compuestos que hidrolizan las enzimas gástricas y que no generan metabolitos tóxicos al degradarse, de manera que su inactivación e inocuidad en el organismo queda garantizada (González-Martínez *et al.*, 2003).

2.4.4 PROBIÓTICOS

La historia de los probióticos y las propiedades benéficas de los cultivos microbianos vivos en productos lácteos fermentados se conocen desde hace varios siglos. (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

En 1907 el biólogo ucraniano y premio Nóbel, Elie Metchnikoff sentó las bases para el desarrollo del término probiótico y el fenómeno relacionado denominado probiósis. La probiósis puede definirse como el efecto benéfico del consumo de productos lácteos con cultivos microbianos viables. En 2003 Reid acuñó la última definición para describir los probióticos, definiéndoles como “*microorganismos vivos que cuando se suministran en cantidades adecuadas confieren beneficios sobre la salud en el anfitrión*” (Reid *et al.*, 2003).

Los efectos benéficos (Tabla 2) están expresados ya sea directamente por la interacción de microorganismos vivos con el huésped, o bien, indirectamente como resultado de la ingestión de los metabolitos microbianos producidos durante el proceso de fermentación (Stanton *et al.*, 2005)

Varios géneros de bacterias lácticas han sido identificadas con beneficios a la salud. Aunque la mayor parte de los probióticos pertenecen al género *Lactobacillus* (Prasad *et al.*, 1998), hay también otras especies de los géneros *Lactococcus* y *Enterococcus* considerados como probióticos (Grant y Salminen, 1998; Salminen y von Wright, 1998; Dunne *et al.*, 1999; Sanders y Huis in't Veld, 1999). Para que un microorganismo sea considerado como un adjunto dietético, es valioso que ejerza una influencia positiva y cumplir ciertos criterios. Las características más importantes de un probiótico son:

- Debe pertenecer a la microflora de un tracto digestivo sano (humano)
- Sobrevivir la vía digestiva superior
- Ser capaz de sobrevivir y desarrollar en el intestino
- Producir efectos benéficos una vez adherido al intestino
- Presentar resistencia a secreciones en el tracto digestivo (ácidos y bilis)
- Seguro para el consumo humano
- Producción de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas
- Adhesión a células humanas intestinales y colonización
- Otras características importantes son, la evaluación taxonómica, identificación de la especie, el fenotipo y la morfología de las bacterias lácticas probióticas (Sanders, 2003).

En el tracto digestivo, los probióticos usan como fuente de carbono a compuestos denominados prebióticos. Un prebiótico es definido como un ingrediente no digestible de los alimentos que beneficia al hospedero, estimulando con criterio selectivo el crecimiento, la actividad, o ambos, de un número limitado de especies bacterianas una vez adheridas en el colon (Collins y Gibson, 1999). Los prebióticos están identificados como carbohidratos no digestibles que incluyen lactitol, lactulosa, inulina, almidón resistente y una gama de oligosacáridos que suministran una fuente de carbohidratos fermentables para los probióticos (Crittenden, 1999).

BENEFICIOS	TRASTORNOS	MECANISMOS PROPUESTOS
Confort digestivo	Síndrome del colon irritable, síntomas en el tracto gastrointestinal en general (estreñimiento, diarrea no patógena, hinchazón, flatulencias, calambres, mal aliento de origen digestivo)	Alteración de la población o de la actividad de la microflora intestinal
	Intolerancia a la lactosa	Liberación de lactasa microbiana en el intestino delgado.
Defensa	Alergia (eczema atípico, alergia a la leche y poliartritis reumatoide)	Translocación, efecto barrera
	Cariogenecidad	Modificación de la población, de la actividad de la microflora oral o de su capacidad para adherirse a los dientes
	Carcinogenicidad, mutagenicidad, tumor	Absorción del mutágeno, estimulación inmunitaria, inhibición de la producción carcinógena de la microflora intestinal
	Diarreas asociadas a los antibióticos. Diarreas por <i>Rotavirus</i> , colitis por <i>C. difficile</i> , diarreas por <i>Helicobacter pylori</i>	Exclusión competitiva, translocación/ efecto barrera, respuesta inmunitaria favorable. Actividad antipatogénica
	Inmunomodulación (estado inmunitario, respuesta a las vacunas)	Interacción con las células inmunitarias o los receptores celulares susceptible de provocar un aumento de la actividad de fagocitosis de los glóbulos blancos, de incrementar las IgA tras una exposición al antígeno, de aumentar la proliferación de leucocitos intraepiteliales y de regular la relación entre Th1/Th2, inducción de la síntesis de citoquinas.
	Inflamación intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, pouchitis	Ponderación de la respuesta inmunitaria
	Crecimiento excesivo de las bacterias intestinales	Actividad antimicrobiana, exclusión competitiva
Otros	Reducción de la colesterolemia	Desconjugación de los ácidos biliares
	Endotoxemia asociada a una cirrosis	Inhibición de la producción de endotoxinas por la microflora intestinal
	Hipertensión	Componentes celulares o péptidos procedentes de la fermentación, que actúan como inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina
	Cálculos renales	Alteración de la flora digestiva susceptible de influenciar la degradación del oxalato

Tabla 2. Efectos identificados y los probables mecanismos subyacentes de los probióticos (Adaptada de Corthier 2004)

Las ventajas de los prebióticos para los probióticos han dado lugar al concepto de simbióticos, en el cual probióticos y prebióticos son usados en combinación. Como la palabra alude al sinergismo, este término es reservado para productos en los cuales el compuesto prebiótico con criterio selectivo favorece el crecimiento de los probióticos. Las adiciones vivas microbianas (probióticos) pueden ser usadas en la conjunción con sustratos específicos (prebióticos) para mejorar la viabilidad y capacidad de desarrollo de los probióticos (ej. un fructooligosacárido o galactooligosacárido en conjunción con cepas de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* con lactilol) (Gibson y Roberfroid, 1995; Schrezenmeir y de Vrese, 2001). Se ha propuesto que esta combinación podría mejorar considerablemente la supervivencia de probióticos, así como ofrecer ventajas de equilibrio microecológico de la microflora intestinal (Gibson, 2004).

2.5 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

Para el análisis de bacterias ácido lácticas se ha recurrido a la determinación de características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, que permiten establecer la identidad de un microorganismo. Sin embargo estas técnicas no proporcionan suficiente información, requieren de mucho tiempo para el análisis y además confían en características visuales subjetivas. No obstante, el intenso y extraordinario avance de la biología molecular en los últimos años, ha permitido desarrollar nuevos métodos de tipificación que facilitan y aportan mayor precisión a la clasificación taxonómica.

2.5.1 MÉTODOS FENOTÍPICOS

Los métodos tradicionales de identificación se basan en el estudio de aspectos fenotípicos y fisiológicos de la población. Por lo general, la identificación comienza con el examen morfológico de las colonias aisladas en medios sólidos. El estudio continúa con el examen microscópico de un extendido de los microorganismos aislados, coloreados según la técnica de Gram. A partir de aquí se inoculan las pruebas bioquímicas tradicionales, donde se requieren cultivos puros del microorganismo en cuestión para obtener una biomasa suficiente capaz de evidenciar los cambios en las pruebas utilizadas como son: sistemas indicadores de pH, formación o degradación de determinadas sustancias y actividades enzimáticas (Nieto *et al.*, 2004).

La identificación fenotípica a nivel de género y especie, se basa en las siguientes características fisiológicas y bioquímicas (Alais, 1980):

- Crecimiento a diferentes temperaturas (10, 37, 45°C).
- Tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (2, 4, 6.5 %).
- Sobrevivencia al tratamiento térmico (63 y 65°C)
- Fermentación de carbohidratos, principalmente: fructosa, glucosa, galactosa, arabinosa, trehalosa, ramnosa, maltosa, rafinosa, manosa, xilosa, dextrosa, amigdalina, celobiosa, melecitosa, melibiosa, ribosa, salicina, sorbitol y sacarosa.
- Producción de acetoina.
- Hidrólisis de esculina.

Los métodos fenotípicos de tipificación son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos, debido a que la expresión de un carácter fenotípico es el resultado de la interacción del genotipo con el ambiente y, por tanto, es susceptible de modificarse cuando las condiciones ambientales varían (Narváez, 2005).

2.5.1.1 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR

Contrariamente a la pared celular, notablemente uniforme de las bacterias Gram negativas, la pared celular de las bacterias Gram positivas contiene varias capas de peptidoglicanos (por lo general más del 30 % de la pared celular) que varía enormemente en la composición y el arreglo estructural (Schleifer y Kandler, 1972; Schleifer y Stackebrandt, 1983). Además de peptidoglicanos, la pared celular de bacterias Gram positivas consiste en polisacáridos, ácidos teicoicos, teicurónicos y/o lipoteicoicos (Schleifer y Stackebrandt, 1983).

En general, el tipo de peptidoglicanos es un carácter bastante estable (Schleifer y Kandler, 1972). Mientras la mitad glicano de los peptidoglicanos es sumamente constante, las diferencias en la secuencia de aminoácidos de los tallos de los péptidos de los peptidoglicanos y el modo de acoplamiento entre los tallos puede ser usado en la diferenciación de especie. La determinación de la composición de la pared celular puede realizarse por métodos enzimáticos y químicos (Schleifer y Kandler, 1972).

El análisis de los interpuentes de los peptidoglicanos es sobre todo viable en la diferenciación del género *Weissella* de otros géneros de BAL (Björkroth y Holzapfel, 2003), y el tipo A3 α (L-lys-L-ser-L-Ala₂) de *Weissella minor* se ha encontrado en *Lactobacillus rossiae* (Corsetti *et al.*, 2005). Determinar la ausencia o presencia del ácido meso-diaminopimélico puede emplearse en lugar de la determinación laboriosa de peptidoglicanos para identificar rápidamente un número grande de cepas de *Lactobacillus* (Kandler y Weiss, 1986; Hammes y Hertel, 2003).

Los polisacáridos de la pared celular de BAL diferentes al genero *Streptococcus* son pobremente estudiados (Trüper y Schleifer, 1999). En *Streptococcus* estos compuestos forman la base para el agrupamiento serológico Lancefield agrupando a excepción de los serogrupos D y N (Schleifer y Kandler, 1972).

El ácido teicurónico esta formado por un azúcar unido mediante enlaces glucosídicos a residuos de ácido urónico. Los ácidos teicoicos son polímeros solubles en agua que contienen azúcar, residuos de D-alanina, y glicerol o fosfatos ribitol. El ácido teicoico puede ser dividido en dos clases; ácido teicoico de la pared celular y ácido lipoteicoico de la membrana celular. Los ácidos teicoicos de la pared celular se encuentran sólo en un número limitado de bacterias Gram positivas (Schleifer y Stackebrandt, 1983). Los serogrupos Lancefield D (*Enterococcus*) y N (*Lactococcus*) están basados en la determinación de ácidos teicoicos (Schleifer y Kandler, 1972). La presencia o ausencia de ácidos teicoicos puede ser usada para diferenciar por ejemplo especies de *Lactobacillus* (Kandler y Weiss, 1986).

2.5.1.2 DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS CELULARES

Las células tienen una variedad de lípidos en su estructura, los lípidos polares son los componentes principales de las membranas bacterianas. Los ácidos grasos son los mayores constituyentes de los lípidos y han sido usados ampliamente para propósitos taxonómicos. Se han identificado más de 300 estructuras químicas de ácidos grasos. Para realizar los análisis taxonómicos se han tomado en cuenta algunos factores como, la variabilidad en la longitud de la cadena hidrocarbonada, la posición de los dobles enlaces y grupos substituyentes en la cadena (Vandamme *et al.*, 1996).

Generalmente los ácidos grasos celulares se extraen por completo, sin embargo sólo se usa la fracción de ácidos polares para el análisis taxonómico. La composición de ácidos grasos metil éster en la célula es considerada como un buen parámetro a condición de que se usen cultivos altamente estandarizados (Vandamme *et al.*, 1996).

Los ácidos grasos en bacterias Gram positivas se encuentran en la membrana citoplasmática, que está formada por aproximadamente el 50% de lípidos. Estos lípidos de la membrana son un grupo diverso de las moléculas que pueden ser usadas como marcadores para la clasificación y la identificación de microorganismos. Las células para el análisis de ácidos grasos, deben ser cultivadas en condiciones estandarizadas, debido a que la composición de ácidos grasos depende de varios factores incluyendo medios de crecimiento y la fase de crecimiento. El análisis por lo general se realiza mediante cromatografía de gas. En BAL, los perfiles celulares de ácidos grasos han sido usados para la identificación y caracterización de *Leuconostoc*, *Weissella* y *Oenococcus oeni* (Samelis *et al.*, 1998; Björkroth y Holzapfel, 2003). La composición de ácidos grasos puede ser usada para la identificación y clasificación de diferentes especies de *Carnobacterium* (Hammes y Hertel, 2003).

2.5.1.3 DETERMINACIÓN DE QUINONAS ISOPRENOIDES

Son compuestos localizados en la membrana citoplasmática, participan activamente en la fosforilación oxidativa, en el transporte de electrones, el transporte activo y pasivo. Existen dos grupos estructurales, las naftoquinonas y las benzoquinonas. Las naftoquinonas pueden ser divididas en dos tipos principales, las filoquinonas que se encuentran en menor proporción en bacterias y las menaquinonas que son producidas por bacterias. Para estudios taxonómicos a diferentes niveles se utiliza la variabilidad en la estructura de las menaquinonas, como el número de sustituyentes isopreniles y la longitud de la cadena, esto se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Vandamme *et al.*, 1996).

2.5.1.4 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS CELULARES

Una cepa bacteriana produce siempre el mismo tipo de proteínas al ser cultivadas en condiciones estandarizadas. El electroforegrama, producido por la electroforesis de zona de estas proteínas en condiciones bien definidas, puede ser considerado como una especie de huella digital de las cepas bacterianas.

Una de las técnicas usadas para este análisis, es la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) donde se determina el contenido proteico de la célula entera, éste es un método relativamente simple y barato que ya ha sido usado para la identificación y la clasificación de BAL. El procedimiento entero consiste en varios pasos experimentales, del cultivo de la cepa al análisis del electroforegrama. El SDS-PAGE separa las proteínas en piezas de acuerdo a la carga y peso molecular. Una modificación a la técnica consiste en no utilizar compuestos desnaturizantes, esta puede ser usada como una técnica complementaria, separando las proteínas celulares según su carga y tamaño, proporcionando alta resolución y buena definición en las bandas (Coeuret *et al.*, 2003).

2.5.1.5 MICROMÉTODOS

Los métodos microbiológicos tradicionales son laboriosos y lentos, esto ha provocado el desarrollo de métodos rápidos, fiables y menos costosos para detectar e identificar microorganismos. Las pruebas bioquímicas y enzimáticas se han utilizado desde el comienzo de la bacteriología para estudiar la actividad metabólica y así poder identificar los diferentes microorganismos. A través de los años, han comenzado a utilizarse sistemas miniaturizados de identificación que consisten en galerías con sustratos para evidenciar en forma clara una determinada actividad metabólica.

Todos los micrométodos de identificación comerciales están basados en una de cinco tecnologías diferentes o una combinación de ellas. Estos incluyen, reacciones para identificar cambios de pH que requieren de 15 a 24 h de incubación; evidenciar reacciones enzimáticas que requieren 2 a 4 h; identificar fuentes de carbono, detección visual de crecimiento bacterial, o la detección de ácidos grasos vía cromatografía de gas. Estos métodos presentan tres ventajas importantes frente a las técnicas convencionales: posibilidad de determinar varias actividades enzimáticas en periodos de tiempo breves, fácil de realizar y manejar, además de requerir menos material y equipamiento (Entis *et al.*, 2001; O'Hara *et al.*, 2003). Actualmente existen diversos sistemas miniaturizados de diagnóstico; de entre ellos cabe mencionar los siguientes (Entis *et al.*, 2001; O'Hara *et al.*, 2003):

- API (bioMérieux, Inc., Francia): Es un sistema estandarizado para la identificación de diferentes grupos bacterianos. Consiste en una plantilla con microtubos conteniendo

medios de cultivo deshidratados que se reconstituyen al agregar una suspensión bacteriana. Permite la realización de varias pruebas bioquímicas a partir de una única suspensión bacteriana y se hablará de el más adelante.

- Biolog (Biolog, Inc., EE UU.): Este método determina la capacidad de una bacteria de metabolizar 95 diversas fuentes de carbono que incluyen aminoácidos, ácidos carboxílicos e hidratos de carbono. También mide el grado de actividad de enzimas específicas (deshidrogenasas) que reducen las sales de tetrazolio usadas como indicador redox; esto se hace para medir actividad respiratoria asociada a una cadena de transporte de electrones. Una prueba positiva, se da por la reducción de una sal de tetrazolio, que causa la formación de un precipitado de coloración rojiza intensa, conocido como formazán.
- BBL Cristal (Becton Dickinson & Co., EE UU.): Es un método miniaturizado para la identificación de microorganismos que utiliza sustratos convencionales, fluorogénicos y cromogénicos modificados. Los paneles del sistema contienen 29 sustratos bioquímicos y enzimáticos deshidratados. Para rehidratar los sustratos se utiliza una suspensión de bacterias en el fluido de inóculo. Las pruebas usadas en el sistema se basan en la utilización y degradación microbiana de sustratos específicos detectados por varios sistemas indicadores. La hidrólisis enzimática de los sustratos fluorogénicos que contienen los microtubos, resulta en un aumento de la fluorescencia que se detecta fácilmente a simple vista con una lámpara de luz ultravioleta. Los sustratos cromogénicos, después de sufrir hidrólisis, producen cambios de color que pueden detectarse visualmente. Además, hay pruebas que detectan la capacidad de un organismo de hidrolizar, degradar, reducir o de alguna forma utilizar un sustrato en el sistema BBL Crystal ID.
- ATB (bioMérieux): Galería con 32 sustratos para la identificación de microorganismos anaerobios, *Estafilococos*, *Micrococos*, levaduras, enterobacterias, *Streptococos* y bacilos Gram negativos.

Estos sistemas miniaturizados resultan muy útiles para la identificación, ya que tienen precisiones del orden del 76-97 % (Entis *et al.*, 2001).

Sistema API 50 CH™

Es un sistema estandarizado, que asocia 49 pruebas bioquímicas para estudiar el metabolismo de carbohidratos de los microorganismos. API 50 CH™ (bioMérieux) es usado en conjunto con API 50 CHL™ (bioMérieux) para la identificación de *Lactobacillus* y géneros relacionados. Este método consiste en una plantilla con 50 microtubos con los sustratos que serán fermentados por cierto microorganismo; los sustratos son, en su mayoría, carbohidratos y/o derivados. Las pruebas de fermentación son inoculadas con medio API 50 CHL™ (bioMérieux) de composición similar al caldo MRS pero sin glucosa, citrato de amonio y con púrpura de bromocresol o con medio API 50 CHB/E™ (bioMérieux), que rehidratan los sustratos.

Durante la incubación, la fermentación es evidenciada por un cambio en el color del microtubo, causada por la producción anaerobia de ácido que origina el vire del indicador de pH en el medio. El primer microtubo, que no contiene ningún ingrediente activo, es usado como un control negativo. El medio empleado en la inoculación de las plantillas dependerá del metabolismo y las exigencias nutricionales del grupo microbiano a ser probado. El API 50 CH™ (bioMérieux, Inc.) es usado para observar dos actividades metabólicas: La oxidación que es visible por un cambio en el color del cultivo, causada por la producción de ácido y el vire del indicador pH en el medio escogido y la asimilación que es evidenciada por el crecimiento del organismo en el pocillo cuando el sustrato es usado como la única fuente disponible de carbono.

Varios autores han utilizado este sistema para identificar patrones bioquímicos de fermentación de carbohidratos por BAL aisladas de diferentes productos lácteos. Swearingen *et al.* (2001) identificaron 75 cepas aisladas de queso Cheddar obteniendo que el 64% de las muestras pertenecieran a *Lactobacillus*, un 32% a *Streptococcus* y finalmente 4% a *Lactococcus*. Guessas y Kihal (2004) aislaron 206 BAL siendo identificadas y clasificadas en los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, y *Leuconostoc*. Haddadin (2005) analizó 18 presuntas BAL, de las cuales 16 fueron identificadas y clasificadas en el género *Lactobacillus*. Gurses y Erdogan (2006) aislaron 253 cepas de quesos frescos, las muestras identificadas pertenecían a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, y *Lactococcus*; la microflora predominante fue *Lactobacillus* con un 75.2% de incidencia, únicamente un 5 % de las cepas no fueron identificadas a nivel especie.

2.5.2 MÉTODOS GENOTÍPICOS.

Existen técnicas de clasificación de microorganismos basadas en el ADN con las que es posible distinguir microorganismos a nivel de especie y cepa. En los últimos años las técnicas moleculares han cambiado la perspectiva de la diversidad microbiana y permitirán describir, monitorear y controlar comunidades microbianas para que lleven a cabo las actividades requeridas, es posible obtener mediante el uso de métodos moleculares datos confiables sobre la diversidad y la identificación taxonómica de los microorganismos (Fleet, 1999).

La taxonomía de BAL basado en análisis genéticos ha revelado que algunos resultados generados por métodos fenotípicos no corresponden con las relaciones filogenéticas. Técnicas moleculares, sobre todo métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como rep-PCR y análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) así como la electroforesis en gel con campos pulsados (PFGE), son considerados métodos importantes para la caracterización específica y la detección de especies de BAL (Gevers *et al.*, 2001; Holzapfel *et al.*, 2001).

2.5.2.1 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE GUANINA-CITOSINA (% G-C)

Fue la primera técnica empleada para la clasificación taxonómica basada en el análisis de ADN, determinando el porcentaje de G-C con respecto a las bases totales. Normalmente en BAL el contenido de G-C es menor de 50%, aunque algunas especies de *Lactobacillus* tienen contenidos mayores a 55% (Axelsson, 2004); generalmente la variación del contenido de G-C es de 5% entre especies y de 10% entre géneros (Schleifer y Stackebrandt, 1983). El método más empleado para determinar este parámetro se basa en la característica del ADN de desnaturalizarse bajo el efecto de calor. La separación de las hebras se traduce en un incremento de la absorbancia a 260 nm, este fenómeno puede seguirse espectrofotométricamente. Cuanto mayor sea el contenido en G-C se necesitara aplicar más calor para conseguir la separación de las hebras. El punto medio de desnaturalización térmica (T_m) es un parámetro importante al depender directamente del contenido de guanina y citosina (Xu *et al.*, 2000).

2.5.2.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método de análisis rápido y sencillo que permite la detección y amplificación de fragmentos específicos de ADN. La polimerasa es una enzima cuya actividad es la síntesis de una cadena de ADN complementaria a una cadena de ADN sencilla. Para ello necesita la presencia de pequeñas secuencias de ADN denominadas cebadores que deben ser complementarias de los extremos de la secuencia que se desea ampliar. El proceso de PCR, puede resumirse en 3 etapas:

- Separación de las cadenas de ADN por efecto térmico, lo cual rompe los enlaces de hidrógeno que mantienen unidas cadenas de ADN originando cadenas sencillas.
- Adición de cadenas cortas de polinucleótidos, denominados cebadores, que se unen por complementariedad de bases a cada una de las cadenas del fragmento de ADN que se desee amplificar. Uno se une a la cadena 5'-3' y otro a la cadena 3'-5'.
- Adición de la ADN polimerasa, los cuatro nucleótidos (ATP, GTP, TTP, CTP) y demás cofactores, para que tenga lugar la síntesis de la cadena complementaria.

La repetición de estos ciclos hace que la cantidad del fragmento de ADN que se está amplificando aumente de manera exponencial, de modo que aunque se parta de una cantidad muy pequeña al final de un número determinado de ciclos se obtendrá una cantidad muy significativa. El diseño de los cebadores es muy importante y su especificidad dependerá del tipo de amplificación que se desee hacer, pudiendo utilizarse cebadores específicos, semiespecíficos o arbitrarios. Pueden realizarse análisis por PCR de tipo cuantitativo o cualitativo:

- El análisis cuantitativo de ADN mediante PCR, permite cuantificar la cantidad total de una o varias secuencias de ADN presentes en una muestra (González *et al.*, 2005).
- El análisis cualitativo de ADN mediante PCR, permite detectar la presencia o ausencia de determinadas secuencias de ADN en una muestra, como secuencias características de determinados organismos o secuencias indicativas de la presencia de variación genética. Entre las técnicas basadas en este tipo de análisis, se encuentran dos que han demostrado ser una buena herramienta para la identificación de bacterias ácido lácticas, estas son:

Análisis de perfiles de ADN por amplificación aleatoria (RAPD)

Consiste en amplificar al azar regiones del ADN extraído de los microorganismos. Los cebadores se escogen al azar, por lo que no es necesario contar con información sobre secuencias específicas del microorganismo a tipificar. Se utilizan temperaturas de alineamiento bajas, de manera que se obtengan productos de PCR que permitan el alineamiento de los cebadores (Figura 3) a pesar de que existan una o dos bases que no coincidan. El resultado de la amplificación mediante estos cebadores es un conjunto de fragmentos de distinta longitud en función de en qué lugares se encuentren las secuencias complementarias de los cebadores empleados. Las ventajas que presentan es que los cebadores son universales y no es necesario disponer de grandes cantidades de ADN, no es necesario utilizar sondas ni hibridaciones y son métodos relativamente sencillos y rápidos (Díaz y Wachter, 2003; González *et al.*, 2005; Ben *et al.*, 2007).

Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

Es una combinación de PCR y el uso de enzimas de restricción. Se basa en la amplificación por PCR de fragmentos de restricción de DNA genómico. Se realiza en tres etapas:

- Restricción del DNA y ligamiento de los adaptadores. Se realiza la restricción con dos enzimas que producen fragmentos de DNA con dos tipos diferentes de extremos ligantes. A éstos se ligan adaptadores, que son oligonucleótidos cortos que funcionarán como los sitios de alineamiento de los cebadores.
- Amplificación selectiva de algunos de los fragmentos de restricción. Se usan dos cebadores diferentes conteniendo la misma secuencia que los adaptadores, más varias bases contiguas al sitio de restricción.
- Separación de fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Generalmente se obtienen patrones de 50 a 100 fragmentos, con mucha reproducibilidad, debido a las condiciones estrictas del alineamiento. Ésta y otras técnicas basadas en el PCR han sido automatizadas mediante el uso de cebadores marcados con fluorescencia (Ben *et al.*, 2007).

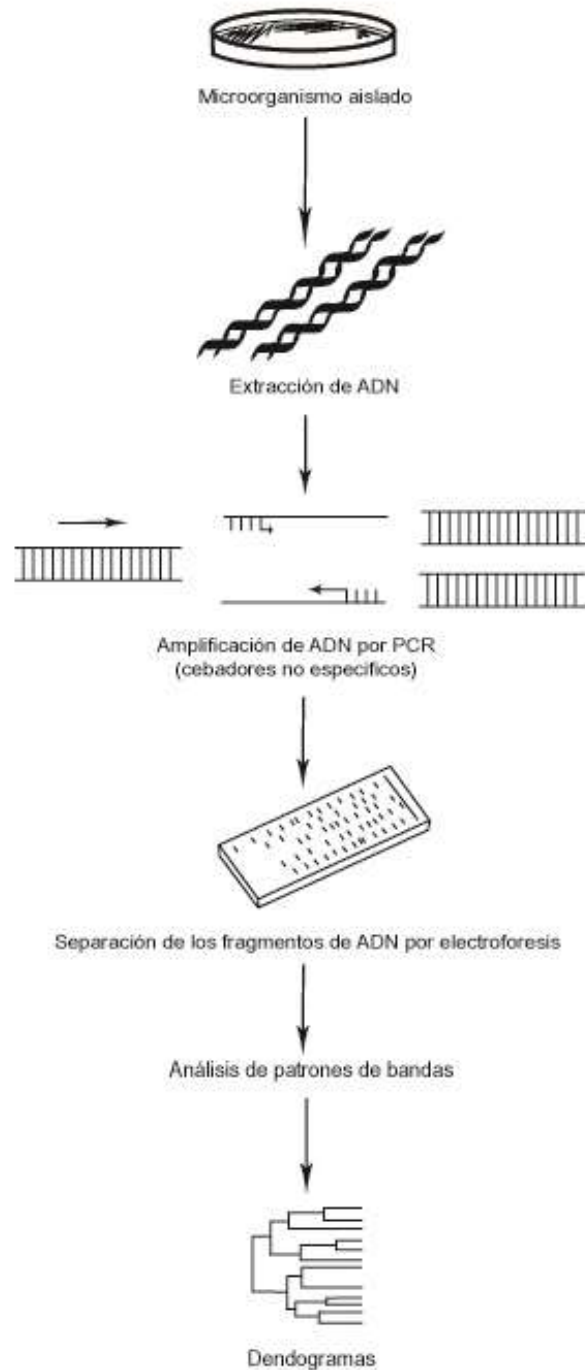


Figura 3. Análisis de colecciones microbianas aisladas de alimentos fermentados mediante el RAPD (Adaptada de Díaz *et al.*, 2003).

2.5.2.3 SECUENCIACIÓN DE ADN

Los ácidos nucleicos son macromoléculas comunes a todos los seres vivos, cambian con el tiempo. Por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva. Asumiendo que los cambios se producen al azar y que aumentan con el tiempo de manera lineal, las diferencias en la secuencia de los monómeros (nucleótidos o aminoácidos) que integran macromoléculas homólogas, en dos microorganismos, reflejan la distancia genética existente entre ellos. Esta idea, introducida por Zuckerkandl y Pauling (1965), se ha venido utilizando durante décadas para establecer las relaciones filogenéticas entre los microorganismos, creando un marco apropiado para su clasificación e identificación (Rodicio y Mendoza, 2004).

Esta técnica se utiliza habitualmente como técnica de comprobación o confirmación positiva de la presencia de un ADN determinado, tras su detección por PCR. Por tanto, el material a detectar suele ser ADN amplificado producto de PCR. Es utilizada en estudios de autenticación genética para la identificación de especies.

Los diferentes tipos de secuenciación aplicados se basan en la técnica desarrollada por Sanger en 1974, basada en la utilización de análogos de base (dideoxy) marcados que provocan la finalización de cadena. La principal diferencia entre el método enzimático de terminación de cadena y el método automático de secuenciación, radica en primer lugar en el tipo de marcaje. En el método automático en vez de radiactividad se utiliza fluorescencia y lo habitual es realizar cuatro mezclas de reacción, cada una con nucleótido trifosfato (dTTP) marcado con un fluorocromo distinto. Este sistema permite automatizar el proceso de manera que es posible leer al mismo tiempo los ADN de nueva síntesis producto de las cuatro mezclas de reacción (González *et al.*, 2005).

La segunda diferencia radica en el sistema de detección de los fragmentos de ADN. La detección del tipo de fluorescencia correspondiente a cada reacción se lleva a cabo al mismo tiempo que la electroforesis, de manera que los fragmentos de ADN de menor tamaño que ya han sido detectados se dejan escapar del gel. Este sistema permite aumentar el número de nucleótidos que se pueden determinar en cada electroforesis y, por consiguiente, en cada secuenciación.

La secuenciación de cadena simple consiste en la secuenciación de un fragmento de ADN, mediante una sola reacción. La secuenciación de cadena proporciona una excelente calidad de lectura, que en la mayoría de los casos alcanza una fiabilidad superior al 98%. El tamaño medio de las lecturas que se obtiene oscila entre las 650-700 pares de bases, y se realiza generalmente a partir de cebadores específicos utilizados durante la PCR. La secuenciación analítica consiste en la secuenciación completa de una de las cadenas del ADN de la muestra. Se recomienda esta modalidad de secuenciación cuando se desea obtener la secuencia completa de un producto de PCR o de un ADN clonado cuando el tamaño del amplificado o del inserto sea superior a 1 kilobase (González *et al.*, 2005).

Existen diversas técnicas emergentes de secuenciación de ADN con diversas aplicaciones: secuenciación por hibridación (SBH), visualización directa por microscopía de fuerza atómica (AFM), secuenciación de molécula sencilla y secuenciación de nucleótido simple mediante suspensión en vacío. Dentro de ellas se destaca el FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing). Es una técnica de secuenciación de ADN de muestras biológicas mediante la amplificación con marcadores fluorescentes de distinto color que permiten identificar la secuencia de nucleótidos. Se trata de un método indirecto por el que las secuencias obtenidas se comparan con secuencias pertenecientes a otras especies, lo que permite el análisis filogenético de las mismas. Se utiliza para la identificación de especies de interés comercial, normalmente como método de confirmación tras la utilización de otras técnicas cualitativas de PCR (González *et al.*, 2005).

2.5.2.4 SECUENCIACIÓN DEL ARNr 16S

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese a principios de la década de 1970 (Olsen y Woese, 1993). El ARNr es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos (nt), codificado por el gen *rrs*, a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla (Neefs *et al.*, 1990).

Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al ARNr 16S, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarle. De hecho, esta macromolécula presenta una serie de características, en base a las cuales fue considerado por Woese como cronómetro molecular definitivo (Rodicio y Mendoza, 2004):

- Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
- Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
- Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información y, junto con las variaciones en los ARNr 18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr SSU (del inglés, *small subunit*) contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
- El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1500 nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
- La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
- Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ARNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento.

2.5.2.5 ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE SATÉLITES (SFLP)

Es una variación del RFLP en la que se analizan los polimorfismos de los fragmentos de restricción de satélites. El ADN satélite se encuentra en los centrómeros de los cromosomas y se caracteriza por contener un número repetido de secuencias de longitud variable. Se utilizan para la identificación de especies híbridas o con una gran homología (González *et al.*, 2005).

2.5.2.6 ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

El método consiste en extraer el ADN (el genoma completo) de cada cepa, se digiere con enzimas de restricción que cortan la molécula de ADN en determinados puntos denominados dianas. Dependiendo de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN aparecerán distintas dianas y al tratarla con enzimas de restricción se originarán fragmentos de restricción de distinta longitud, finalmente los fragmentos obtenidos se separan y visualizan por electroforesis en geles de agarosa. Estos fragmentos pueden analizarse mediante técnicas de hibridación con sondas marcadas en membranas, permitiendo la detección de mezclas de especies.

Es un método rápido, con gran sensibilidad y no requiere un conocimiento previo de la secuencia de la muestra. El inconveniente que presenta es que pueden existir variaciones intraespecíficas y en ocasiones puede ser poco repetitivo, ya que pequeñas variaciones en los protocolos dan como resultado grandes diferencias en los patrones (Díaz y Wachter, 2003; González *et al.*, 2005).

2.5.2.7 RIBOTIPIFICACIÓN

La ribotipificación o ribotipado, consiste en el uso de sondas de ácidos nucleicos para el reconocimiento de los genes contenidos en el ribosoma que tienen la función de sintetizar proteínas necesarias para la célula. Dentro de los ribosomas se encuentra el ARNr (constituyendo un 82% del total de ARN celular) que está compuesto por tres regiones denominadas, en base a su coeficiente de sedimentación, (Svedberg) como: 23S, 16S y 5S. Los genes que codifican el ARNr están muy conservados, incluso bacterias muy distantes filogenéticamente presentan genes de ARNr muy similares.

Mientras que de la mayoría de los genes bacterianos existe una sola copia, en una célula procariota pueden existir varias copias del operon *rrn* que es el encargado de producir el ARNr; cuantas más copias del operon *rrn* presente una especie bacteriana más discriminativo será el ribotipado. Para determinar la presencia de estos genes, generalmente se utilizan sondas marcadas que contienen secuencias de los genes ARNr 23S, 16S y 5S de *Escherichia coli* (Micklos *et al.*, 2003; Mossel *et al.*, 2003).

Esta técnica consta de diferentes etapas, la primera es la extracción del genoma mediante diferentes solventes, en una segunda etapa el ADN es cortado con enzimas de restricción (endonucleasas) que son capaces de romper el enlace fosfodiéster de la cadena de polinucleótidos separando ambas cadenas. Estas enzimas reconocen una única secuencia de 4 a 8 nucleótidos, siendo esta secuencia el lugar de corte, la ruptura se da cada varios cientos de pares de bases; lo que produce la separación de la molécula de ADN en varios fragmentos. Se han realizado estudios probando la efectividad de diferentes enzimas de restricción para emplearlas en la ribotipificación de BAL, entre ellas están: *AvrII*, *ClaI*, *EcoRI*, *HindIII*, *NarI*, *NheI*, *NotI*, *PvuI*, *RsrII*, *SacII* y *SmaI*; los mejores resultados se obtuvieron con las enzimas *HindIII* y *EcoRI* (Björkroth y Korkeala, 1996; Svec *et al.*, 2005; Koort, 2006).

El ribotipado se ayuda de la transferencia Southern que se utiliza para la detección de secuencias de ADN concretas dentro de una mezcla compleja. Los fragmentos obtenidos en la electroforesis se transfieren por capilaridad a una membrana de nylon o nitrocelulosa; una vez que las bandas se han transferido a la membrana, es necesario fijarlas de manera irreversible mediante tratamiento a 80-85°C en el caso de las membranas de nitrocelulosa y/o con luz ultravioleta en el caso de las membranas de nylon.

Una vez realizada la transferencia Southern (Southern, 1975, 2006), el ácido nucleico transferido se desnaturaliza y se hibrida con una sonda de ADNc obtenida de la secuencia de ARNr de *E. coli* 16S o 23S, o ambas, con o sin región espaciadora o incluso se puede emplear una secuencia de oligonucleótidos muy conservada del ARNr. La sonda se marca radiactivamente o con biotina o digoxigenina, que presentan menos problemas que el empleo de isótopos radioactivos y son más limpios. Con la hibridación del ADN con la sonda complementaria, reduce considerablemente el número de bandas de cada perfil sin disminuir la especificidad (Mossel *et al.*, 2003).

Después de aplicada la sonda, cada fragmento de ADN bacteriano contenido en un gen ribosómico será visualizado, obteniéndose así un patrón o perfil con 1 a 15 bandas (ribotipo), que pueden ser comparadas fácilmente entre cepas bacterianas para llegar a una identificación y clasificación a nivel cepa. Una de las mayores ventajas del ribotipado consiste en que, debido a la semejanza de los genes ribosómicos puede utilizarse sondas universales (Mossel *et al.*, 2003).

Existen diversos factores que hacen de la ribotipificación un método eficaz de identificación de microorganismos, estos incluyen: su reproducibilidad, capacidad de discriminación, la facilidad de interpretación de los resultados y de la realización de la técnica, además de que el ADN genómico es una característica estable y su composición es independiente de las condiciones de cultivo (Micklos *et al.*, 2003).

Es por las razones antes mencionadas que diversos autores han utilizado este sistema para identificar y caracterizar bacterias ácido lácticas aisladas de diferentes productos alimenticios. En 1996, Björkroth y Korkeala utilizaron esta técnica para la identificación de *Lactobacillus sake* aislados de productos cárnicos. Tynkkynen *et al.* (1999) compararon diferentes métodos para la identificación de *Lactobacillus* spp., en esta prueba, la ribotipificación mostró ser el segundo método más preciso. Giraffa *et al.* (2000) identificaron 74 *Lactobacillus helveticus* aislados de diferentes tipos de quesos; en los resultados obtuvo una correlación de 96.5% comparando con el análisis de ADN. Satokari *et al.* (2000) analizaron 18 muestras de BAL aisladas de cerveza, la ribotipificación tuvo una capacidad discriminadora mayor que el método SDS-PAGE. Miteva *et al.* (2001) realizaron pruebas con 30 cepas para diferenciar 3 subespecies de *Lactobacillus delbrueckii*, la ribotipificación bajo ciertas condiciones, fue capaz de identificar cada una de las cepas. En el mismo año, Basaran *et al.* pusieron a prueba una vez más este método, se analizaron 25 muestras de *Lactococcus lactis* subespecies *lactis* y *cremoris*, los resultados demostraron la capacidad discriminadora de la técnica identificando el 88% de las muestras.

2.5.2.8 IDENTIFICACIÓN POLIFÁSICA

El término de taxonomía polifásica fue descrito por Colwell y es usado para la delineación de taxones en todos los niveles (Vandamme *et al.*, 1996). La taxonomía polifásica de BAL utiliza la información obtenida de técnicas fenotípicas, genotípicas y estudios filogenéticos. En la práctica, los datos fenotípicos y genotípicos son procesados por la taxonomía numérica basada en el concepto de la semejanza; mientras que el análisis filogenético se basa en el concepto de la homología, es decir, la relación que existe entre dos organismos diferentes cuando sus determinantes genéticos tienen el mismo origen (Vandamme *et al.*, 1996; Koort, 2006).

Este tipo de clasificación, se ayuda de la taxonomía numérica, también llamada Adansoniana, que fue creada para eliminar la tendencia que proviene de la subjetividad humana en la evaluación del valor de caracteres diferentes. En la taxonomía numérica, todos los caracteres básicamente son tratados como igual. El nivel taxonómico seleccionado a probar para el empleo en un estudio es una UOT (Unidad Operacional Taxonómica) dependiendo el estudio, esto se refiere a la especie, subespecie o cepa en cuestión. Para relacionar la información y obtener la información deseada, se han desarrollado varias fórmulas o coeficientes; los valores de semejanza sacados de estos cálculos son usados para agrupar en niveles la UOT. La mayor parte de pruebas usadas en la taxonomía bacteriana generan los datos que pueden ser procesados según la taxonomía numérica.

El número y tipo de análisis necesarios para determinar la identidad de un microorganismo dependerá del nivel de identificación deseado; en la figura 4 se muestra la resolución de los métodos fenotípicos y genotípicos más empleados en estudios de taxonomía de bacterias ácido lácticas.

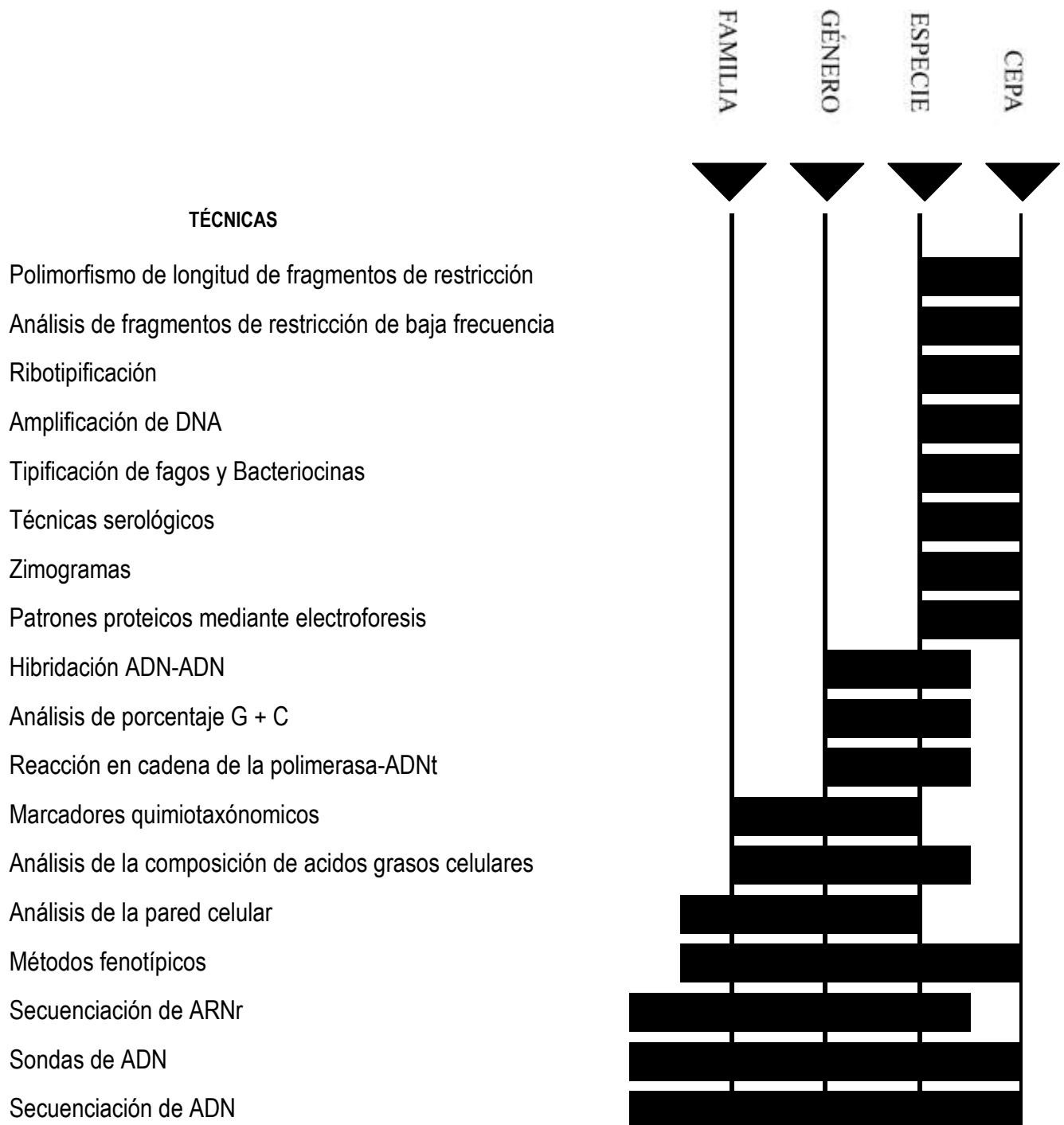


Figura 4. Resolución taxonómica de técnicas empleadas actualmente en la clasificación bacteriana (Adaptada de Vandamme *et al.*, 1996.)

3. JUSTIFICACIÓN

El interés de la comunidad científica en la identificación y caracterización de las bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos de elaboración artesanal, se debe al potencial uso que presentan en la industria alimentaria donde se emplean ampliamente para realizar procesos de fermentación. Sin embargo la adición de estos microorganismos tiene diferentes propósitos.

Para emplear microorganismos en procesos industriales es necesario contar con información taxonómica precisa, por lo que se han empleado métodos alternativos de identificación genotípica para complementar métodos fenotípicos debido a que la expresión fenotípica dentro de una misma especie es variable y, en otros casos, varias especies pueden tener características de expresión bioquímica similares; por último, las bases de datos de las pruebas bioquímicas están descritas sólo para las especies más frecuentes y mejor conocidas lo que ocasiona un sesgo en la identificación.

El aislamiento, caracterización e identificación de cepas de bacterias ácido lácticas a partir de productos lácteos de elaboración artesanal en el Estado de Hidalgo, presenta la posibilidad de emplear éstas cepas en la industria alimenticia.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar fenotípica y genotípicamente cepas de bacterias ácidos lácticos con potencial de industrialización, aisladas de productos de elaboración artesanal en el estado de Hidalgo.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Reactivar las cepas de bacterias ácidos lácticos conservados por liofilización.
- Identificar las cepas mediante perfiles bioquímicos de fermentación de carbohidratos, empleando el sistema API 50 CH™.
- Identificar las cepas a nivel molecular, empleando ribotipificación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivación de las cepas de estudio

Los microorganismos muestra fueron BAL aisladas por Clavel (2006) a partir de productos lácteos de elaboración artesanal en el Estado de Hidalgo. Para los estudios de identificación se tomaron 50 cepas liofilizadas (Tabla 3); por lo que fue necesaria la reactivación de las cepas, esto se realizó haciendo dos cultivos de enriquecimiento para favorecer el crecimiento de BAL. El medio de cultivo Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Difco™, Becton Dickinson & Co., EE UU.) permite un abundante desarrollo de todas las especies de BAL; la peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El Tween 80, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas.

Primero, con una jeringa estéril (Plastipak™, Becton Dickinson & Co., EE UU.) se adicionaron 5 mL de caldo de cultivo MRS estéril al frasco para hidratar el liofilizado (Figura 5); se dejó reposar por 10 min y se homogeneizó por agitación suave durante un minuto. De las cepas rehidratadas se tomó una alícuota de 1 mL que se inoculó en un tubo con 10 mL de caldo de cultivo MRS posteriormente se incubó a 35-37°C durante 24 h.

Del cultivo anterior se tomaron 500 µL de inóculo que se agregaron a un tubo con 10 mL de caldo de cultivo MRS y se incubó a 35-37°C durante 12 h.

Una vez que se obtuvo una suspensión bacteriana densa, se realizó una resiembra más para verificar la pureza de las cepas. Con un asa bacteriológica estéril se tomó una muestra del cultivo anterior y se sembró por estría en una caja petri con 15 mL de agar MRS que se incubó a 35-37°C durante 24 h. A las muestras se le realizaron pruebas de catalasa y oxidasa; tinción de Gram, así mismo se observó la morfología macro y microscópica de los cultivos.

Código de cepa	Producto de origen
0103	Queso Panela
0209	Queso Oaxaca
0508	Leche
0603	Queso Oaxaca
0605	Queso Oaxaca
0709	Queso Panela
0808	Queso Ranchero
1109	Queso Oaxaca
1502	Queso Oaxaca
1509	Queso Oaxaca
1607	Queso Oaxaca
1610	Queso Oaxaca
1705	Queso Oaxaca
1706	Queso Oaxaca
1708	Queso Oaxaca
1801	Queso Oaxaca
1802	Queso Oaxaca
1804	Queso Oaxaca
1805	Queso Oaxaca
1905	Queso Canasto
2005	Queso Molido
2007	Queso Molido
2009	Queso Molido
2103	Queso Manchego
2106	Queso Manchego
2202	Requesón
2209	Requesón
2306	Queso Oaxaca
2309	Queso Oaxaca
2405	Queso Panela
2408	Queso Panela
2409	Queso Panela
2502	Queso Oaxaca
2503	Queso Oaxaca
2510	Queso Oaxaca
2602	Queso Oaxaca
2606	Queso Oaxaca
2607	Queso Oaxaca
2609	Queso Oaxaca
2704	Queso Panela
2706	Queso Panela
2801	Queso Oaxaca
2802	Queso Oaxaca
2907	Queso Panela
2909	Queso Panela
3005	Queso Canasto
3006	Queso Canasto
3010	Queso Canasto
3104	Queso Oaxaca
3110	Queso Oaxaca

Tabla 3. Relación de cepas empleadas para los estudios de identificación mediante perfiles de fermentación y ribotipificación.



Figura 5. Diagrama del procedimiento para la reactivación de las cepas de estudio.

Tinción de Gram.

Sobre el centro de un portaobjetos de vidrio, limpio y seco, se colocó una gota de agua. Se tomó una colonia del cultivo y se frotó en la gota de agua para formar una suspensión bacteriana homogénea. La muestra colocada en el portaobjetos se dejó secar al aire y para fijar el frotis se pasó varias veces de forma horizontal con el extendido celular hacia arriba por la flama del mechero. Las células fijadas al calor, primero se tiñieron cubriendo la muestra con una solución de cristal violeta (Anexo 9.1) dejándola reposar por 1 min después del cual, el exceso de colorante se eliminó lavando con agua; en este paso, todas las células, tanto las Gram positivas como las Gram negativas están teñidas de azul. El portaobjetos se cubrió después con lugol (Anexos 9.1) y se dejó reaccionar por 1 min, se volvió a eliminar el exceso de solución con agua. Con el portaobjetos inclinado se realizó una decoloración agregando con un gotero una mezcla de alcohol-acetona (Anexo 9.1) hasta que la solución dejó de arrastrar el colorante. El portaobjetos con el frotis se cubrió con la solución de safranina (Anexo 9.1), se dejó reaccionar durante 30 s, finalmente, se eliminó el exceso de colorante con agua y se dejó secar al aire. Las bacterias Gram (+) se tiñen de púrpura por el cristal violeta, en cambio, las bacterias Gram (-) perderán la coloración inicial del cristal violeta y se teñirán de rojo debido a la safranina.

Prueba de catalasa.

Sobre el centro de un portaobjetos de vidrio, limpio y seco, se colocó una muestra del cultivo fresco y se adicionó una gota de H_2O_2 al 3%. La prueba es positiva cuando se pone en contacto la muestra con el H_2O_2 y se produce una reacción inmediata liberando burbujas de oxígeno (MacFaddin, 2003).

Prueba de Oxidasa.

En una caja petri se colocó un cuadro de papel filtro de aproximadamente 9 cm^2 impregnado con solución de clorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1% (Reactivo de Gordon y Mcleod). Con un asa se tomaron algunas colonias aisladas en placa y se mezclaron con el reactivo. La prueba positiva se da cuando el reactivo se oxida rápidamente en presencia del *citocromo c* produciendo coloración azul marino purpúreo lo que se toma como prueba positiva; si la prueba es negativa no habrá viraje (MacFaddin, 2003).

5.2 Pruebas de fermentación de carbohidratos.

Para identificar el perfil de fermentación se utilizó el sistema miniaturizado API 50 CH™ (bioMérieux) (Anexo 9.2), en conjunto con el API 50L Medium™ (bioMérieux) (Anexo 9.3) empleado para identificar *Lactobacillus* y géneros relacionados. El sistema consta de una plantilla plástica con una serie de galerías de 50 microtubos con 49 sustratos fermentables (carbohidratos) y un testigo. Los resultados establecieron los perfiles de fermentación de carbohidratos de los microorganismos muestra.

El sistema se empleó siguiendo las instrucciones del fabricante, proporcionadas en las fichas técnicas de los productos; a continuación se describe el proceso (Figura 6):

5.2.1 Selección de las colonias.

Se usaron colonias con forma redonda de color blanco, con aspecto cremoso, de 1 a 2 mm de diámetro con superficie convexa y de bordes enteros; además de ser catalasa y oxidasa negativas, siendo éstas, características generales de BAL. Las cepas se inocularon por estría en cajas petri con 15 mL de agar MRS y se incubaron durante 24 h a 35-37°C.

5.2.2 Preparación de la tira de sustratos.

Cada placa tiene 5 tiras con 10 microtubos numerados; las tiras fueron ordenadas en secuencia y colocadas en la caja plástica de incubación. Para crear una atmósfera con suficiente humedad se distribuyeron 10 mL de agua destilada estéril en la placa de incubación.

5.2.3 Preparación del inóculo.

Para obtener una suspensión bacteriana densa, se transfirieron varias colonias de la caja petri a la ampollita con medio de suspensión (2 mL de agua desmineralizada), posteriormente se tomaron 250 µl de la suspensión para agregarlo a otra ampollita con 5 mL de medio de suspensión, finalmente se inocularon 500 µL de suspensión bacteriana en la ampollita con 10 mL de API 50 CHL Medium™ (bioMérieux) que se agitó para homogeneizar el cultivo.

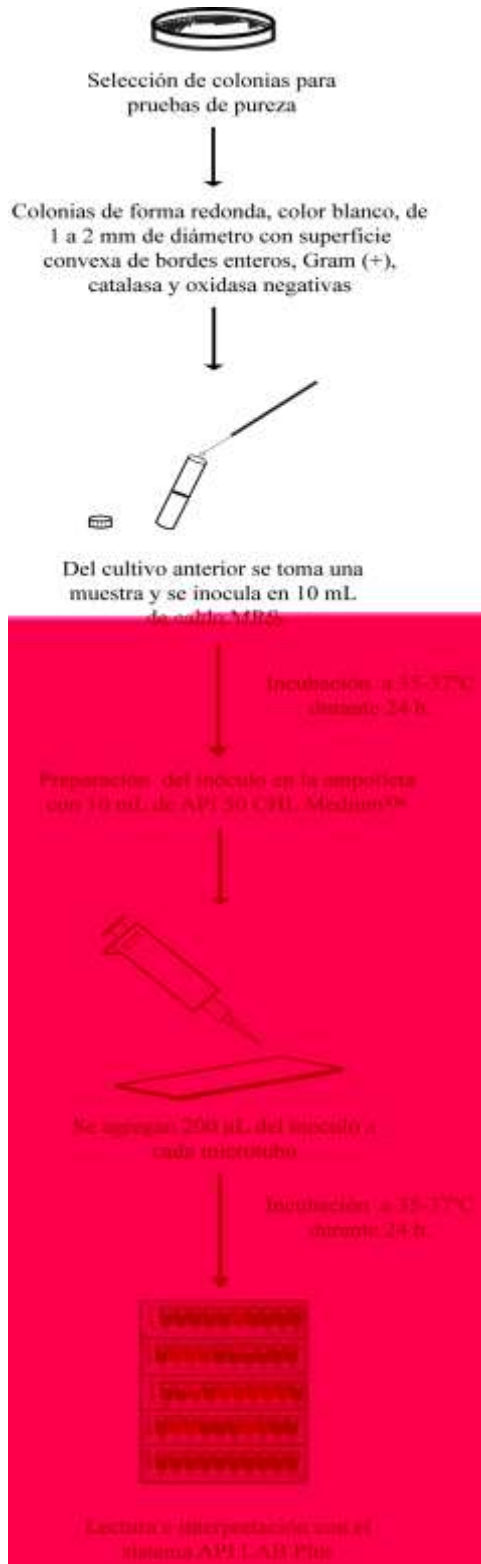


Figura 6. Diagrama del procedimiento para la identificación mediante API 50 CH TM

5.2.4 Inoculación de la tira de sustratos.

Para inocular, se inclinó ligeramente hacia adelante la caja de incubación. Los microtubos se adicionaron con 200 µl de muestra, evitando la formación de burbujas colocando la punta de la micropipeta contra la pared del microtubo. El inóculo se recubrió con aceite de parafina para crear condiciones anaeróbicas. Las cajas se incubaron a 35-37°C durante 48 h.

5.2.5 Lectura e interpretación de la tira de sustratos.

Las tiras se leyeron a las 24 y 48 h de incubación, en cada microtubo se observó la acidificación del medio, producto de la fermentación del sustrato, una prueba positiva es visible por el vire del indicador púrpura de bromocresol (púrpura bajo condiciones no ácidas) a un color amarillo. Para el análisis de esculina (microtubo no. 25), una prueba positiva se observa cuando el medio pasa de un color púrpura a negro por la reacción de sales de hierro y esculetina derivado de la hidrólisis de la esculina. Los resultados fueron anotados en la hoja de resultados como: positivo (+), negativo (-) y dudoso (?); posteriormente se pasaron al programa API LAB Plus (bioMérieux) para establecer la identidad del microorganismo.

5.3 Clasificación mediante ribotipificación.

Para la prueba de identificación a nivel molecular, las muestras fueron enviadas al Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Burgos en España. La técnica empleada se describe a continuación (Figura 7).

5.3.1 Reactivación de las cepas y aislamiento del ADN

Las muestras liofilizadas fueron reactivadas realizando dos cultivos de enriquecimiento en caldo MRS como se describió anteriormente en el apartado 5.1.

Para la extracción de ADN se empleó el método descrito por Pitcher *et al.* (1989) que utiliza tiocianato de guanidina como agente caotrópico; posteriormente fue modificado por Björkroth y Korkeala (1996) donde además se utilizan las enzimas lisozima (Sigma-Aldrich Inc., EE UU.) y mutanolisina (Sigma-Aldrich) para una mejor extracción de ADN.

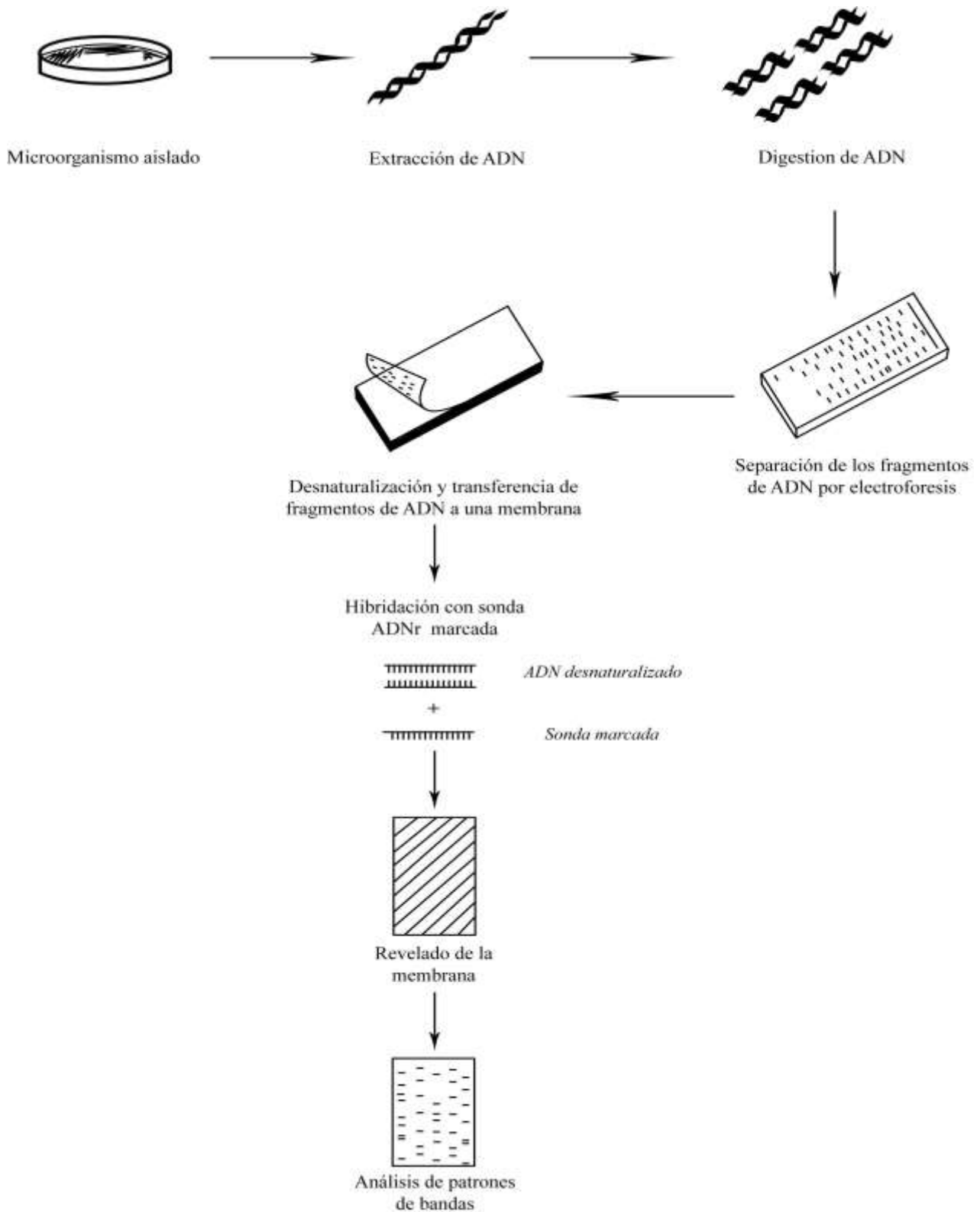


Figura 7. Diagrama del procedimiento para la ribotipificación

En un tubo Eppendorf™ (Eppendorf Inc., Alemania) se colocaron 1.5 mL del cultivo; las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 4 min (Biofuge A Bench, GmbH, Alemania) el sobrenadante fue descartado. Al tubo con las células se le adicionaron 500 µL de buffer TE (Anexo 9.1) y fue agitado manualmente para después ser centrifugado.

Después de la centrifugación se eliminó el sobrenadante, se adicionaron 100 µL de la solución con buffer TE, lisozima (Sigma-Aldrich) y mutanolisina (Sigma-Aldrich) (Anexo 9.1), la mezcla se agitó manualmente e incubó a 37°C durante 1.5 h, a fin de romper la pared celular. Esto fue evidenciado por una ligera aclaración de la solución. Al terminar el periodo de incubación se adicionaron 500 µL de solución GES (Anexo 9.1), se agitó suavemente hasta observar que la mezcla se clarificó completamente y la muestra fue colocada en hielo. Después se adicionó el acetato de amonio (Anexo 9.1), se agitó y nuevamente fue colocada en hielo. A continuación se realizó una extracción con cloroformo/2-pentanol (24:1), agitando fuertemente. La mezcla se centrifugó, obteniendo tres fases dentro del tubo Eppendorf™, del que se tomó la fase superior donde se encuentra el ADN; el resto es descartado debido a que la fase intermedia esta compuesta de la pared celular y la fase inferior es el cloroformo junto con las proteínas celulares. Para precipitar el ADN, la muestra fue transferida a un nuevo tubo Eppendorf™ con isopropanol; se centrifugó y el sobrenadante fue descartado, el precipitado se lavó con etanol al 70%, este proceso se realizó dos veces. Para eliminar el disolvente de la muestra se dejó secar al aire libre.

Finalmente el ADN fue recogido con la punta de una micropipeta y colocado en un tubo Eppendorf™ con buffer TE.

5.3.2 Cuantificación del ADN

El tubo Eppendorf™ fue agitado suavemente para solubilizar el ADN, se tomaron 15 µL del tubo y se colocaron en un nuevo tubo Eppendorf™ (Eppendorf) con agua bidestilada, para homogeneizar se agitó. La cuantificación fue realizada en un espectrofotómetro de luz UV, midiendo la absorbancia bajo longitudes de onda de 300, 280, 260 y 230 nm para obtener los valores correspondientes a la cantidad y pureza del ADN. El estimado de la cantidad de ADN fue calculado teniendo que el cociente entre la lectura a 260/280 es de 1.8-1.9 (en general es 2 para el ARN), valores inferiores a 1.7 indican contaminación por proteínas; también se consideró que el

cociente entre 260/230 generalmente es superior a 2 y valores inferiores a ésta absorbancia indican contaminación por carbohidratos. La concentración de ADN (mg/mL) en la muestra original se obtuvo de la resta de la absorbancia a 300 nm de la absorbancia a 260 nm en las muestras diluidas.

5.3.3 Digestión enzimática del ADN cromosómico

Las muestras fueron preparadas para al final obtener 40 µL en el tubo Eppendorf™, de forma que en l tubo se tenían: 10 µL de ADN (3 µg de ADN), 2 µL de enzima de restricción *HindIII* (New England Biolabs Inc., EE UU.), 4 µL del buffer NE (New England Biolabs) y se completó con agua bidestilada estéril. La mezcla se agitó e incubó a 37°C por 2 h. Después del periodo de incubación, se adicionó ficol (Anexo 9.1), se agitó y fue conservada a -20 °C. Para la digestión de los 10 µL de ADN, fue necesario duplicar la concentración normal de *HindIII* de 1 a 2 unidades por µg de ADN, ya que con el tiempo la enzima pierde actividad. Los productos de restricción que se obtienen son producto del corte del ADN en las zonas que muestra la figura 8.



Figura 8. Puntos de corte la enzima de restricción *HindIII* (Micklos *et al.*, 2007).

5.3.4 Electroforesis de los productos de restricción

Los productos de restricción enzimática fueron separados en geles de agarosa (SeaKem IDNA agarose, FMC, EE UU.) al 8%. La electroforesis fue realizada mediante el empleo del equipo DNA 200 (Pharmacia, Suecia) con buffer TAE 1X (Anexo 9.1) a 25 V. Se utilizó como marcador de peso molecular ADN del fago lambda marcado con digoxigenina y cortado con *HindIII* que produce fragmentos con los siguientes pesos moleculares 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027 y 564 Kb (Roche Molecular Biochemicals, Alemania). Después de obtener bandas adecuadamente separadas, el gel de agarosa fue tratado con una solución de bromuro de etidio (Anexo 9.1), y posteriormente colocado en un transiluminador de luz UV para visualizar los productos de restricción.

5.3.5 Transferencia Southern

Los productos de restricción obtenidos en la digestión enzimática y separados por electroforesis en un gel de agarosa fueron tratados con una solución depurinante (Anexo 9.1), sumergiendo el gel en la cámara de transferencia VacuGene XL Vacuum Blotting System (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia) hasta que el color azul se desvaneció y quedó un color amarillo. Después de que el gel fue lavado con agua bidestilada estéril, se adicionó la solución desnaturalizante (Anexo 9.1) y el gel permaneció en la solución hasta que las bandas regresaron al color original; esta desnaturalización se realiza para separar las hélices del ADN de forma que la sonda de ADN complementario (ADNc) que codifica la producción de ARN 16S puedan hibridar. Nuevamente el gel fue lavado con agua bidestilada estéril para después ser tratado con solución neutralizante (Anexo 9.1).

Los productos de restricción presentes en el gel fueron transferidos a una membrana de nylon MSI Magnagraph (MSI, Westboro, EE UU.) siguiendo el siguiente procedimiento: la cámara de transferencia se llenó con solución 20X SCC (Anexo 9.1), se colocó la membrana de nylon y se dejó transferir por capilaridad asistida de vacío. La membrana fue lavada con solución 4X SCC (Anexo 9.1) para eliminar los residuos de gel, el exceso de solución se eliminó dejando reposar la membrana sobre un papel filtro; una vez que las bandas se transfirieron a la membrana fue necesario fijarlas de manera irreversible mediante tratamiento térmico a 80°C.

5.3.6 Prehibridación e hibridación

La prehibridación de la membrana con ADN heterólogo se realizó para bloquear los sitios de unión que han quedado libres y evitar uniones inespecíficas de las sondas. La prehibridación se realizó colocando la membrana en una bolsa plástica que se llenó con solución de prehibridación (Anexo 9.1) y se dejó dentro de un baño de agua a 58°C por 2 h. Para la hibridación, se eliminó por completo la solución de prehibridación y se adicionaron 10 mL de la solución con la sonda de ADNc obtenida por transcripción inversa de la región del ARNr 16S de *E. coli* (Roche); la sonda fue marcada con digoxigenina-modificada dUTP. Finalmente, la bolsa se selló e incubó a 58°C durante 16 h.

5.3.7 Lavado y revelado

Este proceso asegura la unión específica entre la sonda marcada y los productos de restricción fijados en la membrana. El proceso se siguió de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit DIG DNA Labelling and Detection (Roche), el proceso fue el siguiente: la solución de hibridación se eliminó de las bolsas que contenían las membranas de nylon. Las membranas fueron lavadas con solución de lavado A (Anexo 9.1). Posteriormente las membranas se lavaron con solución de lavado B (Anexo 9.1).

Las membranas fueron extraídas de las bolsas, y depositadas en un plato de plástico para lavarlas con buffer 1 (Anexo 9.1). El buffer 1 fue eliminado para dejar reposar las membranas en el buffer 2 (Anexo 9.1), después se lavaron nuevamente con buffer 1. Las membranas se dejaron reposar en una solución con buffer 1 y digoxigenina, para eliminar la solución anterior las membranas se lavaron con buffer 1 y las membranas fueron equilibradas con buffer 3 (Anexo 9.1).

Las membranas se colocaron en una bolsa de plástico a las que se adicionó una solución colorante con NBT (Roche), BCIP (Roche) y buffer 3, las bolsas se incubaron a oscuras bajo temperatura ambiente. Para detener la reacción, las membranas se lavaron en un plato de plástico por con buffer TE, el exceso de solución fue eliminado colocando las membranas sobre un papel filtro. Las membranas, ya con poca humedad, se almacenaron y sellaron en bolsas de plástico, para su posterior análisis.

5.3.8 Análisis de los perfiles de bandas.

Para el análisis de los perfiles de bandas, las membranas fueron enviadas al Departamento de Alimentos e Higiene Medioambiental de la Universidad de Helsinki en Finlandia; donde fueron escaneadas con el equipo ScanJet 4c/T tabletop (Hewlett-Packard Co., EE. UU.), el perfil de bandas obtenido para cada cepa fue comparado con los correspondientes ribotipos existentes en la base de datos del mismo departamento; obteniéndose el ribotipo al que pertenece la muestra.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación primaria

El crecimiento de las cepas liofilizadas cuando fueron reactivadas en las cajas petri con agar MRS, correspondió con las características macroscópicas de las bacterias ácido lácticas. Se observaron colonias con forma redonda de color blanco, con aspecto cremoso, de 1 a 2 mm de diámetro con superficie convexa y de bordes enteros; resultados que concuerdan con los obtenidos por Shillinger y Lücke (1987) y Tserovska *et al.* (2002).

Las 50 muestras resultaron negativas en las pruebas de catalasa y oxidasa debido a que en la primera no presentaron producción de oxígeno (O_2) cuando se adicionó peróxido de hidrógeno a los frotis; en la segunda no se presentó cambio de color al agregar el reactivo de Gordon y Mcleod en los cuadros de papel filtro con la muestra. Estas pruebas características de las BAL indican que las bacterias son incapaces de crecer en medios ricos en O_2 al no poseer oxidasa para utilizar éste compuesto como aceptor final de hidrógeno (H^+) para reducir el oxígeno molecular a H_2O_2 , que es el último eslabón en la cadena de respiración aerobia. Además, al no poder producir catalasa, las bacterias anaerobias no son capaces de descomponer el H_2O_2 que es tóxico para las células (MacFaddin, 2003).

En las pruebas de tinción de Gram, las 50 cepas fueron identificadas como Gram (+), es decir, que todas retuvieron la coloración azul-violácea. Esto se debe a que las bacterias Gram (+) poseen una pared celular más resistente y con mayor proporción de peptidoglicanos (80 a 90% de la pared celular). En estos microorganismos el solvente orgánico (alcohol-acetona) deshidrata la pared celular y cierra los poros, disminuyendo así el espacio entre las moléculas evitando que pueda escaparse el complejo I_2 -cristal violeta que proporciona la coloración azul-violácea (Lim, 1998).

La relación de cepas identificadas bajo los diferentes morfotipos, junto con las pruebas de catalasa y oxidasa se muestran en la tabla 4. Se identificaron 3 morfotipos: bacilos (56%), cocos (24%) y cocobacilos (20%), como se muestra en la figura 9.

Como resultado de estas pruebas se consideró que las 50 muestras pertenecían al grupo de bacterias ácido lácticas.

MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	CÓDIGO DE CEPA	PRUEBA DE CATALASA	PRUEBA DE OXIDASA
Bacilos cortos Gram (+)	0103, 0209, 0508, 0603, 0605, 0808, 1109, 1705, 1706, 1708, 1801, 1905, 2005, 2106, 2306, 2309, 2408, 2409, 2502, 2503, 2510, 2602, 2606, 2607, 2704, 2706, 2802, 3104	Negativa	Negativa
Cocobacilos Gram (+)	0709, 1502, 1610, 1802, 1805, 2202, 2209, 2609, 2801, 2907, 3005, 3110	Negativa	Negativa
Cocos Gram (+)	1509, 1607, 1804, 2007, 2009, 2103, 2405, 2909, 3006, 3010	Negativa	Negativa

Tabla 4. Relación de cepas identificadas bajo pruebas de identificación primaria. **n=50.**

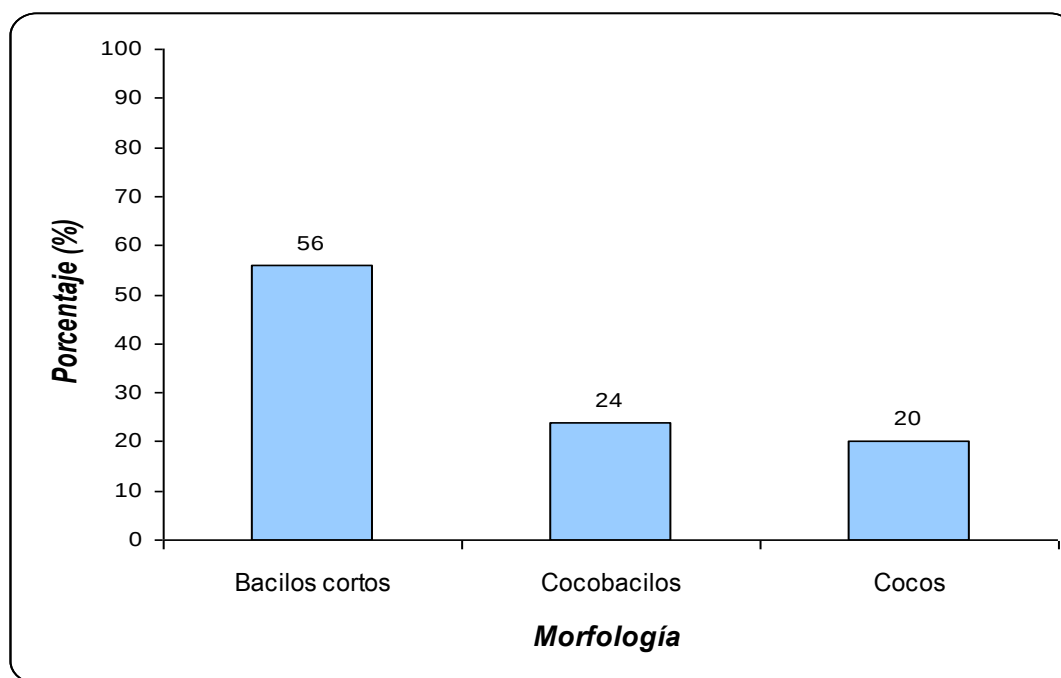


Figura 9. Distribución de cepas identificadas bajo pruebas de identificación primaria. **n=50.**

6.2 Identificación mediante perfiles de fermentación de carbohidratos.

En la fermentación, los carbohidratos se degradan y fraccionan en dos triosas, que posteriormente se degradan a compuestos de 1, 2, 3 y 4 carbonos. Los productos finales varían con cada especie bacteriana, esto depende del sistema enzimático presente en el microorganismo y de las condiciones de cultivo.

Los patrones de fermentación por lo general son característicos para grupos bacterianos específicos o especies; por lo que bajo ésta premisa se determinó la identidad de las muestras, probando la capacidad de las bacterias para degradar un hidrato de carbono específico incorporado en los microtubos de las tiras del sistema API 50 CH™ (bioMérieux) (MacFaddin, 2003). No todos los sustratos fueron degradados por todas las bacterias; con las diferencias entre estos patrones de degradación, se identificaron los microorganismos.

En la tabla 5 se muestran los perfiles de fermentación simplificados, obtenidos con el sistema API 50 CH™ (bioMérieux). Los resultados representan el porcentaje de cepas que degradaron cada uno de los carbohidratos. Cabe mencionar que no se reportan los resultados para las pruebas de fermentación de glicerol, eritrol, D-arabinosa, L-xilosa, D-adonitol, metil-β-D-xilopiranosida, xilitol, y L-arabitol; debido a que ninguna de las cepas fermentó estos compuestos.

Analizando los patrones de fermentación (Tabla 5) se determinó el tipo de fermentación realizada por las muestras, las cepas que fermentaban sólo carbohidratos de 6 carbonos son homofermentativas, las que fermentaban carbohidratos de 5 o 6 son heterofermentativas y las cepas que utilizaban sustratos con 5, 6 o menos carbonos son heterofermentativas facultativas. Así pues el 16% las cepas identificadas eran homofermentativas; el 84% mostraron un metabolismo heterofermentativo.

Sí bien con el sistema API 50 CH™ se logró determinar la identidad de los microorganismos, con un poder de discriminación mayor a 75% y hasta 99% de probabilidad, trece de las muestras (26% del total de BAL estudiadas) no pudieron ser identificadas con un buen poder de discriminación. En algunos casos, debido a la similitud de los patrones de fermentación el programa API LAB Plus (bioMérieux) no pudo determinar la identidad de las cepas con un buen poder de discriminación, siendo menor a 60% el nivel de fiabilidad.

Cepa	<i>Carnobacterium piscicola</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i>
No. de cepas	2	1	2	2	1	4
Porcentaje (%)	4	2	4	4	2	8
Fermentación de:						
LARA	-	-	+	-	-	-
RIB	+ ^a	-	+	+	+	+
DXYL	(50)	(100)	+	50	+	-
GAL	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+
FRU	+	+	+	+	+	+
MNE	+	+	+	+	+	+
SBE	- ^b	-	-	-	-	(25)
RHA	-	-	-	-	-	-
DUL	-	-	-	-	-	(25)
INO	-	-	-	-	-	-
MAN	+	-	+	-	-	+
SOR	(50)	-	-	-	-	50
MDM	-	-	-	-	-	-
MDG	+	-	+	+	-	-
NAG	+	+	+	+	(50)	+
AMY	+	-	+	-	-	75
ARB	+	-	+	-	(50)	75 (25)
ESC	+	+	+	+	-	+
SAL	+	-	+	+	(50)	+
CEL	+	-	+	50	+	+
MAL	+	+	+	+	+	+
LAC	+	+	+	+	+	+
MEL	50 ^c (50)	+	+	-	+	25
SAC	+	+	+	+	+	+
TRE	+	+	+	+	+	+
INU	-	-	-	-	-	-
MLZ	(50)	-	-	-	-	75
RAF	(50)	+	+	-	+	(25)
AMD	(50)	-	(100)	-	-	(25)
GLYG	-	-	-	-	-	-
GEN	+	-	+	-	(50)	75
TUR	+	-	+	+	(50)	25
LYX	-	-	-	-	-	-
TAG	-	-	+	-	-	50
LFUC	-	-	-	-	-	(25)
DARL	-	-	-	-	-	-
GNT	(50)	-	(100)	(50)	-	(75)
2KG	-	-	(50)	-	-	(25)
5KG	-	-	-	-	-	-

Tabla 5. Patrones de fermentación de las cepas identificadas. Símbolos: ^a todas las cepas positivas; ^b todas las cepas negativas; ^c porcentaje de cepas positivas; entre paréntesis: % de fermentación débil.

Cepa	<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides mesenteroides</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
No. de cepas	3	10	3	1	5	15	1
Porcentaje (%)	6	20	6	2	10	30	2
Fermentación de:							
LARA	66.6 (33.3)	60 (20)	33.3	-	20 (40)	26.6 (26.6)	+
RIB	66.6 (33.3)	+	+	+	+	66.6 (6.6)	+
DXYL	+ ^a	40 (20)	-	-	60 (40)	66.6 (13.6)	+
GAL	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+
FRU	+	+	+	+	+	+	+
MNE	+	+	+	+	+	+	+
SBE	- ^b	30	+	-	-	(6.6)	-
RHA	-	10	33.3	-	-	-	-
DUL	-	10	-	-	-	-	-
INO	-	(10)	-	-	-	-	-
MAN	+	+	+	+	+	40 (13.6)	-
SOR	66.6 ^c (33.3)	80	+	-	-	-	-
MDM	-	20	-	-	-	-	-
MDG	66.6	80	+	-	40	80 (20)	-
NAG	+	+	+	+	80 (20)	73.3 (26.6)	(100)
AMY	+	+	+	-	60	40 (13.6)	+
ARB	+	+	+	+	+	60 (20)	+
ESC	+	+	66.6	+	+	93.3 (6.6)	+
SAL	+	+	+	+	+	60 (26.6)	+
CEL	+	+	+	+	+	73.3	+
MAL	+	+	66.6 (33.3)	+	+	+	+
LAC	+	+	+	+	+	+	+
MEL	+	+	+	-	+	93.3 (6.6)	+
SAC	+	+	+	+	+	+	+
TRE	+	+	+	+	+	+	+
INU	-	-	33.3	-	-	-	-
MLZ	33.3 (33.3)	70 (10)	+	-	-	(6.6)	-
RAF	+	70 (20)	66.6	-	60 (20)	46.6 (6.6)	+
AMD	(33.3)	10 (50)	-	(100)	40 (60)	40	-
GLYG	+	-	-	-	-	(6.6)	-
GEN	+	90 (10)	66.6 (33.3)	(100)	60	26.6 (46.6)	+
TUR	+	+	+	-	80	93.3	(100)
LYX	-	-	(33.3)	-	20	-	-
TAG	66.6	+	+	-	20 (40)	20 (13.3)	-
LFUC	-	(10)	(33.3)	-	(20)	6.6	-
DARL	-	+	-	-	-	(6.6)	-
GNT	(33.3)	(60)	(66.7)	-	(20)	33.3	-
2KG	-	-	-	-	(20)	13.3	-
5KG	-	(10)	-	-	-	6.6	-

Tabla 5 (continua). Patrones de fermentación de las cepas identificadas. Símbolos: ^a todas las cepas positivas; ^b todas las cepas negativas; ^c porcentaje de cepas positivas; entre paréntesis: % de fermentación débil.

La estructura de los carbohidratos es de gran importancia en el momento de ser fermentados y su empleo como fuentes de carbono dependerá de la capacidad de los microorganismos de producir las enzimas necesarias para su degradación. Como se puede observar en la tabla 5, hay carbohidratos que fueron fermentados por un gran número de cepas. Dentro de los sustratos del sistema API 50 CH™ mayoritariamente degradados están: D-xilosa, L-arabinosa, D-ribosa (pentosas); D-glucosa, D-galactosa, D-fructosa y D-manosa (hexosas); N-acetilglucosamina (aminoazúcar); amigdalina (glucósido cianogénico); arbutina (benzoquinona glucosaza); esculina (glucósido de dihidrocoumarina); salicina (glicósido fenólico); D-celobiosa (disacárido de glucosa con enlace en configuración anomérica β -1,4-); D-maltosa (disacárido de glucosa con enlace en configuración anomérica α -1,4-); D-lactosa (disacárido de galactosa unida a una glucosa con enlace en configuración anomérica β -1,4-); D-melibiosa (disacárido de galactosa unida a una glucosa con enlace en configuración anomérica α -1,6-); D-sacarosa (disacárido de glucosa unida a una fructosa con enlace en configuración anomérica β -1,2-); D-trehalosa (disacárido de glucosa con enlace en configuración anomérica α -1,1-) (Stryer, 1990).

El 100% de las cepas analizadas presentaron la capacidad para fermentar la lactosa (principal azúcar presente en productos lácteos); la mayoría de las especies de BAL degradan este sustrato introduciéndolo a la célula mediante permeasas específicas e hidrolizándolo con β -galactosidasas para obtener glucosa y galactosa, finalmente es empleado como fuente de carbono vía glucólisis (Bucio, 2004).

Uno de los carbohidratos clave en los patrones de fermentación, es la inulina, que es un oligosacárido constituido por una unidad de glucosa a la que se une una cantidad variable de unidades de fructosa (comprendidas entre 2 y 70). Es frecuentemente utilizada como prebiótico y en fórmulas simbióticas. Por su estructura química, requiere para su utilización la hidrólisis por fructofuranosidasas, parte de la fructosa liberada en la hidrólisis o bien los productos formados durante la fermentación de inulina, pueden ser usados de manera secuencial por la misma bacteria (Roberfroid, 1996, 2000; Van der Meulen *et al.*, 2004; Makras *et al.*, 2005; Valenzuela *et al.*, 2006). En el presente estudio únicamente la cepa 1706 fue capaz de degradar este compuesto para utilizarlo como fuente de carbono.

Los resultados obtenidos para las cepas identificadas como *Carnobacterium piscicola* (Tabla 6) son parecidos a los descritos por Wood y Holzapfel (1995) en cuanto a la producción de ácido a partir de amigdalina, lactosa, manitol, melecitosa, melibiosa, trehalosa y turanosa; la excepción fueron tres sustratos: inulina, 2-cetogluconato potásico y 5-cetogluconato potásico que no fueron fermentados. Ésta especie representa un 4% de las bacterias identificadas (Figura 10).

Las bacterias clasificadas como *Lactobacillus acidophilus* presentaban patrones de fermentación similares a los datos reportados por otros autores (Schillinger y Lücke, 1987; Wood y Holzapfel, 1995; Cai *et al.*, 1999a; Shah, 2000; Sanders y Klaenhammer, 2001) en cuanto a la fermentación de galactosa, manosa, manitol, maltosa, lactosa, sacarosa, melibiosa, trehalosa y rafinosa; sin embargo, se encontraron diferencias en cuanto a la fermentación de salicina y celobiosa que no fueron metabolizados.

El patrón de fermentación para la especie *Lactobacillus brevis* aquí descrito fue similar a los reportados por otros autores (Sharpe *et al.*, 1972; Schillinger y Lücke, 1987; Wood y Holzapfel, 1995; Weise *et al.*, 1996; Bucio, 2004; Seema y Kumaran, 2004; Pulido *et al.* 2007) coincidiendo en la fermentación de arabinosa, ribosa, xilosa, galactosa, esculina, maltosa, melibiosa, rafinosa, sacarosa y manitol; además no producían ácido a partir de melecitosa, arabitol, 2-cetogluconato potásico y 5-cetogluconato potásico.

De acuerdo con distintas publicaciones (Schillinger y Lücke, 1987; Wood y Holzapfel, 1995; Koort *et al.*, 2004; Seema y Kumaran, 2004) *Lactobacillus curvatus* presenta patrones de fermentación similares a los obtenidos en el presente trabajo fermentando ribosa, manitol, galactosa, sacarosa y esculina. Siendo negativas las pruebas para melecitosa, arabinosa, inulina, amigdalina, arbutina, melibiosa y rafinosa.

Las muestras clasificadas como *Lactobacillus fermentum* mostraron patrones similares a los descritos por Wood y Holzapfel (1995), Bouton *et al.* (1998), Nigatu (2000), Niamsup *et al.* (2003) y Pulido *et al.* (2007), teniendo capacidad de producir ácido a partir de ribosa, xilosa, galactosa, celobiosa, maltosa, fructosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa y rafinosa; siendo incapaces de fermentar melecitosa, esculina y ramnosa. Sin embargo se encontraron diferencias al no presentar fermentación de arabinosa, manitol, sorbitol, 2-cetogluconato potásico y 5-cetogluconato potásico.

Identificación por API 50 CH™	Código de cepa	Porcentaje (%)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sbp. <i>mesenteroides</i>	0603, 0605*, 1610, 1705*, 1805*, 1905, 2007, 2103, 2202, 2405, 2609, 2706, 2801, 2907, 3110	30
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0508, 1607, 1801, 2408, 2409*, 2704, 2802, 3006, 3010, 3104*	20
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1109*, 1708, 1802, 2503, 2606	10
<i>Lactobacillus paracasei</i> sbp. <i>paracasei</i>	0103, 2209*, 2309, 3005	8
<i>Lactobacillus pentosus</i>	0209, 1509, 2009	6
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1706, 2502, 2602*	6
<i>Carnobacterium piscicola</i>	1502, 2306	4
<i>Lactobacillus brevis</i>	2510*, 2607*	4
<i>Lactobacillus curvatus</i>	2005*, 2106	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2909*	2
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0709*	2
<i>Lactococcus lactis</i> sbp. <i>lactis</i>	0808	2
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1804	2

Tabla 6. Relación de cepas identificadas mediante perfiles de fermentación de carbohidratos; * Cepas identificadas con un porcentaje de fiabilidad menor a 60%. **n=50.**

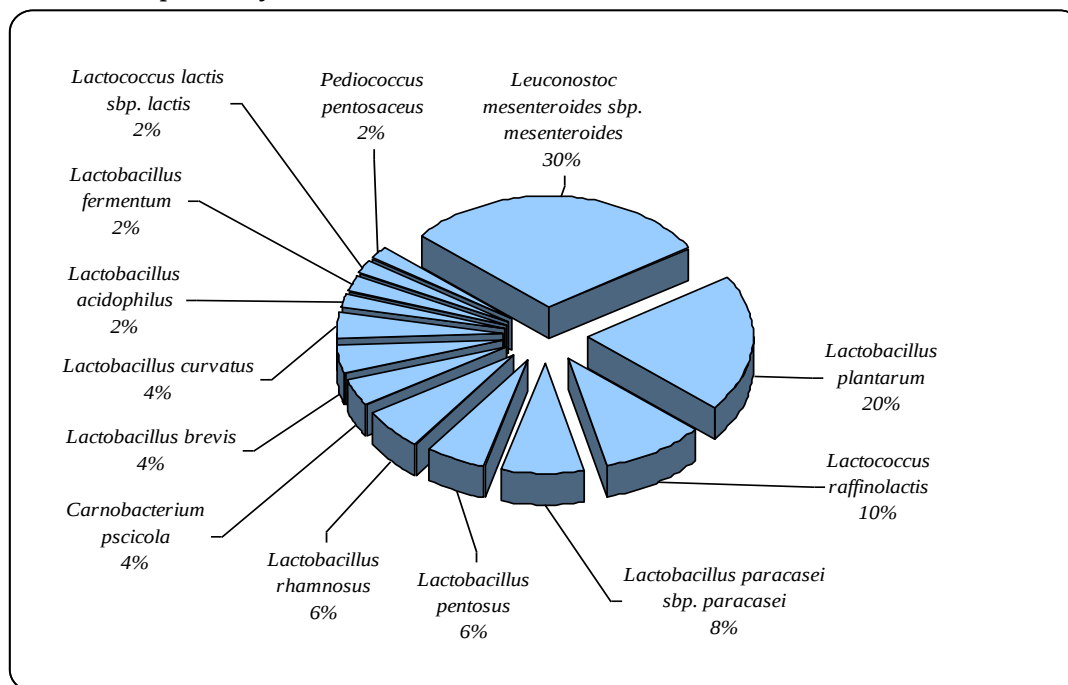


Figura 10. Porcentaje de cepas por especie identificadas mediante perfiles de fermentación de carbohidratos. **n=50.**

Los resultados obtenidos para las cepas identificadas como *Lactobacillus paracasei* sbp. *paracasei* son parecidos a los descritos por varios autores (Wood y Holzapfel, 1995; Bouton *et al.*, 1998; Makras *et al.*, 2005; Bayane *et al.*, 2006) donde las cepas fermentan ribosa, glucosa, fructosa, galactosa, manitol, amigdalina, celobiosa, esculina, melecitosa y rafinosa; siendo negativas las pruebas para arabinosa, melibiosa, adonitol y xilosa. En el estudio realizado por Makras *et al.* (2005) describió que las muestras pertenecientes a esta subespecie fermentaban inulina, lo cual no sucedió con las dos muestras identificadas en este estudio.

Los patrones de fermentación para *Lactobacillus pentosus* descritos por Cai *et al.* (1999a), Bucio (2004) y Pulido *et al.* (2007) concuerdan con los aquí reportados, fermentando arabinosa, ribosa, xilosa, ramnosa, manitol, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa y rafinosa; en cambio eran incapaces de fermentar sorbosa, inositol, lixosa, fucosa, 2-cetogluconato potásico y 5-cetogluconato potásico. El análisis de actividades enzimáticas realizado por Cai *et al.* (1999a) revelaron que hay una alta producción y actividad de β -galactosidasa, α - y β -glucosidasa que son enzimas de suma importancia en la degradación de carbohidratos.

De acuerdo con Wood y Holzapfel (1995), Cai *et al.* (1999a), Bucio (2004), Seema y Kumaran (2004), Shuangquan *et al.* (2006) y Pulido *et al.* (2007) *Lactobacillus plantarum* produce ácido por la fermentación de arabinosa, ribosa, manitol, sorbitol, amigdalina, esculina, celobiosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa, melecitosa y rafinosa; además no degradan inositol, arabitol, ramnosa ni xilitol. Los resultados obtenidos concuerdan con los antes mencionados a excepción de xilosa, galactosa y arabitol que fueron usados como fuente de carbono cuando según estos autores no debieron de haber sido fermentados. En la industria alimentaria el empleo de este microorganismo presenta diferentes beneficios en los procesos de fermentación; en la industria láctea se emplea como cultivo iniciador, produciendo sabores, textura, además de incrementar la calidad nutricional de los alimentos (González-Martínez *et al.*, 2003). En la elaboración de vegetales fermentados se emplea este microorganismo para degradar (mediante α -galactosidasas) α -galactósidos que son reservas de carbohidratos en distintos tejidos vegetales; estos compuestos tienen en su estructura una o varias unidades de galactosa unidas a la molécula de glucosa en la sacarosa por enlaces α -1,6 (Silvestroni *et al.*, 2002; Kraszewska y Wzorek, 2007).

El perfil de fermentación obtenido para las cepas clasificadas como *Lactobacillus rhamnosus* es similar a los datos reportados por otros autores (Bouton *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 1999a; Seema y Kumaran, 2004) fermentando ribosa, manosa, manitol, sorbosa, amigdalina, esculina, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, melecitosa y gluconato; sin fermentar arabinosa, xilosa, rafinosa ni melibiosa. En el estudio sobre perfiles de producción enzimática realizado por Pham *et al.* (2000) encontraron un amplio espectro de glucohidrolasas (α -D-glucosidasa, β -D-glucosidasa, α -D-galactosidasa, β -D-galactosidasa, β -D-glucuronidasa, y α -L-ranmosidasa) enzimas vitales en la fermentación de carbohidratos.

Las muestras identificadas como *Lactococcus lactis* sbp. *lactis* presentan patrones de fermentación donde emplean ribosa, galactosa, manosa, manitol, N-acetilglucosamina, maltosa, lactosa y trehalosa como fuente de carbono; no fermentan arabinosa, dulcitol, melibiosa, melecitosa y rafinosa (Wood y Holzapfel, 1995; Kimoto *et al.*, 2004; Nomura *et al.*, 2006; Shuangquan *et al.*, 2006) estos datos concuerdan con los reportados en este escrito. Esta subespecie es de gran importancia en la industria láctea. Las funciones principales de esta bacteria en la fermentación de leche son: la producción de ácido láctico a partir de lactosa, la hidrólisis de caseína y la fermentación de ácido cítrico. Además, algunas enzimas producidas y los productos finales de fermentación tienen influencia significativa de forma directa o indirecta en la formación de textura, sabor y calidad higiénica de los alimentos (Samaržija *et al.*, 2001).

En los datos encontrados en la bibliografía, *Lactococcus raffinolactis* presenta patrones de fermentación donde degrada ribosa, galactosa, fructosa, N-acetilglucosamina, arbutina, celobiosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa y rafinosa; sin fermentar sorbosa, dulcitol, inositol, manitol, inulina, y melecitosa (Wood y Holzapfel, 1995; Kimoto *et al.*, 2004; Shuangquan *et al.*, 2006) estos datos son similares obtenidos en este estudio.

Los resultados aquí descritos para las muestras identificadas como *Leuconostoc mesenteroides* sbp. *mesenteroides* son similares a los descritos por diversos autores (Cogan y Jordan, 1994; Wood y Holzapfel, 1995; Cai *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000; De Martinis *et al.*, 2001; Holt *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2005) en cuanto a la fermentación de arabinosa, ribosa, xilosa, glucosa, fructosa, manosa, maltosa, celobiosa, salicina, esculina, sacarosa y trehalosa; además de no fermentar ramnosa, dulcitol, inulina, inositol, melecitosa ni sorbosa. Se ha

informado acerca de la dificultad para la identificación de *Leuconostoc* mediante características fenotípicas debido a la gran heterogeneidad en las características bioquímicas y fisiológicas (Santos *et al.*, 2005); como se puede observar en la tabla 5, los patrones de fermentación serían difíciles de interpretar de no ser por el sistema informático API LAB Plus (bioMérieux).

De acuerdo con diferentes investigadores (Wood y Holzapfel, 1995; Cai *et al.*, 1999b; Osmanagaoglu *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2005; Rashid *et al.*, 2007) *Pediococcus pentosaceus* tiene un perfil de fermentación donde produce ácido a partir de arabinosa, ribosa, xilosa, galactosa, glucosa, fructosa, salicina, celobiosa, maltosa, rafinosa, trehalosa, lactosa y sacarosa sin emplear ramnosa, manitol, inulina, melecitosa ni gluconato como fuente de carbono; siendo estos resultados completamente idénticos a los aquí descritos lo que confirma la identidad de la muestra clasificada bajo esta especie.

Finalmente, los perfiles de fermentación nos permitieron agrupar las 50 muestras dentro de 5 géneros, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Como se puede observar en la figura 11, el género de mayor incidencia fue *Lactobacillus* seguido de *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Carnobacterium* y por último *Pediococcus*.

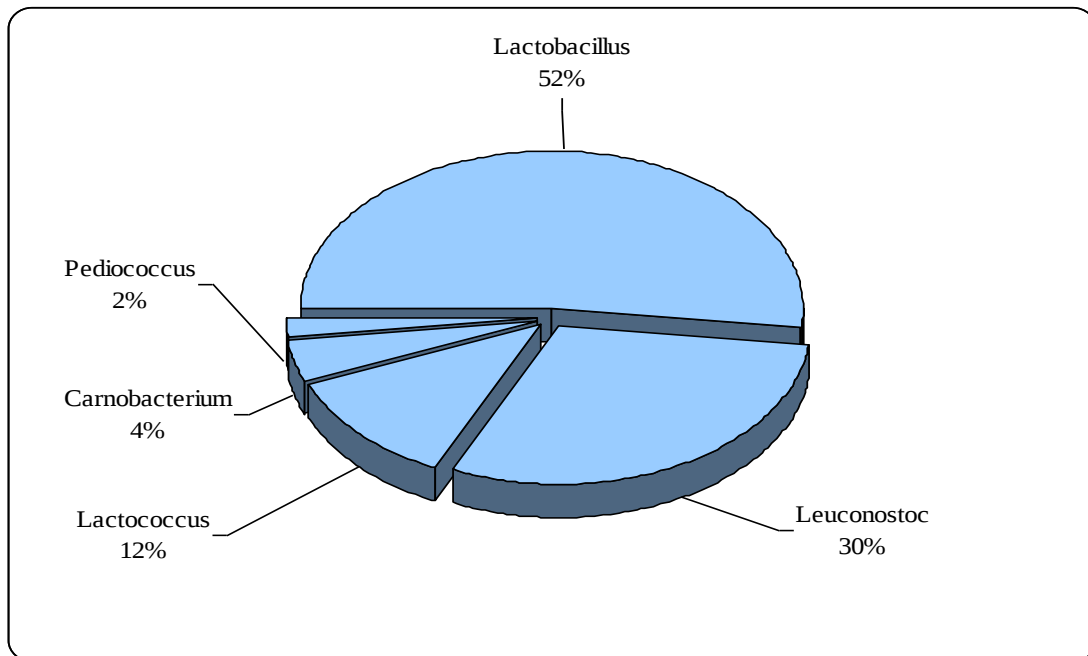


Figura 11. Distribución de cepas por género identificadas mediante perfiles de fermentación de carbohidratos. n= 50.

Diferentes autores han reportado resultados similares en estudios de identificación bacteriana en productos de elaboración artesanal; las especies predominantes varían, sin embargo los géneros se mantienen constantes (Demarigny *et al.*, 1996; Giraffa y Neviani, 1999; Fitzsimons *et al.*, 1999; Beukes *et al.*, 2001; Tserovska *et al.*, 2002; Muyanja *et al.*, 2003; Guessas y Kihal, 2004). Savadogo *et al.* (2004) identificaron 100 cepas de BAL procedentes de una leche fermentada tradicional, los géneros encontrados fueron: *Lactobacillus* (32%), *Leuconostoc* (30%), *Lactococcus* (20%), *Leuconostoc/β-bacterium* (10%), *Streptococcus* (6%) y *Enterococcus* (2%). Rashid *et al.* (2007) identificaron un total de 266 cepas de BAL procedentes de “dahi” (leche fermentada tradicional en Bangladesh, similar al yogurt, se produce de la leche de vaca y de búfalo o de una mezcla de estas por un método tradicional usando cultivos iniciadores tradicionales); las cepas aisladas fueron identificadas por sus características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas. La distribución por género de las cepas fue: *Streptococcus* (50%), *Lactobacillus* (27%), *Enterococcus* (9%), *Leuconostoc* (5%), *Lactococcus* (5%) y *Pediococcus* (4%).

Sí bien los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* son aislados frecuentemente de productos lácteos, se tienen pocos reportes de bacterias aisladas pertenecientes al género *Carnobacterium*. Las especies de *Carnobacterium* son bacterias psicrótrofas, débilmente ácidotolerantes y tolerantes a condiciones microaerófilas; por éstas razones forman parte de la microflora psicrótrofa predominante de la leche en refrigeración sin pasteurizar (Cailliez-Grimal *et al.*, 2005). Esto ayuda a explicar su presencia en las muestras analizadas ya que estas, al ser de elaboración artesanal, seguramente no se realizó ningún tipo de tratamiento térmico. En los estudios realizados en Francia por Millière *et al.* (1994a, 1994b) se determinó que varias especies de *Carnobacterium* formaban parte de la microflora predominante en quesos elaborados con leche sin pasteurizar. En 1997 Herbin *et al.* aislaron cepas de *Carnobacterium piscicola* CP5 de quesos blandos, éstas cepas mostraron actividad antimicrobiana frente a varios microorganismos patógenos. Cailliez-Grimal *et al.* (2007) describieron la flora nativa de quesos suaves madurados, encontrando que la única especie de *Carnobacterium* presente en estos productos era *Carnobacterium maltaromaticum*.

6.3 Identificación mediante ribotipificación

El método implica la separación e identificación de los genes que codifican el ARNr presentes en varias copias en el genoma bacteriano y que hace posible establecer la identidad del microorganismo basándose en las diferencias de los fragmentos de restricción correspondientes a dichos genes. El hecho de que regiones específicas del ARNr hayan permanecido altamente conservadas entre especies debido a su importancia en la funcionalidad de los ribosomas, permitió la identificación de las muestras con el empleo de ARNr 16S de *E. coli* como sonda.

Tras el aislamiento y digestión del ADN cromosómico con la endonucleasa de restricción *HindIII* se realizó la electroforesis obteniendo un barrido de ADN para cada una de las cepas analizadas. Estos perfiles de restricción, permiten agrupar las bacterias ya que perfiles idénticos implican la pertenencia a la misma especie, sin embargo la comparación es difícil por el alto número de bandas.

Tras pasar las bandas a la membrana de nylon y realizar la hibridación con la sonda complementaria del ARNr 16S, se obtuvo un número menor de bandas que pudo visualizarse fácilmente; el número de bandas obtenido tras la hibridación, está relacionado directamente al número de copias del operon *rrn* contenidas en los ribosomas. Los patrones de bandas se muestran en las figuras 12, 13 y 14. La técnica de ribotipificación permitió la identificación del 94% de las cepas muestra; cabe mencionar que el 6% restante no pudo ser identificado debido a que 2 de las cepas no pudieron ser reactivadas (muestras 2802 y 2909) y una se perdió (muestra 0508).

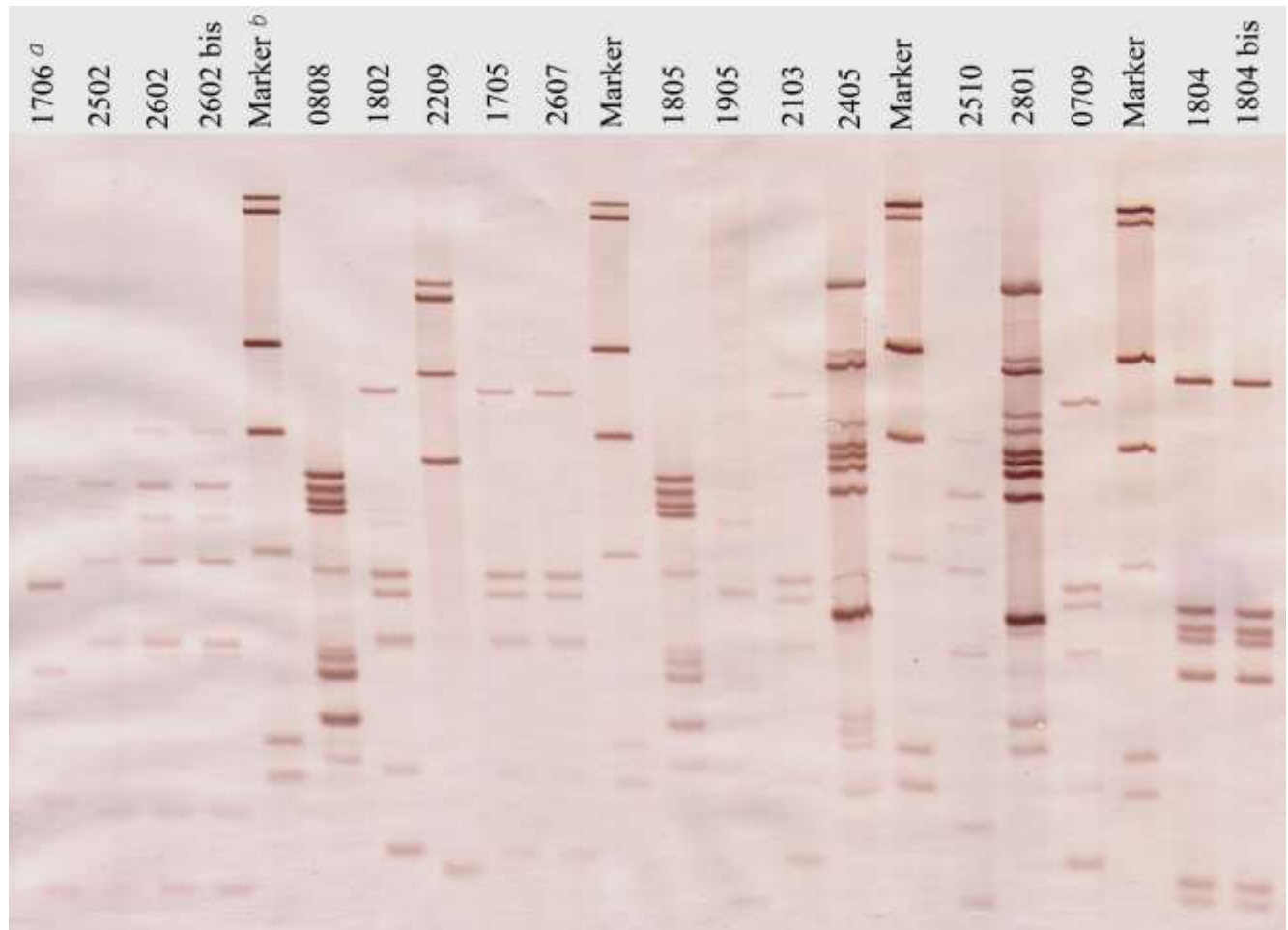


Figura 12. Patrones de bandas obtenidos tras la digestión del genoma con *Hind*III, electroforesis, transferencia Southern e hibridación con la sonda de ADNc que codifica la región 16S del ARNr. *a*: código de cepa; *b*: marcador molecular, Fago λ cortado con *Hind*III y marcado con digoxigenina.

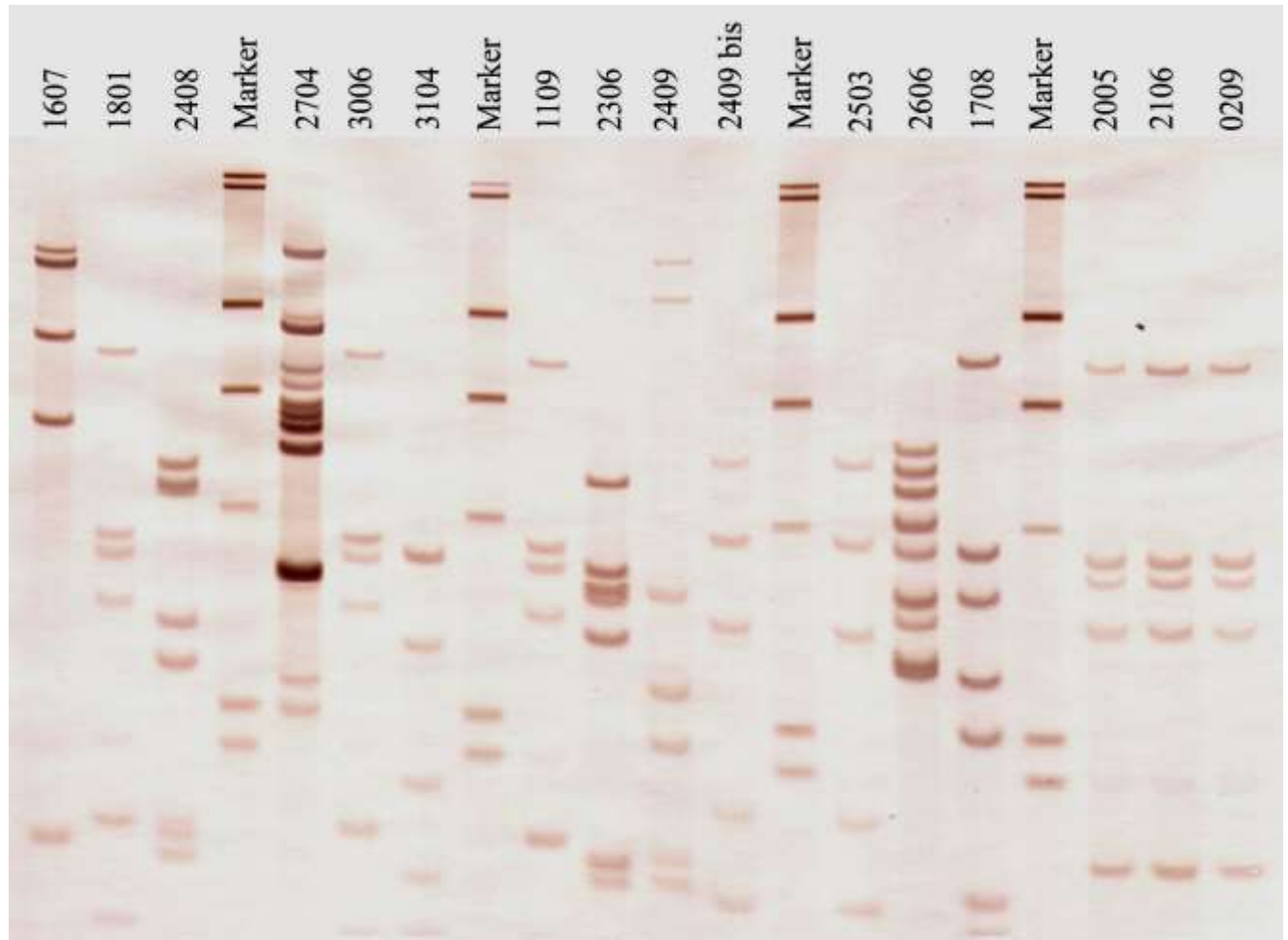


Figura 13. Patrones de bandas obtenidos tras la digestión del genoma con *Hind*III, electroforesis, transferencia Southern e hibridación con la sonda de ADNc que codifica la región 16S del ARNr.

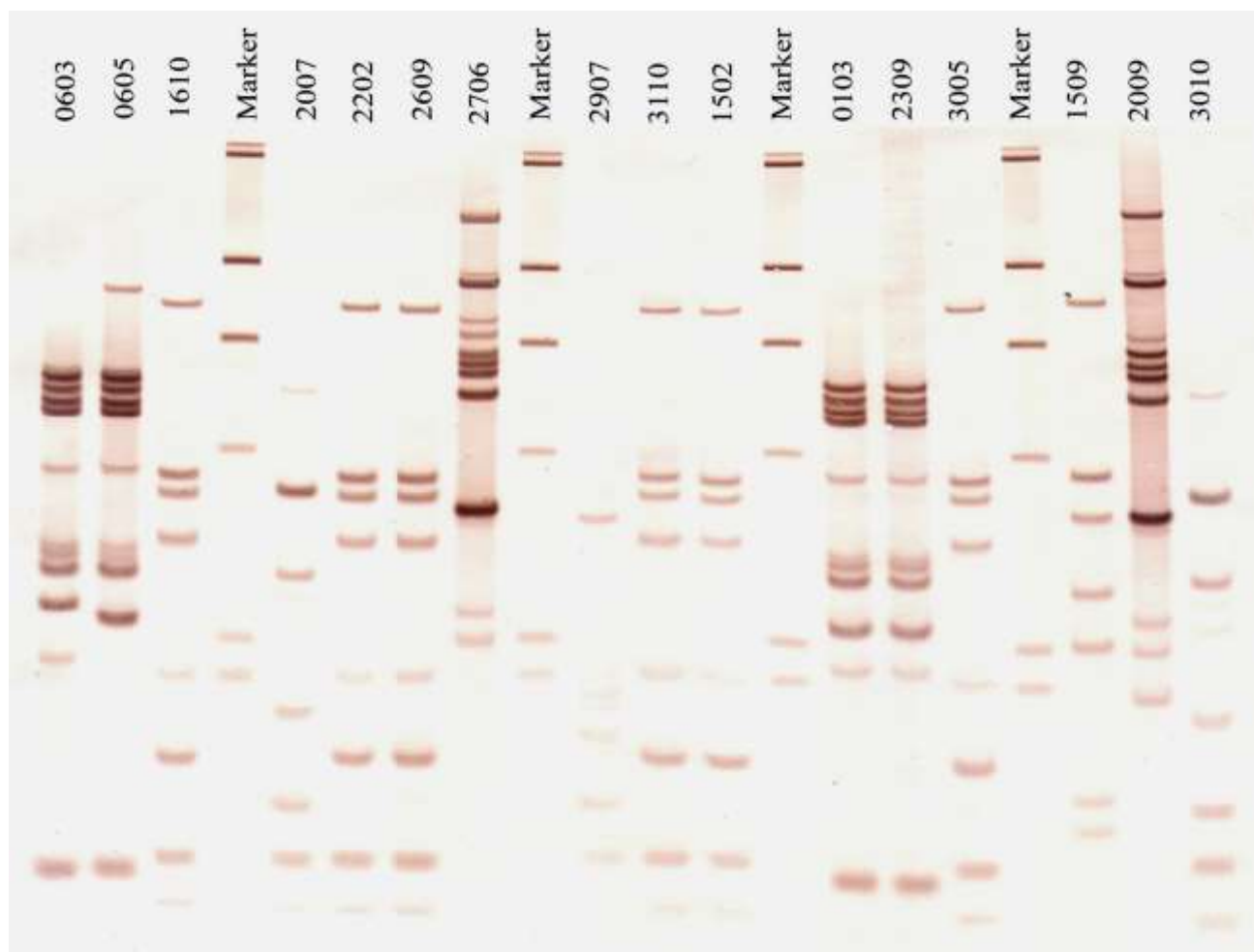


Figura 14. Patrones de bandas obtenidos tras la digestión del genoma con *Hind*III, electroforesis, transferencia Southern e hibridación con la sonda de ADNc que codifica la región 16S del ARNr.

Como lo muestra la figura 15, de los once ribotipos encontrados en el estudio, el mayor número pertenece a *Leuconostoc mesenteroides* sbp. *mesenteroides*; las otras cepas encontradas fueron: *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc citreum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus paracasei* sbp. *paracasei*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* sbp. *lactis* y *Leuconostoc lactis*.

Aunque el análisis de los patrones de bandas obtenidos con la enzima *HindIII* no permitió identificar plenamente algunas cepas de la especie *Lactococcus lactis* (0103, 0603, 0605, 1805 y 2309) a nivel subespecie, el ribotipo de las bacterias era muy similar al de la cepa de referencia de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* LMG 6890^T. La imposibilidad de determinar completamente la identidad de estas muestras se debió a que algunas de las bandas obtenidas, no se observan claramente y el programa de comparación no pudo distinguirlas correctamente.

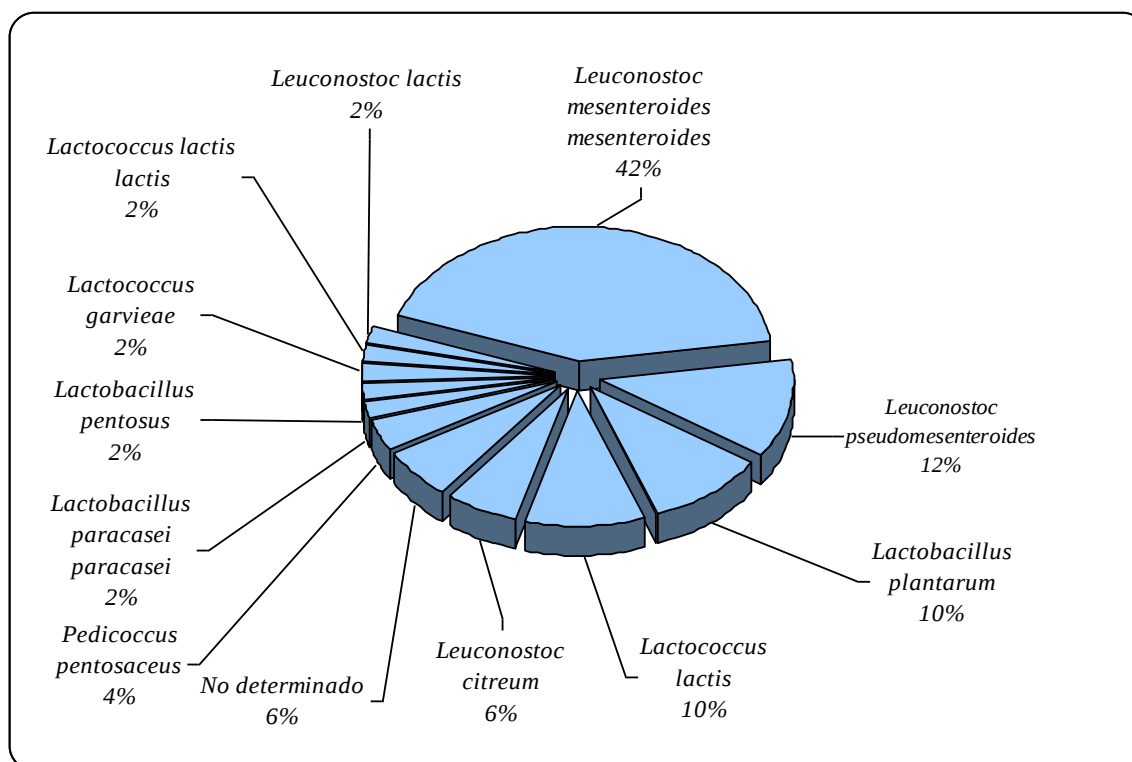


Figura 15. Porcentaje de cepas por especie identificadas mediante ribotipificación. n=50.

El 42% de las muestras, se agruparon con la cepa tipo de *Leuconostoc mesenteroides* sbp. *mesenteroides* DSM 20343^T (Tabla 7) presentando el mismo ribotipo. Diversos autores que han descrito la microflora nativa de diferentes productos fermentados, reportaron la presencia de esta subespecie (Cibik *et al.*, 2000; Herreros *et al.*, 2003; Muyanja *et al.*, 2003; Guessas y Kihal, 2004; Rashid *et al.*, 2007). La importancia de esta subespecie radica en los múltiples usos que podría tener como adjunto en la elaboración de alimentos fermentados por su capacidad de producir diferentes compuestos que otorgan propiedades deseables en los alimentos.

Identificación por ribotipificación	Código de cepa	Número de cepas	Porcentaje (%)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sbp. <i>mesenteroides</i>	1502, 2607, 2005, 2106, 0709, 1109, 1802, 1610, 1705, 1905, 2103, 2202, 3005, 0209, 1801, 3006, 2405, 2609, 2706, 2801, 3110	21	42
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	2510, 2509, 1706, 2502, 2602, 2503	6	12
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1509, 2408, 2704, 1708, 1607	5	10
<i>Lactococcus lactis</i>	0103, 2309, 0603, 0605, 1805,	5	10
<i>Leuconostoc citreum</i>	3010, 3104, 2007	3	6
No determinado	2909, 0508, 2802	3	6
<i>Pedicoccus pentosaceus</i>	2306, 1804	2	4
<i>Lactobacillus paracasei</i> sbp. <i>paracasei</i>	2209	1	2
<i>Lactobacillus pentosus</i>	2009	1	2
<i>Lactococcus garvieae</i>	2606	1	2
<i>Lactococcus lactis</i> sbp. <i>lactis</i>	0808	1	2
<i>Leuconostoc lactis</i>	2907	1	2

Tabla 7. Relación de cepas identificadas mediante ribotipificación. n=50.

Las 6 bacterias identificadas como *Leuconostoc pseudomesenteroides* presentaban ribotipos iguales a los de la cepa de referencia *Leuconostoc pseudomesenteroides* DSM 20343^T. En los estudios realizados por An *et al.* (2004) y Ouadghiri *et al.* (2005) encontraron un gran número de bacterias pertenecientes a esta especie en los productos analizados. Flórez *et al.* (2006) describieron la microflora presente en quesos azules; entre las diferentes especies de BAL encontradas, el 12.5% del total pertenecía a *L. pseudomesenteroides*. Estas bacterias son de gran importancia para la industria láctea donde son empleadas como cultivos iniciadores en conjunto con *Lactococcus lactis* sbp. *lactis* y *Lactococcus lactis* sbp. *lactis* biovar. *diacetylactis* para la producción de diversos productos lácteos fermentados, pero en particular para la elaboración de

suero fermentado, crema ácida y mantequilla de crema madurada. Esta especie produce diacetilo (2,3-butanediona) que es uno de los componentes principales responsables del sabor típico de estos productos. La concentración de diacetilo en suero fresco fermentado es típicamente de 2 a 4 mg/L (Ratnay et al., 2003).

Las bacterias identificadas como *Lactobacillus plantarum*, se agruparon junto con la cepa de referencia de *L. plantarum* ATCC 14917^T; diferentes autores han descrito la presencia de este microorganismo en productos derivados de leche (Fitzsimons et al., 1999; Beukes et al., 2001; Guessas y Kihal, 2004; Haddadin, 2005; Pisano et al., 2006). En un estudio sobre identificación de BAL en leches fermentadas tradicionales de Mongolia, realizado por An et al. (2004) se reportó la presencia de este microorganismo siendo también la especie predominante dentro de los microorganismos identificados. En el mismo año, Mathara et al. aislaron e identificaron BAL de una leche fermentada en Kenia; describiendo que dentro de los géneros encontrados, *Lactobacillus* era el más común y a la vez *L. plantarum* era el microorganismo predominante.

Un 6% del total de muestras analizadas se agruparon con la cepa de referencia *Leuconostoc citreum* LGM 9824^T, existen diferentes reportes de la presencia de esta especie en productos lácteos de elaboración artesanal, sin embargo no es una especie que se encuentre en concentraciones considerables (Cibik et al., 2000; Beukes et al., 2001; Savadogo et al., 2004; Ouadghiri et al., 2005). Se ha descrito la importancia de esta especie en la industria de síntesis de productos químicos, en especial por la capacidad que comparte con algunos géneros de BAL para producir glucosiltransferasas que catalizan la transferencia de glucosa y/o fructosa provenientes de la sacarosa a moléculas aceptoras, principalmente azúcares, para la síntesis de oligosacáridos de diferentes grados de polimerización (Olivares-Illana et al., 2003).

Las bacterias identificadas como *Pediococcus pentosaceus* se agruparon con la cepa tipo de esta subespecie, LMG 11488^T presentando un patrón de bandas igual; esta especie se ha aislado en trabajos de caracterización de productos fermentados (Tserovska et al., 2002; Rashid et al., 2007). De acuerdo con Satokari et al. (2000) la ribotipificación mostró una gran capacidad discriminatoria (más alta que métodos de identificación fenotípica) para identificar a nivel de especie y en muchos casos, diferenciar hasta nivel cepa miembros del género *Pediococcus*.

Dentro del género *Lactobacillus* se identificaron 1 subespecie y una especie más. Únicamente una muestra fue identificada como *Lactobacillus paracasei* sbp *paracasei* presentando un ribotipo similar al de la cepa de referencia *Lactobacillus paracasei* sbp *paracasei* LMG 6902^T; la presencia de esta cepa se ha descrito en trabajos sobre caracterización de la microflora nativa de productos lácteos fermentados (Bouton *et al.*, 1998; Swearingen *et al.*, 2001; Caridi, 2003; Guessas y Kihal, 2004; Morais, 2004). *Lactobacillus pentosus* fue otro microorganismo identificado, habiendo una cepa con un ribotipo igual al de la cepa tipo de la Colección Americana de Cultivos Tipo ATCC 14931^T, algunos autores han descrito el aislamiento de esta bacteria en alimentos que tuvieron una fermentación espontánea, es decir, que no fueron adicionados con cultivos iniciadores (An *et al.*, 2004; Morais, 2004).

Se identificó una muestra como *Leuconostoc lactis* al tener un ribotipo igual al de la cepa tipo CCUG 30064^T, este microorganismo es comúnmente aislado en productos lácteos (Beukes *et al.*, 2001; Morais, 2004 Savadogo *et al.*, 2004; Haddadin, 2005).

Una muestra fue identificada como *Lactococcus lactis* sbp. *lactis* por tener patrones de bandas iguales a los de la cepa tipo de esta subespecie LMG 8893^T, su presencia en alimentos fermentados ha sido descrita por diversos autores (Centeno *et al.*, 1996; Beukes *et al.*, 2001; Mas *et al.*, 2002; Muyanja *et al.*, 2003; An *et al.*, 2004; Morais, 2004; El-Baradei *et al.*, 2007; Rashid *et al.*, 2007). En el estudio realizado por Guessas y Kihal (2004) para caracterizar la flora microbiana de quesos elaborados con leche de cabra, encontraron que esta subespecie era la predominante. El estudio de caracterización microbiológica de queso Fiore Sardo con leche de oveja como principal ingrediente, realizado por Pisano *et al.* (2006) encontraron que el género *Lactococcus* era el más frecuente, siendo, *Lactococcus lactis* sbp. *Lactis* el microorganismo dominante con un 22.7% con respecto al total de las muestras analizadas.

Finalmente, también se identificó una cepa de *Lactococcus garvieae* que tenía el mismo ribotipo que la cepa de referencia de esta especie codificada como LMG 8893^T, esta especie ha sido encontrada en varios productos de fermentación espontánea por diversos autores (An *et al.*, 2004; Ouadghiri *et al.*, 2005; El-Baradei *et al.*, 2007).

En la tabla 8 se presenta una comparación de los resultados de la identificación fenotípica con API 50 CH™ y genotípicamente mediante ribotipificación. De acuerdo con los datos mostrados, una parte de las 50 cepas incluidas en el estudio fueron clasificadas correctamente con ambas técnicas, lo que supone un 34% de las cepas analizadas. Sin embargo, el análisis genotípico no corrobora la presencia de las especies *Lactococcus raffinolactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus fermentum* determinadas con el micrométodo; estableciendo la presencia de otras especies como *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Lactococcus garvieae* y *Leuconostoc lactis*.

Número de cepas	API 50 CH™	Número de cepas	Ribotipificación	Código ^a
2	<i>Carbacterium piscicola</i>	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sbp. <i>mesenteroides</i>	M
		1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	M
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	ND ^b	
2	<i>Lactobacillus brevis</i>	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sbp. <i>mesenteroides</i>	M
		1	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	M
2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sbp. <i>mesenteroides</i>	M
		1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sbp. <i>mesenteroides</i>	M
1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sbp. <i>mesenteroides</i>	M
4	<i>Lactobacillus paracasei</i> sbp. <i>paracasei</i>	1	<i>Lactobacillus paracasei</i> sbp. <i>paracasei</i>	B
		2	<i>Leuconostoc citreum</i>	M
		1	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	M
3	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	G
		1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	G
		1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sbp. <i>mesenteroides</i>	M
10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	<i>Lactobacillum plantarum</i>	B
		2	<i>Leuconostoc citreum</i>	M
		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sbp. <i>mesenteroides</i>	M
		1	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	M
		2	ND	
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sbp. <i>mesenteroides</i>	M
1	<i>Lactococcus lactis</i> sbp. <i>lactis</i>	1	<i>Lactococcus lactis</i> sbp. <i>lactis</i>	B
5	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1	<i>Lactobacillum plantarum</i>	M
		1	<i>Lactococcus garvieae</i>	G
		2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sbp. <i>mesenteroides</i>	M
		1	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	M
15	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sbp. <i>mesenteroides</i>	3	<i>Lactococcus lactis</i>	M
		1	<i>Leuconostoc citreum</i>	G
		1	<i>Leuconostoc lactis</i>	G
		10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sbp. <i>mesenteroides</i>	B
1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	B

Tabla 8. Comparación entre la identificación fenotípica y genotípica de BAL aisladas de productos lácteos de elaboración artesanal. ^a: B: especie correctamente identificada fenotípicamente; G: género correctamente determinado fenotípicamente; M: especie incorrectamente clasificada por métodos fenotípicos. ^b: ND: no determinado.

Como se puede observar en los resultados aquí descritos, existen cepas que mantenían un perfil de fermentación sumamente complejo; este problema no sólo corresponde a los patrones de fermentación sino en conjunto a los métodos fenotípicos donde ocasionalmente los resultados obtenidos son difíciles de interpretar ya que algunas características pueden ser modificadas con las condiciones de crecimiento o conservación de los microorganismos, además de que las bases de datos no contemplan especies atípicas o nuevas especies. Por lo general los métodos fenotípicos poseen un menor poder de discriminación en comparación con los métodos genotípicos. Un claro ejemplo de esto son los resultados obtenidos para el género *Leuconostoc*, donde las especies y subespecies encontradas en este estudio presentaban características bioquímicas y morfológicas muy heterogéneas. Para facilitar la diferenciación de éste género de otros con características fenotípicas similares existen pruebas como la determinación del isómero de ácido láctico producido por las cepas, siendo la estructura D(-) la predominante.

Con la comparación de los patrones de la fermentación de azúcares obtenidos mediante API 50 CH™ se identificaron las cepas analizadas; sin embargo, varios grupos de BAL tienen variaciones menores en estas características y en ciertas especies tienen un patrón altamente variable, que hace complicada una identificación confiable. La caracterización fenotípica basada en el patrón de fermentación de azúcares y en características morfológicas convencionales no siempre es eficiente para la identificación fiable de las bacterias lácticas, aunque se trata de una herramienta sumamente útil para una aproximación a la clasificación proporcionando información sobre sus necesidades nutricionales. Por lo tanto, el uso de un método fenotípico de identificación como el sistema API 50 CH™ debe ser complementado con alguna técnica genotípica, siendo el ribotipado una opción sumamente viable para una mayor precisión en la identificación de bacterias ácido lácticas. Si bien los resultados obtenidos con las técnicas genotípicas como la ribotipificación son más confiables, reproducibles y precisos; presentan ciertas desventajas, requiriendo personal especializado, siendo también más complejos y costosos comparados con los métodos fenotípicos. Es por ello que posiblemente no llegarán a desplazar el lugar ocupado por los métodos tradicionales de identificación que proporcionan información valiosa sobre el metabolismo, morfología, estructura y composición de algunos componentes celulares, que puede utilizarse para determinar las mejores condiciones de cultivo o las mejores cepas para ser utilizadas en determinados productos alimenticios.

7. CONCLUSIONES

- Se logró la reactivación de las muestras conservadas por liofilización para las pruebas de identificación.
- Mediante los perfiles de fermentación, se identificaron 5 géneros, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Pediococcus*. Siendo *Lactobacillus* el género de mayor incidencia.
- Finalmente, con la ribotipificación las muestras fueron clasificadas en 4 géneros, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Pediococcus*; descartando la presencia de *Carnobacterium*. Se determinó la presencia de once ribotipos, siendo *Leuconostoc mesenteroides* sbp. *mesenteroides* la especie predominante; seguida por *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc citreum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus paracasei* sbp. *paracasei*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* sbp. *lactis* y *Leuconostoc lactis*.
- Se ha puesto de manifiesto, el sistema API 50 CH™ junto con la ribotipificación son herramientas complementarias que permiten una mejor y más clara identificación de las bacterias ácido lácticas además de proporcionar información metabólica de las mismas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aarnikunnas, J., 2006. Metabolic engineering of lactic acid bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially important compounds. Tesis doctoral, Department of Basic Veterinary Sciences, Division of Microbiology and Epidemiology, University of Helsinki, Finlandia.
- Adams, M. R. y Hall, C. J., 1988. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23: 287-292
- Ahmad, N. y Marth, E. H., 1989. Behaviour of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35 degree in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic acid. *J. Food Prot.* 52: 688-695.
- Aixalà, R. C., 2002. Influència de components dels vins sobre el metabolisme d' *Oenococcus oeni* i sobre la seva dinàmica de poblacions a la fermentació malolàctica. Tesis doctoral, Universitat Rovira I Virgili Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Tarragona, España.
- Alais, C., 1980. Ciencia de la leche. Compañía Editorial Continental S. A., México.
- Amann, R. y Kühn, M., 1998. *In situ* methods for assessment of microorganisms and their activities. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 352-358.
- An, Y., Adachi, Y. y Ogawa, Y. 2004. Classification of lactic acid bacteria isolated from chigee and mare milk collected in inner Mongolia. *Ani. Sci. J.* 75: 245-252.
- Axelsson, L., 2004. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. En: Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Salminen, S., von Wright, A. y Ouwehand, A. (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, EE UU.
- Basaran, P., Basaran, N. y Cakir, I., 2001. Molecular differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and *cremoris* strains by ribotyping and site specific-PCR. *Curr. Microbiol.* 42 (1): 45-48.
- Bascomb, S. y Manafi, M., 1998. Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic Gram-positive cocci. *Am. Soc. Microbiol.* 11 (2): 318-340.
- Bayane, A., Roblain, D., Dubois, R. D., Destain, J. y Diawara, B., Thonart, P., 2006. Assessment of the physiological and biochemical characterization of a Lactic acid bacterium isolated from chicken faeces in sahelian region. *Afr. J. Biotechnol.* 5 (8): 629-634.
- Ben, K. A., Vaughan E. E. y de Vos W. M., 2007. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *J. Nutr.* 137: 741S-747S.
- Beukes, E. M., Besterb, B. H. y Mosterta, J. F., 2001. The microbiology of South African traditional fermented milks. *Int. J. Food Microbiol.* 63: 189-197.

- Björkroth, J. y Holzapfel, W. H., 2003. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. En: The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Dworkin, M. (Ed.). New York, EE UU.
- Björkroth, J. y Korkeala, H., 1996. Evaluation of *Lactobacillus sake* contamination in vacuum-packaged sliced cooked meat products by ribotyping. J. Food Protec. 59: 398-401.
- Björkroth, J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel, W. H., Korkeala, H. J. y Vandamme, P., 2002. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. Int. J. Syst. Bacteriol. 52: 141-148.
- Bouton, Y., Guyot, P. y Grappin, R., 1998. Preliminary characterization of microflora of comté cheese. J. Appl. Microbiol. 85: 123-131.
- Bucio, A. G., 2004. *Lactobacillus plantarum* 44A as a live feed supplement for freshwater fish. Tesis doctoral, University of Wageningen, Holanda.
- Byczkowski, J. y Gessner, T., 1988. Biological role of superoxide ion-radical. Int. J. Biochem. 20. 569-580.
- Cai, Y., Benno, Y., Takeda, A., Yoshida, T., Itaya, T. y Nakase, T., 1998. Characterization of *Leuconostoc* species isolated from vacuum-packaged ham. J. Gen. Appl. Microbiol. 44: 153-159.
- Cai, Y., Okada, H., Mori, H., Benno, Y. y Nakase, T., 1999a. *Lactobacillus paralimentarius* sp. nov., isolated from sourdough. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 1451-1455
- Cai, Y., Kumai, S., Ogawa, M., Benno, Y. y Nakase, T., 1999b. Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. Appl. Environ. Microbiol. 65 (7): 2901-2906.
- Cailliez-Grimal, C., Edima, H. C., Revol-Junelles, A. M. y Millière, J. B. 2007. Short communication: *Carnobacterium maltaromaticum*: the only *Carnobacterium* species in French ripened soft cheeses as revealed by polymerase chain reaction detection. J. Dairy Sci. 90: 1133-1138.
- Cailliez-Grimal, C., Miguindou-Mabiala, R., Leseine, M., Revol-Junelles, A. M. y Millière, J. B., 2005. Quantitative polymerase chain reaction used for the rapid detection of *Carnobacterium* species from French soft cheeses. FEMS Microbiol. Lett. 250:163-169.
- Caridi, A., 2003. Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from the artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. Int. J. Dairy Tech. 56 (2): 105-110.
- Casp, A. V. y Abril, J., 1999. Procesos de conservación de alimentos. Ed. Mundi-Prensa, España.
- Centeno, J. A., Menendez, S. y Rodríguez-Otero, J. L., 1996. Main microbial flora present as natural starters in cebreiro raw cow's milk cheese (northwest Spain). Int. J. Food Microbiol. 33: 307-313.

Champagne, C. P., 1998. Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. En: La Fondation des Gouverneurs et Edisem. Sainte-Hyacinthe, Canada.

Cibik, R., Lepage, E. y Talliez, P., 2000. Molecular diversity of *leuconostoc mesenteroides* and *leuconostoc citreum* isolated from traditional french cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification. Syst. Appl. Microbiol. 23 (2): 267-278.

Clavel, M. M., 2006. Condiciones microbiológicas y aislamiento de bacterias lácticas en quesos artesanales del estado de Hidalgo. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M. y Vernoux, J. P., 2003. Isolation, characterisation *Lactobacillus focusing* mainly on cheeses and other dairy products. Lait 83: 269-306.

Collins, E. B. y Gibson, G. R., 1999. Probiotics, prebiotics and synbiotics: dietary approaches for the modulation of microbial ecology. Am. J. Clin. Nutri. 69: 1052-1057.

Cogan, T. M. y Jordan, K. N., 1994. Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. J. Dairy Sci. 77: 2704-2717.

Conner, D. E., 1993. Naturally occurring compounds. En: Antimicrobials in Foods, 2ª edición, Davidson, P. M. y Branen, A. L. (Eds.). Marcel Dekker Inc., New York, EE UU.

Cords, B. R. y Dychdala, G. R., 1993. Sanitizers: halogens, surface-active agents, and peroxides. En: Antimicrobials in Foods, 2ª edición, Davidson, P. M. y Branen, A. L. (Eds.). Marcel Dekker Inc., New York, EE UU.

Corsetti, A., Settani, L., van Sinderen, D., Felis, G. E., Dellaglio, F. y Gobbetti, M., 2005. *Lactobacillus rossii* sp. nov., isolated from wheat sourdough. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 35-40.

Corthier, C., 2004. Los beneficios de los probióticos para la salud. Danone Vitapole Nutritopics, 29: 1-14.

Crittenden, R. G., 1999. Prebiotics. En; Probiotics: A critical review. Tannock, G. W. (Eds.), Horizon Scientific Press. Wymondham, UK.

Daeschel, M. A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. 43: 164-166.

Davidson, P. M., Post, L. S., Braner, A. L. y McCurdy, A. R., 1983. Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. En: Antimicrobials in Foods. Davidson, P. M. y Branen, A. L. (Eds.). Marcel Dekker Inc., New York, EE UU.

- Dellaglio, F., de Roissard, H., Torriani, S., Curk, M. C. y Janssens, D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. En: Bactéries lactiques. Volumen 1, De Roissard, H. y Luquet, F. M. (Eds.). Lorica, Uriage, Francia.
- Demarigny, Y., Beuvier, E., Dasen, A. y Duboz, G., 1996. Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheese, evolution of microflora during ripening and characterisation of facultatively heterofermentative *Lactobacilli*. Lait 76:371-387.
- De Martinis, C. P., Públio, R. P., Santarosa, R., Freitas, Z. 2001. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. Braz. J. Microbiol. 32 (1): 32-37.
- Díaz, R. G. y Wachter, R. C., 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. Rev. Latinoam. microbiol. 45: 30-40.
- Dicks, L. M. T., Dellaglio, F., y Collins, M. D., 1995. Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 45 (2): 395-397.
- Doleyres, Y., 2003. Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Tesis doctoral, Département des sciences des aliments et de nutrition, Faculté des Sciences de L'agriculture et de L'alimentation, Université Laval, Canada.
- Dos Santos, W. L. M, 1993. Aislamiento y Caracterización de una Bacteriocina Producida por *Pediococcus* sp. 347 de Origen Cárnico. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Dunne, C., Murphy, L., Flyin, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thorton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Keily, B., Quigley, E. M. M., O'Sullivan, G. C., Shanhan, F. y Collins, K., 1999. Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical human trials. Antonie van Leeuwenhoek 76: 279-292.
- Earnshaw, R. G., 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. En: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Wood, B. J. B. (Ed.). Elsevier Appl. Science, London, UK.
- Eklund, T., 1984. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. Int. J. Food Microbiol. 1: 179-185.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. y Ogier, J. C., 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian domiati cheese. Appl. Environ. Microbiol. 73 (4): 1248-1255.
- Entis, P., Fung, D. Y. C., Griffiths, M. W., McIntre, L., Rusell, S., Sharpe, A. N. y Tortorello, M. L., 2001. Rapid Methods for Detection, Identification, and Enumeration. En: Compendium of methods for the microbial examination of foods. 4ª edición, Pouch, F. e Ito, K. (Eds). American Public Health Association, Washington, EE UU.

- Facklam, R., y Elliott, J. A., 1995. Identification, Classification, and clinical relevance of catalase-negative, Gram-positive cocci, excluding the *Streptococci* and *Enterococci*. Am. Soc. Microbiol. 8 (4): 479-495.
- Farber, J. M., 1991. Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology - A review. J. Food Prot. 54: 58-70.
- Fitzsimons, N. A., Cogan, T. M., Condon, S. y Beresford, T., 1999. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter Lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. Appl. Environ. Microbiol. 65 (8): 3418-3426.
- Fleet, G. H., 1999. Microorganisms in food ecosystems. Int. J. Food Microbiol. 50: 101-117.
- Flórez, A. B., López-Díaz, T. M., Álvarez-Martín, P. y Mayo, B., 2006. Microbial characterisation of the traditional Spanish blue-veined Cabrales cheese: identification of dominant lactic acid bacteria. Eur. Food Res. Techn. 223 (4): 503-508.
- Frazier, W. C. y Wethoff, D. C., 1993. Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia.
- FSANZ (Food Standards in Australia and New Zeland), 2006. A risk profile of dairy products in Australia, Primary production and processing standard for dairy.
- Gevers, D., Huys, G. y Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. FEMS Microbiol. Lett. 205 (1): 31-36.
- Gibson, G. R., 2004. From probiotics to prebiotics and a healthy digestive system. J. Food Sci. 69 (5): M141-M143.
- Gibson, G. R., y Roberfroid, M. B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota. J. Nutri. 125: 1401-1412.
- Giraffa, G., Gatti, M., Rossetti, L., Senini, L. y Neviani, E., 2000. Molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* as revealed by genotypic characterization. Appl. Environ. Microbiol. 66 (4): 1259-1265.
- Giraffa, G. y Neviani, E., 1999. Different *Lactobacillus helveticus* strain populations dominate during Grana Padano cheesemaking, Food Microbiol. 16: 205-210.
- González, V. R., Ruiz, G. O., García, I. E. y Vega, G. M., 2005 Aplicaciones de la biotecnología en seguridad alimentaria. Agencia Española de Seguridad Alimentaria/Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica
- González-Martínez, B. E., Gómez-Treviño, M. y Jiménez-Salas, Z., 2003. Bacteriocinas de probióticos. RESPYN 4 (2): 99-106.
- Gould, G. W., 1991. Antimicrobial compound. En: Biotechnology and Food Ingredients. Goldberg, I. y Williams, R. (Eds.). Van Nostrand Reinhold, New York, EE UU.

Grant, C. y Salminen, S., 1998. The potential of *Propionibacterium* spp. as probiotics. En: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Salminen, S., von Wright, A. (Eds). Marcel Dekker Inc., New York, EE UU.

Guessas, B. y Kihal, M., 2004. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goat's milk. *Af. J. Biotech.* 3 (6): 339-342.

Gurses, M. y Erdogan, A., 2006. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tulum cheese during ripening period. *Int. J. Food Prop.* 3: 551-557.

Gutiérrez M. J., 2005. Caracterización inmunoquímica de la *Enterocina P* y evaluación de su clonación, producción y expresión funcional en *Escherichia coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Lactococcus lactis* y *Pichia pastoris*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España.

Haddadin, J. S. Y., 2005. Kinetic Studies and Sensorial analysis of lactic acid bacteria isolated from white cheese made from sheep raw milk. *Pak. J. Nutr.* 4 (2): 78-84.

Hammes, W. P. y Hertel, C., 2003. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. En: The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Dworkin, M. (Ed.). New York, EE UU.

Herbin, S; Mathieu, F; Brule F; Branlant, C; Lefebvre, G. y Lebrihi, A; 1997. Characteristics and genetic determinants of bacteriocin activities produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 isolated from cheese. *Cur. Microbiol.* 35 (6): 319-326.

Herreros, M. A., Fresno, J. M., Gonzalez-Prieto, M. J. y Tornadijo, M. E., 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *Int. Dairy J.* 13 (6): 469-479.

Holt, S. M., Al-Sheikh, H. y Shin, J. K., 2001. Characterization of dextran-producing *Leuconostoc* strains. *Lett. Appl. Microbiol.*, 32: 185-189.

Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (2): 365S-373s.

Hotchkiss, J. H., Chen, J. H. y Lawless, H. T., 1999. Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. *J. Dairy Sci.* 82: 690-695.

Huang, L., Forsberg, C. W. y Gibbins, L. N., 1986. Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermented products. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1230-1234.

ICMSF (International Comisión on Microbiological Specification for Food), 1980. Ecología microbiana de los alimentos; factores que afectan la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Ed. Acribia, España.

- Jay, M. J., 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 525-532.
- Jay, M. J. 1992. *Microbiología Moderna de los Alimentos*. 3ª edición. Ed. Acribia. España.
- Jay, M. J. 2000. *Microbiología Moderna de los Alimentos*. 4ª edición. Ed. Acribia. España.
- Kabara, J. J., 1993. Medium-chain fatty acids and esters. En: *Antimicrobials in Foods*, 2ª edición., Davidson, P. M. y Branen, A. L. (Eds). Marcel Dekker Inc., New York, EE UU.
- Kandler, O. y Weiss, N., 1986. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. y Holt, J. G.. (Eds.). Williams & Wilkins Co., EE UU.
- Kashket, E. R., 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.* 46 (3): 233-244.
- Kim, J., Chun, J. y Han, H. U., 2000. *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1915-1919.
- Kimoto, H., Nomura, M., Kobayashi, M., Okamoto, T. y Ohmomo, S., 2004. Identification and probiotic characteristics of *Lactococcus* strains from plant materials. *JARQ* 38 (2): 111-117.
- Kong, S. y Davison, A. J., 1980. The role of interactions between O₂, H₂, OH⁻, e⁻ and O₂⁻ in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 204: 13-29.
- Koort, J., 2006. Polyphasic taxonomic studies of lactic acid bacteria associated with non-fermented meats. Tesis doctoral, Department of Food and Environmental, University of Helsinki, Finlandia.
- Koort, J., Vandamme, P., Schillinger, U., Holzapfel, W. y Björkroth, J., 2004. *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* is a later synonym of *Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1621-1626.
- Kraszewska, J. y Wzorek, W., 2007. Changes of the selected properties of *Lactobacillus plantarum* ATCC 4080 during storage of malt beverage. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 6(1): 69-81.
- Leveau, J. Y. y Bouix, M., 2000. *Microbiología industrial*. Los microorganismos de interés industrial. Ed. Acribia, España.
- Lim, D., 1998. Composition and structure of procariotyc and eucaryotic cells. En: *Microbiology*, 2ª edición. Ed. McGraw-Hill Co. Inc., EE UU.
- Lindgren, S. E., y Dobrogosz, W. J., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 149-164.

- Lourens-Hattingh, A. y Viljoen, B. C., 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.* 11: 1-17.
- MacFaddin, J. F; 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana, Argentina.
- Makras, L., Van Acker, G. y De Vuyst, L., 2005. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (11): 6531-6537.
- Mas, M., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I., Gonzalez, J., Rebollo, J. E. y Cáceres, P., 2002. Ibore's goat's milk cheese: Microbiological and physicochemical changes throughout ripening. *Lait* 82: 579-587.
- Mathara, J. M., Schillinger, U., Kutima, P. M., Mbugua, S. K. y Holzappel, W. H., 2004. Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* 94 (3): 269-278.
- Micklos, D. A., Freyer G. A., 2003. DNA Science a first course. CSHL Press, EE UU.
- Millière, J. B. y Lefebvre, G., 1994a. *Carnobacterium piscicola*, a common species of French soft cheeses from cow's raw milk. *Neth. Milk Dairy J.* 48: 19-30.
- Millière, J. B., Michel, M., Mathieu, F. y Lefebvre, G., 1994b. Presence of *Carnobacterium* spp. in french surface mould-ripened soft-cheese. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 264-269.
- Miteva, V., Boudakov, G. I., Ivanova-Stoyancheva, Marinova, B., Mitev, V. y Mengaud J., 2001. Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* spp. by ribotyping and amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *J. Appl. Microbiol.* 90 (6): 909-918.
- Morais, J. 2004. Estudio de adecuación de cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja guirrapara la elaboración de queso. Tesis doctoral, Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, España.
- Mossel, D. A. A., Moreno, B. y Struijk, C. B., 2003. Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia, España.
- Muñoz, P. P. A, 2006. Optimización de la producción de la *Enterocina AS-48* y ensayo de su eficacia como bioconservante en alimentos. Tesis doctoral, Universidad de Granada, España.
- Muyanja, C. M. B. K., Narvhus, J. A., Treimo, J. y Langsrud T. 2003. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 201-210.
- Narváez, P., Pedroza, R., Alonso, G. y Rodríguez L. V., 2005. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 25 (1): 29-34.

Naser, S; Thompson, F. L; Hoste, B. Gevers, D; Vandemeulebroecke, K; Cleenwerck, I; Thompson, C. C., Vancanneyt, M., y Swings, J., 2005. Phylogeny and identification of *Enterococci* by *atpA* gene sequence analysis. J. Clin. Microbiol. 43 (5): 2224-2230.

Neefs, J. M., van de Peer, Y., Hendriks, L. y de Wachter, R., 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucl. Acids Res. 18: 2237-2330.

Niamsup, P., Nengah, I. S., Tanaka, M., Sone, T., Hanada, S., Kamagata, Y., Lumyong, S., Assavanig, A., Asano, K., Tomita, F. y Yokota, A., 2003. *Lactobacillus thermotolerans* sp. Nov; a novel thermotolerant species isolated from chicken faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 263-268.

Nieto, L. I., Donolo, A. S., Bava, A. J. y Yantorno, O. M., 2004. Empleo de espectroscopia infrarroja-transformada de Fourier para diferenciar bacterias de importancia clínica. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. 38 (3): 289-295.

Nigatu, A., 2000. Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. J. Appl. Microbiol., 89: 969-978.

Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, M., Kimoto-Nira, H. y Okamoto, T., 2006. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. J. of App. Microbiol. 101: 396-405.

O'Hara, C. M., Weinstein, M. P. y Miller, J. M., 2003. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms, En: Manual of clinical microbiology, 8ª edición, Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A. Jorgensen, J. H. y Tenover, R. C. (Eds.). American Society for Microbiology, EE UU.

Olsen, G. J. y Woese, C. R., 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. FASEB J. 7: 113-123.

Olivares-Illana, V., López-Munguía, A. y Olvera, C., 2003. Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. J. Bacteriol. 185 (12): 3606-3612.

Osmanagaoglu, Ö; Beyatli, Y. y Gündüz, U., 2001. Isolation and characterization of pediocin producing *Pediococcus pentosaceus* Pep1 from vacuum-packed sausages. Turk. J. Biol., 25: 133-143.

Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M. y Swings, J., 2005. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese. FEMS Microbiol. Lett. 251: 267-271.

Ouwehand, A. C., 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2ª edición. Salminen, S. y von Wright, A. (Eds). Marcel Dekker Inc., New York, EE UU.

- Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G. y Cerning, J., 2000. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (6): 2302-2310.
- Piard, J. C. y Desmazeaud, M., 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 71: 525-541.
- Piard, J. C. y Desmazeaud, M., 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait* 72: 113-142.
- Pisano, M. B., Fadda, M. E., Deplano, M., Corda A. y Cosentino, S., 2006. Microbiological and chemical characterization of Fiore Sardo, a traditional Sardinian cheese made from ewe's milk. *Int. J. Dairy Tech.* 59 (3): 171-179.
- Pitcher, D. G., Saunders, N. A. y Owen, R. J., 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8: 151-156.
- Podolak, P. K., Zayas, J. F., Kastner, C. L., y Fung, D. Y. C., 1996. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* 59: 370-373.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J. y Gopal, P. K., 1998. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J.* 8: 993-1002.
- Pulido, R. P., Ben, O. N., Abriouel, H., Lucas, L. R., Martínez, C. M., Guyot, J. P. y Gálvez, A., 2007. Characterization of *Lactobacilli* isolated from caper berry fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 102: 583-590.
- Rachman, C., Kabadjova, P., Valcheva, R., Hervé Prévost, H. y Dousset, X., 2004. Identification of *Carnobacterium* species by restriction fragment length polymorphism of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region and species-specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (8): 4468-4477.
- Rao, D. R. y Reddy, J. C., 1984. Effect of lactic fermentation of milk on milk lipids. *J. Food Sci.* 49: 748-750.
- Rashid, H; Togo, K., Ueda M. y Miyamoto, T., 2007. Identification and characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk Dahi in Bangladesh. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 125-133.
- Ratnay, F. P., Myling-Petersen, D., Larsen, D. y Nilsson, D., 2003. Plasmid-encoded diacetyl (Acetoin) reductase in *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (1): 304-311.
- Reid, G. G., Sanders, M. E. y Gaskins, H. R., 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J. Clin. Gastroen.* 37: 105-118.

- Reiter, B. y Härnuly, B. G., 1984. Lactoperoxidase antibacterial systems: natural occurrence, biological functions and practical applications. *J. Food Prot.* 47: 724-732.
- Richards, R. M. E., Xing, D. K. L. y King, T. P; 1995. Activity of *p*-aminobenzoic acid compared with other organic acids against selected bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 209-215.
- Rodicio, M. R. y Mendoza, M. C., 2004. Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22 (4): 238-245.
- Rothschild, P., 1995. Internal defences. *Dairy Ind. Int.* 2: 24-25.
- Roberfroid, M. B., 1996. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides. *Nutr. Rev.* 54: 38-42.
- Roberfroid, M. B., 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1682-1687.
- Salminen, S. y von Wright, A., 1998. Current probiotics-safety assured? *Micro. Ecol. Health & Disease*, 10: 68-77.
- Samaržija, D., Antunac, N. y Havranek, J. L., 2001. Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. *Mljekarstvo* 51 (1): 35-48.
- Samelis, J., Rementzis, J., Tsakalidou, E. y Metaxopoulos, J., 1998. Usefulness of rapid GC analysis of cellular fatty acids for distinguishing *Weissella viridescens*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella hellenica* and some non-identifiable, arginine-negative *Weissella* strains of meat origin. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 260-265.
- Sanders, M. E., 2003. Probiotics: Considerations for human health. *Nutri. Reviews*, 61: 91-99.
- Sanders M. E. y Huis in't Veld, J., 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 293-315.
- Sanders, M. E. y Klaenhammer, T. R., 2001. *Invited Review: The Scientific Basis of Lactobacillus acidophilus* NCFM Functionality as a Probiotic. *J. Dairy Sci.* 84: 319-331.
- Santos, E. M., Jaime, I., Rovira, J., Lyhs, U., Korkeala, H. y Björkroth, J., 2005. Characterization and identification of lactic acid bacteria in "morcilla de Burgos". *Int. J. Food Microbiol.* 97: 285-296.
- Sanz, B., Selgas, D., Parejo, I. y Ordonez, J. A., 1988. Characteristics of *Lactobacillus* isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 6: 199-205.
- Satokari, R., Mattila-Sandholm, T. y Suihko, M. L., 2000. Identification of *Pediococcus* by ribotyping. *J. Appl. Microbiol.* 88: 260-265.

- Savadogo, A. Ouattara, C. A. T., Savadogo, P. W., Ouattara, A. S., Barro, N. y Traore, A. S., 2004. Microorganisms involved in Fulani traditional fermented milk in Burkina Faso. *Pakistan J. Nutr.* 3 (2): 134-139.
- Schillinger, U. y Lücke, F. K., 1987. Identification of *Lactobacilli* from meat and meat products. *Food Microbiol.* 4: 199-208.
- Schillinger, U. y Lücke, F. K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.
- Schleifer, K. H. y Kandler, O., 1972. Petidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36: 407-477.
- Schleifer, K. H. y Stackebrandt, E., 1983. Molecular systematics of prokaryotes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 143-187.
- Schrezenmeir, J. y de Vrese, M., 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (2): 361S-364s
- Seema, P. N. y Kumaran, P. S., 2004. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. *J. Cult. Collect.* 4: 48-52.
- Shah, N. P., 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* 83: 894-907.
- Sharpe, M. E., Garvie, E. I. y Tilbury, R. H., 1972. Some slime forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*. *Appl. Microbiol.* 23: 389-397.
- Shuangquan, Burentegusi, Yu, B., y Miyamoto, T., 2006. Microflora in traditional starter cultures for fermented milk, hurunge, from Inner Mongolia, China. *Ani. Scien. J.* 77: 235-241.
- Silvestroni, A., Connes, C., Sesma, F., Savoy de Giori, G. y Piard, J. C., 2002. Characterization of the *melA* Locus for α -Galactosidase in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (11): 5464-5471.
- Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald, G. F. y Ross, R. P., 2001. Genomic diversity within the genus *Pediococcus* as revealed by randomly amplified polymorphic DNA PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2): 765-771.
- Smulders, F. J. M., Barendsen, P., van Logtestijn, J. G., Mossel, D. A. A. y van Der Marel, G. M., 1986. Review: lactic acid: considerations in favor of its acceptance as a meat decontaminant. *J. Food Technol.* 21: 419-436.
- Sneath, P. H. A., Hair, N. S. y Sharpe, M. E., 1986. *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology Volumen 2*. Ed. William & Willkins Press Co., EE UU.

Southern, E. M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

Southern, E. M., 2006. Southern blotting. *Nat. Protoc.* 1 (2): 518-25.

Stamer, J. R., 1976. Lactic acid bacteria. En: *Food microbiology: public health and spoilage aspects*. Defigueiredo, M. P. y Splittstoesser, D. F. (Ed.). AVI Publishing, EE UU.

Stanton, C., Ross, P., Fitzgerald, G. F. y Van Sinceren, D., 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr. Opin. Biotech.* 16: 198-203.

Stiles, M. E. y Holzapfel, W. H., 1997. Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.

Stryer, L., 1990. *Bioquímica*. 3^{er} edición, Editorial Reverte, España.

Svec, P., Dráb V. y Sedláček, I., 2005. Ribotyping of *Lactobacillus casei* group strain isolated from dairy products. *Folia Microbiol.* 50 (3): 223-228.

Swearingen, P. A., O'Sullivan, D. J. y Warthesen, J. J., 2001. Isolation, characterization, and influence of native, nonstarter lactic acid bacteria on Cheddar cheese quality. *J. Dairy. Sci.* 84: 50-59.

Talarico, T. L. y Dobrogosz, W. J., 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 (5): 674-679.

Trüper, H. G. y Schleifer, K., 1999. Prokaryote characterization and identification. En: *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Dworkin, M. (Ed.). New York, EE UU.

Tserovska, L., Stefanova, S. y Yordanova, T., 2002. Identification of lactic acid bacteria isolated from Katyk, Goat's milk and cheese. *J. Cult. Collect.* 3: 48-52.

Tynkkynen, S., Satokari, R., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T. y Saxelin, M., 1999. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (9): 3908-3914.

Valenzuela, A. B., Maiz, A. G., 2006. El rol de la fibra dietética en la nutrición enteral. *Rev. Chil. Nutr.* 33 (2): 342-351

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. y Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407-438.

Van der Meulen, R., Avonts, L. y De Vuyst, L., 2004. Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (4): 923-930.

- Wagner, M. K. y Moberg, L. J., 1989. Present and future use of traditional antimicrobials. Food Technol. 1: 143-147.
- Wagner, N., Tran, Q. H., Richter, H., Selzer, P. M. y Uden, G., 2005. Pyruvate fermentation by *Oenococcus oeni* and *Leuconostoc mesenteroides* and role of pyruvate dehydrogenase in anaerobic fermentation. App. And Environ. Microbiol. 71 (9): 4966-4971.
- Wiese, B. G., Strohm, W., Rainey, F. A. y Diekmann, H., 1996. *Lactobacillus panis* sp. nov., from Sourdough with a Long Fermentation Period. Int. J. Syst. Bacteriol. 46 (2): 449-453.
- Wong, H. C. y Chen, Y. L., 1988. Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2179-2184.
- Wood, B. J. B. y Holzapfel, W. H., 1995. The Lactic Acid Bacteria, vol. 2 "The Genera of Lactic Acid Bacteria". Blackie Academic & Professional, UK.
- Woolford, M. K., 1975. Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. J. Sci. Food Agric. 26: 229-237.
- Xu, H., Kawamura, Y., Li, N., Zhao, L., Li, T., Li, Z., Shu, S. y Ezaki, T., 2000. A rapid method for determining the G-C content of bacterial chromosomes by monitoring fluorescence intensity during DNA denaturation in capillary tube. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 1463-1469.
- Zuckerlandl, E. y Pauling, L., 1965. Molecules as documents of evolutionary history. J. Theor. Biol. 8: 357-366.

9. Anexos

9.1 Reactivos y soluciones

- **Cristal violeta**

Violeta cristal	2.0 g
Etanol 95%	20 ml
Oxalato amónico	0.8 g
Agua destilada	80 ml

- **Lugol**

Yodo	1.0 g
Yoduro de potasio	2 g
Agua destilada	80 ml

- **Alcohol-acetona**

Etanol 75%	70 ml
Acetona 35%	30 ml

- **Safranina**

Safranina	0.25 g
Etanol 95%	10 ml
Agua destilada	100 ml

- **Buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA, pH 8)**

Tris-HCl 1 M (pH 7.5)	1 ml
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	0.2 ml
Agua destilada estéril	Aforar a 100 ml

- **Solución buffer TE, lisozima y mutanolisina.**

Mutanolisina (1000 U/ml)	500 µl
Lisozima (50mg/ml)	1000 µl
Buffer TE	700 µl

- **Acetato de amonio**

Acetato de amonio	57.75 g
Agua destilada estéril	Aforar a 100 ml

- **Solución GES (5 M Tiocianato de guanidina)**

Tiocianato de guanidina	60 g
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	20 ml
Sarkysol 10%	5 ml
Agua destilada estéril	Aforar a 100 ml

- **Buffer NE**

Tris-HCl 1 M (pH 7.5)	10 mM
Cloruro de sodio	50 mM
Cloruro de magnesio	10 mM
Ditioeritritol	1mM

- **Ficol**

Azul de bromofenol	0.25 g
Xileno cianol	0.25 g
Ficol	15 g
Agua destilada estéril	Aforar a 50 ml

- **Solución TAE 1X**

Trizma base	4.84 g
Ácido acético glacial	1.14 ml
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	2.0 ml
Agua destilada estéril	Aforar a 1000 ml

- **Solución depurinante (HCl 0.25 N)**

Ácido Clorhídrico 25%	36.6 ml
Agua destilada estéril	Aforar a 1000 ml

- **Solución desnaturalizante (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH)**

Cloruro de sodio	87.6 g
Hidróxido de sodio	20 g
Agua destilada estéril	Aforar a 1000 ml

- **Solución neutralizante (1 M Tris, 2 M NaCl)**

Tris	121.1 g
Cloruro de sodio	87.6 g
Agua destilada estéril	800 ml

- **Solución salina citrada 20X (20X SCC)**

Citrato trisódico	88.2 g
Cloruro de sodio	175 g
Agua destilada estéril	Aforar a 1000 ml

- **Solución salina citrada 4X (4X SCC)**

Citrato trisódico	15.48 g
Cloruro de sodio	35.1 g
Agua destilada estéril	Aforar a 1000 ml

- **Solución de lavado A (2X SSC, 0,1% SDS)**

20X SCC	100 ml
SDS 10%	10 ml
Agua destilada estéril	Aforar a 1000 ml

- **Solución de lavado B (0.1X SSC, 0,1% SDS)**

20X SCC.....	5 ml
SDS 10%.....	10 ml
Agua destilada estéril.....	Aforar a 1000 ml

- **Buffer 1 (100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl)**

Tris-HCl 1 M (pH 7.5)	100 ml
NaCl	50 ml
Agua destilada estéril.....	Aforar a 1000 ml

- **Buffer 2**

Agente bloqueador.....	2 g
Buffer 1	200 ml

- **Buffer 3 (100 mM Tris-HCl, pH 9.5; 100 mM NaCl; 20 mM MgCl₂)**

Tris-HCl 1 M (pH 9.5).....	100 ml
Cloruro de sodio 3 M.....	33.3 ml
Cloruro de sodio.....	50 ml
Agua destilada estéril.....	Aforar a 1000 ml

9.2 Compuestos en los microtubos del sistema API 50 CH™

TUBO	PRUEBA	INGREDIENTE ACTIVO	CONCENTRACIÓN (µG)
0	-----	Control negativo	-----
1	GLY	Glicerol	1.64
2	ERY	Eritrol	1.44
3	DARA	D-arabinosa	1.4
4	LARA	L-arabinosa	1.4
5	RIB	D-ribosa	1.4
6	DXYL	D-xilosa	1.4
7	LXYL	L-xilosa	1.4
8	ADO	D-adonitol	1.36
9	MDX	Metil-βD-xylopiranosida	1.28
10	GAL	D-galactosa	1.4
11	GLU	D-glucosa	1.56
12	FRU	D-fructosa	1.4
13	MNE	D-manosa	1.4
14	SBE	L-sorbosa	1.4
15	RHA	L-ramnosa	1.36
16	DUL	Dulcitol	1.36
17	INO	Inositol	1.4
18	MAN	D-manitol	1.36
19	SOR	D-sorbitol	1.36
20	MDM	Metil-αD-Manopiranosida	1.28
21	MDG	Metil-αD-Glucopiranosida	1.28
22	NAG	N-acetilglucosamina	1.28
23	AMY	Amigdalina	1.08
24	ARB	Arbutina	1.08
25	ESC	Esculina/Citrato férrico	1.16/0.152
26	SAL	Salicina	1.04
27	CEL	D-celobiosa	1.32
28	MAL	D-maltosa	1.4
29	LAC	D-lactosa (de origen bovino)	1.4
30	MEL	D-melibiosa	1.32
31	SAC	D-sacarosa (sucrose)	1.32
32	TRE	D-trehalosa	1.32
33	INU	Inulina	1.28
34	MLZ	D-melecitosa	1.32
35	RAF	D-rafinosa	1.56
36	AMD	Almidón	1.28
37	GLYG	Glicógeno	1.28
38	XLT	Xilitol	1.4
39	GEN	Gentiobiosa	0.5
40	TUR	D-turanosa	1.32
41	LYX	D-lixosa	1.4
42	TAG	D-tagatosa	1.4
43	DFUC	D-fucosa	1.28
44	LFUC	L-fucosa	1.28
45	DARL	D-arabitol	1.4
46	LARL	L-arabitol	1.4
47	GNT	Gluconato potásico	1.84
48	2KG	2-cetogluconato potásico	2.12
49	5KG	5-cetogluconato potásico	1.8

9.3 Medios de cultivo

- **Agar MRS**

Fórmula	g/l
Peptona de proteosa N° 3	10.0
Extracto de carne	10.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	20.0
Tween 80	1 ml
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Citrato de amonio	2.0
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Agar	15.0

- **Caldo MRS**

Fórmula	g/l
Peptona de proteosa N° 3	10.0
Extracto de carne	10.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	20.0
Tween 80	1 ml
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Citrato de amonio	2.0
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05

- **API 50 CHL medium TM**

FÓRMULA	G/L
Polipectona	10
Extracto de levadura	5
Tween 80	1 ml
Fosfato dipotásico	2
Acetato de sodio	5
Citrato de amonio	2
Sulfato de magnesio	0.20
Sulfato de manganeso	0.05
Purpura de bromocresol	0.17