



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE PUEBLA

PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS ÁCIDO LACTICAS
AISLADAS DE DIVERSAS FUENTES**

PROYECTO DE FIN DE CARRERA
PRESENTADO POR
MIGUEL ANGEL TAMER MEYER

**PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

DIRECTORA DEL PROYECTO:
MC. MA. GABRIELA ALVARADO CASTILLO

REVISORES:
DRA. CLAUDIA MONTALVO PAQUINI
M.C. MA. DEL TRANSITO BORRAZ ARGUELLO

Estadía Profesional realizada, dentro del marco de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, en los laboratorios del Departamento de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Politécnica de Puebla. Tercer carril del Ejido "Serrano" S/N, San MateoCuanalá, Municipio Juan C. Bonilla, Puebla C.P. 72640.

SAN MATEO CUANALÁ, PUEBLA. 23 DE AGOSTO DE 2018

El presente proyecto de investigación titulado “Identificación fenotípica de cepas bacteria ácido lácticas aisladas de diversas fuentes” y realizado por Miguel Angel Tamer Meyer, ha sido revisada y aprobada por el siguiente consejo particular, para obtener el Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Consejo Particular

Firma

M.C. Ma. Gabriela Alvarado Castillo

Dra. Claudia Montalvo Paquini

M.C. Ma. del Tránsito Borraz Arguello

San Mateo Cuanalá, Puebla, México. 23 de agosto de 2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón a todas las personas que me apoyaron durante todo el curso de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, me gustaría hacer mención principalmente a mis padres, mi hermano, mi novia y a mis amigos cercanos que me dieron el apoyo emocional para poder sobrellevar los momentos de estrés y presión, los momentos donde dudaba de mí mismo e hicieron que lograra seguir adelante. También hacer mención de todos los profesores que me impartieron clases y que me ayudaron a lo largo de todo este viaje, me gustaría agradecer con mis más sinceras gracias a: La M.C. Ma. Del Tránsito Borraz Argüello, M.C. Ma. Gabriela Alvarado Castillo, Dra. Claudia Montalvo Paquini, Dra. Lucila Valdéz Castro quienes me mostraron que tengo las capacidades para realmente salir adelante y que a pesar de mis fallos siempre estuvieron ahí enseñándome, ayudándome y mostrándome cómo poder mejorar día con día, siempre las recordaré, estoy muy contento de haberlas conocido y haber tenido la oportunidad de tener a cada una de ellas como mis profesoras.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	6
I. INTRODUCCIÓN	7
II. OBJETIVOS	8
1. OBJETIVOS GENERALES:.....	8
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	8
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	9
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	9
2. GÉNERO DE <i>Streptococcus</i>	9
3. GÉNERO DE <i>Lactococcus</i>	10
4. GÉNERO DE <i>Lactobacillus</i>	11
5. GÉNERO DE <i>Enterococcus</i>	12
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
1. REACTIVACIÓN DE CEPAS BACTERIA ÁCIDO LÁCTICAS	13
2. DETERMINACIÓN DE PUREZA DE CEPAS	13
3. CONSERVACIÓN EN GLICEROL AL 20%	13
4. PREPARACIÓN DE INÓCULOS	14
5. MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA, TINCIÓN DE GRAM Y PRUEBA DE CATALASA	14
6. CRECIMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS	14
7. CRECIMIENTO A DIFERENTES PH	15
8. CRECIMIENTO A DIFERENTE CONCENTRACIÓN DE NA ₂ CO ₃	15
9. MEDIO AGAR LBS.....	15
13. MEDIO AGAR LACTOSA AZUL DE CHINA	17
15. PERFIL DE AZUCARES.....	18
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
1. DETERMINACIÓN DE PUREZA DE CEPAS	19
2. MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA, TINCIÓN DE GRAM Y PRUEBA DE CATALASA	20
5. CRECIMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS	23
6. CRECIMIENTO A DIFERENTES PH	24
7. CRECIMIENTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NA ₂ CO ₃	24

8. CRECIMIENTO EN MEDIOS DE CULTIVO ADICIONADOS CON SALES BILIARES	24
9. PRUEBA DE MOVILIDAD Y ORNITINA EN MEDIO MIO.....	25
10. FERMENTACIÓN EN EL MEDIO AGAR M5	25
11. FERMENTACIÓN DE GLUCOSA Y FORMACIÓN DE GAS.....	26
12. PERFIL DE AZÚCARES.....	26
13. CONSERVA EN GLICEROL AL 20%.....	31
VI. CONCLUSIÓN	31
VII. LITERATURA CITADA.....	32

ÍNDICE DE CUADROS

	17
Tabla 1: Resultados de morfología macroscópica y microscópica	
Tabla.2. Resultados de morfología microscópica, pureza, tinción de Gram y catalasa para las cepas de estudio	19
Tabla 3. Resultados del perfil de azúcares en placas de 96 pozos	24
Tabla 4: Referencia de resultados del perfil de azúcares de diferentes especies de bacterias ácido lácticas homofermentativas estrictas	26
Tabla 5: Referencia de resultados del perfil de azúcares de diferentes especies de bacterias ácido lácticas heterofermentativas facultativas	27
Tabla 6: Referencia de resultados del perfil de azúcares de diferentes especies de bacterias ácido lácticas heterofermentativas obligadas	28
Tabla 7: Resultados obtenidos de las pruebas fenotípicas de las cepas obtenidas del cepario de la Universidad Politécnica de Puebla	29

RESUMEN

La presente investigación consiste en la identificación de 10 cepas obtenidas del cepario de la Universidad Politécnica de Puebla mediante análisis de pruebas fenotípicas, dicha investigación se apoyara principalmente en lo mencionado por el manual de determinación bacteriológica de Bergey y el libro del Prokaryotes para llevar a cabo la identificación de las distintas cepas de estudio. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias heterogéneas y están caracterizadas por ser Gram positivas, usualmente catalasa negativo, sin motilidad, no esporulantes y que como mayor producto durante la fermentación de carbohidratos generan ácido láctico (Purohit, 2012). Se realizaron pruebas de resistencia de distintos factores de crecimiento como: temperatura, pH, concentración de NaCl y sales biliares. También se llevaron a cabo pruebas de crecimiento en medios de cultivo selectivos y diferenciales específicos para bacterias ácido lácticas así como el perfil de azúcares fermentables de 8 distintos carbohidratos, y se encontró que las cepas de estudio podrían ser del género de *Lactobacillus* y *Enterococcus*.

Palabras clave: identificación fenotípica, bacterias ácido lácticas, pruebas de resistencia, crecimiento en diferentes medios de cultivo selectivo y diferencial, perfil de azúcares fermentables, *Lactobacillus* y *Enterococcus*.

ABSTRACT

The present investigation is about the identification of 10 different strains from the cepario of the Universidad Politécnica de Puebla by phenotypical tests, this investigation it is based on the reference of the Bergey's manual and The Prokaryotes to identify the different strains. The lactic acid bacteria (LAB) are a heterogeneous group and it is characterized for being gram positive, usually catalase-negative, without motility and no forming spores, they produce as the major end product of the fermentation of carbohydrates lactic acid. There had been done resistance tests of different growth factors such as temperature, pH, concentrations of NaCl, bile salts. There had been done growth test on different selective and differential culture medium for lactic acid bacteria and a fermentable sugar profile of 8 different carbohydrates and there was found that the study strains could be of the gender of *Lactobacillus* and *Enterococcus*.

Key words: Phenotypical identification, lactic acid bacteria, resistance tests, growth on different selective and differential culture medium, fermentable sugars profile, Lactobacillus and Enterococcus

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas están comprendidas por una gran variedad de géneros, las cuales incluyen un gran número de especies. Son bacterias Gram positivo, microaerofilicos y anaerobios facultativos; usualmente no forman endoesporas y producen ácido láctico como el mayor producto de la fermentación de carbohidratos. Los géneros de estas bacterias son: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, etc.

El género *Lactobacillus* es el grupo más extenso dentro del grupo de los Lactobacteriaceae y contiene sobre 110 especies. Estas especies pueden ser encontradas en plantas, animales y también en el tracto gastrointestinal de los seres humanos; las bacterias ácido lácticas son generalmente reconocidas como seguras (GRAS) y han sido utilizadas como cultivos iniciadores en varios procesos de la industria de alimentos debido a su habilidad de producir sabor y textura deseable (Sajeevan, 2016).

Los lactobacilos son bacilos Gram positivos que forman parte de la flora normal de la vagina, sistema gastrointestinal y la orofaringe de los humanos. Están distribuidos en diversos ámbitos y comprenden parte de la flora natural de muchas otras especies animales; también se pueden encontrar en varias fermentaciones de productos animales o de plantas, por ejemplo: Lácteos, granos, alimentos de consumo diario, peces (Koneman et al, 2013).

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GENERALES:

Identificar las bacterias ácidos lácticos que han sido utilizadas como referencia mediante el uso de pruebas fenotípicas.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Identificar la especie de cada una de las 10 referencias de bacterias ácidos lácticos mediante el uso de las siguientes pruebas:

1. Verificar la pureza de los aislados en resguardo.
2. Realizar pruebas orientativas como catalasa y tinción de Gram.
3. Realizar pruebas confirmatorias como: crecimiento en medios selectivos y diferenciales para bacterias ácido láctico.
4. Pruebas fenotípicas como resistencia a diferentes temperaturas, acidez, concentraciones de NaCl, sales biliares y asimilación de diferentes azúcares.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general, las bacterias ácido lácticas son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles salvo en algunas excepciones de cepas con flagelos (De vos et al, 2009), anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa, solo con algunas excepciones, carecen de citocromos, no reducen nitratos y producen ácido láctico como el único o el principal producto de la fermentación de carbohidratos, las bacterias ácido lácticas pueden crecer bajo ciertos niveles bajos de pH como 3.2; otras pueden crecer a valores de pH tan altos como 9.6 y de forma general crecen a pH 4-4.5. Las bacterias ácido lácticas pueden encontrarse en diversas fuentes: suelo, plantas, carnes y tracto gastrointestinal (Ramírez et al, 2007).

2. GÉNERO DE *Streptococcus*

Las cepas de *Streptococcus* son usualmente esféricas u ovoides, miden menos de 2µm de diámetros, pueden encontrarse en células en cadenas ó en pares cuando crecen en medio líquido, no poseen movilidad, no son formadores de esporas, y son bacterias Gram positivas. Prácticamente todas las especies son anaerobios facultativos pero se ha observado que algunas especies requieren CO₂ para crecer, el mayor producto de la fermentación de carbohidratos es ácido láctico sin la generación de gases, son catalasa negativo. Ramonosa es un constituyente común de casi todas las paredes celulares de las especies de *Streptococcus* y siendo muy notable su ausencia en las especies del grupo Mitis la cual incluye a *S.pneumoniae*. La temperatura óptima de crecimiento es usualmente alrededor de los 37°C, sin embargo su rango de temperatura máxima y mínima varía notablemente entre especies.

Figura. Tabla de referencias de especies de *Streptococcus*

	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. anginosus</i> ¹	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. albedoflavus</i>	<i>S. anginosus</i>	<i>S. aureus</i>
Characteristics						
Cell size (µm)	0.5-2.0	ND	0.5-1.2	0.5-1.2	0.5-1.2	ND
Catalase	-	-	-	-	-	-
Acid production from ²						
N-Acetylglucosamine	-	ND	+	+	J	ND
Adonitol	-	-	-	-	ND	ND
Arabinose	-	ND	-	d	-	ND
Arbutin	-	-	-	-	-	-
Arabinol	-	ND	-	J	-	ND
Arabinol	-	-	-	-	ND	ND
Cellulose	d	ND	d	+	d	ND
Cyclodextrin	-	-	-	-	-	ND
Dextrin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dulcitol	-	-	-	-	ND	ND
Erythritol	-	-	-	-	ND	ND
Tartritol	ND	ND	-	ND	ND	ND
Fructose	-	-	+	+	ND	ND
Fructose	ND	-	ND	-	ND	ND
Galactose	-	ND	+	+	ND	ND
Gentofucose	ND	ND	ND	d	ND	ND
Glucose	-	-	-	-	ND	ND
2-Ketogluconate	ND	-	ND	-	ND	ND
5-Ketogluconate	ND	-	ND	-	ND	ND
Glycerol	J	ND	+	J	-	ND

Referencia obtenida del manual de Bergey. De vos et al, 2009

3. GÉNERO DE *Lactococcus*

Este género presenta formas esféricas u ovoides, la células se encuentran simples, en pares o en cadenas y están usualmente alargadas en la dirección de la cadena, son Gram positivas, no forman endosporas, sin movilidad, no realizan β -hemólisis, son anaerobios facultativos; catalasa negativo, puede crecer a temperaturas de 10°C pero no a 45°C. Usualmente crece en medios con 4% de NaCl con la excepción de *L.lactis subsp. cremoris* la cual solo tolera 2% de NaCl. El producto final de la fermentación de glucosa es L (+) ácido láctico (De vos et al, 2009)

Figura. Tabla de referencias de especies de *Lactococcus*

Characteristic:	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>kefirianus</i>	<i>L. garvieae</i>	<i>L. fusiformis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. ruffinellii</i>
Peptidoglycan type ²	Lys-D-Asp	Lys-D-Asp	Lys-D-Asp	Lys-Ma-Gly-Ma	ND	Lys-Ser-Ma	Lys-Thr-Ma
Major menaquinones ³	MK-9, MK-8	MK-9, MK-8	MK-8, MK-9	MK-9, MK-8	ND	-	-
Acid production from:							
Galactose:	+	+	-	+	+	-	+
Lactose	+	+	-	+	+	-	+
Maltose	+	-	-	V	+	+	+
Melibiose	-	-	-	V	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	+	+	V
Raffinose	-	-	-	-	+	-	+
Ribose	+	-	-	+	-	-	V
Hydrolysis of arginine:	+	-	+	+	-	-	V

¹Adapted from Schleifer (1987) and Sakata et al. (2002a).

²+, Positive, -, negative, V, variable, ND, not determined.

³Abbreviations according to Schleifer and Kandler (1972): Asp, aspartic acid, Gly, glycine, Lys, lysine, Ser, serine; Thr, threonine, Ala, alanine.

⁴Abbreviations according to Collins and Jones (1979): MK-8, menaquinone with n = 8 isoprene units; MK-9, menaquinone with n = 9 isoprene units

Referencia obtenida del manual de Bergey. De vos et al, 2009

4. GÉNERO DE *Lactobacillus*

El género de *Lactobacillus* consiste de células de longitud variable, algunos son bacilos alargados y delgados y otras pueden ser bacilos en forma de cuña o cortos, usualmente pueden encontrarse en forma de corineformes ó cocobacilos; pueden observarse comúnmente cadenas, movilidad no se presenta usualmente, no es formador de esporas, son Gram positivos. Pueden ser homofermentativos estrictos, heterofermentativos facultativos ó heterofermentativos estrictos. Son anaerobios facultativos y casi no presentan reducción de nitratos. Catalasa y citocromos negativos, sus condiciones de crecimiento pueden variar desde 2-53°C, siendo su temperatura óptima un rango entre 30-40°C. El pH óptimo de crecimiento puede variar entre un pH de 5.5-6.2, el crecimiento inicial se puede ver inhibido por pH neutros o alcalinos (De vos et al, 2009).

Figura. Tabla de referencias de especies de *Lactobacillus*

Species	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>indigenicus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>denon</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>indicus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. amylophilus</i>	<i>L. amylophilus</i>	<i>L. amylophilus</i>	<i>L. amylophilus</i>	<i>L. geroensis</i> subsp. <i>geroensis</i>	<i>L. eximius</i> subsp. <i>eximius</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. fermenti</i>	<i>L. gelidus</i>	<i>L. gumi</i>	<i>L. helveticus</i>
Phylogenetic group	de	de	de	de	de	de	de	de	de	dl	dl	de	de	de	de	de
Peptidoglycan type	Lys-0-Asp	Lys-0-Asp	Lys-0-Asp	Lys-0-Asp	Lys-0-Asp	Lys-0-Asp	Lys-0-Asp	Lys-0-Asp	Lys-0-Asp	Lys-0-Asp	Lys-0-Asp	Lys-0-Asp	Lys-0-Asp	Lys-0-Asp	Lys-0-Asp	Lys-0-Asp
G-C content (mol%)	49-51	49-51	49-51	49-51	51-52	59	44-46	40-43	39-43	41-43	35-38	34-36	34-36	36-37	33-35	37
Lactic acid isomer(s)	d	d	d	d	dl	dl	l	dl	dl	l(d)	dl	l(d)	dl	dl	dl	dl
Growth (°C) 15/45	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/ND	-/ND	-/+	+/-	+/+	-/+	-/+
Carbohydrate fermentation:																
Arabinose	-	-	+	-	-	d	-	+	d	d	+	+	+	+	+	-
Cellulose	-	d	d	-	-	-	-	+	+	d	+	+	+	+	+	-
Galactose	-	-	d	-	-	+	+	+	d	-	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	+	+	+	+	+	-	-	d	-	+	+	+	d	d	+
Maltose	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
Melibiose	-	-	-	-	d	d	-	-	d	-	-	-	-	+	d	-
Raffinose	-	-	-	-	d	d	-	-	+	-	-	-	-	+	d	-
Salicin	-	-	+	-	d	d	-	+	+	d	+	+	+	+	+	-
Sucrose	+	-	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Trehalose	d	-	+	-	d	-	-	+	+	+	+	+	+	+	d	d

Symbols and abbreviations: +, 90% or more of strains are positive; -, 50% or more are negative; d, 11-89% of strains are positive; w, weak positive reaction; ND, no data available; (l), isomer in parenthesis indicates L-lactic acid; mlDps, meso-diaminopimelic acid; de, *Lactobacillus delbrueckii* group; dl, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* group; re, *Lactobacillus reuteri* group; u, unique.

Referencia obtenida del manual de Bergey. De vos et al, 2009

5. GÉNERO DE *Enterococcus*

Son bacterias Gram positivas, las células se encuentran en forma ovoide y pueden observarse en células simples, en pares o en cadenas cortas que están frecuentemente en la dirección de la cadena. No son formadoras de esporas y las cepas de algunas especies pueden poseer movilidad por flagelos. Son anaerobios facultativos y algunas especies son dependientes de la concentración de CO₂ en el medio. Son catalasa negativo pero algunas cepas pueden revelar actividad de catalasa cuando son cultivados en agares adicionados con sangre, la respuesta de hemólisis de sangre varia y depende en gran medida de las diferentes especies de este género. Temperatura óptima de crecimiento de la mayor parte de las especies es a una temperatura entre los 35-37°C, algunas especies son capaces de crecer incluso a 45°C y a 10°C. Son bastante resistentes a condiciones de “sequía”. Llevan a cabo procesos homofermentativos estrictos y producen ácido láctico como mayor producto de la fermentación de carbohidratos. Pueden crecer en concentraciones de NaCl de 6.5% a temperaturas de 10°C y 45°C.

Figura. Tabla de referencias de especies de *Enterococcus*

	<i>E. faecalis</i> group			<i>E. avium</i> group			<i>E. faecium</i> group			<i>E. occorvus</i> group	<i>E. gallinarum</i> group	<i>E. italicus</i> group	Phylogenetically distinct species							
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
Motility	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyruvate utilization	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production of																				
Alkaline phosphatase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pyrocidinyl arylamidase	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from																				
Adonitol	-	-	-	-	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabinol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melzitose	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	-	-	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigment production	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth																				
at 10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
at 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
in 6.5% NaCl	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production of																				
Acetate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D group antigen	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Galactosidase	-	-	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Galactosidase	-	-	d	+	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of																				
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hippurate	+	d	+	+	-	d	-	d	+	-	d	-	d	-	d	-	d	-	d	-
Starch	-	w	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid from																				
N-Acetylglucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Avicel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabinose	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ambrose	-	-	+	d	+	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabinol	-	-	-	-	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Referencia obtenida del manual de Bergey. De vos et al, 2009

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVACIÓN DE CEPAS BACTERIA ÁCIDO LÁCTICAS

Se reactivaron 10 cepas provenientes del cepario de la Universidad Politécnica de Puebla, éstas habían sido conservadas en tubos de micro centrífuga de 2ml con caldo MRS y glicerol al 20%; se llevó a cabo colocando un inóculo de 100 uL en tubos de ensaye con 5 ml de caldo MRS y se llevó a incubación durante 24hrs a 37°C incubadora modelo FE-134AD.

2. DETERMINACIÓN DE PUREZA DE CEPAS

Después de 24 hrs de incubación a una temperatura de 37° C se preparó agar MRS en cajas p60 y se inoculó colocando una alícuota de 10uL en la placa y se sembró mediante la técnica de estría cruzada, incubando nuevamente durante 24 hrs a 37°C. Para la determinación de pureza se utilizó como base la homogeneidad de las colonias tomando en cuenta la morfología macroscópica (Relieve, borde, forma, textura, etc.).

3. CONSERVACIÓN EN GLICEROL AL 20%

Para la conserva de las cepas se preparó caldo MRS y se vertió 4ml en tubos de ensaye por cada una de las cepas de estudio, se colocó en cada tubo 100 uL de muestra para llevarlo a incubación por 24 hrs a una temperatura de 37°C, una vez obtenida una biomasa de 24 hrs de cada una de las cepas de estudio, se utilizaron dos tubos de micro centrífuga de 2ml en los cuales se vertió los 4 ml de cada una de las cepas incubadas para posteriormente centrifugar a una velocidad de 10,000 rpm durante 1 min en una centrifuga “Vela0 modelo TGL-160”, se retiró el sobrenadante mediante decantación para obtener una pastilla celular de cada cepa.

Se prepararon dos caldos MRS, uno adicionado con glicerol al 40%, y se vertieron 750 uL de caldo MRS en los tubos de micro centrífuga de 2ml con pastilla celular y se re suspendió mediante agitación por inversión, posteriormente se agregaron 750 uL de caldo MRS con glicerol al 40% y se mezcló mediante agitación por inversión para obtener un caldo MRS con 20% de glicerol el cual se llevó a congelación a -20°C en un congelador.

4. PREPARACIÓN DE INÓCULOS

Para las pruebas bioquímicas se usaron inóculos de cepas con 24 hrs de crecimiento a una temperatura de 37°C. Los inóculos se realizaron preparando 2 ml de caldo MRS en tubos de ensaye por cepa de estudio, donde se colocaron 100uL de alícuota de muestra donde estas se obtuvieron a partir de las conservas realizadas en caldo MRS y glicerol al 20%.

Para las pruebas bioquímicas en medios líquido se tomaron 100uL de alícuota y se añadieron a los tubos de ensaye donde se realizaba el estudio.

Para las pruebas bioquímicas en medios sólidos se tomó 10uL de alícuota y se colocó sobre el medio de cultivo sólido para hacer posteriormente una siembra de estría cruzada o estría simple cola de ratón.

5. MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA, TINCIÓN DE GRAM Y PRUEBA DE CATALASA

Se preparó agar MRS en placas p60 con un cultivo de 24hrs de crecimiento y se realizaron frotis de cada una de las cepas de estudio para realizar la tinción de Gram y se observó al microscopio para corroborar si las cepas son Gram positivo o Gram negativo y analizar su morfología microscópica o dicho de otra manera si forman bacilos, cocos, o cocobacilos, etc.

Para la prueba de catalasa se colocó una gota de agua destilada y se añadió un inóculo proveniente de un medio agar MRS cultivado durante 24hrs para posteriormente agregar una gota de agua de oxigenada

6. CRECIMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS

La temperatura es un factor de crecimiento importante en el crecimiento microbiano, puesto que los microorganismos poseen distintas capacidades que les permite o no tolerar las altas o bajas temperaturas, y es debido a esto que se utiliza prueba bioquímica que permite delimitar el rango de estudio de las cepas de interés para la identificación de los microorganismos.

Se prepararon 2 ml de caldo MRS en tubos de ensaye y se inocularon con una muestra 100 uL por cada cepa donde posteriormente se llevaron a incubación. Las muestras fueron incubadas a dos distintas temperaturas; 10 y 45°C, donde se utilizó un refrigerador ajustado para

la temperatura de 10°C y una incubadora ajustada para la temperatura de 45°C.

7. CRECIMIENTO A DIFERENTES PH

Al igual que la temperatura, el pH es otro factor de crecimiento microbiano de importancia ya que diferentes valores de acidez o alcalinidad pueden impedir o promover el desarrollo de los microorganismos y este valor puede ser usado para la identificación de los distintos géneros de microorganismos.

Se prepararon 2 ml de caldo MRS en tubos de ensaye y se ajustaron a tres pH diferentes; 2, 4.4 y 9.6, se les inoculó 100uL de muestra de cada una de las cepas con un crecimiento de 24 hrs. en caldo MRS a a una temperatura de 37°C.

8. CRECIMIENTO A DIFERENTE CONCENTRACIÓN DE NaCl

La concentración de NaCl es otro factor de crecimiento microbiano, debido a que, así como la temperatura y el pH, ya que altas concentraciones de esta sal pueden inhibir o impedir el crecimiento de los microorganismos ya que influye, al igual que los azúcares, sobre la presión osmótica y esta a su vez afecta la biodisponibilidad del agua del medio donde los microorganismos se desarrollan.

Se preparó 2 ml de caldo MRS en tubos de ensaye por cada cepa a los cuales se les agregó diferentes concentraciones NaCl las cuales fueron; 4.5% y 6.5%, se inoculó 100uL de muestra de las cepas puras con un crecimiento de 24 hrs. a una temperatura de 37°C.

9. MEDIO AGAR LBS

El agar LBS, también conocido como Rugosa Agar, es un medio selectivo para el aislamiento de las bacterias, principalmente las del género *Lactobacillus*, provenientes de la cavidad bucal y heces. Los compuestos que hacen de este medio cultivo ser selectivo son: el polisorbato 80 el cual es utilizado como una fuente de factores de crecimiento ya que aporta ácidos grasos requeridos para el metabolismo de los *Lactobacillus*, el citrato de amonio y el acetato de sodio son agentes inhibidores de crecimiento para microorganismos del género *Streptococcus* y otras

bacterias que puedan encontrarse en la cavidad bucal.

Se preparó agar LBS en cajas P60 las cuales fueron divididas a la mitad mediante marcas con un plumón indeleble y se rotuló con la clave respectiva de la cepa pura donde posteriormente se inoculó colocando 10uL de una muestra de caldo MRS con 24hrs de incubación y se llevó a incubar en la incubadora modelo FE-134AD a 37°C durante 24hrs.

10. PRUEBA MIO

La prueba MIO consiste en un medio semi-líquido para diferenciar movilidad y las cepas que poseen la enzima triptofanasa y ornitina descarilasa. Se han realizado investigaciones sobre la movilidad de las bacteria ácido lácticas y se ha observado que usualmente no poseen esta característica y acorde a la bibliografía varios géneros de este grupo como *Lactobacillus* suelen presentar formación de indol (Campo et al, 2008; De vos et al, 2009).

Se preparó 2ml del medio MIO en tubos de ensaye correspondiente a cada cepa pura, se inoculó por punción utilizando asas de punta circular, tomando una alícuota proveniente de tubos con caldo MRS con un tiempo de crecimiento de 24hrs incubados a una temperatura de 37°C, y se llevó a incubación durante 24 hrs a 37°C.

11. PRUEBA DE GLUCOSA/CO2

La fermentación es unos procesos de óxido-reducción en condiciones anaerobias el cual realizan los microorganismos y utilizan compuestos orgánicos como los azúcares los cuales son aprovechados como el aceptor final de electrones. La fermentación de azúcares sirve para la identificación de cepas microbianas ya que poseen una gran diversidad de enzimas, la fermentación de los diferentes azúcares y la producción de una variedad de productos depende si la cepa es homofermentativo o heterofermentativa, para el caso de las bacterias ácido lácticas se conoce que el mayor producto de la fermentación de carbohidratos es el ácido láctico, por lo que el medio de cultivo para la prueba de azúcares consiste del indicador rojo fenol que en medio ácido da una coloración de rojo mexicano a amarillo.

Los microorganismos heterofermentativos pueden generar gas (CO₂) durante la fermentación de azúcares por lo que utilizó una campana Durham para corroborar la presencia de burbujas (gas) en el medio de cultivo.

Se prepararon 5 ml del medio de cultivo con el indicador rojo fenol en tubos de ensaye por cada

cepa pura, a cada tubo se agregó una campana Durham. Se inoculó por asada utilizando asas de punta circular tomando una muestra proveniente de una colonia aislada de agar MRS incubada durante 24 hrs a una temperatura de 37°C y se llevaron a cabo tres asadas por cepa, se incubó los tubos de ensaye inoculados en la incubadora modelo FE-134AD durante 24 hrs a 37°.

12. SALES BILIARES

Las sales biliares se utilizan como ingrediente para la preparación de medios de cultivo selectivos de microorganismos entéricos, así como también sirve como prueba para corroborar la capacidad de los microorganismos para crecer en presencia de este compuesto y que se ha documentado que gran parte de las bacterias ácido lácticas poseen dicha capacidad ya que son usadas como probióticos en la industria, siendo la tolerancia a sales biliares una característica probiótica (Clementina Cueto and, Stephania Aragón, 2012).

Se prepararon 2ml de caldo MRS en tubos de ensaye por cepa pura y se le adicionó sales biliares al 1%, se inoculó una muestra de 100 uL de caldo MRS con un crecimiento de 24 hrs a una temperatura de 37°C, posteriormente se preparó agar MRS en placas P60, se colocó sobre el medio sólido una alícuota de 10 uL del caldo MRS adicionado con las sales biliares al 1% y se realizó una siembra por estría cruzada, se incubó en la incubadora modelo FE-134AD a 37°C durante un periodo de 24 hrs para la toma de resultados.

13. MEDIO AGAR LACTOSA AZUL DE CHINA

El medio agar lactosa azul de China es un medio diferencial para cepas capaces de degradar lactosa como único azúcar fermentable y para el llevar a cabo el conteo microbiano en muestras de leche, el modo de acción consiste en que este medio se encuentra libre de inhibidores y contiene lactosa como reactante. La degradación del azúcar a ácido es indicada por el vire de color provocado por el indicador de pH, azul China, el cual da una coloración de “incolora” (color del medio) a azul.

Se preparó agar lactosa azul de China en cajas P60, las cajas fueron divididas a la mitad mediante marcas con un plumón indeleble y se rotuló con la clave respectiva de cada una de las cepas puras, se tomaron 10 uL de una muestra de caldo de MRS incubada durante 24hrs y se realizó una siembra por estría simple cola de ratón.

14. AGAR M5

Las bacterias ácido lácticas pueden estar divididas en dos grupos fisiológicos, dependiendo de su ruta de fermentación de hexosas: las bacterias ácido lácticas homofermentativas y las bacterias ácido lácticas heterofermentativas. Las bacterias ácido lácticas homofermentativas degradan hexosas vía glicolisis, produciendo ácido láctico como producto final principal, mientras que las bacterias ácido lácticas heterofermentativas usan la vía pentosa fosfato y producen ácido láctico, CO₂, ácido acético y/o etanol (M.Zuñiga y S. Ferrer, 1992). El medio M5 es un medio formulado diseñado para diferenciar a las bacterias homofermentativas de las heterofermentativas, utilizando como azúcar fermentable la fructosa y el indicador de pH verde de bromocresol, para llevar a cabo dicha diferenciación, donde se observa un viré en el color del medio (azul-verdoso) a amarillo, siendo una respuesta positiva para cepas homofermentativas, y si el medio no se observa un vire de color o este se torna verdoso, indica formación de diferentes compuestos que mantienen el pH y no producen una acidificación, siendo una respuesta positiva para cepas heterofermentativas.

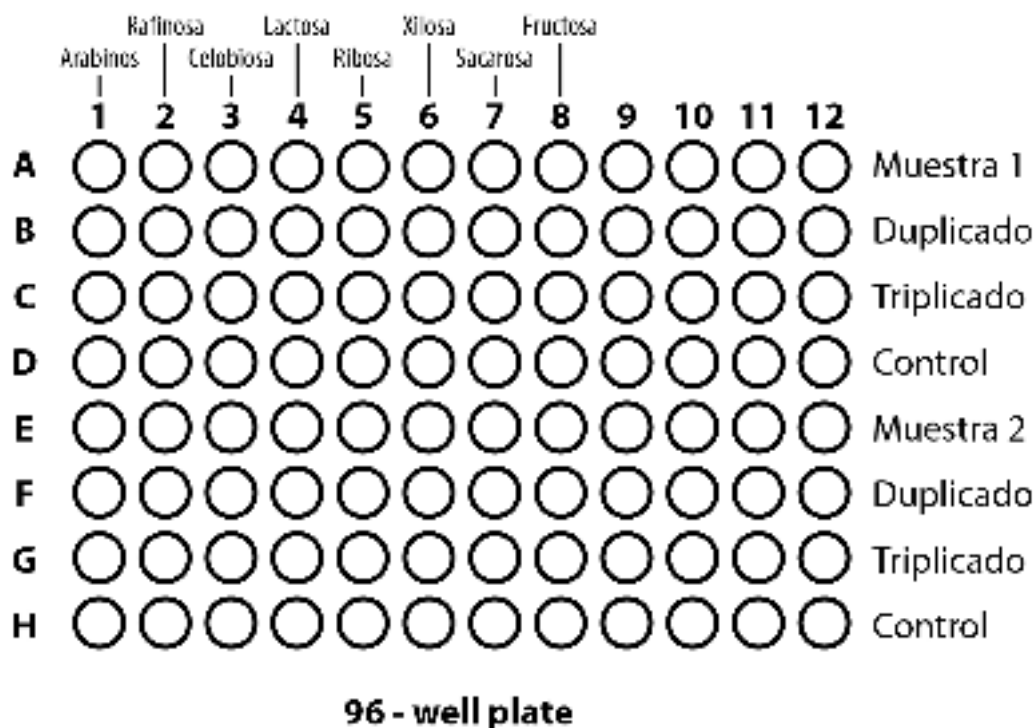
Se preparó el medio diferencial agar M5, en la cual se utilizó para la formulación del medio: 10grs/L de peptona de caseína. 5grs/L, 2.5grs/L de fructosa, 2.5grs/L de fosfato monopotásico, 1ml/L de Tween 80, 0.2 grs/L sulfato de magnesio heptahidratado, 20ml/L verde de bromocresol y 20ml/L de agar bacteriológico; en cajas P60 por cada cepa pura, se colocó una alícuota de 10 uL a partir de una muestra en caldo MRS con 24hrs de crecimiento y se realizó una siembra por estría cruzada, las placas se incubaron por 24 y 48hrs a 37°C.

15. PERFIL DE AZUCARES

Se prepararon 81 ml del medio base para la prueba de azúcares (sin agregar el carbohidrato) y se vertió 9 ml del medio de cultivo en recipientes de 20 ml, se rotuló los recipientes con cada uno de los azúcares que se utilizaron para llevar a cabo la prueba, los cuales fueron: arabinosa, rafinosa, celobiosa, lactosa, rabiosa, xilosa, sacarosa, fructosa. Se ocupó para el perfil de azúcares cajas de 96 pozos, se dividió la caja en dos secciones para inocular dos cepas por placa como se muestra en la **figura 1**, en las cuales se colocó 225 uL de cada azúcar, se realizaron asadas utilizando un asa de punta circular y se colocó una muestra obtenida de una colonia aislada en agar MRS con un tiempo de crecimiento de 24hrs, este proceso se realizó por

triplicado, se incubaron las cajas de 96 pozos en la incubadora modelo FE-134AD durante 24hrs a una temperatura de 37°C.

Figura 1: Orden de carbohidratos en placa de 96 pozos.



V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN




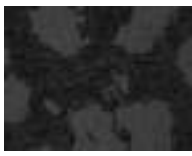
1. DETERMINACIÓN DE PUREZA DE CEPAS


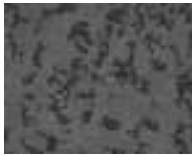







Se tomó como base de referencia para la determinación de pureza de las cepas de estudio la observación de colonias homogéneas en los medios de cultivo agar MRS con un tiempo de incubación de 24hrs a una temperatura de 37°C de manera que compartieran las mismas características de morfología macroscópica (Forma, borde, superficie, elevación, consistencia, color y luz transmitida), dichos resultados se mostraran en la tabla 1.

2. MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA, TINCIÓN DE GRAM Y PRUEBA DE CATALASA

Acorde a la literatura las cepas más comunes de bacterias ácido lácticas son: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* (Sajeevan et al, 2016) y *Enterococcus* (Koneman et al, 2013), por lo que durante la tinción de Gram al observar al microscopio se observaron principalmente formas de bacilos gram positivos, seguido de cocobacilos gram positivos y finalmente un único coco Gram positivo, esto dio a pensar que posiblemente gran parte de las cepas de estudio pertenecieran al género de *Lactobacillus*. Durante la revisión de bibliografía se encontró que las bacterias pertenecientes al género de *Lactobacillus* pueden hallarse en forma de bacilos, corineforme o en forma de cocobacilos (De vos et al, 2009). Existen bacterias que comparten características fenotípicas con el género de *Lactobacillus* y pueden crecer en los mismos medios selectivos, algunos ejemplos de estas bacterias son cepas del género: *Weissella*, *leuconostocs*, *pediococci*, *bifidobacteria*, y ocasionalmente *carnobacteria*, *lactococci*, *streptococci*, *enterococci* y *tetragenococci* (Dworkin et al, 2006), y al igual que *Lactobacillus*, el resto de géneros mencionados son catalasa negativo y bacterias Gram positivas.

Tabla 1: Resultados de morfología macroscópica y microscópica

Clave de la cepa	Morfología macroscópica	Descripción de morfología macroscópica	Morfología microscópica x100	Descripción Morfología de microscópica x100
YOP		Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa Consistencia: cremosa Luz: opaca		Tinción: Gram positivo Forma: Bacilo
LA-5		Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa Consistencia: cremosa		Tinción: Gram positivo Forma: Bacilo

		Luz: opaca		
REF1		Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa Consistencia: cremosa Luz: opaca		Tinción: Gram positivo Forma: cocobacilo
REF2		Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa Consistencia: cremosa Luz: opaca		Tinción: Gram positivo Forma: cocobacilo
REF3		Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa Consistencia: cremosa Luz: opaca		Tinción: Gram positivo Forma: cocobacilo
REF4		Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa Consistencia: cremosa Luz: transparente		Tinción: Gram positivo Forma: Coco
N1		Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa Consistencia: cremosa Luz: opaca		Tinción: Gram positivo Forma: Bacilo
N2		Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa Consistencia: cremosa Luz: opaca		Tinción: Gram positivo Forma: Bacilo




N22		Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa Consistencia: cremosa Luz: opaca		Tinción: Gram positivo Forma: Bacilo
N28		Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa Consistencia: cremosa Luz: opaca		Tinción: Gram positivo Forma: Bacilo

Tabla 2: Resultados de morfología microscópica, pureza, tinción de Gram y catalasa para las cepas de estudio

Clave de la cepa	Crecimiento En placa Homogéneo/ Heterogéneo	Morfología microscópica Coco/bacilo/cocobacilo	Pureza Si/no	Prueba de catalasa +/-	Tinción de Gram +/-
Yop	Homogéneo	Bacilos	Si	-	+
LA-5	Homogéneo	Bacilos	Si	-	+
REF 1	Homogéneo	Cocobacilo	Si	-	+
REF 2	Homogéneo	Cocobacilo	Si	-	+
REF 3	Homogéneo	Cocobacilo	Si	-	+
REF 4	Homogéneo	Cocos	Sí	-	+
Cepa No. 2	Homogéneo	Bacilos	Sí	-	+
Cepa No. 22	Homogéneo	Bacilos	Sí	-	+
Cepa No. 28	Homogéneo	Bacilos	Sí	-	+
Cepa No. 1	Homogéneo	Bacilos	Sí	-	+

3. CRECIMIENTO EN AGAR LACTOSA AZUL DE CHINA

Acorde a las especificaciones descritas por el fabricante del medio Azul de china se encontró que especies del género *Enterococcus* presentan una coloración de colonia azul marino o azul fuerte.

Tabla: Referencia de control de calidad del medio agar lactosa azul de China

Cepa de prueba	Crecimiento	Cambio de color a azul
Escherichia coli ATCC 25922	Buena/Muy buena	+
Proteus mirabilis ATCC 29906	Buena/Muy buena	-

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Bueno/Muy bueno	-
Enterococcus faecalis ATCC 11700	Bueno/Muy bueno	+ (pobre)
Streptococcus agalactiae ATCC 13813	Bueno/Muy bueno	+
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	Bueno/Muy bueno	+
Bacillus cereus ATCC 11778	Bueno/Muy bueno	-

V.4. CRECIMIENTO EN AGAR LBS

De acuerdo a la investigación realizada sobre los componentes utilizados en el agar LBS se comprobó que es un medio selectivo principalmente para cepas del género de *Lactobacillus*, ya que posee compuestos como acetato de sodio que inhiben el crecimiento de cepas que puedan hallarse en muestras de la cavidad bucal o heces, como por ejemplo especies del género *Streptococcus*

ó *Enterococcus*, lo que conlleva a la sospecha que las cepas REF2, REF4 y N28 al no crecer en el medio de cultivo pudieran no ser del género *Lactobacillus*

5. CRECIMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS

Al hacer la revisión de resultados de crecimiento a una temperatura de 10°C y 45°C se tomó en cuenta las especies del género de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*, y se descartó la posibilidad que se tratase de una especie del género *Carnobacterium* ya que esta no es capaz de crecer a temperaturas de 45°C y tampoco en presencia de acetato, por lo que no sería capaz de crecer en el medio LBS (Dworkin et al, 2006).

Las cepas con las claves correspondientes a YOP, LA-5, REF1, REF3, N1, N2, al considerarse que pertenecen al género de *Lactobacillus* se realizó la comparación de crecimiento a diferentes temperaturas de distintas especies con los resultados obtenidos de cada cepa con las mencionadas en la bibliografía, se encontró que podría tratarse de las especies de *Lactobacillus* de: *L.acidophilus*, *L.gallinarum*, *L.jhonsonii*, *L.nagelii*, *L.arizonensis*, *L.paralimentarius*, *L.rhamnosus*, *L.zaeae*, *L.parakefiri*, *L.pontis* (De vos et al, 2009; Dworkin et al, 2006)

Las cepas REF2 y REF4 al observarse como bacilos, se comparó con la literatura y es posible que estas cepas se tratasen de cepas de *Enterococcus* ó algunas especies de *Streptococcus* ya que pueden crecer a temperaturas de 10°C (crecimiento lento) y a 45°C (De vos et al, 2009).

6. CRECIMIENTO A DIFERENTES PH

Se descartó la posibilidad que las cepas de estudio perteneciesen al género *Carnobacterium* ya que acorde a la investigación bibliográfica este género de bacterias no puede crecer en pH ácidos a partir de un valor de 4.5, y es un dato diferencial utilizado para la identificación de *Lactobacillus* (Dworkin et al, 2006), por lo que se mantuvo la sospecha que las cepas puedan pertenecer a distintas especies del género *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* (Koneman et al, 2013, De vos et al, 2009; Dworkin et al, 2006).

7. CRECIMIENTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl

Se comparó los resultados obtenidos a partir de las 10 cepas estudio con la bibliografía y acorde a la investigación se encontró que diversas especies del género *Lactobacillus*, y *Enterococcus* pueden crecer a concentraciones de 6.5% de NaCl (Dworkin et al, 2006, Koneman et al, 2013). La cepa con la clave correspondiente a REF3 presento resultados de un crecimiento debil en los medios de cultivo de MRS adicionado con una concentración de 6.5% de NaCl lo que llevo a la sospecha, de acuerdo a la literatura que la cepa pudiera tratarse de una especie del género *Lactococcus* (Dworkin et al, 2006).

8. CRECIMIENTO EN MEDIOS DE CULTIVO ADICIONADOS CON SALES BILIARES

Se encontró en la literatura que la mayor parte de las especies documentadas de *Enterococcus* han sido aisladas del intestino de animales mamíferos (incluyendo el ser humano), aves o en contaminación de cultivos de plantas por heces (Dworkin et al, 2006, De vos et al, 2009), esto indicó que las especies de este género tienen alta tolerancia a las sales biliares ya que es un compuesto que se encuentra dentro del tracto gastrointestinal, de la misma manera varias especies del género *Lactobacillus*, al ser parte de la micro flora natural del tracto gastrointestinal de varias especies animales incluida el hombre (Koneman et al 2013), se logró comprobar que varias especies de estos géneros poseen altas tolerancias a este compuesto y lograr proliferar en los medios de cultivo.

9. PRUEBA DE MOVILIDAD Y ORNITINA EN MEDIO MIO

Acorde a la bibliografía los géneros de algunas especies de *Lactobacillus* y *Enterococcus* pueden poseer un flagelo permitiendo movilidad, aunque no se encontró más información con respecto a este punto (De vos et al, 2009). Se realizó la comparación de los resultados con la literatura y se descartó la posibilidad de que la cepa REF3 se tratase de alguna especie de *Streptococcus* ya que fue la única en presentar movilidad positiva.

10. FERMENTACIÓN EN EL MEDIO AGAR M5

En base a los resultados obtenidos y la revisión bibliográfica se encontraron los siguientes puntos;

Las cepas YOP, LA-5, REF1 REF3, REF4, N22 y No28 al dar un resultado positivo para una fermentación homofermentativa se consideraron las especie de dentro de los géneros de *Lactobacillus* y *Enterococcus* y se encontró que pueden tratarse de: *L.acidophilus*, *L.jhonsonii*, *L.nagelii* y *E.faecalis* (Dworkin et al, 2006). Las cepas REF2, N1, N2 al dar un resultado positivo para una fermentación heterofermentativa se consideraron las especies de: *L.arizonensis*, *L.paracasei*, *L.paralimentarius*, *L.rhamnosus* ya que estas especies pertenecen al grupo de bacterias heterofermentativas (Dworkin et al, 2006).

Figura 2: Agar M5, sin inoculación



Figura 3: Agar M5, respuesta homofermentativa

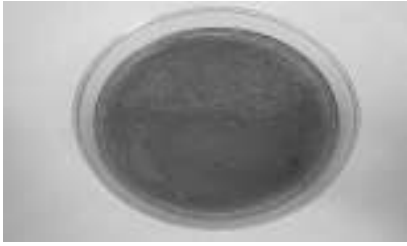


Figura 4: Agar M5, respuesta heterofermentativa

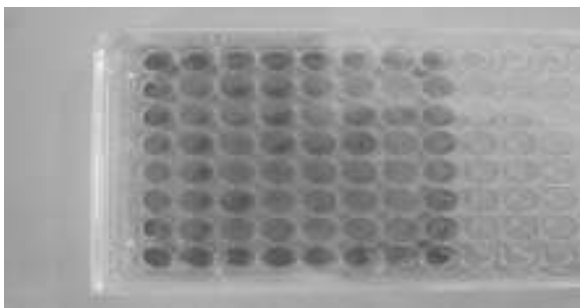
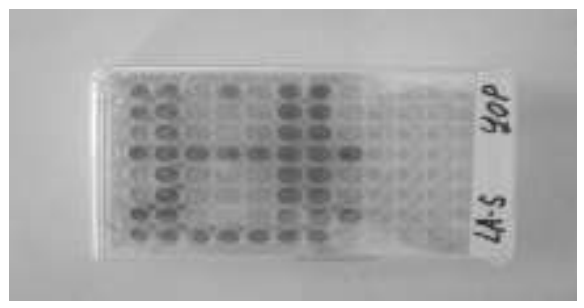


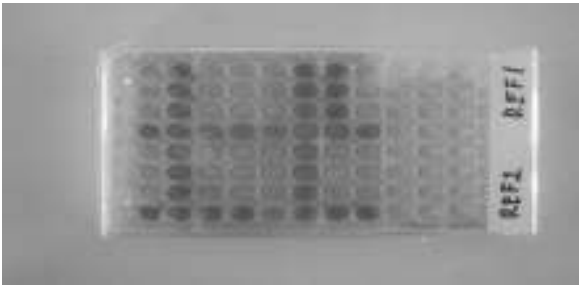
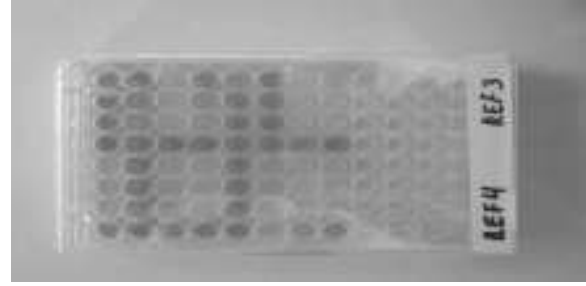
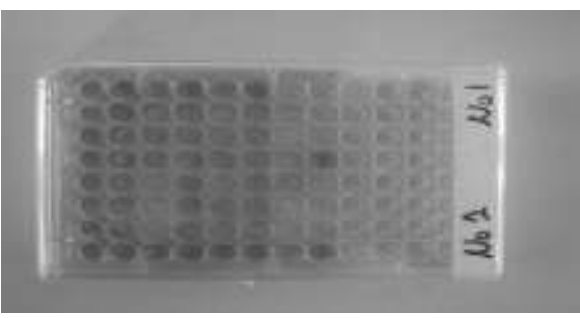
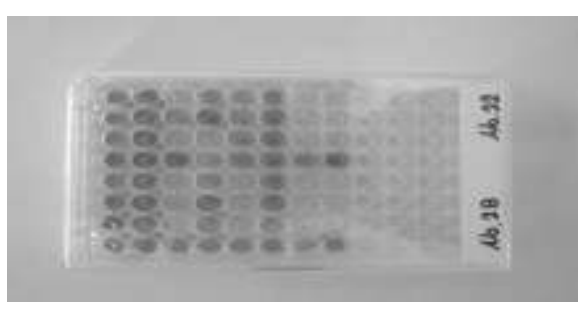
11. FERMENTACIÓN DE GLUCOSA Y FORMACIÓN DE GAS

Acorde a la literatura gran parte de las especies de *Lactobacillus*, *Enterococcus* pueden fermentar la glucosa generando principalmente como producto final de la fermentación de este azúcar ácido láctico y no suelen producir CO₂ (De vos et al, Dworkin et al, 2006) lo cual este dato se confirmó al observarse las respuestas de las cepas de estudio, sin embargo no se logró disminuir el número de posibles especies ya que no hubo diferencia entre las cepas de estudio y es una respuesta común entre los géneros mencionados.

12. PERFIL DE AZÚCARES

Tabla 3: Resultados del perfil de azúcares en placas de 96 pozos.

	
<p>Placa de 96 pozos sin inoculación</p>	<p>Placa de 96 pozos con los inóculos de YOP y LA-5 por un tiempo de incubación de 24hrs a una temperatura de 37°C</p>

	
Placa de 96 pozos con los inóculos de REF1 y REF2 por un tiempo de incubación de 24hrs a una temperatura de 37	Placa de 96 pozos con los inóculos de REF3 y REF4 por un tiempo de incubación de 24hrs a una temperatura de 37
	
Placa de 96 pozos con los inóculos de No.1 y No.2 por un tiempo de incubación de 24hrs a una temperatura de 37	Placa de 96 pozos con los inóculos de No.22 y No.28 por un tiempo de incubación de 24hrs a una temperatura de 37

Se realizó la comparación de literatura con los resultados obtenido de la cepa YOP comparando principalmente aquellas cepas que pertenezcan al grupo de bacterias homofermentativas o heterofermentativa facultativa, y se analizó su perfil de azúcares como se muestra en la **tabla 5** para compararlo con la **tabla 3** y la **tabla 4** donde la especie con el mayor índice de características similares fueron *L.pantheris* y *L. paracasei subsp. paracasei* acorde a la bibliografía citada (Dworkin et al, 2006; De vos et al, 2009), sin embargo no se puede determinar que en efecto *L.pantheris* ó *L. paracasei subsp. paracasei* sea la especie correspondiente a la cepa YOP, ya que es necesario realizar principalmente pruebas moleculares para confirmar(Dworkin et al, 2006; De vos et al, 2009).

Acorde a la **tabla 3** y la **tabla 4** de referencias la cepa LA-5 puede tratarse de las especies de *L.acidophilus*, *L.jhonsonii*, y *L. rhamnosus* sin embargo se pone en cuestión la falta de capacidad de la cepa para fermentar el azúcar de sacarosa el cual podría explicarse si se tratase de algún tipo de sub especie que no posea tal capacidad y se sugieren más investigaciones al respecto de esta cepa (Dworkin et al, 2006; De vos, 2009).

La cepa REF1 acorde a los resultados en agar M5 puede tratarse de una bacteria homofermentativa o heterofermentativa facultativa por lo que se hizo la comparación de resultados de su perfil de azúcares con los mostrados en la **tabla 3** y la **tabla 4**, se encontró que las especies con mayor número de similitudes con respecto a los resultados del perfil de azúcares de esta cepa son *L.rhamnosus*, *L.jhansonii* y *E.faecalis* pero no se puede decir con exactitud si se trata de estas especies y requiere de un mayor número de pruebas fenotípicas y genotípicas (Dworkin et al, 2006; De vos, 2009).

La cepa REF2 acorde a los resultados en agar M5 puede tratarse de una bacteria heterofermentativa estricta y se realizó la comparación del perfil de azúcares fermentables y se determinó que podría ser una especie de *L.suebicus*, es necesario el realizar el estudio de pruebas moleculares para confirmar el género y especie de esta cepa (Dworkin et al, 2006; De vos, 2009).

La cepa REF3 acorde a los resultados en agar M5 puede tratarse de una bacteria homofermentativa o heterofermentativa facultativa y se llevó a cabo la comparación de resultados a partir de los datos obtenidos de las referencias bibliográficas, en el que se determinó que podría tratarse de *E.faecalis* al ser el género y especie con el mayor número de similitudes con respecto a la cepa de estudio, se requiere un análisis por medio de pruebas moleculares para confirmar este supuesto (Dworkin et al, 2006; De vos, 2009).

La cepa REF4 se lograron observar forma de cocos por lo que se comparó los resultados del perfil de azúcares de esta cepa con la **tabla 3** donde se observó que un gran número de similitudes con el género y especie de *E.faecalis* y se requiere de un estudio por medio de prueba molecular para confirmar el supuesto (Dworkin et al, 2006; De vos, 2009).

La cepa con la clave correspondiente a N1 y N2 se comparó con la tabla 5, ya que se observó un crecimiento heterofermentativo en el medio agar M5 y se tiene el supuesto que podría tratarse de una bacteria heterofermentativa estricta del género *Lactobacillus*, se determinó que se requiere más pruebas fenotípicas y estudios por medio de pruebas moleculares para lograr una mejor identificación de la cepa y corroborar su género e identificar la especie (Dworkin et al, 2006; De vos, 2009).

La cepa con la clave correspondiente a No.22 se comparó con la tabla 3 y tabla 4, ya que se observó un crecimiento homofermentativo en el medio agar M5 y se tiene el supuesto que podría tratarse de una bacteria homofermentativa estricta o heterofermentativa facultativa del género *Lactobacillus*, y de acuerdo a la comparación con los resultados del perfil de azúcares

obtenidos en laboratorio y en literatura se observó que la cepa de estudio tenía varias similitudes con la especie *L.casei* y *L.amyphilus* (Dworkin et al, 2006; De vos, 2009).

La cepa con la clave correspondiente a No.28 se comparó con la tabla 3 y tabla 4, ya que se observó un crecimiento homofermentativo en el medio agar M5 y se tiene el supuesto que podría tratarse de una bacteria homofermentativa estricta o heterofermentativa facultativa del género *Lactobacillus spp* y *Enterococcus.spp* (Dworkin et al, 2006; De vos, 2009), sin embargo al igual que las cepas No. 1 y No.2, es necesario la aplicación de pruebas moleculares para corroborar el género y la especie de la cepa. Acorde a la comparación realizada se observó gran similitud entre la cepa de estudio y la especie de *E.faecalis*

Tabla 4: Referencia de resultados del perfil de azúcares de diferentes especies de bacterias ácido lácticas homofermentativas estrictas

Especies	Azúcares fermentables							
	Arabinosa	Rafinosa	Celobiosa	Lactosa	Ribosa	Xilosa	Sacarosa	Fructosa
<i>E.faecalis</i>	-	ND	+	d	d	d	ND	+
<i>L.acidophilus</i>	ND	D	+	+	ND	ND	+	ND
<i>L.jhonsonii</i>	ND	d	+	+	ND	ND	+	ND
<i>L.nagelit</i>	ND	-	+	-	ND	ND	+	ND
<i>L.amyphilus</i>	ND	-	+	-	ND	ND	-	ND
<i>L.pantheris</i>	ND	-	+	+	ND	ND	-	ND

+, Positivo; -, negativo; ND, no hay datos; d, del 11-89% son resultados positivos

Dworkin et al, 2006; De vos, 2009

Tabla 5: Referencia de resultados del perfil de azúcares de diferentes especies de bacterias ácido lácticas heterofermentativas

facultativas

	Azúcares fermentables							
Especies	Arabinosa	Rafinosa	Celobiosa	Lactosa	Ribosa	Xilosa	Sacarosa	Fructosa
<i>L. paracasei</i> <i>subsp.</i> <i>paracasei</i>	-	-	+	ND	+	-	+	ND
<i>L. casei</i>	-	-	+	ND	+	-	+	ND
<i>L. paralimentari</i> <i>us</i>	-	-	+	ND	+	-	+	ND
<i>L. rhamnosus</i>	d	-	+	ND	+	-	+	ND
<i>L. zeae</i>	-	-	+	ND	+	-	+	ND

+, Positivo; -, negativo; ND, no hay datos; d, del 11-89% son resultados positivos

Dworkin et al, 2006; De vos, 2009

Tabla 6: Referencia de resultados del perfil de azúcares de diferentes especies de bacterias ácido lácticas heterofermentativas obligadas

	Azúcares fermentables							
Especies	Arabinosa	Rafinosa	Celobiosa	Lactosa	Ribosa	Xilosa	Sacarosa	Fructosa
<i>L. parakefiri</i>	+	-	-	ND	+	-	-	ND
<i>L. pontis</i>	-	d	-	ND	+	-	+	ND
<i>L. suebicus</i>	+	-	d	ND	+	+	d	
<i>L. reuteri</i>	+	+	+	ND	+	-	+	ND

+, Positivo; -, negativo; ND, no hay datos; d, del 11-89% son resultados positivos

Dworkin et al, 2006; De vos, 2009

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de todas las pruebas fenotípicas realizadas para el estudio de las cepas de interés

Tabla 7: Resultados obtenidos de las pruebas fenotípicas de las cepas obtenidas del cepario de la Universidad Politécnica de

CLAVE DE CEPA	REF-1	REF-2	REF-3	REF-4	No. 1	No. 2	No.22	No.28	YOP	LA-5
Crecimiento en Lactosa-azul-CH	+	+	++	++	-	+	-	++	w	++
Lactosa-azul-CH-color-colonia	Azul tenue	Azul tenue	Azul marino	Azul marino	Azul tenue	Azul tenue	Azul tenue	Azul marino	Azul tenue	Azul tenue
Lactosa-azul-CH-color del medio	Azul marino	Azul marino	Azul marino	Azul marino	Azul marino	Azul marino	Azul claro	Azul marino	Azul claro	Azul marino
LBS	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
10° C	++	++	+++	+++	+	+++	+++	++	+	+
45° C	+++	++	w	+	+	+	-	+	w	+
pH 4.4	++	++	++	++	+++	+++	++	+++	+++	w
pH 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w
pH 9.6	+++	+++	++	+++	++	++	++	++	+++	++
NaCl 6.5%	+	w	w	w	++	++	+	++	+++	w
NaCl 4.5%	+	+	w	w	++	++	+	++	+++	++
Sales biliares 1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Movilidad en MIO	O -	O -	O -	O -	O -	O -	O -	O -	O -	O -
	M -	M -	M +	M -	M -	M -	M -	M -	M -	M -
Fermentación en M5	HOMO	HETERO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO	HOMO	HOMO	HOMO	HOMO
GLUCOSA/ CO ₂	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
ARABINOSA	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
RAFINOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CELOBIOSA	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
LACTOSA	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
RIBOSA	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
XILOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SACAROSA	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
FRUCTOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RESGUARDO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Puebla

+++; Vasto crecimiento; ++, crecimiento moderado; +, poco crecimiento; w, crecimiento debil; HOMO, homofermentativo; HETERO, heterofermentativo, O, Ornitina negativo; M -, movilidad negativa; M +, movilidad positiva

13. CONSERVA EN GLICEROL AL 20%

Durante la conserva de las cepas en caldo MRS y 20% de glicerol se realizó una investigación acerca del crecimiento de *Lactobacillus* y *Enterococcus* en medios adicionados con MRS en el que se encontró que ambos géneros tienen la capacidad para proliferar en distintos medios solidos/líquidos adicionados con este compuesto (Dworkin et al, 2006)

VI. CONCLUSIÓN

En base a la investigación de los resultados obtenidos para la identificación de las cepas de estudio provenientes del cepario de la Universidad Politécnica de Puebla, se concluyó que las cepas con la clave correspondientes a YOP, LA-5, REF2, No.1, No.2, No.22 podrían pertenecer al género de *Lactobacillus spp* ya que de acuerdo a la literatura comparte un gran número de características fenotípicas y morfológicas, es necesario un estudio por medio de pruebas moleculares para lograr una identificación más específica. Las cepas de estudio No.28, REF1,

REF3, REF4 se determinó que pueden pertenecer al género de *Enterococcus spp* ya que se encontraron varios resultados similares con los encontrados dentro de la literatura citada y es necesario seguir con los estudios de más pruebas fenotípicas, así como pruebas moleculares.

VII. LITERATURA CITADA

Álvarez-Calatayud G., Pérez-Moreno J., Tolín M., y Sánchez C., 2013, Aplicaciones clínicas del empleo de probióticos en pediatría, Sección de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España, pp: 564-574.

Breed R. S., Murray E.G.D, Hitchens, A.P, 1948, Bergey's manual of determinative bacteriology, the Williams & Wilkins Company, 6th edition, page 349-356

Bucio A., Hartemink R., Schrama J. W., Verreth J., y Rombouts F. M., 2006, Presence of *lactobacilli* in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system, Food Microbiology ELSEVIER, No 23, pp: 476-482.

Campo M. C.I, Gómez H.H.E, Alaniz de la O. R. 2008, Bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica y actividad bacteriocinogénica aisladas de queso fresco, e-Gnosis [online] Vol. 6, Art. 5.

Canchaya C., Claesson M. J., Fitzgerald G. F., Sinderen D. V., y O'Toole P.W., 2006, Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species, Department of Microbiology and Alimentary Pharmabiotic Centre, University College Cork, Ireland.

Caufield P.W., Li Y., Dasanayake A., y Saxena D., 2005, Diversity of *Lactobacilli* in the Oral Cavities of Young Women with Dental Caries, college of Dentistry, New York.

Cueto-Vigil M. C., Acuña-Monsalve Y., y Valenzuela-Riaño J., 2010, Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño, Actual Biol 32, pp: 129-138.

Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackerrandt E., 2006, The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria, 3rd edition, Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria.

De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R, Ludwig W., Rainey F.A, Schleifer K.H., Whitman W.B., 2009, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, Volume Three

The Firmicutes.

Ghiasi F., 2011, Predominant lactic acid bacteria isolated from the intestines of silver carp in low water temperature, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, African Journal of Biotechnology Vol. 10, pp: 12717-12721.

Jurado H., Aguirre D., y Ramírez C., 2009, Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos, Rev. MVZ Córdoba, pp: 1723-1735.

Markiewicz L., y Biedrzycka E., 2005, Identification of *lactobacillus* and *bifidobacterium* species with pcr applied to quality control of fermented dairy beverages, polish journal of food and nutrition sciences, Vol 14/55, No 4, pp: 359-365.

Ouwehand A. C., Tiihonen K., Saarinen M., Putaala H., y Rautonen N., 2009, Influence of a combination of *Lactobacillus acidophilus* NCFM and lactitol on healthy elderly: intestinal and immune parameters, British Journal of Nutrition, pp: 367-375.

Petrova S., Vladimirov B., Nedkova R., y Trifonova S., 2008, Phenotypic and molecular identification of *lactobacilli* isolated from vaginal secretions, J Microbiol Immunol Infect. No 41, pp: 469-477.

Purohit S., Sharma R., Jodhawat N., y Kaur S., 2012, Evaluation of probiotic potential of *lactobacillus fermentum* strain, Microbiology and Mycology laboratory, Department of Botany ,No 25, pp: 142-144.

Ramachandran P., Lacher D.W. , Pfeiler E. A., y Elkins C. A., 2013, Development of a Tiered Multilocus Sequence Typing Scheme for Members of the *Lactobacillus acidophilus* Complex, Applied and Environmental Microbiology, No 23, pp: 7220–7228.

Ramírez J. C., Ulloa P. R., Velázquez M. Y., Ulloa J. A., y Romero F. A., 2011, Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud, Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nayarit.

Rondón A. J., Samaniego L. M., Bocourt R., Rodríguez S., Milián G., Ranilla M. J., Laurencio M., y Pérez M., 2009, Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *lactobacillus sp.* Procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba, CYTA - Journal of Food.

Rosander A., Connolly E., y Roos S., 2008, Removal of Antibiotic Resistance Gene-Carrying Plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and Characterization of the

Resulting Daughter Strain, *L. reuteri* dsm 17938, applied and environmental microbiology, Vol. 74, No. 19, pp: 6032-6040

Ruiz K., Ortega D. P., Hotos J. L., y Torres G. A., 2016, Selección de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico de interés en el sector piscícola, *Agronomía Colombiana*.

Sheu S-J., Hwang W-Z., Chen H-C., Chiang Y-C., y Tsen H-Y., 2009, Development and Use of tuf Gene–Based Primers for the Multiplex PCR Detection of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* Group, *Lactobacillus delbrueckii*, and *Bifidobacterium longum* in Commercial Dairy Products, *Journal of Food Protection*, Vol. 72, No. 1, pp: 93-100.

Sul, Su-Yeon, Kim H-J., Kim T-W., y Kim H-Y., 2006, Rapid Identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in Probiotic Products Using Multiplex PCR, *J.Microbiol. Biotenhol*, pp: 490-495.

Terzic-Vidojevic A., Tolinacki M., Nikolic M., Lozo J., Begovic J., Gulahmadov S. G. O., Kuliev A. A., Dalgarradondo M., Chobert J., Haertlé T., y Topisirovic L., 2009, Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Azerbaijani traditional dairy products, *African Journal of Biotechnology*. Vol 8, pp: 2576-2588.

Thomas D. A., 2005, Efecto de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri* en las propiedades físico-químicas y sensoriales del yogur, *Zamorano*, Honduras.

Vázquez S., Lopretti M., Rey F., y Zunino P., 2007, Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Lactobacillus spp.* Para su uso como probióticos en la industria láctea, *Publicación anual del laboratorio tecnológico del Uruguay*.