



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Aislamiento de bacterias ácido lácticas de tracto
intestinal de ratón infante y caracterización
bioquímica primaria y de perfil de
carbohidratos**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**PRESENTAN:
NATALIA YURIDIA RIOS ARANJO
SAGRARIO JAISEL VILLANUEVA CHÁVEZ**

**ASESOR: DRA. ADRIANA LLORENTE BOUSQUETS
COASESOR: M. en C. CRISÓFORO MERCADO
MÁRQUEZ**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Aislamiento de bacterias ácido lácticas de tracto intestinal de ratón infante y caracterización bioquímica primaria y de perfil de carbohidratos.

Que presenta la pasante: **Natalia Yuridia Rios Aranjó**

Con número de cuenta: **414067761** para obtener el Título de la carrera: **Ingeniería en Alimentos**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Febrero de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en A. Jorge López Pérez	
VOCAL	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
SECRETARIO	Dra. Adriana Llorente Bousquets	
1er. SUPLENTE	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
2do. SUPLENTE	M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Aislamiento de bacterias ácido lácticas de tracto intestinal de ratón infante y caracterización bioquímica primaria y de perfil de carbohidratos.

Que presenta la pasante: **Sagrario Jaisel Villanueva Chávez**
Con número de cuenta: **414008193** para obtener el Título de la carrera: **Ingeniería en Alimentos**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Febrero de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en A. Jorge López Pérez	
VOCAL	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
SECRETARIO	Dra. Adriana Llorente Bousquets	
1er. SUPLENTE	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
2do. SUPLENTE	M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

El presente Trabajo de Tesis de Investigación fue desarrollado en el TMIA: Taller de Procesos Tecnológicos de Productos Cárnicos en el Laboratorio 7 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria UIM de la FES Cuautitlán UNAM

**Recibió apoyo del proyecto DGAPA-PAPIIT IT201917.
“Estudios *in vitro* de nuevos probióticos para nutrición animal”**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a Dios y a la Virgen de Guadalupe por haberme permitido cerrar un ciclo maravilloso en mi vida.

Gracias a mis padres **Yoni Arango Ríos** y **Ramón Ríos Hernández**, por todo el esfuerzo que hicieron para que tuviera las herramientas necesarias durante mi formación académica y por lo que me han enseñado en casa, a cada día crecer como persona.

A mi hermano **Ramón**, por ser un excelente hermano, que siempre estuvo para apoyarme en las buenas y en las malas, por su cariño, complicidad y sin duda por siempre guiarme y aconsejarme.

Gracias a la familia **Moya Arango** por abrirme las puertas de su casa cuando recién ingrese a la universidad, fueron meses difíciles por la distancia pero era muy agradable llegar a casa y saber que estaban ahí, para escucharme como había estado mi día. Y también quiero agradecer a la familia **Espinosa Arango**, por siempre estar en todo momento.

Gracias familia por siempre creer en mí. ¡Los amo!

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Fes Cuautitlán** la cual siempre estaré agradecida por abrirme sus puertas y darme tanto durante estos años. Gracias por haberme formado como profesionalista y siempre estaré orgullosa de pertenecer a la máxima casa de estudios.

A mis asesores, a la **Dra. Adriana Llorente** y al **M. en C. Crisóforo Mercado** gracias por transmitirme sus conocimientos y guiarme durante toda la etapa del proyecto, por dedicarme su tiempo para escucharme y aconsejarme. Y sobre todo por haber confiado en mí. Son unas excelentes personas y soy muy afortunada de haberlos conocido. Sin su apoyo y sabiduría no hubiera podido concluir de esta manera este ciclo.

Al **jurado** asignado, gracias por el tiempo que dedicaron a la revisión de este proyecto, que con sus observaciones lo han enriquecido.

Gracias a cada uno de los **maestros** que compartieron sus conocimientos y sus experiencias y contribuyeron a mi formación profesional, siempre los recordaré con mucho cariño y respeto.

Gracias a mis grandes **amigos** de la universidad que han sido una parte importante durante esta etapa, donde compartí y espero seguir compartiendo buenos momentos a sus lados. Y a las personas que de alguna manera me han acompañado y enseñado muchas cosas.

DEDICATORIAS

Quiero dedicar este trabajo a las personas más cercanas e importantes en mi vida. A ti **Mamá** por traerme a la vida, por el amor que me demuestras a través de tus enseñanzas, consejos, desvelos, enojos y preocupaciones. A ti **Papá** gracias por siempre estar para mí a pesar de la distancia, por los ejemplos de esfuerzo y perseverancia que me has infundado para salir adelante. A ti **Hermano** gracias por el apoyo incondicional y por todo lo que me has enseñado de la vida, que nunca hay que rendirse y por el pequeño **Jesús** que nos ha regalado tantas alegrías. Familia son mi inspiración de siempre salir adelante, sin el apoyo y amor de ustedes no hubiera logrado cerrar este ciclo con éxito.

“La confianza en sí mismo es el primer secreto del éxito” **Ralph Waldo Emerson**

AGRADECIMIENTOS

Me siento feliz de poder cumplir un reto más en mi vida que poco a poco se concluyó como un logro, gracias a Dios, el amor y paciencia de las personas que se encuentran en mi vida, a las cuales solo me queda darles las gracias.

Gracias a **Dios** por permitirme llegar a este momento tan importante en mi vida de la salud y dicha que tengo para poder seguir superando cada reto en mi vida y continuar creciendo en todos los ámbitos de mi vida.

Agradezco a la **Universidad Nacional Autónoma de México** mi máxima casa de estudios, **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** lo que me brindaron, por darme las herramientas necesarias para mi formación académica, profesional y humana.

A mis asesores de tesis la **Doctora Adriana Llorente** y el **M. en C. Crisóforo Mercado** por brindarme su apoyo, dedicación, consejos y comprensión; gracias por la paciencia y por las experiencias compartidas, por siempre alentarme a ser mejor persona y profesional. Sin ustedes no habría sido posible concluir esta etapa de mi vida.

A los integrantes del **jurado** por la paciencia y el tiempo que invirtieron en la revisión de este proyecto así como sus consejos que me brindaron.

A todos mis **maestros** por los conocimientos que me brindaron en este camino, por las experiencias, regaños y consejos. Todo me ha servido para poder crecer en todos los ámbitos.

A todos **mis amigos** por hacer ameno el transcurso de esta etapa, por cada vivencia y aventura que tuvimos, de cada uno me llevo lo mejor y un aprendizaje único. Gracias por brindarme su amistad, horas de estudio, regaños, conocimientos y apoyo. Los quiero mucho.

DEDICATORIAS

A mi hermosa familia que quiero, amo y respeto, pero sobre todo son los pilares de mi vida, que me ayudan a seguir creyendo en cada uno de mis sueños, creciendo día con día.

Por eso gracias infinitas a mis padres **Federico Villanueva** y **Sagrario Chávez** por poder brindarme todas las herramientas para forjarme como profesionista y como mejor ser humano, todo lo que soy se los debo a ustedes a los sacrificios y desvelos que hicieron día con día; a la entereza que demostraron y que me brindaron al tenerlos tan lejos de mí, gracias por amarme tanto, educarme y guiarme, por depositar su confianza en cada uno de mis sueños, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible. **LOS AMO INFINITAMENTE Y LES AGRADEZCO TODO LO QUE ME HAN DADO.**

A ti hermana **Brenda** por demostrarme que aún a pesar de cada obstáculo que la vida nos ponga tenemos que salir adelante, por enseñarme tanto con cada paso que das, porque eres una mujer decidida y aguerrida, gracias porque sé que aun sin pedirlo estarás en las buenas y en las malas, te amo muchísimo.

A mis abuelitos **Trinidad Chávez** ⁽⁺⁾ y **Natalia Pacheco** por demostrarme que todo sueño se alcanza con amor y perseverancia, gracias por guiar cada uno de mis pasos y por amarme incondicionalmente, a ti abuelita te agradezco infinitamente estos 5 años por estar a mi lado y cuidarme, por siempre confiar en mí, este triunfo es también en gran parte tuyo. Abuelito sé que desde el cielo estas orgullos y feliz de este logro, te extrañó cada día de mi vida pero sé que siempre estarás cuidando de mí. Los amo con todo mí ser.

A todas mis tías **Norma**, **Araceli**, **Patricia** y **Lulú** por siempre creer en mí, apoyarme y brindarme la calidez de su hogar, gracias por el cariño y paciencia que me tienen. Gracias por tanto, las quiero mucho.

*“Todos tus sueños se pueden convertir en realidad si tienes el coraje de perseguirlos”. **Walt Disney***

ÍNDICE

ÍNDICE	9
ÍNDICE CUADROS	11
ÍNDICE DE FIGURAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS.....	23
RESUMEN	24
INTRODUCCIÓN	25
1. MARCO TEÓRICO.....	27
1.1. Probióticos	28
1.1.1. Microbiota intestinal en diferentes nichos	29
1.1.2. Beneficios	31
1.2. Normatividad	33
1.2.1. FAO/OMS	33
1.2.2. Autoridad Europea para la Inocuidad de los Alimentos (EFSA)	35
1.3. Bacterias ácido lácticas (BAL).....	36
1.4. Clasificación de las BAL.....	37
1.5. Actividad metabólica	40
1.6. Identificación bacteriana.....	43
1.6.1. Caracterización bioquímica	44
1.6.2. Caracterización molecular	55
JUSTIFICACIÓN	58
OBJETIVO GENERAL	61
OBJETIVOS PARTICULARES.....	61
HIPÓTESIS	62
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	63

2.1. Manejo de ratones según su edad	64
2.2. Procedimiento para la obtención del lavado de tracto intestinal y colon de ratones de 2 y 3 semanas de edad	64
2.3. Estandarización del procedimiento para la obtención de microbiota de tracto intestinal y colon de ratón de 4 semanas de edad	66
2.4. Aislamiento y selección de bacterias lácticas anaerobias Gram positivas de tracto intestinal y colon del modelo murino	67
2.5. Pruebas microbiológicas primarias	69
2.5.1. Morfología colonial.....	69
2.5.2. Tinción de Gram	69
2.5.3. Prueba de catalasa.....	71
2.5.4. Prueba de oxidasa.....	72
2.5.5. Prueba de O/F	73
2.5.6. Movilidad	75
2.6. Perfil fermentación de carbohidratos con sistema API® 50 CH y 50 CHL	75
2.7. Evaluación de actividad hemolítica	79
2.8. Liofilización de cepas aisladas	79
3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	81
3.1. Procedimiento de estandarización para el manejo de ratón infante	82
3.2. Desarrollo metodológico para el aislamiento y obtención de cepas puras de bacilos y cocos anaerobios Gram positivos	82
3.3. Pruebas microbiológicas primarias: morfología colonial, tinción de Gram, catalasa, oxidasa y O/F.....	84
3.4. Fermentación de carbohidratos con sistema API® 50 CHL	87
3.5. Actividad Hemolítica de las cepas.....	88
CONCLUSIONES.....	193
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	195

ÍNDICE CUADROS

Cuadro 1. Principales familias y géneros de BAL.....	38
Cuadro 2. Modo de fermentación de azúcares por géneros y especies de BAL	42
Cuadro 3. Composición de la galería API® 50 CH.....	54
Cuadro 4. Relación de cepas aisladas por sección de intestino.....	83
Cuadro 5. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V	89
Cuadro 6. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V	90
Cuadro 7. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	91
Cuadro 8. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de <i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	92
Cuadro 9. Resultados de prueba de O/F de <i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	93
Cuadro 10. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 53103	94
Cuadro 11. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 53103	94
Cuadro 12. Resultados de prueba de O/F de <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 53103.....	95
Cuadro 13. Características macroscópicas y microscópicas de <i>S. aureus</i> ATCC 6538P.....	96
Cuadro 14. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de <i>S. aureus</i> ATCC 6538P	96
Cuadro 15. Características macroscópicas y microscópicas de <i>P. aeruginosa</i> spp. 97	
Cuadro 16. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de <i>P. aeruginosa</i> spp. ..	98
Cuadro 17. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1A.....	99
Cuadro 18. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1A	99
Cuadro 19. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1A	100
Cuadro 20. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1A con la galería API® 50 CH en 24 h	102

Cuadro 21. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1A con la galería API® 50 CH en 48 h	104
Cuadro 22. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 2A.....	105
Cuadro 23. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 2A	106
Cuadro 24. Resultados de prueba de O/F de la cepa 2A	107
Cuadro 25. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 2A con la galería API® 50 CH en 24 h	109
Cuadro 26. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 2A con la galería API® 50 CH en 48 h	111
Cuadro 27. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1B.....	112
Cuadro 28. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1B	113
Cuadro 29. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1B	114
Cuadro 30. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1C.....	115
Cuadro 31. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1C	116
Cuadro 32. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1C.....	117
Cuadro 33. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1C con la galería API® 50 CH en 24 h	119
Cuadro 34. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1C con la galería API® 50 CH en 48 h	121
Cuadro 35. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1D.....	122
Cuadro 36. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1D	123
Cuadro 37. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1D.....	124
Cuadro 38. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1D con la galería API® 50 CH en 24 h	126
Cuadro 39. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1D con la galería API® 50 CH en 48 h	128
Cuadro 40. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1E.....	129
Cuadro 41. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1E	130
Cuadro 42. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1E	131
Cuadro 43. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 2E.....	132
Cuadro 44. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 2E	133

Cuadro 45. Resultados de prueba de O/F de la cepa 2E	134
Cuadro 46. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 2E con la galería API® 50 CH en 24 h	136
Cuadro 47. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 2E con la galería API® 50 CH en 48 h	138
Cuadro 48. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 3E	139
Cuadro 49. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 3E	140
Cuadro 50. Resultados de prueba de O/F de la cepa 3E	141
Cuadro 51. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 4E	142
Cuadro 52. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 4E	143
Cuadro 53. Resultados de prueba de O/F de la cepa 4E	144
Cuadro 54. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 4E con la galería API® 50 CH en 24 h	146
Cuadro 55. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 4E con la galería API® 50 CH en 48 h	148
Cuadro 56. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 5E	149
Cuadro 57. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 5E	150
Cuadro 58. Resultados de prueba de O/F de la cepa 5E	151
Cuadro 59. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1F	152
Cuadro 60. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1F	153
Cuadro 61. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1F	154
Cuadro 62. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 2F	155
Cuadro 63. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 2F	156
Cuadro 64. Resultados de prueba de O/F de la cepa 2F	157
Cuadro 65. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 2F con la galería API® 50 CH en 24 h	159
Cuadro 66. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 2F con la galería API® 50 CH en 48 h	161
Cuadro 67. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 3F	162
Cuadro 68. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 3F	163
Cuadro 69. Resultados de prueba de O/F de la cepa 3F	164

Cuadro 70. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1G	165
Cuadro 71. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1G	166
Cuadro 72. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1G	167
Cuadro 73. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1G con la galería API® 50 CH en 24 h	169
Cuadro 74. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1G con la galería API® 50 CH en 48 h	171
Cuadro 75. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1H	172
Cuadro 76. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1H	173
Cuadro 77. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1H	174
Cuadro 78. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1H con la galería API® 50 CH en 24 h	176
Cuadro 79. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1H con la galería API® 50 CH en 48 h	178
Cuadro 80. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 2H	179
Cuadro 81. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 2H	180
Cuadro 82. Resultados de prueba de O/F de la cepa 2H	181
Cuadro 83. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 3H	182
Cuadro 84. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 3H	183
Cuadro 85. Resultados de prueba de O/F de la cepa 3H	184
Cuadro 86. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1I	185
Cuadro 87. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1I	186
Cuadro 88. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1I	187
Cuadro 89. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1I con la galería API® 50 CH en 24 h	189
Cuadro 90. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1I con la galería API® 50 CH en 48 h	191

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Elementos que influyen en el desarrollo de la microbiota en niños	29
Figura 2. Etapas de la colonización microbiana del intestino del infante y del niño. Las familias bacterianas más abundantes aparecen representadas en círculos (cuanto mayor es el círculo, mayor es la abundancia relativa del taxón bacteriano representado)	30
Figura 3. Efectos benéficos asociados con probióticos	32
Figura 4. Presentación esquemática de las principales vías de fermentación de las hexosas por bacterias ácido lácticas	41
Figura 5. Características morfológicas de colonias	45
Figura 6. Modelo tridimensional de la “envoltura o cubierta” de una bacteria Gram positiva que consta de una gruesa capa de peptidoglicano y una membrana citoplasmática subyacente. Obsérvese que en este tipo de bacterias no existe el periplasma.....	46
Figura 7. Modelo tridimensional de la “cubierta o envoltura” celular de una bacteria Gram negativa. Consta de una densa membrana externa, un periplasma o espacio periplásmico, una capa intermedia compuesta por peptidoglicano y una membrana citoplasmática subyacente	47
Figura 8. Representación de resultados de la prueba de oxidación – fermentación	49
Figura 9. Vías metabólicas de la fermentación fosforilada	50
Figura 10. Vía metabólica oxidativa.....	51
Figura 11. Microorganismos inmóviles en medio semisólido Hugh & Leifson	52
Figura 12. Desarrollo de la metodología experimental	60
Figura 13. Cámara de CO ₂	64
Figura 14. Tracto intestinal de ratón	65
Figura 15. Distribución de la microbiota intestinal	66
Figura 16. Ratón de la cepa CD1 de cuatro semanas de edad	67
Figura 17. Crecimiento bacteriano en caldo MRS (BD Difco™)	67
Figura 18. Segundo crecimiento bacteriano en caldo MRS (BD Difco™).....	68
Figura 19. Kit de tinción de Gram (BBL™)	70

Figura 20. Preparación de muestra para la prueba de tinción de Gram a) Gota de agua destilada en portaobjetos b) Selección de colonia a teñir c) Fijación de la colonia ...	70
Figura 21. Procedimiento de la prueba de tinción de Gram.....	71
Figura 22. Materiales para la realización de la prueba de catalasa.....	72
Figura 23. Procedimiento de la prueba de catalasa a) Gota de H ₂ O ₂ al 3% en portaobjetos b) Impronta de colonia a evaluar c) Contacto de la colonia con el H ₂ O ₂	72
Figura 24. Materiales para la realización de la prueba de oxidasa.....	73
Figura 25. Procedimiento de la prueba de oxidasa a) Impronta de colonia a evaluar b) Contacto de la colonia con el papel filtro impregnado con el reactivo	73
Figura 26. Carbohidratos empleados en la prueba de O/F.....	74
Figura 27. Procedimiento de la prueba de O/F a) Impronta de la colonia a evaluar b) Inóculo de la colonia por picadura c) Tubos en condiciones anaerobia y aerobia.....	74
Figura 28. Montaje del sistema API® 50 CH a) Cámara con atmosfera húmeda b) Colocación de las galerías en la cámara.....	76
Figura 29. Comparación con la escala #2 de Mc Farland	77
Figura 30. Procedimiento para el llenado de la cúpula.....	77
Figura 31. Aspecto de las cúpulas en las galerías de la prueba comercial API® 50 CH	78
Figura 32. Demostración de galerías API® 50 CHL en programa informático API web	78
Figura 33. Siembra de cultivo por estría en agar sangre (BD BBL™) con 5% v/v de sangre de bovino.....	79
Figura 34. Ultracongelador Thermo Revco Thermo Scientific	80
Figura 35. Liofilizadora Labconco Freezone 4.5.....	80
Figura 36. Distribución de cepas aisladas por sección de intestino.....	84
Figura 37. Representación de resultados de la prueba catalasa a) Resultado negativo b) Resultado positivo.....	85
Figura 38. Representación de resultados de la prueba oxidasa a) Resultado negativo b) Resultado positivo.....	86
Figura 39. Representación de tubos inoculados antes de presentar cambios en el color	87

Figura 40. Representación de tubos inoculados después de presentar cambios en el vire	87
Figura 41. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa de estudio c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P	89
Figura 42. Morfología colonial de <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V en agar MRS	90
Figura 43. Morfología microscópica de <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V	90
Figura 44. Catalasa negativo en <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V	90
Figura 45. Oxidasa negativo en <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V	90
Figura 46. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa de estudio c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P	91
Figura 47. Morfología colonial de <i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014 en agar MRS	92
Figura 48. Morfología microscópica de <i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	92
Figura 49. Catalasa negativo en <i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	92
Figura 50. Oxidasa negativo en <i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	92
Figura 51. Representación de resultados de la prueba O/F de <i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	93
Figura 52. Morfología colonial de <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 53103 en agar MRS	94
Figura 53. Morfología microscópica de <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 53103	94
Figura 54. Catalasa negativo en <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 53103.....	95
Figura 55. Oxidasa negativo en <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 53103	95
Figura 56. Representación de resultados de la prueba O/F de <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 53103	95
Figura 57. Morfología colonial de <i>S. aureus</i> ATCC 6538P en agar BHI	96
Figura 58. Morfología microscópica de <i>S. aureus</i> ATCC 6538P	96
Figura 59. Catalasa positivo en <i>S. aureus</i> ATCC 6538P	97
Figura 60. Oxidasa positivo en <i>S. aureus</i> ATCC 6538P	97
Figura 61. Morfología colonial de <i>P. aeruginosa spp.</i> en agar Pseudomona P	98
Figura 62. Morfología microscópica de <i>P. aeruginosa spp.</i>	98
Figura 63. Catalasa positivo en <i>P. aeruginosa spp.</i>	98
Figura 64. Oxidasa positivo en <i>P. aeruginosa spp.</i>	98
Figura 65. Morfología colonial de la cepa 1A en agar MRS.....	99

Figura 66. Morfología microscópica de la cepa 1A.....	99
Figura 67. Catalasa negativo cepa 1A.....	100
Figura 68. Oxidasa negativo cepa 1A.....	100
Figura 69. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1A	100
Figura 70. Tira API® 50 CH de la cepa 1A tras 24 h de incubación a 30 ± 2 °C	101
Figura 71. Tira API® 50 CH de la cepa 1A tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C	103
Figura 72. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 1A c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P.....	105
Figura 73. Morfología colonial de la cepa 2A en agar MRS.....	106
Figura 74. Morfología microscópica de la cepa 2A.....	106
Figura 75. Catalasa negativo cepa 2A.....	106
Figura 76. Oxidasa negativa cepa 2A.....	106
Figura 77. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 2A	107
Figura 78. Tira API® 50 CH de la cepa 2A tras 24 h de incubación a 30 ± 2 °C	108
Figura 79. Tira API® 50 CH de la cepa 2A tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C	110
Figura 80. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 2A c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P.....	112
Figura 81. Morfología colonial de la cepa 1B en agar MRS.....	113
Figura 82. Morfología microscópica de la cepa 1B.....	113
Figura 83. Catalasa negativo cepa 1B.....	113
Figura 84. Oxidasa negativa cepa 1B.....	113
Figura 85. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1B	114
Figura 86. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 1B c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P.....	115
Figura 87. Morfología colonial de la cepa 1C en agar MRS	116
Figura 88. Morfología microscópica de la cepa 1C.....	116
Figura 89. Catalasa negativo cepa 1C	116
Figura 90. Oxidasa negativo cepa 1C	116
Figura 91. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1C	117
Figura 92. API® 50 CH de la cepa 1C tras 24 h de incubación a 30 ± 2 °C	118
Figura 93. Tira API® 50 CH de la cepa 1C tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C	120

Figura 94. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 1C c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P	122
Figura 95. Morfología colonial de la cepa 1D en agar MRS	123
Figura 96. Morfología microscópica de la cepa 1D.....	123
Figura 97. Catalasa negativo cepa 1D	123
Figura 98. Oxidasa negativo cepa 1D	123
Figura 99. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1D	124
Figura 100. API® 50 CH de la cepa 1D tras 24 h de incubación a 30 ± 2 °C	125
Figura 101. Tira API® 50 CH de la cepa 1D tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C ...	127
Figura 102. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 1C c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P	129
Figura 103. Morfología colonial de la cepa 1E en agar MRS	130
Figura 104. Morfología microscópica de la cepa 1E.....	130
Figura 105. Catalasa negativo cepa 1E.....	130
Figura 106. Oxidasa negativo cepa 1E.....	130
Figura 107. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1E	131
Figura 108. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 1E c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P.....	132
Figura 109. Morfología colonial de la cepa 2E en agar MRS	133
Figura 110. Morfología microscópica de la cepa 2E.....	133
Figura 111. Catalasa negativo cepa 2E.....	133
Figura 112. Oxidasa negativo cepa 2E.....	133
Figura 113. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 2E	134
Figura 114. Tira API® 50 CH de la cepa 2E tras 24 h de incubación a 30 ± 2 °C ...	135
Figura 115. Tira API® 50 CH de la cepa 2E tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C ...	137
Figura 116. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 2E c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P.....	139
Figura 117. Morfología colonial de la cepa 3E en agar MRS	140
Figura 118. Morfología microscópica de la cepa 3E.....	140
Figura 119. Catalasa negativo cepa 3E.....	140
Figura 120. Oxidasa negativo cepa 3E.....	140

Figura 121. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 3E	141
Figura 122. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 3E c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P.....	142
Figura 123. Morfología colonial de la cepa 4E en agar MRS	143
Figura 124. Morfología microscópica de la cepa 4E.....	143
Figura 125. Catalasa negativo cepa 4E.....	143
Figura 126. Oxidasa negativo cepa 4E.....	143
Figura 127. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 4E	144
Figura 128. Tira API® 50 CH de la cepa 4E tras 24 h de incubación a $30 \pm 2^\circ\text{C}$	145
Figura 129. Tira API® 50 CH de la cepa 1A tras 48 h de incubación a $30 \pm 2^\circ\text{C}$...	147
Figura 130. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 4E c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P.....	149
Figura 131. Morfología colonial de la cepa 5E en agar MRS	150
Figura 132. Morfología microscópica de la cepa 5E.....	150
Figura 133. Catalasa negativo cepa 5E.....	150
Figura 134. Oxidasa negativo cepa 5E.....	150
Figura 135. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 5E	151
Figura 136. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 5E c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P.....	152
Figura 137. Morfología colonial de la cepa 1F en agar MRS.....	153
Figura 138. Morfología microscópica de la cepa 1F	153
Figura 139. Catalasa negativo cepa 1F.....	153
Figura 140. Oxidasa negativo cepa 1F.....	153
Figura 141. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1F	154
Figura 142. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 1F c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P.....	155
Figura 143. Morfología colonial de la cepa 2F en agar MRS.....	156
Figura 144. Morfología microscópica de la cepa 2F	156
Figura 145. Catalasa negativo cepa 2F	156
Figura 146. Oxidasa negativo cepa 2F.....	156
Figura 147. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 2F	157

Figura 148. Tira API® 50 CH de la cepa 2F tras 24 h de incubación a 30 ± 2°C	158
Figura 149. Tira API® 50 CH de la cepa 1A tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C ...	160
Figura 150. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 2F c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P.....	162
Figura 151. Morfología colonial de la cepa 3F en agar MRS.....	163
Figura 152. Morfología microscópica de la cepa 3F	163
Figura 153. Catalasa negativo cepa 3F	163
Figura 154. Oxidasa negativo cepa 3F	163
Figura 155. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 3F.....	164
Figura 156. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 3F c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P.....	165
Figura 157. Morfología colonial de la cepa 1G en agar MRS	166
Figura 158. Morfología microscópica de la cepa 1G	166
Figura 159. Catalasa negativa cepa 1G	166
Figura 160. Oxidasa negativa cepa 1G	166
Figura 161. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1G	167
Figura 162. Tira API® 50 CH de la cepa 1G tras 24 h de incubación a 30 ± 2 °C...	168
Figura 163. Tira API® 50 CH de la cepa 1G tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C...	170
Figura 164. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. Lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 1G c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P	172
Figura 165. Morfología colonial de la cepa 1H en agar MRS	173
Figura 166. Morfología microscópica de la cepa 1H.....	173
Figura 167. Catalasa negativo cepa 1H	173
Figura 168. Oxidasa negativo cepa 1H	173
Figura 169. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1H	174
Figura 170. Tira API® 50 CH de la cepa 1H tras 24 h de incubación a 30 ± 2 °C ...	175
Figura 171. Tira API® 50 CH de la cepa 1H tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C ...	177
Figura 172. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 1H c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P	179
Figura 173. Morfología colonial de la cepa 2H en agar MRS	180
Figura 174. Morfología microscópica de la cepa 2H.....	180

Figura 175. Catalasa negativo cepa 2H	180
Figura 176. Oxidasa negativo cepa 2H	180
Figura 177. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 2H	181
Figura 178. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 2H c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P	182
Figura 179. Morfología colonial de la cepa 3H en agar MRS	183
Figura 180. Morfología microscópica de la cepa 3H.....	183
Figura 181. Catalasa negativo cepa 3H	183
Figura 182. Oxidasa negativo cepa 3H	183
Figura 183. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 3H	184
Figura 184. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 3H c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P	185
Figura 185. Morfología colonial de la cepa 1I en agar MRS	186
Figura 186. Morfología microscópica de la cepa 1I	186
Figura 187. Catalasa negativo cepa 1I	186
Figura 188. Oxidasa negativo cepa 1I	186
Figura 189. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1I.....	187
Figura 190. Tira API® 50 CH de la cepa 1I tras 24 h de incubación a 30 ± 2 °C.....	188
Figura 191. Tira API® 50 CH de la cepa 1I tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C.....	190
Figura 192. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: <i>Lc. lactis</i> ATCC 0205V b) cepa 1I c) control positivo: <i>S. aureus</i> 6538P	192

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Grados Celsius	Internacional de Probióticos y Prebióticos
ADN: Ácido Desoxirribonucleico	L: Levógiro
ADNc: ADN complementario	Lb: Lactobacillus
ADNg: ADN genómico	Lc: Lactococcus
ATCC: American Type Culture Collection	mL: Mililitros
ATP: Adenosín trifosfato	MRS: Man Rogosa y Sharpe
BAL: Bacterias Acido Lácticas	NaCl: Cloruro de Sodio
BHI: Brain Infusion Heart	O/F: Oxidación / Fermentación
D: Dextrógiro	OMS: Organización Mundial de la Salud
DGGE: Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante	PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción de Cadena Polimerasa)
ED: Entner-Duodoroff	pH: Potencial Hidrogeno
EFSA: European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Inocuidad Alimentaria)	QPS: Qualified Presumption of Safety (Presunción calificada de seguridad)
EMP: Embden-Meyerhof Parnas	RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
FAO: Food and Agriculture Organization (Organización de Agricultura y Alimentos)	ssp: Especies
GRAS: Generally Recognized As Safe (Generalmente reconocido como seguro)	TGGE: Electroforesis en gel con gradiente de temperatura
h: Horas	TGI: Tracto Gastrointestinal
H₂O₂: Peróxido de hidrogeno	µL: Microlitros
ISSAP: Asociación Científica	UFC/g: Unidades formadoras de colonia por gramo

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se han detectado como parte de un complejo ecosistema en la mayoría de los nichos. La actividad de las BAL en el tracto gastrointestinal de los seres vivos incluye la protección contra microorganismos patógenos, desarrollo y modulación del sistema inmune y, en consecuencia efectos positivos sobre la salud del colon y la nutrición del huésped. Este equipo de trabajo se enfocó en el aislamiento e identificación de BAL aisladas de tracto intestinal y colon de ratón. A las cepas aisladas se les realizaron pruebas primarias (cultivo en agar, observación colonial en agar, tinción de Gram y observación al microscopio) para corroborar la pureza de las mismas, secundarias de oxidación y fermentación así como de producción de hemolisinas según criterios de caracterización de probióticos de la FAO/OMS. Se verificó que las cepas aisladas eran bacilos Gram positivos, cuyas características coloniales en agar corresponden a los géneros de especies de estos nichos. En todos los casos se trabajó las cepas aisladas y los controles fueron cultivadas en sus respectivos medios, para las pruebas de catalasa y oxidasa se emplearon cultivos de 24 h como controles positivos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (medio BHI) y *Pseudomonas aeruginosa* spp. (medio Pseudomonas P) y controles negativos *Lc. lactis* ATCC 0205V, *Lb. plantarum* ATCC 8014 y *Lb. rhamnosus* ATCC 53103 (medio MRS). En la prueba de Oxidación / Fermentación se utilizaron 5 carbohidratos (sacarosa, glucosa, lactosa, xilosa y sorbitol). Adicionalmente se estableció el perfil de fermentación de carbohidratos con el sistema API® 50 CHL (Cowan, 2004). Se obtuvieron resultados de posibles géneros y especies de las cepas aisladas, mediante el software API web™. Todas las cepas aisladas estudiadas resultaron negativas en la producción de hemolisinas. Por último las cepas fueron cultivadas en caldo MRS y preparadas para su ultracongelación y liofilización con la adición de leche descremada como crioprotector.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se han asociado íntimamente con el desarrollo de las antiguas civilizaciones y su bienestar a lo largo de la historia. Así mismo se relaciona con el desarrollo de los microbios particulares y las características sensoriales, de calidad y de seguridad de los alimentos fermentados.

El uso de las BAL como microorganismos probióticos y los ácidos orgánicos que producen son una excelente alternativa biológica al uso de antibióticos, con el propósito de equilibrar la microbiota intestinal (Gámez *et al.*, 2009, Holzapfel y Wood, 2014).

Las BAL constituyen un grupo de bacterias Gram positivas que comparten características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Muchas de estas cepas son consideradas por la Organización para la Alimentación y Agricultura (FAO) como Generalmente reconocidas como seguras (GRAS) en los alimentos (Castellano *et al.*, 2008).

La actividad metabólica de estas bacterias representa diversos beneficios, proporcionando sabor y textura, así como el incremento en el valor nutrimental de los alimentos. Adicionalmente se utilizan en la industria alimentaria como bioconservantes debido a la producción de diversas sustancias con acción antibacteriana que contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos y al control de patógenos responsables de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) (Driener & Rivera, 2016).

Han sido tradicionalmente empleadas, empíricamente o deliberadamente, en la elaboración de productos lácteos (quesos, mantequilla, yogurt), vegetales fermentados (encurtidos, aceitunas, col agria), productos cárnicos (mortadelas, salami), bebidas (sidras), entre otros (Alaniz *et al.*, 2006).

Las BAL generalmente se consideran como bacterias promotoras de la salud (probióticas), sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (FAO, 2006; Lathien *et al.*, 2011). Los probióticos son microorganismos viables, que una vez ingeridos por humanos y animales, producen efectos fisiológicos beneficiosos al ayudar el establecimiento de una microbiota intestinal benéfica para el huésped (Guerra *et al.*, 2007).

Según el apartado 3, “Directrices para los probióticos” del libro “Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación” documento de la FAO/OMS, indica que la identificación de las cepas probióticas es importante para relacionarlas con un efecto saludable específico, por lo que es necesario conocer su género y especie mediante metodología valida establecida de ensayos fenotípicos.

Con base en ello, este proyecto realizó el aislamiento de microorganismos procedentes de tracto intestinal y colon de ratón lactante e infante, para después realizar la identificación de género y posible especie mediante pruebas primarias, pruebas de oxidación y fermentación de carbohidratos (Cowan, 2004), aplicación de métodos comerciales del sistema API® CHL 50, API® CH y del software API web™ para establecer el perfil de fermentación de carbohidratos.

Con base en los criterios establecidos por la FAO/OMS (2006) para la caracterización de nuevos probióticos, se realizó la prueba de hemólisis siguiendo la metodología de Santini *et al.* (2010). Finalmente las cepas fueron liofilizadas para estudios posteriores de sus características probióticas y la posibilidad de emplearlas en la bioconservación de alimentos.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Probióticos

Los probióticos del griego “*pro*” para; y “*bios*” vida, existen en nuestros alimentos tradicionales desde tiempos remotos como en bebidas, pescados salados, yogur y diferentes tipos de quesos (Amara & Shibl, 2015), y a partir de su investigación muchos autores los han definido como:

- ✓ Kollat fue el primer científico que uso el término probiótico en 1953, para describir la restauración de la salud de pacientes mal nutridos (Harzallah & Belhadj, 2013).
- ✓ En 1965, Lilly y Stillwell definieron probiótico como “microorganismos promotores de crecimiento de otros microorganismos” (Amara & Shibl, 2015).
- ✓ Fuller en 1989 propone que un probiótico está constituido por una mezcla de biomasa, metabolitos y enzimas que tienen efecto benéfico en la fisiología de la microflora (AFRC, 1989).
- ✓ La Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas, la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) y la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISSAP), definen a los probióticos como “Microorganismos vivos que cuando se administran en dosis apropiadas, confieren un beneficio en la salud del hospedero.” (FAO/OMS, 2002).

Los probióticos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo. Son también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos y se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales. Es importante que estos microorganismos puedan ser capaces de atravesar la barrera gástrica para poder multiplicarse y colonizar el intestino. El efecto protector de estos microorganismos se realiza mediante 2 mecanismos: el antagonismo que impide la multiplicación de los patógenos y la producción de toxinas que imposibilitan su acción patogénica. Este antagonismo está dado por la competencia por los nutrientes o los sitios de adhesión. Mediante la inmunomodulación protegen al huésped de las infecciones, induciendo a un aumento de la producción de inmunoglobulinas, aumento de la activación de las células mononucleares y de los linfocitos (Penna, 1998).

1.1.1. Microbiota intestinal en diferentes nichos

El término de microbiota se entiende como el conjunto de microorganismos que cohabitan en diferentes regiones anatómicas, en un determinado nicho ecológico. El suelo y las plantas, son considerados como primer nicho hipotético, haciendo que se asuma que el segundo hábitat posible podría ser el intestino de los animales que se alimentan de plantas.

La microbiota intestinal es un ecosistema complejo compuesto por diferentes especies de microorganismos, la mayoría de ellos del género *Lactobacillus*, la mayor parte reside en el intestino grueso, y superan las cifras de 10^{12} - 10^{14} log UFC/g (La Rosa Hernández *et al.*, 2014). La microbiota se comienza a adquirir inmediatamente después del nacimiento y los patrones de colonización bacteriana temprana difieren en gran manera, se ha demostrado (Penders *et al.*, 2007) que la primera microbiota está determinada por el tipo de parto, mostrándose que la microbiota intestinal de los recién nacidos es muy similar al tipo de microbiota a la que se enfrentan al nacer (Figura 1).



Figura 1. Elementos que influyen en el desarrollo de la microbiota en niños

Fuente: Honeyman *et al.*, 2016

A los dos años de edad (Figura 2), la microbiota establecida es prácticamente definitiva, se pueden presentar modificaciones transitorias derivadas del uso de antibióticos o en relación con cambios dietéticos, aunque suelen ser reversibles, de modo que cada individuo mantiene una flora predominante relativamente estable.

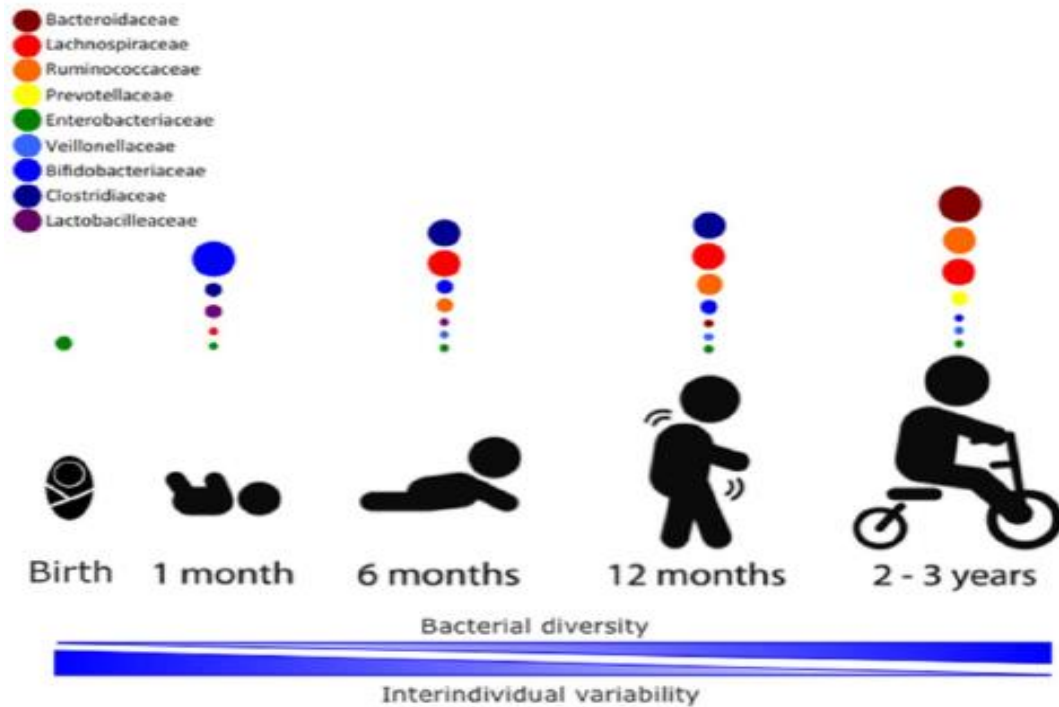


Figura 2. Etapas de la colonización microbiana del intestino del infante y del niño. Las familias bacterianas más abundantes aparecen representadas en círculos (cuanto mayor es el círculo, mayor es la abundancia relativa del taxón bacteriano representado)

Fuente: Gil & Catalina, 2018

La composición de la microbiota bacteriana es variable de un individuo a otro, aunque sus funciones metabólicas son menos diversas; entre las funciones principales se encuentran 1) fermentación de residuos de la dieta y mucinas endógenas; 2) recuperación de energía mediante la generación de ácidos grasos de cadena corta; 3) protección contra la colonización e invasión de patógenos (efecto barrera) y, 4) desarrollo, estimulación y modulación del sistema inmune (Guarner, 2002).

Se necesitan tres áreas principales de adaptaciones genómicas para que una bacteria

del suelo o planta sobreviva y se multiplique en el intestino de los animales: 1) resistencia a las barreras de colonización del huésped (es decir, pH gástrico bajo y sales biliares en el intestino); 2) adhesión a los tejidos intestinales para superar el flujo intestinal; y 3) la capacidad de fermentar algunos sustratos de manera más eficiente que las bacterias competidoras (Lebeer *et al.*, 2008).

1.1.2. Beneficios

Debido a las implicaciones que tienen los probióticos sobre la salud, es necesario conocer la interacción con el organismo hospedador. Entre los efectos atribuidos a los probióticos destacan los asociados con efectos nutricionales, con el tracto gastrointestinal, el sistema inmunitario, el sistema cardiovascular o con el tracto urogenital que se representan en la figura 3 (Mattila-Sandholm *et al.*, 1999; Barman *et al.*, 2008).

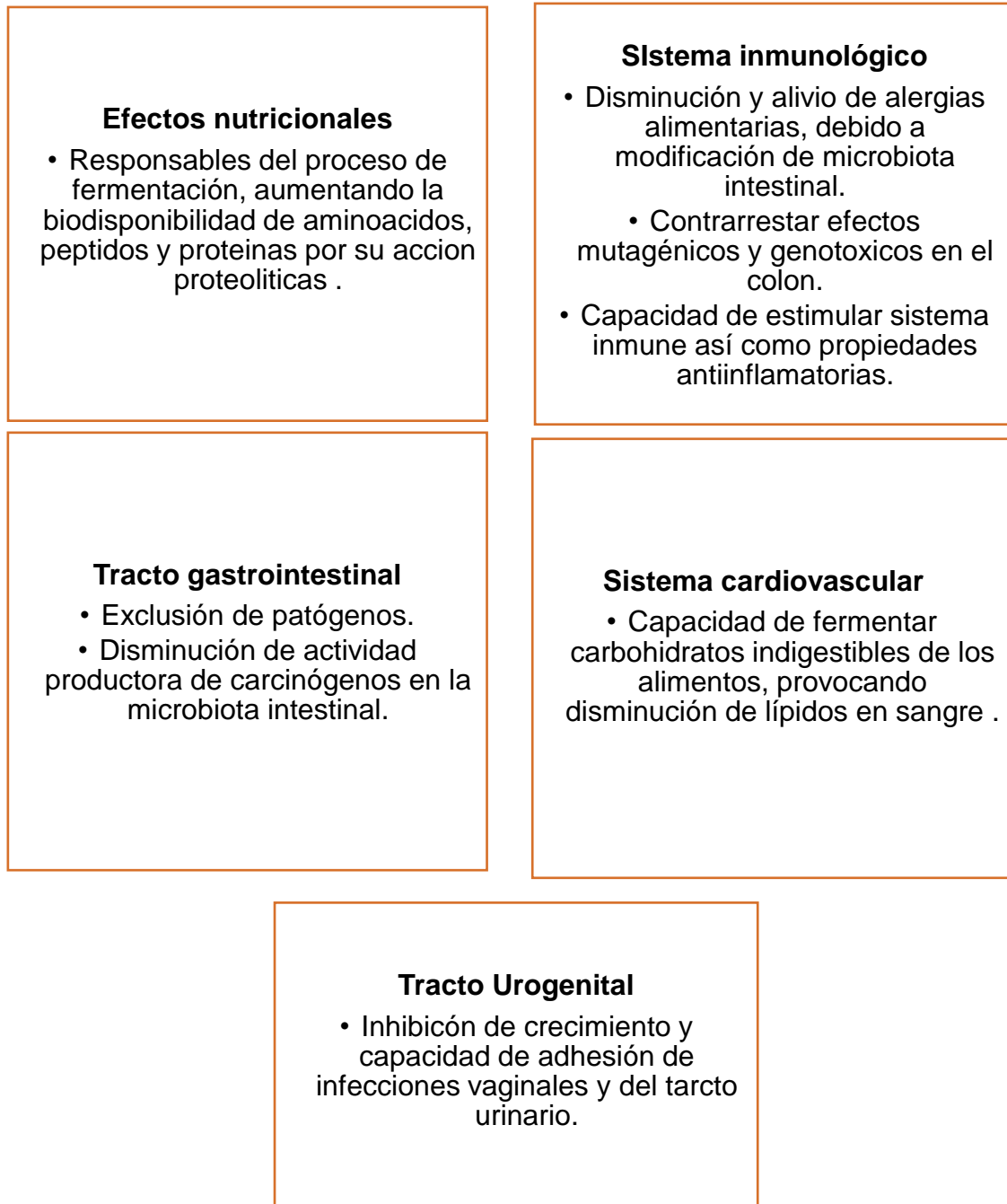


Figura 3. Efectos benéficos asociados con probióticos

Fuente: Fooks *et al.*, 1999; Mattila-Sandholm *et al.*, 1999; Salminen *et al.*, 1999; Barman *et al.*, 2008

1.2. Normatividad

Los principales organismos internacionales en la regulación de uso de probióticos, son la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), así mismo la Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos (EFSA).

1.2.1. FAO/OMS

La FAO y la OMS convocaron un grupo de trabajo de expertos para desarrollar Directrices para la Evaluación de los Probióticos en los Alimentos. Las Directrices resultantes proporcionan una metodología para ser utilizada en la evaluación de los probióticos, y define los criterios y niveles específicos de evidencia científica necesarios para realizar declaraciones de propiedades saludables para los alimentos probióticos.

Criterios para la evaluación de microorganismos probióticos

Los microorganismos probióticos utilizados en los alimentos deberían ser capaces no sólo de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino también de proliferar en el intestino. Esto significa que deberían ser resistentes a los jugos gástricos y poder crecer en presencia de bilis, en las condiciones existentes en los intestinos, o ser consumidos en un alimento que, actuando como vehículo, les permita sobrevivir al paso por el estómago y a la exposición a la bilis. Con el fin de evaluar las propiedades de los probióticos, la FAO/OMS propusieron que se utilizaran las directrices siguientes. (FAO/OMS, 2002; Castro & De Rovetto, 2006).

Identificación de género y especie

La correcta identificación a nivel género y especie es requisito para garantizar que la cepa a evaluar sea reconocida según su clasificación taxonómica como un microorganismo inocuo y de grado alimentario GRAS/ QPS (FAO/OMS, 2002).

Caracterización biológica

Es necesario demostrar el efecto beneficioso de los microorganismos a través de pruebas *in vitro*, determinando las características de producción de metabolitos como bacteriocinas, ácido láctico, peróxido de hidrogeno, habilidad para inhibir adherencia de patógenos (Collado, 2004).

Inocuidad

Los probióticos son organismos vivos, por lo cual es posible que puedan llegar a generar algunas infecciones en el huésped comportándose como patógenos, por esta razón se recomienda que las cepas con aptitud probiótica sean sometidas a pruebas que determinen si son capaces de producir toxinas, la caracterización de actividad hemolítica, resistencia o susceptibilidad frente antibióticos y estudio de la capacidad de transmitir esta información a través de plásmidos (Collado, 2004; Hummel *et al.*, 2007).

Actividad hemolítica

Hemólisis es el proceso de destrucción de los hematíes, que conlleva la liberación del contenido intraeritrocitario en el plasma alterando su composición (Rioja *et al.*; 2009).

Los microorganismos hemolíticos liberan enzimas (hemolisinas) al medio que destruyen los glóbulos rojos apareciendo halos de hemólisis. Las hemolisinas son enzimas que producen lisis de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas mediante la producción de poros en la membrana citoplasmática. Las bacterias que producen estas enzimas presentan un halo transparente alrededor de las colonias a consecuencia de la lisis de los hematíes.

La hemólisis beta se refiere a un halo de hemólisis completamente claro, alrededor de la colonia; la hemólisis alfa se refiere a la lisis parcial de los glóbulos rojos dando una

coloración verde (debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado biliverdina) (Leandro, 1960).

Estudios *in vitro* para la selección de probiótico

Dentro de estas pruebas se encuentran: 1) Resistencia a la acidez gástrica y a sales biliares, ya que son condiciones limitantes para la supervivencia a través del tracto gastrointestinal, asegurando que lleguen viables al intestino para ejercer una acción beneficiosa en el huésped, 2) adherencia a mucus intestinal, es un requisito para ejercer efectos inmunomoduladores que favorezcan el desplazamiento de patógenos (FAO/OMS, 2002).

1.2.2. Autoridad Europea para la Inocuidad de los Alimentos (EFSA)

La Autoridad Europea para la Inocuidad de los Alimentos (*EFSA*) evalúa la inocuidad de alimentos de una amplia gama de agentes biológicos como bacterias, levaduras y virus, en el contexto de autorización de comercialización como fuentes de aditivos alimentarios y forrajeros, enzimas y productos fitosanitarios. La evaluación de la presunción calificada de seguridad (*QPS*) se desarrolló para proporcionar una pre evaluación genérica, para respaldar las evaluaciones de riesgos de seguridad operacional realizadas por los paneles científicos de la EFSA (EFSA, 2014).

La presunción calificada de seguridad (*QPS*) es una asunción de inocuidad basada en evidencia razonable. Si una evaluación de un grupo de microorganismos concluye que no plantean problemas de inocuidad, se concede al grupo el "estado *QPS*". Cualquier microorganismo asignado a ese grupo no necesita someterse a la evaluación de seguridad completa. Para obtener el estado de *QPS*, un microorganismo debe cumplir los siguientes criterios:

- ✓ Su identidad taxonómica debe estar bien definida
- ✓ El cuerpo de conocimiento disponible debe ser suficiente para establecer su seguridad

- ✓ La falta de propiedades patogénicas debe establecerse y justificarse
- ✓ Su uso previsto debe describirse claramente

Los microorganismos que no están bien definidos, para los cuales se identifican algunos problemas de inocuidad o para los cuales no es posible concluir si representan un problema de inocuidad para humanos, animales o el medioambiente, no se consideran adecuados para el QPS y deben someterse a una evaluación de seguridad completa. Una vez que la EFSA concede a un microorganismo el estatus de QPS, se incluye en la "lista de QPS", que está disponible en el sitio web de la EFSA (Piskoríková, 2010).

1.3. Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Son cocos o bacilos Gram positivos con un grosor entre 0.5-0.8 μm ; no esporulados, inmóviles, carecen de actividad respiratoria por ausencia de la enzima citocromo catalasa, por tanto son anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes; carecen de la enzima oxidasa. Producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr *et al.*, 2002; Huertas, 2010).

Diferentes factores afectan el crecimiento de BAL en un medio de fermentación; la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en su crecimiento, existe una temperatura óptima a la cual la velocidad de crecimiento es más alta que va de los 30 a los 40°C dependiendo de las características del microorganismo. Dado que no son capaces de sintetizar la mayoría de los compuestos que requieren son microorganismos exigentes y necesitan nutrientes para su crecimiento, por ejemplo, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y minerales, por lo que sólo crecen en medios complejos, dado que no son capaces de sintetizar la mayoría de los compuestos que requieren (Huertas, 2010; Von Wright & Axelsson, 2012). Algunos de estos microorganismos necesitan factores de crecimiento especiales, como ácido ascórbico, sulfato de manganeso, etc. (Holzapfel & Wood, 2014).

Las BAL se encuentran en diversos hábitats dondequiera que haya sustratos de carbohidratos disponibles. Estos incluyen alimentos (productos lácteos, productos de granos, carne y productos pesqueros, cerveza, vino, frutas y jugos de frutas, verduras en escabeche, puré, ensilaje y masa madre), agua, tierra, aguas residuales y la vía oral (membranas mucosas), tracto respiratorio, gastrointestinal y genital de humanos y animales (Zhang & Cai, 2014).

1.4. Clasificación de las BAL

Históricamente los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* forman el núcleo del grupo de las BAL, aunque las revisiones taxonómicas de estos géneros y la descripción de nuevos géneros permite asumir que podrían, en su amplia definición fisiológica, comprender alrededor de 20 géneros. Sin embargo, desde un punto de vista práctico de la tecnología de los alimentos, los siguientes géneros se consideran como los principales: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Von Wright & Axelsson, 2012).

Según Axelsson (1993) la clasificación de las BAL en diferentes géneros se basa en gran medida en la morfología (cocos o bacilos), el modo de fermentación de la glucosa (homofermentativa o heterofermentativa), el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido (D, L o DL), la capacidad de crecer a altas concentraciones de sal y la tolerancia ácida o alcalina (cuadro 1).

Cuadro 1. Principales familias y géneros de BAL

FAMILIA	GÉNERO	CARACTERÍSTICAS			
		Forma	CO ₂ de la glucosa	Crec. a 10°C	Crec. a 45°C
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	Cocos (tétradas)	-	+	-
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	Bacilos	-	+	-
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	Cocos	-	+	+
	<i>Tetragenococcus</i>	Cocos (tétradas)		+	-
	<i>Vagococcus</i>	Cocos		+	-
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	Bacilos	V	V	V
	<i>Pediococcus</i>	Cocos (tétradas)	-	V	V
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	Cocos ^a	+	+	-
	<i>Oenococcus</i>		+	+	-
	<i>Weissella</i>		+	+	-
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i> ^b	Cocos	-	+	-
	<i>Streptococcus</i>		-	-	V

Cuadro 1. (Continuación)

CARACTERÍSTICAS					
GÉNERO	Crec. en 6.5% de NaCl	Crec. en 18% de NaCl	Crec. a pH de 4.4	Crec. a pH de 9.6	Tipo de ácido láctico
<i>Aerococcus</i>	+	-	-	+	L
<i>Carnobacterium</i>	ND	-	ND	-	L
<i>Enterococcus</i>	+	-	+	+	L
<i>Tetrageonococcus</i>	+	+	-	+	
<i>Vagococcus</i>	-	-		-	
<i>Lactobacillus</i>	V	-	V	-	D, L, DL
<i>Pediococcus</i>	V	-	+	-	L, DL
<i>Leuconostoc</i>	V	-	V	-	D
<i>Oenococcus</i>	V	-	V	-	D
<i>Weissella</i>	V	-	V	-	D, DL
<i>Lactococcus</i> ^b	-	-	V	-	L
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	-	L

Nota: ND, no determinado

V, Variable

^a Algunas cepas de *Weissella* tienen forma de bacilo

^b En la literatura más antigua, los *Lactococcus* se denominan grupo N *Streptococcus*

Fuente: Von Wright & Axelsson, 2012

Las BAL se han caracterizado principalmente por su capacidad para formar diversos isómeros del ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos y se puede determinar su capacidad de rotar la luz ópticamente. Si la rotación es a la derecha, se denomina dextrorrotatorio (D); si es a la izquierda, se denomina levorrotatorio (L), o si hay una mezcla de D y L se denomina racemico (DL). La proporción en la que se producen estos isómeros es casi idéntica entre las cepas de la misma especie y se considera una de las características clave para clasificar las BAL en subgrupos (Carr *et al.*, 2002; Holzapfel & Wood, 2014).

1.5. Actividad metabólica

Debido a que las BAL no poseen un sistema respiratorio funcional, tienen que obtener su energía mediante la fosforilación a nivel de sustrato. Las tres vías principales de fermentación de hexosa que se producen dentro de las BAL tienen en común que solo atacan los fosfatos de hexosa con configuración glucosa (Kandler, 1983; Von Wright & Axelsson, 2012). La vía *homofermentativa* se basa en la vía de glucólisis o Embden-Meyerhof Parnas (EMP). La glucosa solo se convierte en ácido láctico (dos moléculas de ácido láctico por molécula de glucosa consumida). Esta vía se caracteriza por la división de la fructosa 1,6-bisfosfato con la enzima aldosa en dos fracciones de fosfato de triosa que se convierten en lactato. Teóricamente, el rendimiento de esta vía es de dos moléculas de ATP a partir de una molécula de glucosa (Kandler, 1983; Carr *et al.*, 2002; Von Wright & Axelsson, 2012) (cuadro 2).

En la fermentación *heterofermentativa*, también conocida como vía Pentosa Fosfocetolasa (PFK) o vía 6-fosfogluconato, las hexosas se convierten en pentosas por la enzima fosfocetolasa; se inicia por la oxidación de la glucosa 6-fosfato a gluconato seguida de descarboxilación y división de la pentosa 5-fosfato resultante en un resto de C-2 y C-3. Esta vía produce, además de ácido láctico, cantidades significativas de CO₂ y etanol a partir de la glucosa (una molécula de ácido láctico, etanol y CO₂ por cada molécula de glucosa). Produce en el rendimiento una ganancia neta de una molécula de ATP por molécula de glucosa consumida (Kandler, 1983; Von Wright & Axelsson, 2012).

También existen las bacterias *heterofermentativas facultativas*, las cuales comparten las características de ambos grupos, ya que tienen enzimas de ambas vías metabólicas (Holzapfel & Wood, 2014).

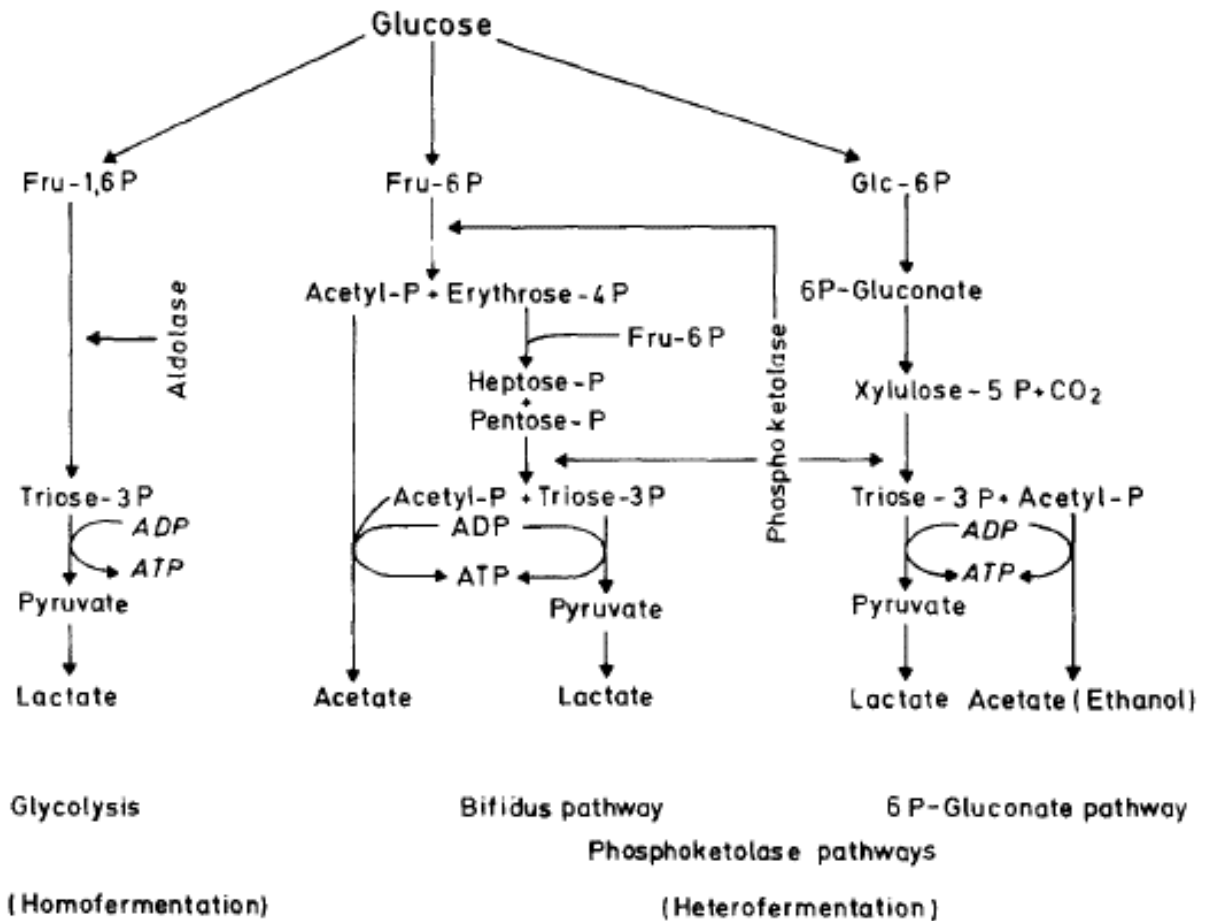


Figura 4. Presentación esquemática de las principales vías de fermentación de las hexosas por bacterias ácido lácticas

Fuente: Kandler, 1983

Cuadro 2. Modo de fermentación de azúcares por géneros y especies de BAL

HOMOFERMENTATIVA	FACULTATIVAMENTE HETEROFERMENTATIVA	HETEROFERMENTATIVA
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Lb. amylophilus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Oenococcus</i>
<i>Lb. aviarus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Weissella</i>
ssp. <i>araffinosus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lb. brevis</i>
ssp. <i>aviarus</i>	<i>Vagococcus</i>	<i>Lb. bunchneri</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>Lb. acetotolerans</i>	<i>Lb. collinoides</i>
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. agilis</i>	<i>Lb. fermentum</i>
ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	<i>Lb. fructivorans</i>
ssp. <i>delbrueckii</i>	<i>Lb. bifermentans</i>	<i>Lb. fructosus</i>
ssp. <i>lactis</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. hilgardii</i>
<i>Lb. farciminis</i>	<i>Lb. coryniformis</i>	<i>Lb. kefir</i>
<i>Lb. gallinarum</i>	ssp. <i>coryniformis</i>	<i>Lb. malefermentans</i>
<i>Lb. gasseri</i>	ssp. <i>torquens</i>	<i>Lb. oris</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. panis</i>
<i>Lb. jensenii</i>	<i>Lb. graminis</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>
<i>Lb. johnsonii</i>	<i>Lb. hámster</i>	<i>Lb. parakefir</i>
<i>Lb. kefiranofaciens</i>	<i>Lb. homohiochii</i>	<i>Lb. pontis</i>
<i>Lb. mali</i>	<i>Lb. intestinalis</i>	<i>Lb. reuteri</i>
<i>Lb. ruminis</i>	<i>Lb. murinus</i>	<i>Lb. sanfrancisco</i>

Cuadro 2. (Continuación)

HOMOFERMENTATIVA	FACULTATIVAMENTE HETEROFERMENTATIVA	HETEROFERMENTATIVA
<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. suebicus</i>
ssp. <i>salicinus</i>	ssp. <i>paracasei</i>	<i>Lb. vaccinostercus</i>
ssp. <i>salivarius</i>	ssp. <i>tolerans</i>	<i>Lb. vaginalis</i>
<i>Lb. sharpeae</i>	<i>Lb. paraplantarum</i>	
	<i>Lb. pentosus</i>	
	<i>Lb. plantarum</i>	
	<i>Lb. rhamnosus</i>	
	<i>Lb. sakei</i>	

Fuente: Stiles & Holzapfel, 1997; Von Wright & Axelsson, 2012; Holzapfel & Wood, 2014

1.6. Identificación bacteriana

Por lo general la identificación comienza con el estudio morfológico de las colonias aisladas en medios selectivos y diferenciales, un enfoque común para el aislamiento de las BAL es la utilización de medios generales como el agar APT, el agar MRS.

El caldo o agar MRS se utilizan como medios de cultivo para *Lactobacillus* según Man, Rogosa y Sharpe. Estos autores demostraron que estos medios promueven un buen crecimiento de todos los *Lactobacillus* de origen oral, fecal, lácteo y de otras fuentes (De Man, Rogosa & Sharpe, 1960). El MRS contiene peptona y dextrosa; éstos suministran nitrógeno, carbono y otros elementos necesarios para su crecimiento. Polisorbato 80, acetato, magnesio y manganeso proporcionan factores de crecimiento para cultivar una variedad de *Lactobacillus*. Los ingredientes anteriores pueden inhibir el crecimiento de algunos organismos distintos de los *Lactobacillus* (Difco™ & BBL™).

1.6.1. Caracterización bioquímica

Las observaciones realizadas y las pruebas aplicadas tienen como objetivo caracterizar al microorganismo para que pueda describirse y compararlo con descripciones de otros organismos previamente identificados y clasificados. Cowan y Steel en 1960 y 1961 desarrollaron una ayuda mecánica, en donde la identificación se realizó mediante pruebas primarias y secundarias (Cowan, 2004).

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de los microorganismos objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar (Olmos *et al.*, 2010).

Pruebas primarias

Morfología colonial

En la mayoría de los casos la primera información que se usa en el proceso de identificación es la descripción macroscópica de la colonia o morfología de la colonia.

Las colonias de una única especie, cuando crecen en medios específicos y bajo condiciones idóneas se describen por sus características de forma, elevación, borde (Figura 5), tamaño, color, superficie, densidad y consistencia. El tamaño de las colonias bacterianas es generalmente uniforme entre una misma especie y se expresa en mm, la consistencia puede ser untuosa o mantecosa, viscosa, membranosa, quebradiza, cremosa, entre otras. La superficie puede variar entre brillante, mate u otras, y la densidad entre opaca, traslucidas, transparente, entre otras. Algunos

microorganismos producen colonias pigmentadas, lo que puede ser de ayuda en el proceso de identificación (Koneman & Allen, 2008; Olmos *et al.*, 2010).

Forma	puntiforme		irregular	
	circular		rizoide	
	filamentosa		ahusada	
Elevación	plana		pulviniforme	
	elevada		en forma de botón	
	convexa		umbilicada	
Borde	liso o continuo		corroído	
	ondulado o festoneado		filamentoso	
	lobulado		encrespado	

Figura 5. Características morfológicas de colonias

Fuente: Koneman & Allen, 2008

Tinción de Gram

Después de la observación cuidadosa de la colonia se emplea la tinción de Gram para separar a los microorganismos en dos grandes grupos basados en la reacción de Gram. Este método fue desarrollado por el científico danés Hans Christian Gram a fines del siglo XIX y, hoy en día, sigue siendo una de las tinciones más utilizadas universalmente debido a lo económico, sencillo y eficaz que resulta. En los esquemas formales, la mayoría de los géneros consisten en bacterias que son Gram positivas o Gram negativas (Cowan, 2004; Forbes, 2009).

Las diferencias en la composición de las paredes de las células Gram positivas, que contienen capa gruesa de peptidoglicano con numerosos enlaces cruzados de ácido teicoico (Figura 6) y, las paredes de las células Gram negativas, en las que la capa de peptidoglucano es más delgada (Figura 7), explican las diferencias de tinción de Gram entre estos dos grupos principales de bacterias. Las bacterias Gram positivas son capaces de retener el primer colorante (cristal violeta), tiñéndose de violeta, en tanto que las Gram negativas no, lo que les permite reaccionar con el segundo colorante de contraste (safranina) adquiriendo un color rosado (Forbes, 2009).

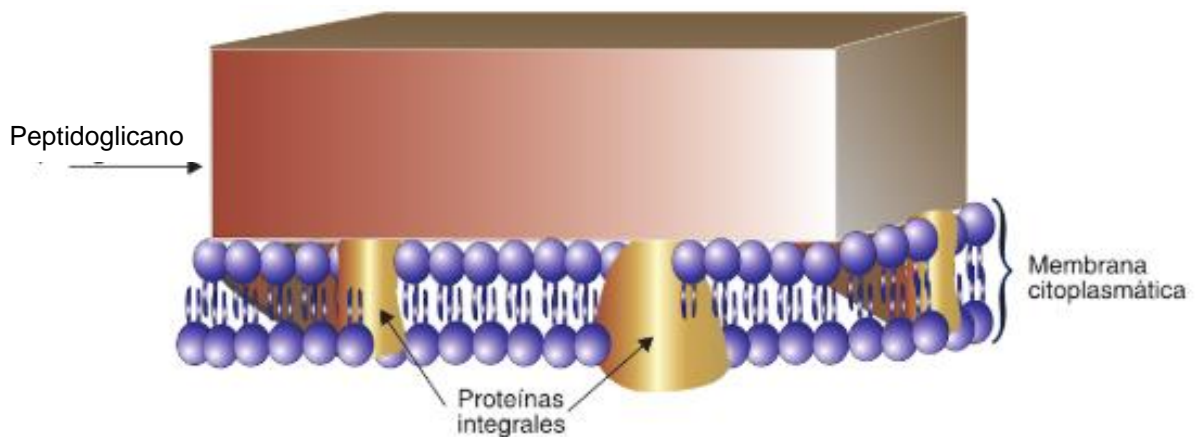


Figura 6. Modelo tridimensional de la “envoltura o cubierta” de una bacteria Gram positiva que consta de una gruesa capa de peptidoglicano y una membrana citoplasmática subyacente. Obsérvese que en este tipo de bacterias no existe el periplasma

Fuente: Montoya, 2008

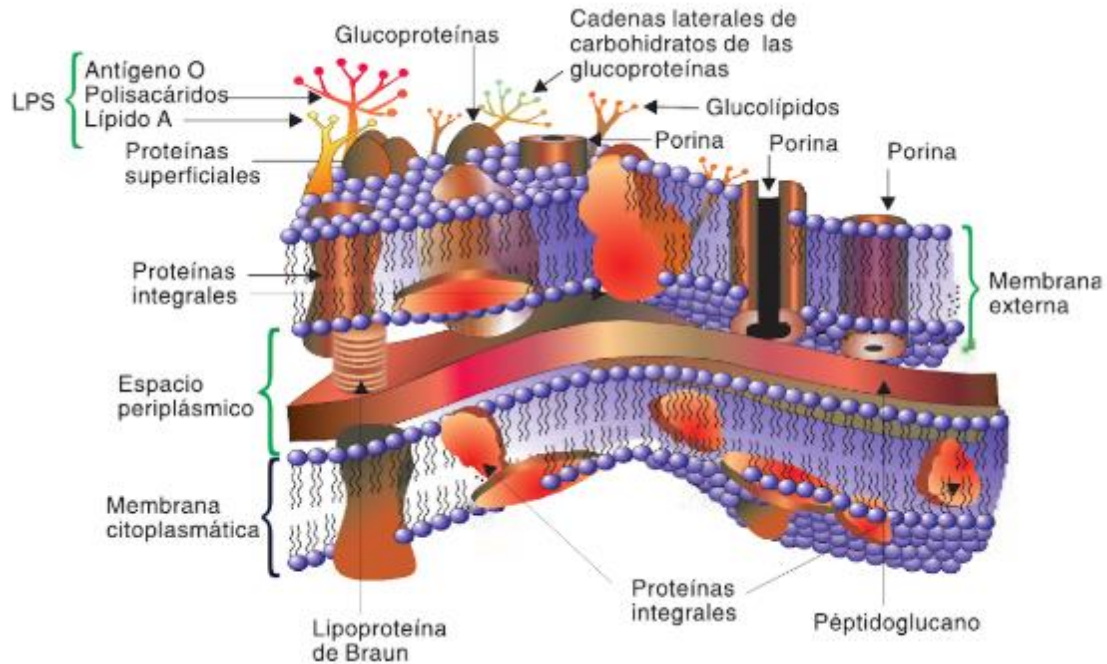


Figura 7. Modelo tridimensional de la “cubierta o envoltura” celular de una bacteria Gram negativa. Consta de una densa membrana externa, un periplasma o espacio periplásmico, una capa intermedia compuesta por peptidoglucano y una membrana citoplasmática subyacente

Fuente: Montoya, 2008

Catalasa

La prueba de la catalasa es clave para el esquema de identificación de muchos microorganismos Gram positivos. Gagnon, Hunting & Esselen (1959) describieron un método simple en el cual parte del crecimiento del microorganismo bajo prueba se extendió en discos de papel de filtro y se dejó caer en 3% de H_2O_2 ; cuando la catalasa estaba presente, la evolución del gas rápidamente llevó los discos a la superficie (Cowan, 2004).

La enzima catalasa cataliza la liberación de agua y oxígeno a partir del H_2O_2 ($H_2O_2 + \text{catalasa} = H_2O + O_2$). El H_2O_2 es un producto final oxidativo (producción rápida de burbujas) de la degradación aerobia de los azúcares; su presencia se determina por análisis directo de un cultivo bacteriano (MacFaddin, 2003; Forbes, 2009).

Oxidasa

La prueba de oxidasa se usó por primera vez para demostrar colonias de especies de *Neisseria* en cultivos mixtos, aunque luego de la prueba ideada por Kovacs, ahora se usa también para distinguir *Pseudomonas*, de las bacterias entéricas. Se deben de tomar precauciones para evitar la oxidación del reactivo, de este modo la prueba es sensible y útil en la clasificación e identificación bacteriana. Leclerc & Beerens en 1962 utilizan una técnica similar a la de Kovacs, aunque sustituyen el dimetilo más estable por el compuesto de tetrametilo (Cowan, 2004).

La prueba de oxidasa detecta la presencia de la citocromooxidasa (citocromo c) presente en el transporte de electrones y en la vía metabólica del nitrato de ciertas bacterias, mediante el empleo de la oxidación del sustrato dihidroclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina a indofenol, un producto final de color púrpura. El desarrollo del color mencionado indica una prueba positiva, de lo contrario indica una prueba negativa y ausencia de la enzima. Por lo general, el sistema citocromooxidasa solo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y, excepcionalmente, en algunas microaerófilas, aunque las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa. (Forbes, 2009; Olmos *et al.*, 2010).

Oxidación – Fermentación (O/F)

La determinación de la reacción de oxidación – fermentación (O/F) ayuda en gran medida a la identificación de los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos. Los microorganismos utilizan los azúcares por uno de dos procesos metabólicos, fermentativo u oxidativo. Algunos microorganismos pueden metabolizar un azúcar (producción de ácido) solo en condiciones aerobias, mientras que otras producen ácido tanto de modo aerobio como anaerobio (MacFaddin, 2003).

Es frecuente que los microbiólogos se refieran a todos los carbohidratos como azúcares. El azúcar habitual incluido en el medio es la glucosa, aunque debido a la

aparición de microorganismos que no utilizan la glucosa, sino descomponen otros azúcares, hacen necesario utilizar otras pruebas mediante la adición de otros monosacáridos al medio basal (Cowan, 2004; Koneman & Allen, 2008).

La prueba O/F se hace cultivando el microorganismo en dos tubos con medio de Hugh & Leifson (OFBM), en un tubo el medio está cubierto con una capa de aceite mineral y el otro expuesto al oxígeno atmosférico. Este proceso se detecta observando cambios de color en los indicadores de pH a medida que se forman los productos ácidos (figura 8) (Cowan, 2004; Koneman & Allen, 2008).

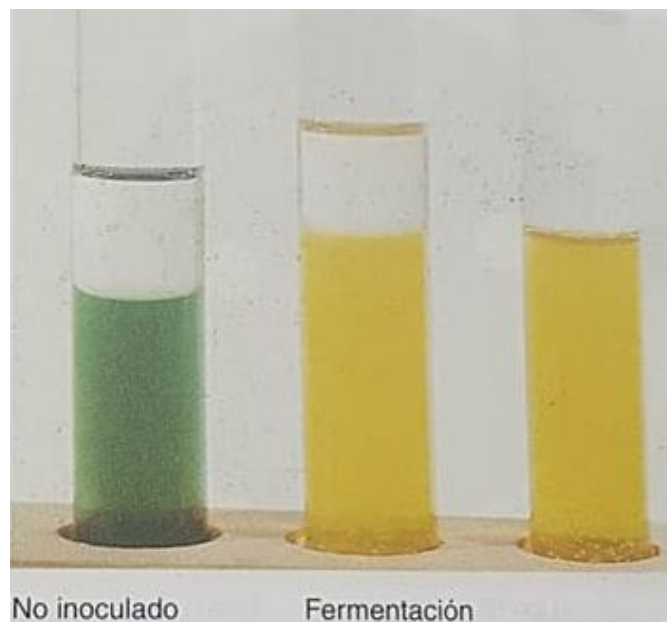


Figura 8. Representación de resultados de la prueba de oxidación – fermentación

Fuente: MacFaddin, 2003

El medio basal OF puede usarse para todas las "reacciones de azúcar" necesarias para caracterizar bacterias. Algunos microorganismos no parecen ser capaces de atacar un azúcar fácilmente y, a menudo muestran la producción de ácido, sólo después de varios días de incubación (Cowan 2004).

En la fermentación, un azúcar es hidrolizado en dos moléculas de triosa que son convertidas a una cantidad de compuestos con 1, 2, 3 o 4 carbonos; el principal

intermediario es el ácido pirúvico. Los productos finales varían con cada especie bacteriana (MacFaddin, 2003).

La principal vía metabólica fermentativa de la glucosa es la vía de EMP, aunque la degradación puede ocurrir por la vía de la derivación de las pentosas o por la de Entner-Duodoroff (ED) o una combinación. Sin embargo, las tres vías metabólicas requieren la fosforilación de la glucosa como el paso inicial antes de que pueda ocurrir la degradación. La vía metabólica de EMP también se denomina fermentativa (MacFaddin, 2003).

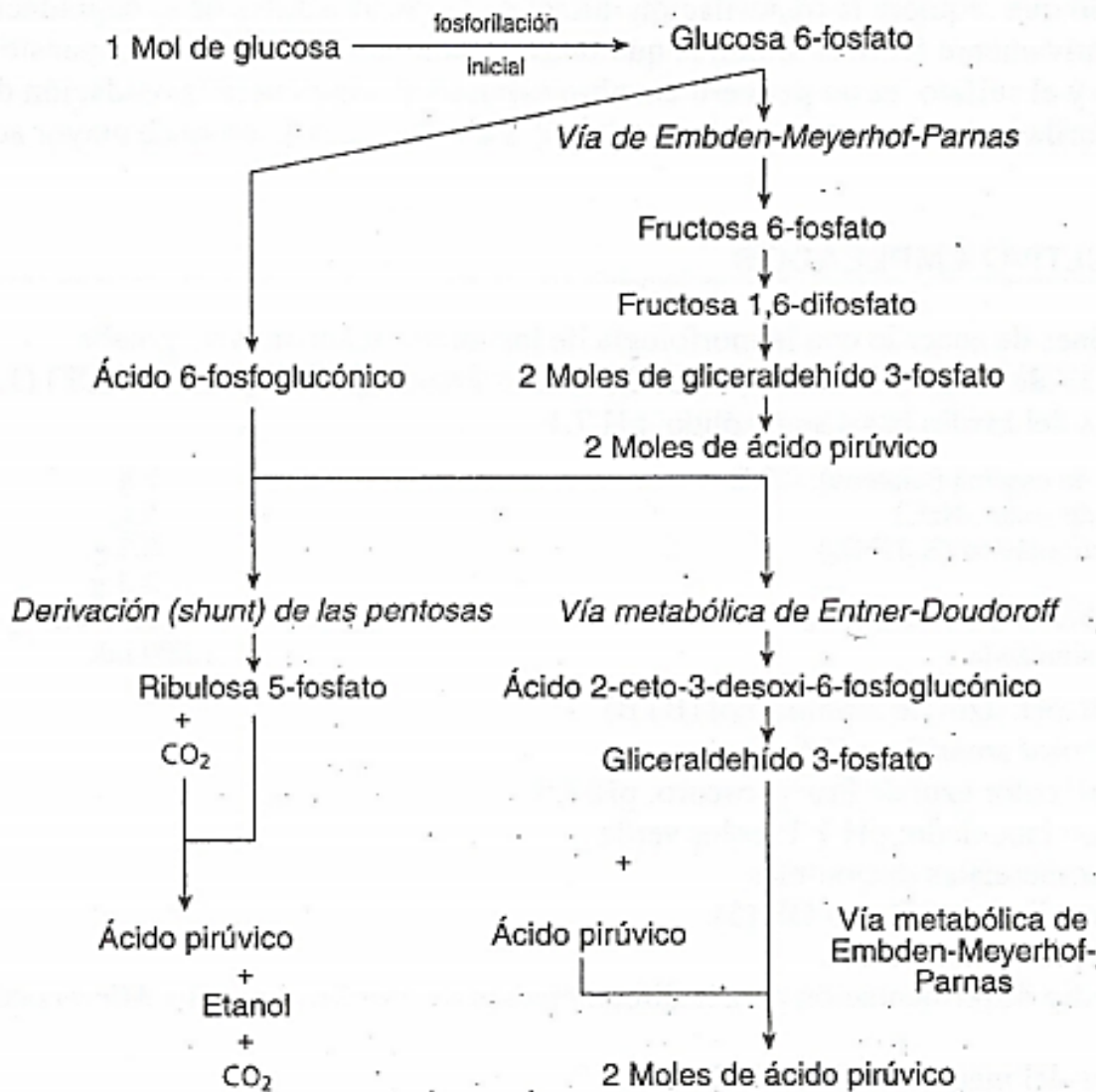


Figura 9. Vías metabólicas de la fermentación fosforilada

Fuente: MacFaddin, 2003

La oxidación de la glucosa por una de las vías metabólicas de derivación es un proceso aerobio y los microorganismos que oxidan los azúcares por lo común son aerobios obligados. En el proceso de oxidación, la glucosa u otros carbohidratos no son degradados y fraccionados en dos triosas. En contraste con lo que ocurre en la fermentación, en la oxidación no se requiere la fosforilación inicial de un carbohidrato de la degradación (MacFaddin, 2003).



Figura 10. Vía metabólica oxidativa

Fuente: MacFaddin, 2003

La principal diferencia entre el metabolismo fermentativo y el metabolismo oxidativo de un carbohidrato es el requerimiento de oxígeno atmosférico y la fosforilación inicial. La fermentación produce mayor acidez que la oxidación.

Movilidad

La prueba de oxidación – fermentación puede determinar la movilidad de los microorganismos debido al medio semisólido. Se determina que el microorganismos es móvil cuando el crecimiento se propaga desde la línea de punción e inmóvil con un crecimiento aislado a la línea de punción (MacFaddin, 2003).

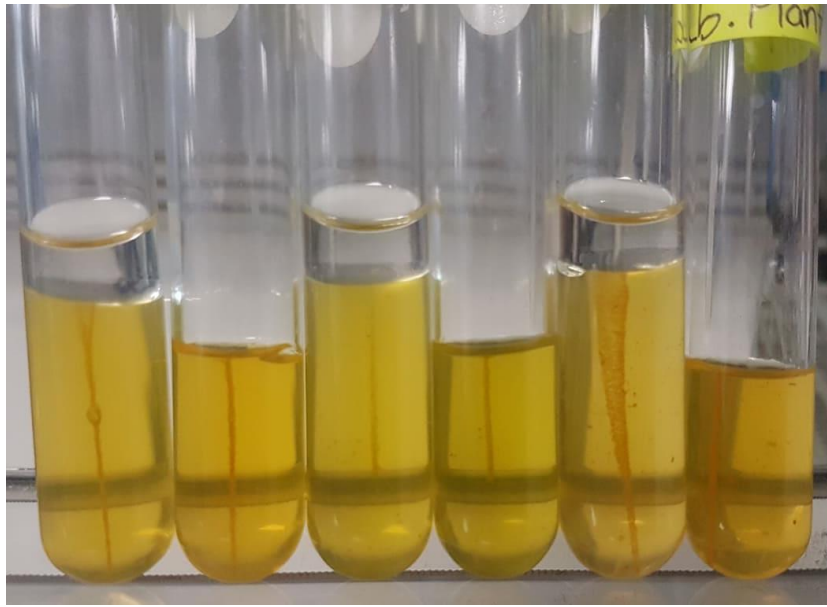


Figura 11. Microorganismos inmóviles en medio semisólido Hugh & Leifson

Pruebas secundarias

Fermentación de carbohidratos

Las llamadas "pruebas de fermentación" iniciales fueron utilizadas por los primeros bacteriólogos para distinguir un organismo de otro. Su principio es determinar la capacidad de un microorganismo para degradar un carbohidrato específico incorporado en un medio basal y producir ácido. En los últimos años los taxonomistas han pensado adecuadamente en la importancia de la producción de ácido por parte de una bacteria que crece en un medio que contiene un carbohidrato (MacFaddin, 2003; Cowan, 2004).

La fermentación es un proceso metabólico anaerobio de oxidación-reducción, en el cual un carbohidrato orgánico actúa como el aceptor final de hidrógeno en lugar de oxígeno, dando por resultado productos finales reducidos y oxidados. Los productos finales provenientes de las fermentaciones de carbohidratos dependen de varios factores: a) el microorganismo que lleva a cabo el proceso de fermentación, b) el sustrato a ser fermentado y c) a veces, factores ambientales como la temperatura y la

acidez (MacFaddin, 2003).

El proceso de fermentación más común produce como producto final ácido láctico; sin embargo, ocurren otras vías de fermentación, que difieren con respecto al carbohidrato metabolizado o al producto final producido. Las pruebas de fermentación de carbohidratos pueden utilizarse para determinar qué productos finales se han formado aunque no las vías metabólicas utilizadas (MacFaddin, 2003).

Métodos rápidos comerciales para la identificación de bacterias

El trabajo pionero de Buissiere & Nardon en 1968 sobre los métodos de múltiples pruebas de sustrato único a partir del cual evolucionó el sistema API ha conducido también al desarrollo de varios kits comerciales con tiras de plástico especiales para procedimientos de un solo paso para identificación bacteriana (Cowan, 2004).

El uso de estos kits requiere inocularlas con suspensiones de los microorganismos de prueba en un medio basal; dado que la densidad requerida de microorganismos puede variar de acuerdo con el kit, las suspensiones deben prepararse como lo describe cada fabricante. Algunas de las pruebas necesitan una capa de aceite mineral estéril o parafina para asegurar una reacción microaerofílica adecuada y, después de la incubación durante 18-48 horas.

Sistema API CH

API® tiene una amplia gama de kits disponibles para muchos grupos de bacterias de uso médico. De hecho, los kits de prueba API® 50 CH se consideran actualmente como uno de los medios más convenientes para la identificación de especies de *Bacillus* (Berkeley *et al.*, 1984).

El sistema API® 50 CH es un sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos (Cuadro 3) destinados al estudio del metabolismo de los carbohidratos en

los microorganismos. Se utiliza en combinación con medio API® 50 CHL, que hidrata los carbohidratos, para la identificación de *Lactobacillus*. Durante el periodo de incubación, la fermentación se traduce en un cambio de color en tubo, debido a una producción de ácido en anaerobiosis revelada por el indicador de pH del medio elegido. El primer tubo, sin principio activo, sirve como testigo negativo (BioMérieux, 2002).

Cuadro 3. Composición de la galería API® 50 CH

TUBO	ENSAYO	COMPONENTE ACTIVO	TUBO	ENSAYO	COMPONENTE ACTIVO
0		TESTIGO	14	SBE	L-SorBosA
1	GLY	GLIcerol	15	RHA	L-RHAMnosa
2	ERY	ERItrol	16	DUL	DULcitol
3	DARA	D-ARABinosa	17	INO	INOsitol
4	LARA	L-ARABinosa	18	MAN	D-MANitol
5	RIB	D-RIBosa	19	SOR	D-SORbitol
6	DXYL	D-XILosa	20	MDM	Metil- α D- Manopiranosida
7	LXYL	L-XILosa	21	MDG	Metil- α D- Glucopiranosida
8	ADO	D-ADOnitol	22	NAG	N- AcetilGlucosamina
9	MDX	Metil- β D- Xilopiranosida	23	AMY	AMIdalina
10	GAL	D-GALactosa	24	ARB	ARButina
11	GLU	D-GLUcosa	25	ESC	ESCulina citrato férico
12	FRU	D-FRUctosa	26	SAL	SALicina
13	MNE	D-MamNosA	27	CEL	D-CELOBiosa

Cuadro 3. (Continuación)

TUBO	ENSAYO	COMPONENTE ACTIVO	TUBO	ENSAYO	COMPONENTE ACTIVO
28	MAL	D-MALtosa	39	GEN	GENtiobiosa
29	LAC	D-LACtosa (origen bovino)	40	TUR	D-TURanosa
30	MEL	D-MELibiosa	41	LYX	D-LIXosa
31	SAC	D-SACarosa	42	TAG	D-TAGatosa
32	TRE	D-TREhalosa	43	DFUC	D-FUCosa
33	INU	INUlina	44	LFUC	L-FUCosa
34	MLZ	D-MeLeZitosa	45	DARL	D-ARabitol
35	RAF	D-RAFinosa	46	LARL	L-ARabitol
36	AMD	AlmiDón	47	GNT	GlucoNato potásico
37	GLYG	GLIcóGeno	48	2KG	2-CetoGluconato potásico
38	XLT	XiLiTol	49	5KG	5-CetoGluconato potásico

Fuente: BioMérieux, 2002

1.6.2. Caracterización molecular

La identificación de las BAL puede ser llevada a cabo mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas, aunque en algunos casos se llegan a presentar limitaciones, no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos. También se pueden

presentar limitaciones en el software que se ha desarrollado (API web™). Por ello, en la caracterización de género y especie de microorganismos se han introducido metodologías más sensibles como las técnicas moleculares (genotípicas) como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotipos (Olmos *et al.*, 2010).

Los primeros métodos de identificación molecular desarrollados fueron la hibridación ADN-ADN, el análisis de secuencia del 16S ADNr, la hibridación con una sonda específica y el análisis RFLP o ribotipificación. A diferencia de las características fisiológicas y bioquímicas, la identificación molecular se basa en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos más que en los productos de su expresión (Ward & Roy, 2005).

La segunda generación de métodos moleculares para la detección e identificación de géneros y especies son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR múltiple y electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE). La aplicación de electroforesis en geles con gradientes desnaturizantes, como la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante y electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), que permiten separar fragmentos de la misma longitud aunque con diferentes secuencias, que los obtenidos mediante la amplificación de regiones de los genes ribosomales del DNA de una comunidad microbiana (Ruiz & Rodarte, 2003; Ward & Roy, 2005).

Técnica PCR

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es de operación rápida, precisa, sensible y fácil. Permite detectar la presencia de genes específicos y se emplea como etapa previa a la técnica de secuenciación genómica.

La PCR fue desarrollada en 1986 por el Dr. Kary Mullis, lo que le hizo valedor del premio nobel en 1993. Esta técnica es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica

millones de veces una secuencia específica de ADN genómico (ADNg) o ADN complementario (ADNc) durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. En cada uno de los ciclos las moléculas se duplican hasta que los reactivos se agotan. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa, actualmente la enzima más utilizada en PCR, que tiene la capacidad de polimerizar una nueva cadena de ADN tomando como modelo otra ya existente.

En la PCR múltiple se realiza la amplificación de más de un fragmento de ADN en una sola reacción de PCR con dos o más juegos de primers. Tiene la ventaja de que ahorra tiempo y reactivos, aunque presenta el inconveniente de que el diseño de los primers debe ser adecuado para que no se complementen entre ellos (Salazar *et al.*, 2013).

JUSTIFICACIÓN

Las bacterias ácido lácticas, además de contribuir en la bioconservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales como el sabor, olor y textura, aumentan su calidad nutritiva y en muchos casos incrementan los rendimientos de producción. También son los microorganismos más utilizados como probióticos, que son cultivos puros o mezcla de cultivos de microorganismos vivos, que al ser consumidos por el hombre y los animales en cantidades adecuadas aportan efectos benéficos al huésped mejorando las propiedades de la microbiota nativa.

Las BAL se encuentran en diversos hábitats donde quiera que haya sustratos de carbohidratos disponibles. Estos incluyen alimentos (productos lácteos, productos de granos, carne y productos pesqueros, cerveza, vino, frutas y jugo de frutas, verduras en escabeche, puré, ensilaje y masa madre), agua, tierra, aguas residuales y la vía oral (membranas mucosas), tracto respiratorio, gastrointestinal y genital de humanos y animales (Zhang et al., 2014).

Las BAL de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* generalmente se consideran como bacterias probióticas (FAO/OMS, 2002). Los *Lactobacillus* forman una parte muy pequeña de la microbiota total de las heces humanas, aunque en animales, cerdos, gallinas, ratones y ratas, los lactobacilos son dominantes en distintas zonas del intestino (Fuentes, 2005).

Para poder considerar un microorganismo apto para su uso como probióticos y en la bioconservación de los alimentos, debe cumplir una serie de requisitos indispensables según los criterios establecidos por FAO, uno de ellos es que debe estar perfectamente caracterizado a nivel de género, especie y cepa, y depositado en una colección de cultivos internacional y reconocida; los más estudiados son las bacterias ácido lácticas.

En este proyecto se realizó la identificación de las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas del tracto intestinal de ratón infante mediante pruebas primarias tanto

microscópicas como macroscópicas, así como de perfil de fermentación de carbohidratos y prueba de hemólisis, para un posterior estudio de sus capacidades probiótica y en la bioconservación de alimentos.

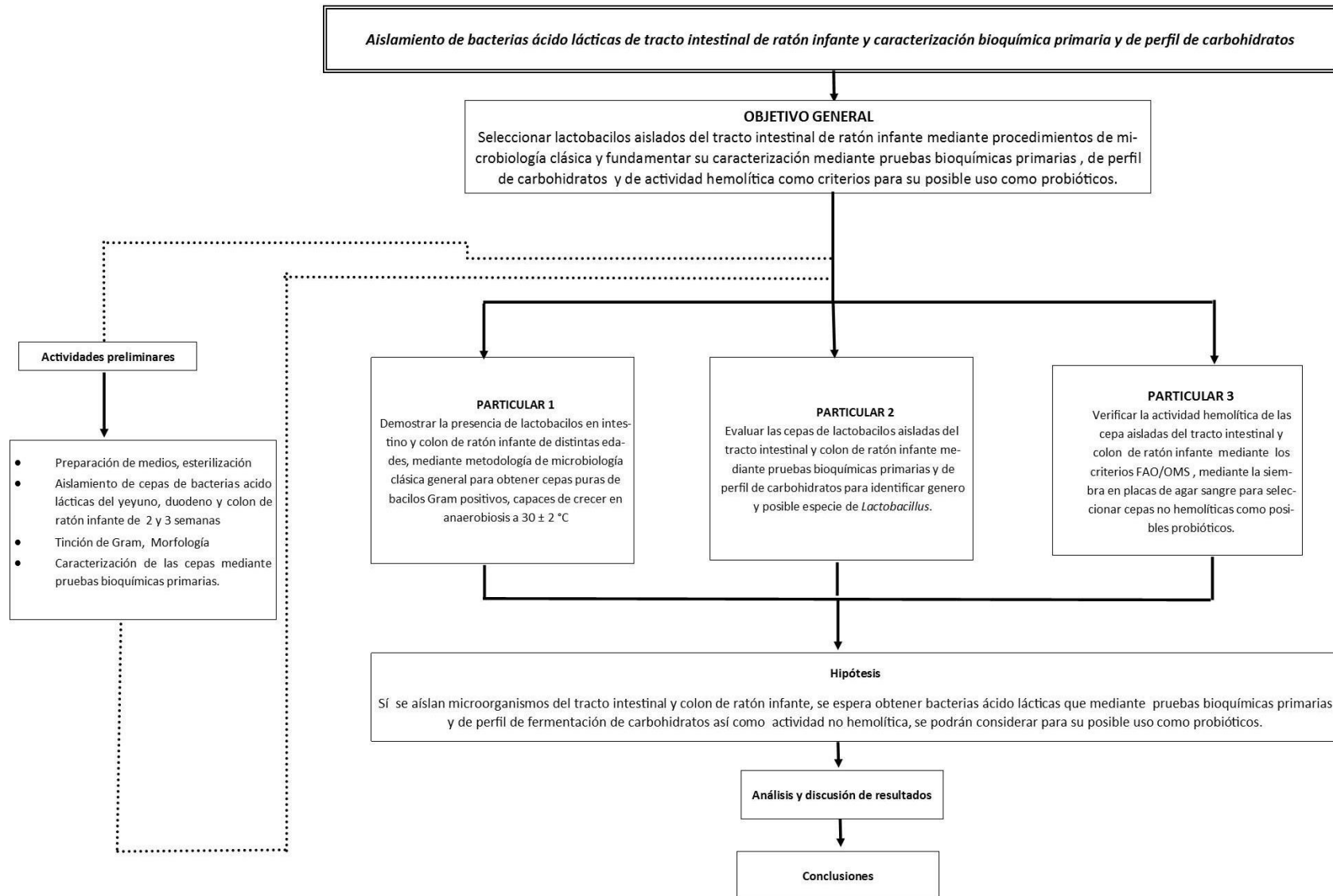


Figura 12. Desarrollo de la metodología experimental

OBJETIVO GENERAL

Seleccionar bacterias ácido lácticas aisladas del tracto intestinal de ratón infante mediante procedimientos de microbiología clásica y fundamentar su caracterización mediante pruebas bioquímicas primarias, de perfil de carbohidratos y de actividad hemolítica como criterios para su posible uso como probióticos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Demostrar la presencia de lactobacilos en intestino y colon de ratón infante de distintas edades, mediante metodología de microbiología clásica general para obtener cepas puras de bacilos Gram positivos, capaces de crecer en anaerobiosis a 30 ± 2 °C.
2. Evaluar las cepas de lactobacilos aisladas del tracto intestinal y colon de ratón infante mediante pruebas bioquímicas primarias y de perfil de carbohidratos para identificar género y posible especie de *Lactobacillus*.
3. Verificar la actividad hemolítica de las cepas aisladas del tracto intestinal y colon de ratón infante mediante el criterio FAO/OMS, mediante la siembra en placas de agar sangre para seleccionar cepas no hemolíticas como posibles probióticos

HIPÓTESIS

Sí se aíslan microorganismos del tracto intestinal y colon de ratón infante, se espera obtener bacterias ácido lácticas que mediante pruebas bioquímicas primarias y de perfil de fermentación de carbohidratos así como actividad no hemolítica, se podrán considerar para su posible uso como probióticos.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. Manejo de ratones según su edad

Se seleccionaron ratones de la cepa CD1, de dos, tres y cuatro semanas de edad (uno de cada edad) del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. A los ratones de dos y tres semanas de edad se les realizó eutanasia por el método físico de decapitación debido a su difícil manejo por su tamaño; y al ratón de cuatro semanas, se le realizó la eutanasia por método de agentes inhalables, colocándolo en una cámara con CO₂ (Figura 8). Dichos métodos lo establece la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, donde se indican las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y posteriormente se llevaron al laboratorio 7 de Bioconservación ubicado en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM).



Figura 13. Cámara de CO₂

2.2. Procedimiento para la obtención del lavado de tracto intestinal y colon de ratones de 2 y 3 semanas de edad

Los cadáveres de los ratones se llevaron a la campana de flujo laminar Nuair NU-126-400 con la finalidad de preservar un ambiente estéril, en donde se limpiaron los abdómenes con alcohol al 70% y se extrajo el tracto intestinal de cada uno de los ratones con un equipo de disección y se separó el intestino delgado (duodeno y

yeyuno) y colon (Figura 9) para obtener el contenido de cada uno de estos. La obtención del contenido intestinal de cada ratón se manejó a diferentes condiciones según su edad.

Al ratón de dos semanas de edad se le realizó un lavado por cada porción de intestino seccionado haciendo pasar agua peptonada para retirar todo el contenido intestinal que se recuperó en tubos Axygen Falcon® de 15mL; los tubos se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 h. Al ratón de tres semanas de edad se le realizó un lavado en las mismas condiciones del ratón anterior con la diferencia de que se enriqueció recuperando 1 mL de estos lavados de cada sección en tubos Axygen Falcon® de 15mL con 10 mL de caldo MRS (BD Difco™) estéril.

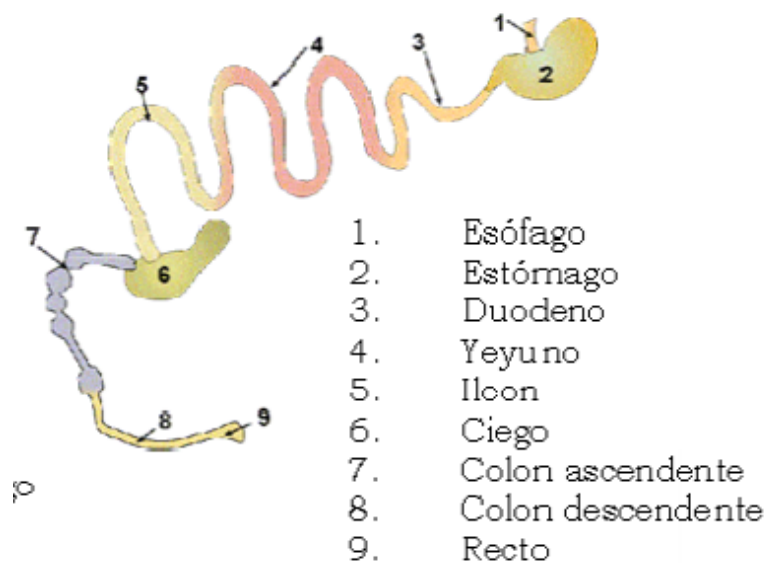


Figura 14. Tracto intestinal de ratón

Fuente: Barman *et al.*, 2008

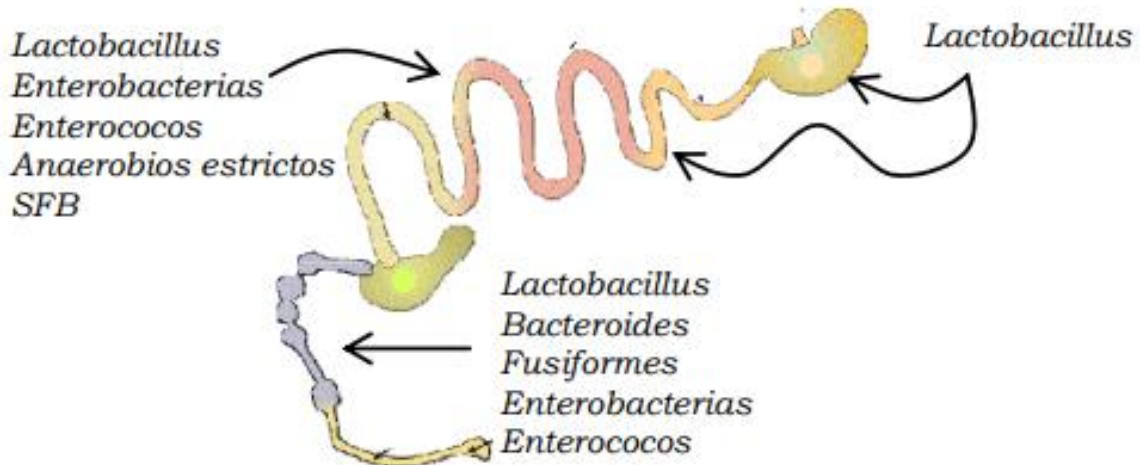


Figura 15. Distribución de la microbiota intestinal

Fuente: Barman *et al.*, 2008

2.3. Estandarización del procedimiento para la obtención de microbiota de tracto intestinal y colon de ratón de 4 semanas de edad

Al ratón de cuatro semanas de edad se le realizó un lavado por cada porción de intestino seccionado haciendo pasar agua peptonada para retirar todo el contenido intestinal y se recuperó en tubos Axygen Falcon® de 15mL; estos se enriquecieron recuperando 1 mL de estos lavados de cada sección en tubos Axygen Falcon® de 15mL con 10 mL de caldo MRS (BD Difco™) estéril y, se incubaron a 30°C ± 2°C durante 48 h. Posteriormente se realizó un sembrado por estría en Agar MRS (BD Difco™) y se incubaron en cámara de anaerobiosis (sobre BD Gas Pack™) en incubadora Quincy Lab, Inc. 12-140 durante 48 h como criterio de restricción al desarrollo de microorganismos aerobios y favorecer el de los microorganismos anaerobios Gram positivos, relacionados con la microbiota de interés.



Figura 16. Ratón de la cepa CD1 de cuatro semanas de edad

2.4. Aislamiento y selección de bacterias lácticas anaerobias Gram positivas de tracto intestinal y colon del modelo murino

Posteriormente se seleccionaron las cepas en agar MRS (BD Difco™) cocos o bacilos Gram positivos y uniformes entre ellos, que se utilizaron para su estudio. Se aislaron cultivando una colonia del agar MRS (BD Difco™) de cada cepa de estudio en tubos para cultivo con 10 mL de caldo MRS (BD Difco™) estéril, se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (incubadora Quincy Lab, Inc. 12-140) durante 48 h (Figura 12).

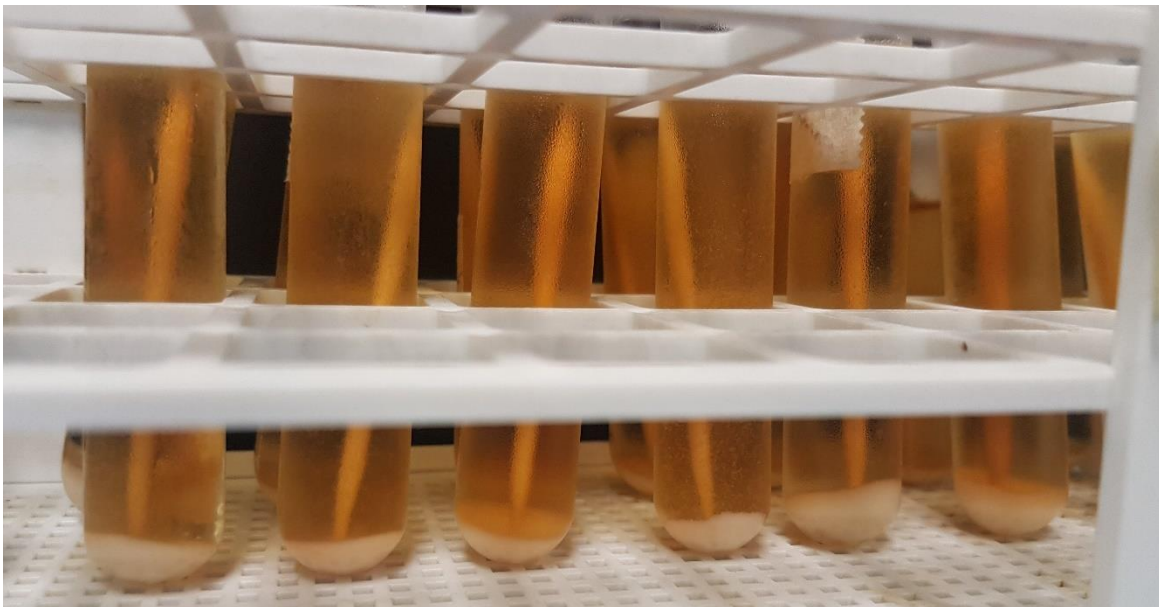


Figura 17. Crecimiento bacteriano en caldo MRS (BD Difco™)

Una vez transcurrida las 48 horas de incubación, se realizó un segundo pase, tomando 200 μL de crecimiento bacteriano en caldo MRS (BD Difco™) a un nuevo tubo para

cultivo con 10 mL de caldo MRS (BD Difco™) estéril, se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (incubadora Quincy Lab, Inc. 12-140) durante 48 h (Figura 13).

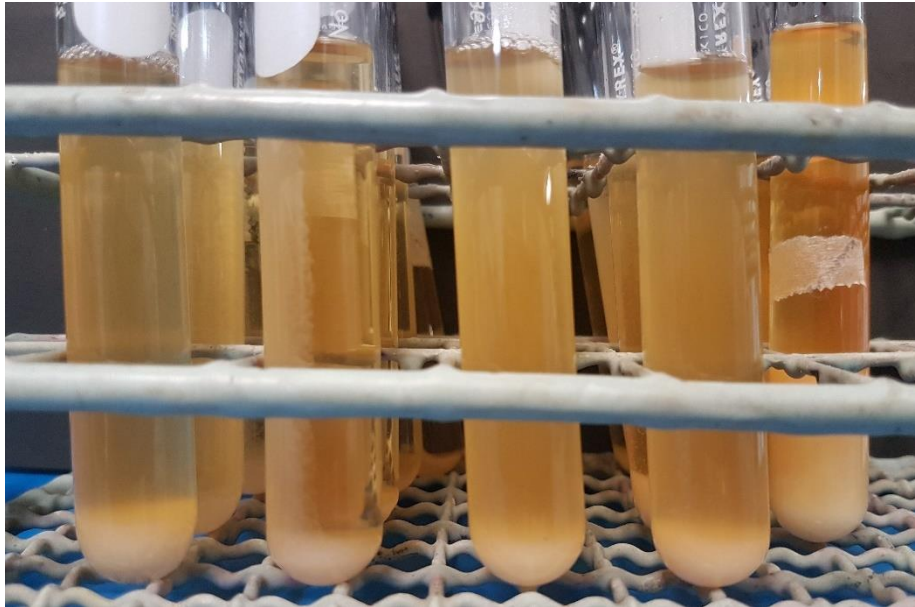


Figura 18. Segundo crecimiento bacteriano en caldo MRS (BD Difco™)

Finalmente se realizó un sembrado por estría en Agar MRS (BD Difco™) para cada cultivo y se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (incubadora Quincy Lab, Inc. 12-140) durante 48 h, para su posterior caracterización bioquímica mediante pruebas primarias y de perfil de carbohidratos y, la realización de la prueba hemólisis como uno de los principales criterios para su posible uso como probiótico.

Reactivación de microorganismos utilizados como controles

En las pruebas siguientes se utilizaron *Lc. lactis* ATCC 0205V, *Lb. plantarum* ATCC 8014 y *Lb. rhamnosus* ATCC 53103 como controles negativos. Se reactivaron cultivando un pellet en tubos para cultivo con 10 mL de caldo MRS (BD Difco™) estéril y se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (incubadora Quincy Lab, Inc. 12-140) durante 48 h.

Posteriormente, se realizó un segundo pase, tomando 200 μL de medio bacteriano en

caldo MRS (BD Difco™) a un nuevo tubo para cultivo con 10 mL de caldo MRS (BD Difco™) estéril, se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (incubadora Quincy Lab, Inc. 12-140) durante 48 h.

Finalmente se realizó un sembrado por estría en Agar MRS (BD Difco™) y se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (incubadora Quincy Lab, Inc. 12-140) durante 48 h.

Como controles positivos se utilizaron *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y *Pseudomonas aeruginosa* spp. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P se reactivó en tubos para cultivo con 10 mL de caldo BHI (BD Difco™) estéril y se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 12 h. Finalmente se realizó un sembrado por estría en Agar BHI (BD Difco™) y se incubó a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (incubadora Quincy Lab, Inc. 12-140) durante 12 h. *Pseudomonas aeruginosa* spp. se reactivó en cajas Petri con medio Pseudomonas P (BD Difco™) y se incubó a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (incubadora Quincy Lab, Inc. 12-140) durante 12 h.

2.5. Pruebas microbiológicas primarias

2.5.1. Morfología colonial

Los cultivos de agar MRS con 48 h de incubación se inclinaron en varias direcciones, bajo iluminación directa, de manera que la luz se refleje desde varios ángulos y se evaluó la superficie del agar para observar las características generales de las colonias (Koneman & Allen, 2008).

2.5.2. Tinción de Gram

Para realizar la tinción de Gram se depositó sobre un portaobjeto limpio una gota de agua destilada, posteriormente se tomó una azada de la colonia pura de 24 h y se fijó a la flama (Figura 15).



Figura 19. Kit de tinción de Gram (BBL™)

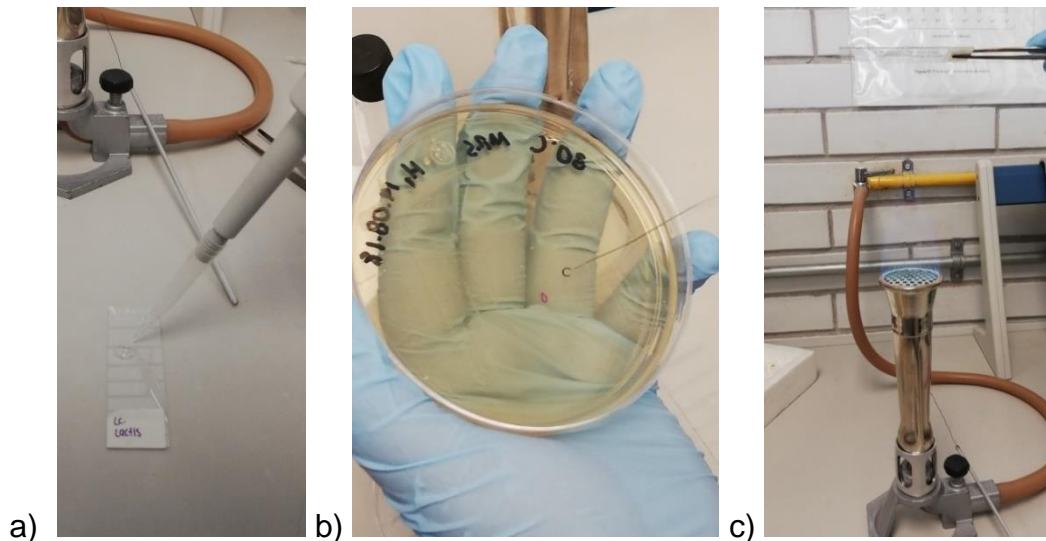


Figura 20. Preparación de muestra para la prueba de tinción de Gram a) Gota de agua destilada en portaobjetos b) Selección de colonia a teñir c) Fijación de la colonia

Se tiñó con cristal violeta durante 60 s, se lavó ligeramente con agua destilada, posteriormente se cubrió con lugol por 60 s, se lavó ligeramente con agua destilada y se decoloró con una solución de alcohol-acetona durante 15 s, se lavó ligeramente con agua destilada, por último se tiñó con safranina por 60 s y se lavó ligeramente con agua destilada (Figura 16). Se dejó secar el frotis a temperatura ambiente y se observó en el microscopio Olympus CX31 a 100x (Forbes, 2009).

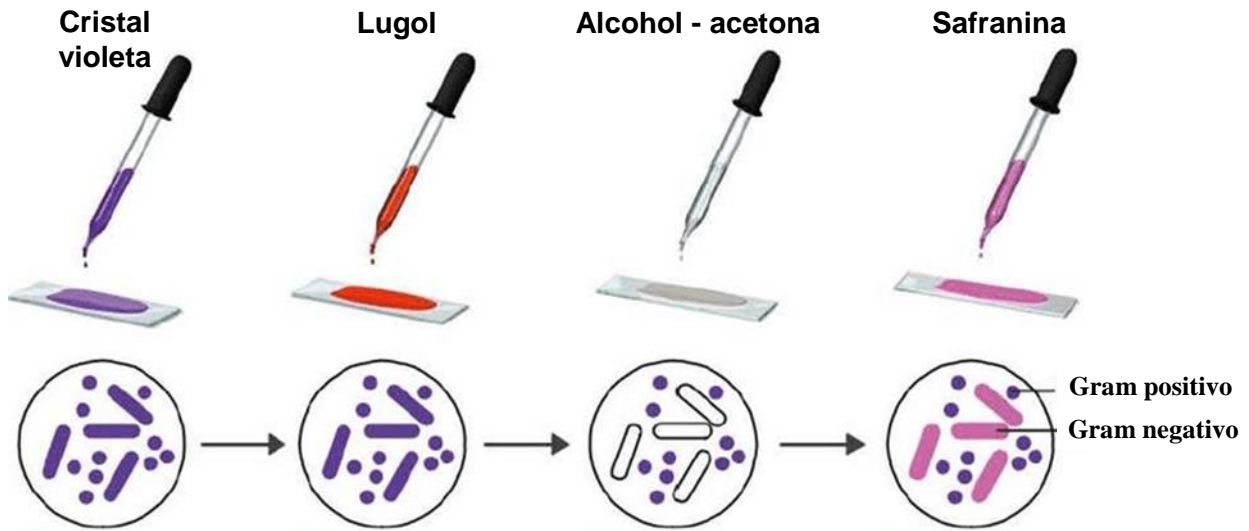


Figura 21. Procedimiento de la prueba de tinción de Gram

2.5.3. Prueba de catalasa

Para realizar la prueba se colocó con la ayuda de un palillo de madera una impronta de colonia pura y fresca de 48 h en un portaobjeto limpio y posteriormente se le agregó una gota de H_2O_2 al 3%, si observa inmediatamente la formación de burbujas, es decir, liberación de CO_2 , se expresa como prueba positiva, de lo contrario prueba negativa (Figura 18). Como control positivo se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y como controles negativo *Lc. lactis* ATCC 0205V, *Lb. plantarum* ATCC 8014 y *Lb. rhamnosus* ATCC 53103 (MacFaddin, 2003).



Figura 22. Materiales para la realización de la prueba de catalasa

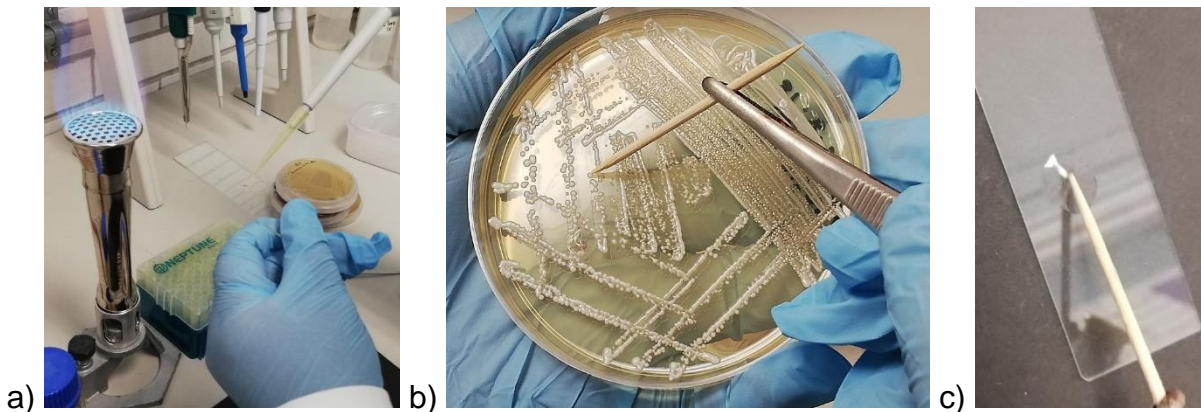


Figura 23. Procedimiento de la prueba de catalasa a) Gota de H₂O₂ al 3% en portaobjetos b) Azada de colonia a evaluar c) Contacto de la colonia con el H₂O₂

2.5.4. Prueba de oxidasa

Para la prueba oxidasa se empleó el reactivo N, N, N', N' - tetrametil-p-fenilendiamina al 1% (Sigma Aldrich®). Para realizar la prueba se colocó con la ayuda de un palillo de madera una impronta de la colonia pura y fresca de 48 h sobre el papel de filtro posteriormente se adicionó una gota del reactivo sobre la muestra. Se observó en el papel que no hubiera un cambio de color a azul o violeta oscuro dentro de los 10 segundos, expresándolo como una prueba negativa, de lo contrario como una prueba

positiva (Figura 20). Como microorganismo de referencia para un control positivo se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* spp. y para los controles negativos *Lc. lactis* ATCC 0205V, *Lb. plantarum* ATCC 8014 y *Lb. rhamnosus* ATCC 53103 (MacFaddin, 2003).



Figura 24. Materiales para la realización de la prueba de oxidasa

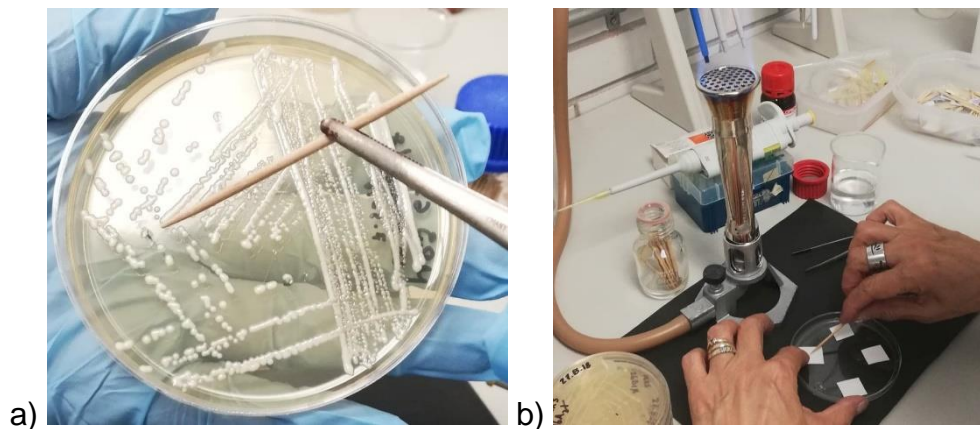


Figura 25. Procedimiento de la prueba de oxidasa a) Impronta de colonia a evaluar b) Contacto de la colonia con el papel filtro impregnado con el reactivo

2.5.5. Prueba de O/F

Se realizó la prueba de oxidación - fermentación empleando como medio básico Hugh – Leifson, formulado con peptona de caseína en una concentración de 0.2%, cloruro

de sodio (NaCl) 0.5%, fosfato de potasio en concentración de 0.03%, agar en una concentración de 0.5%; como carbohidratos se emplearon sacarosa 0.5%, Glucosa 1.0%, Lactosa 2.0%, Xilosa y Sorbitol al 1.0% y, como indicador, se utilizó azul de bromotimol en concentración de 0.005% (Llorente, 1998, MacFaddin, 2003).



Figura 26. Carbohidratos empleados en la prueba de O/F

Se prepararon dos tubos con 5 mL de medio Hugh - Leifson estéril para cada carbohidrato por cepa de estudio, se utilizaron cultivos puros y frescos de 48 h de cada cepa de estudio y se emplearon dos controles *Lb. plantarum* ATCC 8014 y *Lb. rhamnosus* ATCC 53103. Se inoculó una impronta de las colonias en el medio semisólido por picadura aproximadamente 0.6 mm de fondo de cada tubo; con la finalidad de obtener un ambiente aerobio, es decir, el tubo quedó abierto y en otro anaerobio, este se cubrió con una capa de 1 mL de aceite mineral estéril.

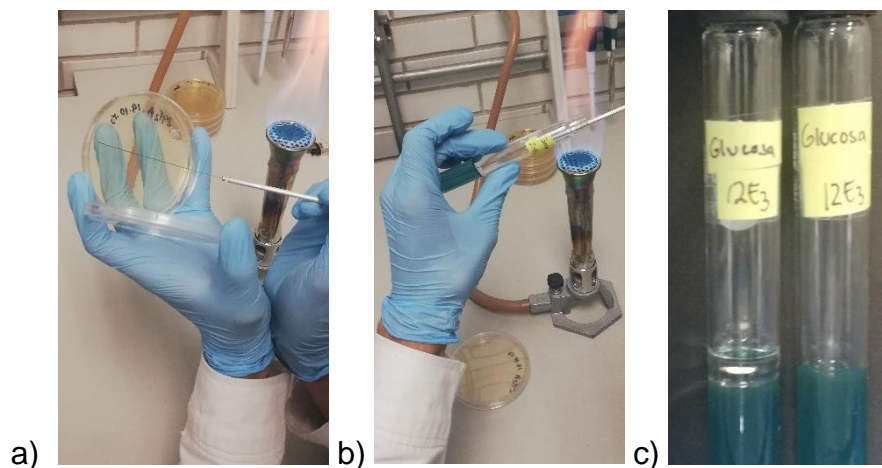


Figura 27. Procedimiento de la prueba de O/F a) Impronta de la colonia a evaluar b) Inóculo de la colonia por picadura c) Tubos en condiciones anaerobia y aerobia

Se incubaron los tubos a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (incubadora Quincy Lab, Inc. 12-140) por aproximadamente 14 días, debido al crecimiento lento de estos microorganismos. Los resultados se expresaron en términos de viraje que presentaron los tubos, si el color viraba a amarillo, se determinaba como positivo (MacFaddin, 2003).

2.5.6. Movilidad

La prueba de motilidad se realizó empleando los tubos para la prueba de oxidación - fermentación, ya que se registraron como móviles, si el crecimiento se propagaba desde la línea de punción e inmóviles si el crecimiento se mantuvo aislado a la línea de punción (MacFaddin, 2003).

2.6. Perfil fermentación de carbohidratos con sistema API® 50 CH y 50 CHL

Una vez realizadas las pruebas primarias, se cultivó una colonia del agar MRS (BD Difco™) de cada cepa de estudio en tubos para cultivo con 10 mL de caldo MRS (BD Difco™) estéril; se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (incubadora Quincy Lab, Inc. 12-140) durante 48 h. Posteriormente, se realizó un segundo pase, tomando 200 μL de cultivo bacteriano en caldo MRS (BD Difco™) a un nuevo tubo con 10 mL de caldo MRS (BD Difco™) estéril, se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (incubadora Quincy Lab, Inc. 12-140) durante 48 h.

Para el uso de las galerías API® 50 CH se trabajó en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar Nuair™ NU-126-400. Se repartieron 10 ml de agua destilada estéril en el recipiente del fondo de la cámara para crear una atmósfera húmeda (Figura 23.a), se retiraron las galerías de su empaque y se acomodaron de igual manera en el fondo (Figura 23.b).

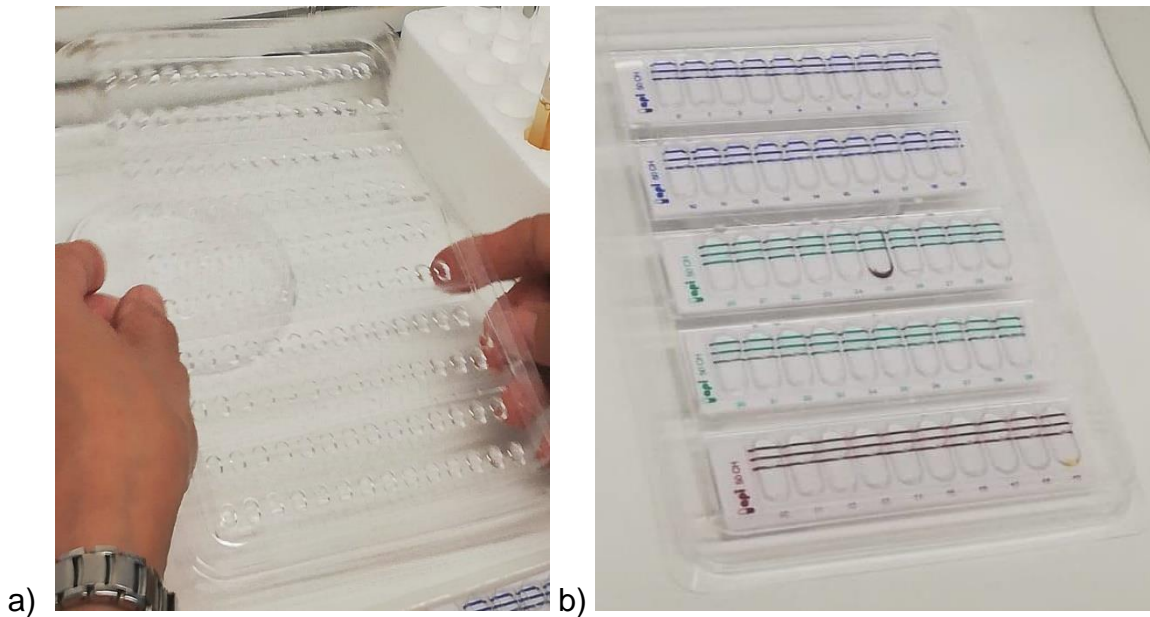


Figura 28. Montaje del sistema API® 50 CH a) Cámara con atmosfera húmeda b) Colocación de las galerías en la cámara

Se colocaron 500 μ L del cultivo en caldo MRS en un tubo de cultivo con 2 mL de agua peptonada estéril y se homogenizó por agitación. Se colocaron un determinado número de gotas (n) del tubo anterior a otro tubo de cultivo con 5 mL de agua peptonada estéril hasta obtener una turbidez similar al patrón 2 de Mc Farland (CDC - OMS, 2009) (Figura 24). Posteriormente, se colocó del tubo de turbidez similar al patrón 2 de Mc Farland el doble de gotas (2n) a la ampolleta que contiene el medio API® 50 CHL, se homogenizó por sifonéo y se utilizó de manera inmediata.

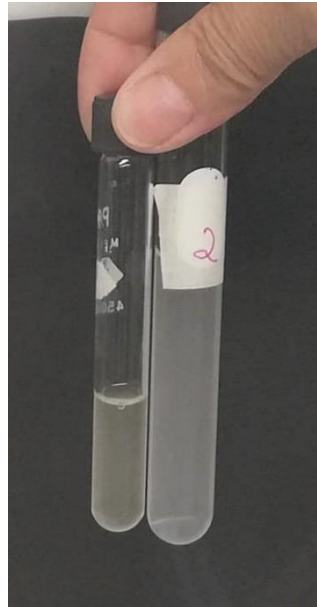


Figura 29. Comparación con la escala #2 de Mc Farland

La suspensión bacteriana se repartió con ayuda de una pipeta estéril en los 50 microtubos de las galerías, considerando los siguientes criterios:

- Inclinarse ligeramente hacia adelante la cámara de incubación.
- Evitar la formación de burbujas apoyando la punta de la pipeta en un extremo del borde de la cúpula (Figura #).
- No rebasar el límite superior del microtubo en el momento de la inoculación, con el fin de conservar una buena anaerobiosis.
- Evitar la formación de un menisco cóncavo o convexo.



Figura 30. Procedimiento para el llenado de la cúpula

Finalmente, se cubrieron los microtubos con aceite mineral estéril para conservar un ambiente anaerobio y se cerró la cámara de incubación. Se incubaron las galerías a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 h (incubadora Quincy Lab, Inc. 12-140), las lecturas se realizaron a

las 24 h y 48 h de incubación. Los resultados se interpretaron como “+” o “-” en términos del viraje que presentaron las cúpulas, como se muestran en la figura 26.



Figura 31. Aspecto de las cúpulas en las galerías de la prueba comercial API® 50 CH
Fuente: API web™, 2018

Una vez obtenidos los resultados de las galerías, se interpretaron con la ayuda del programa informático de identificación API web™ (Figura 27).

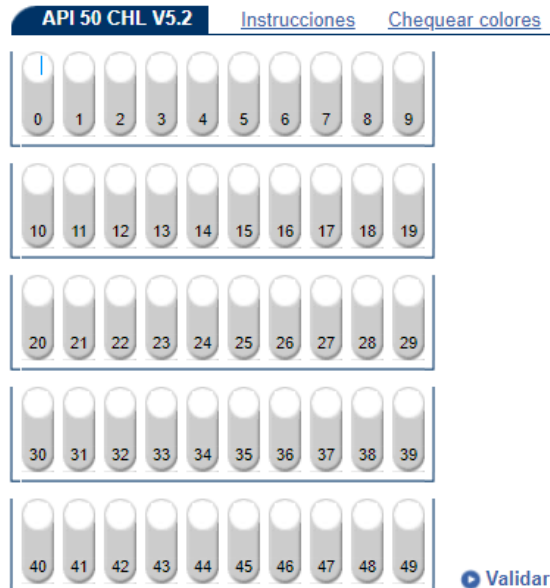


Figura 32. Demostración de galerías API® 50 CHL en programa informático API web

Fuente: API web, 2018

2.7. Evaluación de actividad hemolítica

Para determinar la capacidad hemolítica de los cultivos en estudio se evaluaron las cepas puras y frescas de 12 h. Se sembraron los cultivos bacterianos por estría en agar sangre (BD BBL™) con 5% v/v de sangre de bovino (Figura 28), proporcionada por el Centro de Enseñanza Agropecuaria (CEA) de la Facultad De Estudios Superiores Cuautitlán, y se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en una incubadora Quincy Lab, Inc. 12-140 por 12 h. Los resultados se registraron como α - hemolítica si presentó coloración verdosa en el medio alrededor de la colonia; b-hemolítica si presentó coloración traslúcida en el medio alrededor de la colonia o como cepa no hemolítica si no presentó ningún cambio el medio de cultivo. Como control positivo se utilizó *Lb. Lactis* ATCC 0205V y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P como control positivo.



Figura 33. Siembra de cultivo por estría en agar sangre (BD BBL™) con 5% v/v de sangre de bovino

2.8. Liofilización de cepas aisladas

Los cultivos de las cepas aisladas puras y frescas de 48 h se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 min; se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 mL de Caldo MRS (BD Difco™) estéril + 10% de leche en polvo descremada. Se congelaron en un ultracongelador Thermo Revco Thermo Scientific (Figura 29) a -

70°C durante 12 h. Ya congelados se colocaron en una liofilizadora Labconco Freezone 4.5 (Figura 30) y, al terminar se cerraron todos los viales y se almacenaron en congelación a -4°C (Llorente, 1998).



Figura 34. Ultracongelador Thermo Revco Thermo Scientific



Figura 35. Liofilizadora Labconco Freezone 4.5

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Procedimiento de estandarización para el manejo de ratón infante

En la obtención del contenido intestinal del ratón *lactante* de dos semanas de edad, no se logró un crecimiento apropiado de los microorganismos aislados, debido a que sólo se utilizó agua peptonada, misma que no tenía los nutrientes necesarios para su desarrollo y a que en esta edad, el ratón no tenía bien establecida su microbiota intestinal.

Lo anterior llevó a la necesidad de utilizar un nuevo ratón de edad más avanzada (3 semanas); además, se realizó un ajuste metodológico, en el cual se cambió el agua peptonada por caldo MRS, ya que este contiene los nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento de los microorganismos lácticos.

Adicionalmente se optó por cambiar también la edad del ratón y obtener el contenido intestinal de un ratón *infante* de 4 semanas, con una microbiota intestinal más estable y que se auto enriquece debido a su característica de ser animales coprófagos (Barman *et al.*, 200), lo cual se vio reflejado en la obtención de un mayor desarrollo de los microorganismos aislados. Por otra parte el uso del caldo MRS favoreció la obtención de mejores cultivos en comparación con los anteriores. Los ajustes metodológicos adicionales se enfocaron a utilizar atmósferas anaerobias y un paso de incubación en caldo MRS a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ restricciones de crecimiento que permitieron obtener con mayor certeza, microorganismos lácticos, debido al nicho del que se obtuvieron. Al confirmar el crecimiento en MRS se realizó propagación por estría en Agar MRS e incubación a las mismas condiciones.

3.2. Desarrollo metodológico para el aislamiento y obtención de cepas puras de bacilos y cocos anaerobios Gram positivos

La caracterización microbiológica de las cepas aisladas seleccionadas, incluyó la realización de las pruebas primarias para lo cual se escogieron cepas crecidas en agar MRS con base en su morfología colonial, especialmente que fuesen similares a las descritas para BAL, que presentaran las principales características, forma redonda, de 1-3 mm, de apariencia cremosa, opacas, bordes continuos. Se obtuvieron improntas

de estas colonias y se les realizó tinción de Gram para su observación al microscopio óptico con ocular de 100X para entonces seleccionar bacilos y cocos. Las cepas seleccionadas se cultivaron dos veces en caldo MRS, para lograr obtenerlas por separado, de este modo se obtuvieron 4 cepas procedentes del Yeyuno, 9 de Colon y 5 de Duodeno, a las que se le asignaron las siguientes claves (cuadro 4, figura 31).

Cuadro 4. Relación de cepas aisladas por sección de intestino

CLAVE DE LA CEPA	ORIGEN
1A	Yeyuno
2A	Yeyuno
1B	Yeyuno
1C	Yeyuno
1D	Colon
1E	Colon
2E	Colon
3E	Colon
4E	Colon
5E	Colon
1F	Colon
2F	Colon
3F	Colon
1G	Duodeno
1H	Duodeno
2H	Duodeno
3H	Duodeno
1I	Duodeno

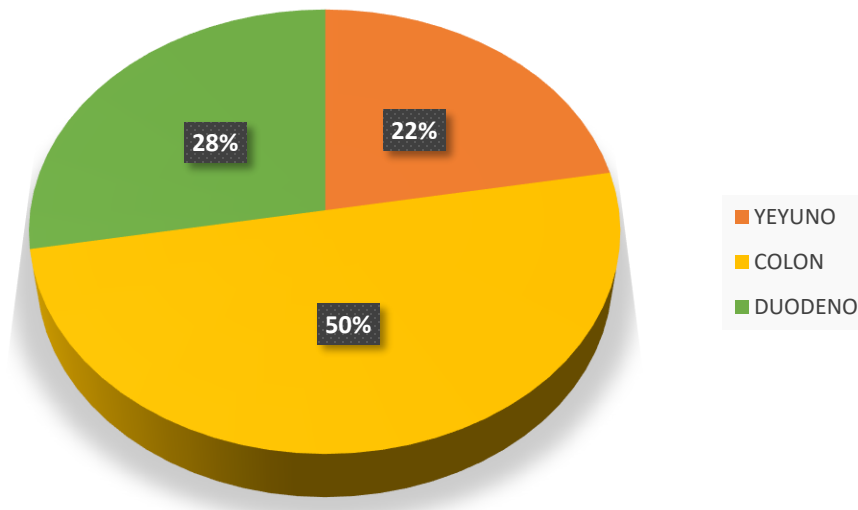


Figura 36. Distribución de cepas aisladas por sección de intestino

En paralelo se obtuvieron los cultivos en agar MRS de las cepas de colección *Lactococcus lactis* ATCC 0205V, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014.

También se realizaron las pruebas bioquímicas de *catalasa* y *oxidasa* y de *perfil de carbohidratos* para así poder compararlos con las cepas de BAL de referencia empleadas: Tomando en consideración que las BAL son catalasa negativas, se utilizaron también controles positivos, para esta prueba empleando cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y *Pseudomonas aeruginosa* spp. Todo esto con la finalidad de poder dar validez a los resultados.

3.3. Pruebas microbiológicas primarias: morfología colonial, tinción de Gram, catalasa, oxidasa y O/F

El crecimiento de las cepas aisladas y puras en agar MRS correspondió con las características morfológicas coloniales, propias de las BAL tal como lo reportan Von Wright y Axelsson (2012), ya que se observaron colonias con forma redonda de color blanco y brillante, convexa con bordes lisos y de apariencia cremosa e inmóviles con un tamaño de 0.5-2 mm de diámetro. En la prueba de tinción de Gram todas las cepas

fueron identificadas como Gram positivas, esto las relaciona con la característica de poseer pared celular gruesa, constituida por peptidoglicano, con afinidad con el colorante primario cristal violeta y al utilizar el Lugol impide la salida del complejo cristal violeta- yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared celular (López *et al.*, 2014). De la observación al microscopio se lograron identificar 3 formas bacterianas: bacilos (10 cepas), cocobacilos (7 cepas) y diplobacilos (1 cepa).

Una vez caracterizadas las cepas aisladas con los criterios anteriores y de encontrar las coincidencias macroscópicas y microscópicas reportadas en la literatura para las BAL, tal como lo demostraron Tserovska *et al.* (2002), Lee *et al.* (2006); Vantsawa *et al.* (2017), se realizaron las pruebas de oxidasa y catalasa.

Ambas pruebas y en todas las cepas aisladas, resultaron negativas lo que es consistente con el comportamiento de las BAL ya que estas carecen de estas enzimas (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2011). En la prueba de catalasa cuando se adicionó el peróxido de hidrógeno al frotis no se observó producción de burbujas (Figura 32.a) es decir de oxígeno; además de carecer de la enzima catalasa en algunas bacterias anaerobias o microaerófilas, el peróxido de hidrógeno si se acumula, es tóxico para las bacterias y produce su muerte (MacFaddin, 2003).

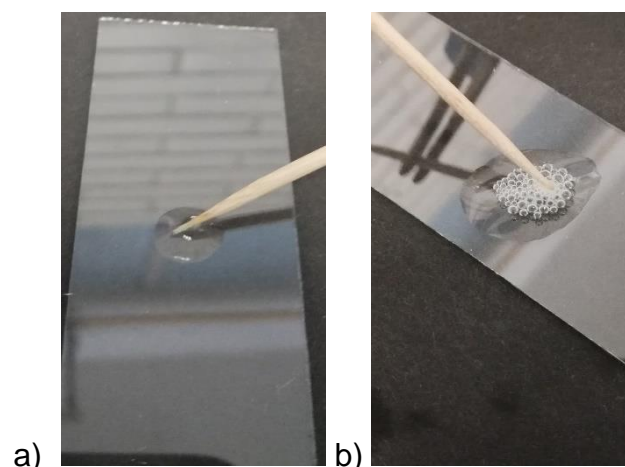


Figura 37. Representación de resultados de la prueba catalasa a) Resultado negativo b) Resultado positivo

En la prueba de oxidasa no se presentó ningún cambio de coloración al colocar el reactivo con el frotis (figura 33.a), esto se debe a que los microorganismos anaerobios carecen de la actividad de oxidasa, estos resultados concuerdan con lo demostrado por Deibel y Evans (1960) y Tserovska *et al.*, (2002) que mostraron que las especies de *Lactobacillus* carecen de estas enzimas.

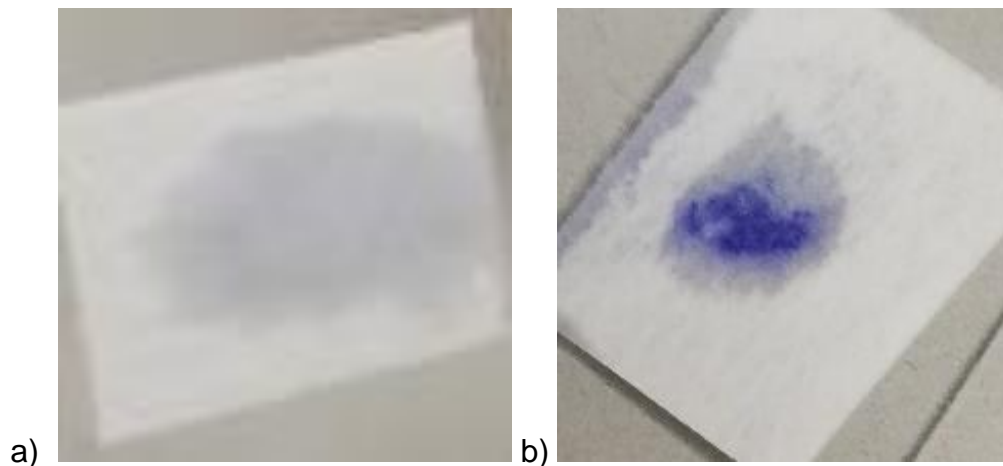


Figura 38. Representación de resultados de la prueba oxidasa a) Resultado negativo
b) Resultado positivo

Para finalizar las pruebas primarias se realizó la prueba de óxido-fermentación, en donde se utilizaron 5 carbohidratos (Glucosa, Lactosa, Xilosa, Sacarosa y Sorbitol), se consideró como resultado positivo si se produjo virre de color azul a color amarillo (figura 35), es decir, hubo producción de ácido. Se pudo observar que todas las cepas de estudio fermentaron la glucosa en las dos condiciones en la que se realizó la prueba, en el carbohidrato sorbitol las cepas 4E y 2H presentaron fermentación; todas las cepas fermentaron a la xilosa excepto 2A, 1D y 2F; las cepas que no fermentaron lactosa son 2A, 1D, 1E, 3E, 2F, 3F, 1H Y 3H y en cuanto a la sacarosa, las cepas que no presentaron fermentación fueron 1C, 1D, 1E, 3E, 5E, 2F, 3F Y 1H.



Figura 39. Representación de tubos inoculados antes de presentar cambios en el color

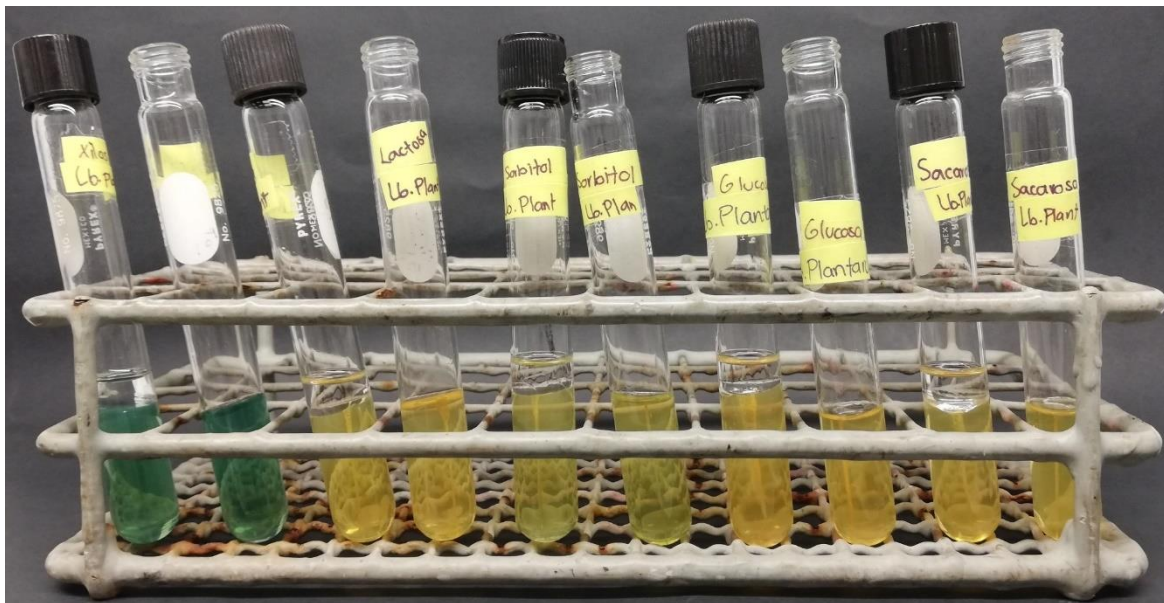


Figura 40. Representación de tubos inoculados después de presentar cambios en el vire

3.4. Fermentación de carbohidratos con sistema API® 50 CHL

Se realizó la prueba de API para obtener una presuntiva del género y especie al que pueden corresponder las cepas de estudio; los resultados obtenidos para la cepa como *Lactobacillus plantarum* son similares a los descritos por Galindo (2004), Pulido

(2007), Bergey (2011), Wood y Holzapfel (2014), fermentando glucosa, fructosa, manosa, sorbitol, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, sacarosa y rafinosa.

El perfil de fermentación obtenido para las cepas clasificadas como *Lactococcus lactis* presenta patrones de fermentación similares a los descritos por Kimoto *et al.*, (2004), Bergey (2011), Wood y Holzapfel (2014), a excepción de los siguientes carbohidratos que no fueron metabolizados: arabinosa, ribosa, celobiosa, melibiosa y rafinosa.

De acuerdo con Cachat y Priest (2005), Bergey (2011), Wood y Holzapfel (2014) se observaron similitudes el metabolismo de los carbohidratos: galactosa, glucosa, fructosa, manosa, acetilglucosamina, arbutina, esculina, salicina, maltosa, lactosa, sacarosa; a excepción de la melibiosa cuando según los autores mencionados no debió de haber fermentado. Entre estas cepas se presentaron diferencias en la fermentación de los carbohidratos: celobiosa, rafinosa, glicógeno, arabinosa y ribosa.

3.5. Actividad Hemolítica de las cepas

Para la prueba de hemólisis, las cajas de agar sangre se seccionaron en tres partes para poder realizar una comparación con los controles empleados y la cepa de estudio (figura 36); se empleó como control negativo *Lactococcus lactis* ATCC 0205V ya que no produce hemólisis de ningún tipo (Bergey, 2011) y como control positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, ya que presenta características que son perjudiciales para el ser humano como son coagulasa positivos y hemolisinas positivas (Bennett *et al.*, 2001), todas las cepas de estudio presentaron un comportamiento similar al control negativo.

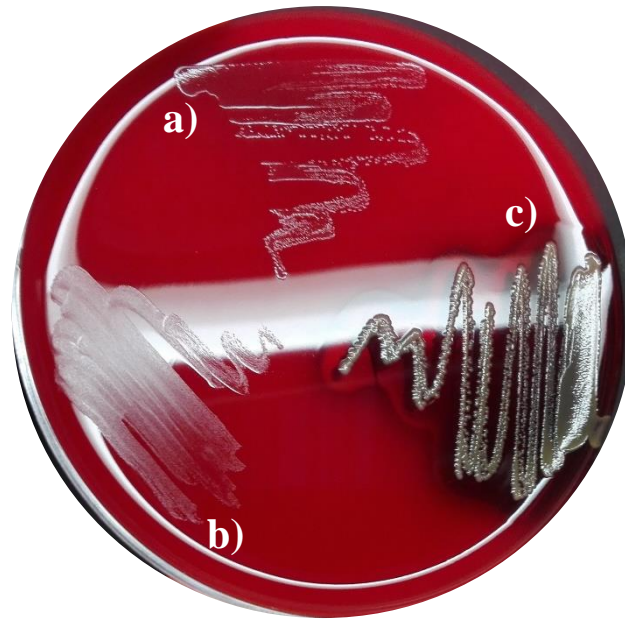


Figura 41. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa de estudio c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Lactococcus lactis ATCC 0205V

Cuadro 5. Características macroscópicas y microscópicas de *Lc. lactis* ATCC 0205V

MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
Redondas de color blanco, brillantes y opacas, de 1 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Cocos Gram (+) inmóviles, de 0.5 – 1 μm , en pares y en racimos



Figura 42. Morfología colonial de *Lc. lactis* ATCC 0205V en agar MRS

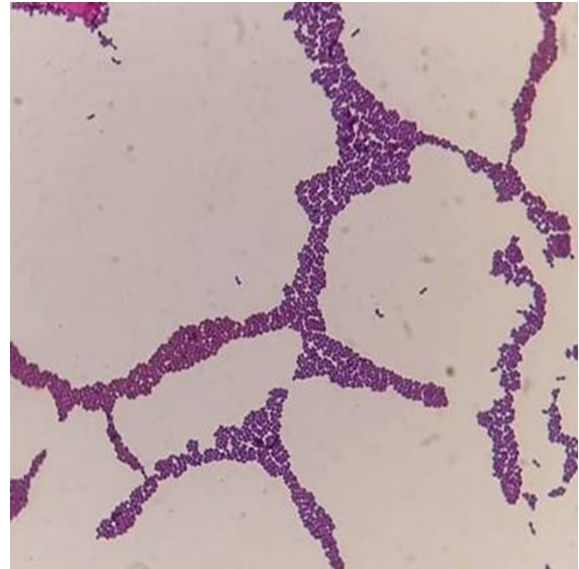


Figura 43. Morfología microscópica de *Lc. lactis* ATCC 0205V

Cuadro 6. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de *Lc. lactis* ATCC 0205V

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo



Figura 44. Catalasa negativo en *Lc. lactis* ATCC 0205V



Figura 45. Oxidasa negativo en *Lc. lactis* ATCC 0205V

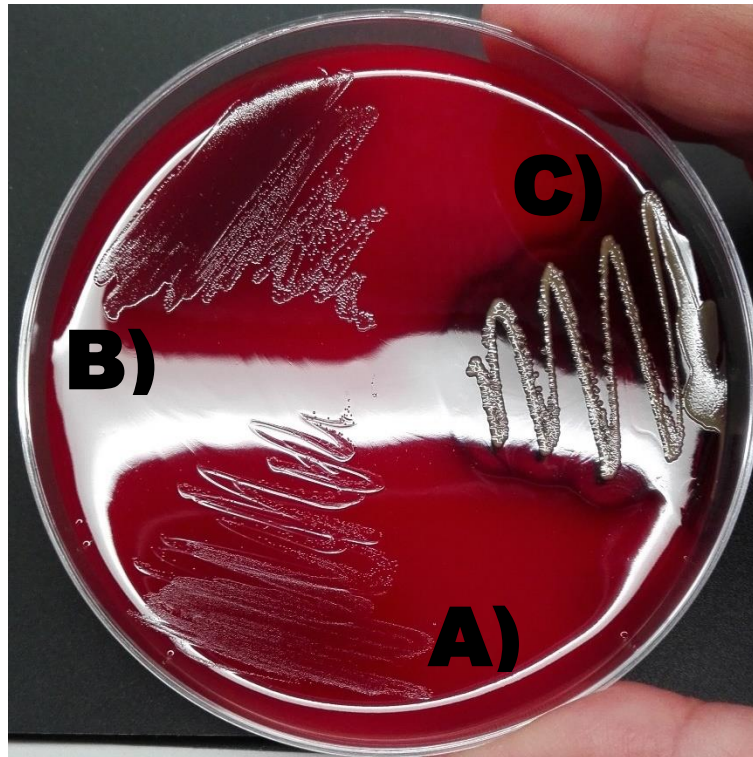


Figura 46. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa de estudio c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Lactobacillus plantarum ATCC 8014

Cuadro 7. Características macroscópicas y microscópicas de *Lb. plantarum* ATCC 8014

MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA
Redondas de color blanco, brillantes y opacas, de 1 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Bacilos cortos Gram (+) inmóviles, de 2 μm, empalizados

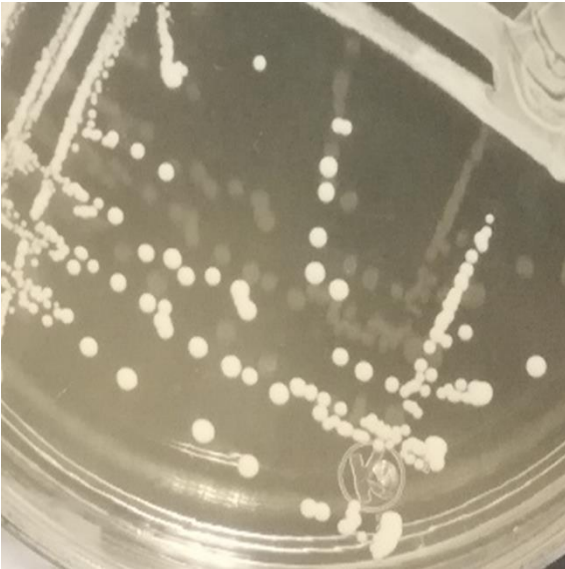


Figura 47. Morfología colonial de *Lb. plantarum* ATCC 8014 en agar MRS

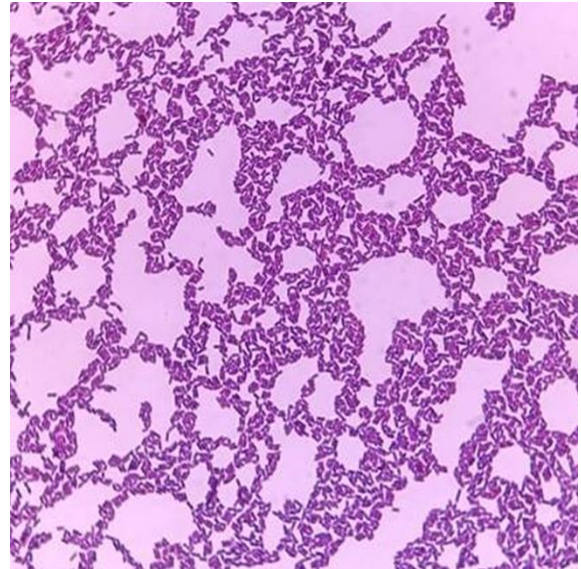


Figura 48. Morfología microscópica de *Lb. plantarum* ATCC 8014

Cuadro 8. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de *Lb. plantarum* ATCC 8014

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo



Figura 49. Catalasa negativo en *Lb. plantarum* ATCC 8014



Figura 50. Oxidasa negativo en *Lb. plantarum* ATCC 8014

Cuadro 9. Resultados de prueba de O/F de *Lb. plantarum* ATCC 8014

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂
(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

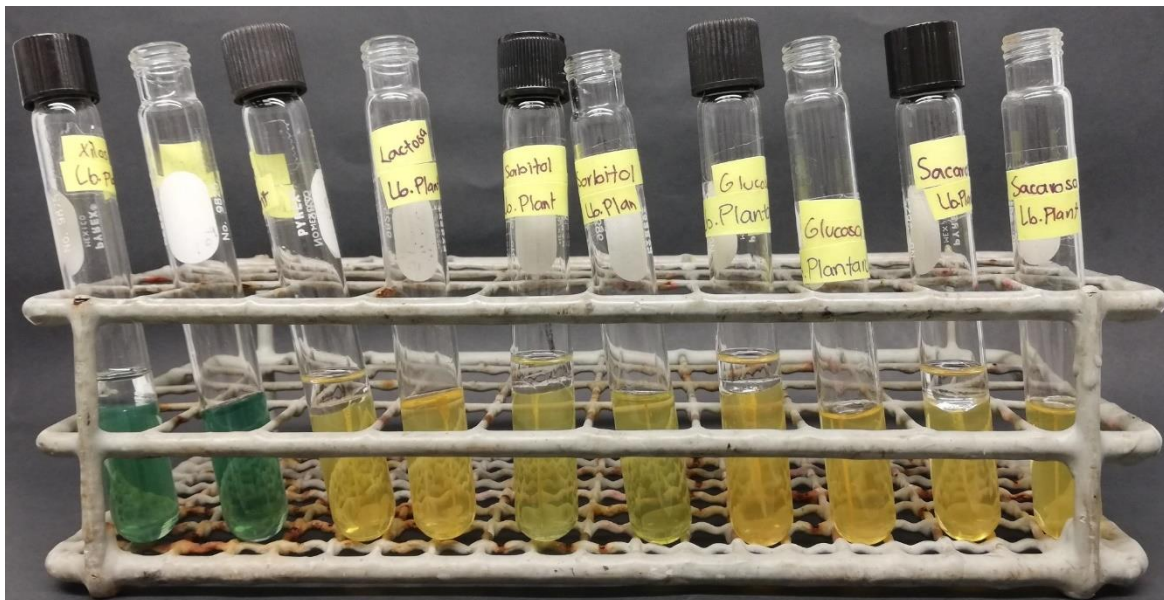


Figura 51. Representación de resultados de la prueba O/F de *Lb. plantarum* ATCC 8014

Lactobacillus rhamnosus ATCC 53103

Cuadro 10. Características macroscópicas y microscópicas de *Lb. rhamnosus* ATCC 53103

MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA
Redondas de color blanco, brillantes y opacas, de 1 – 2 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Bacilos cortos Gram (+) inmóviles, de 3 - 4 μ m, agrupados en cadenas y aislados

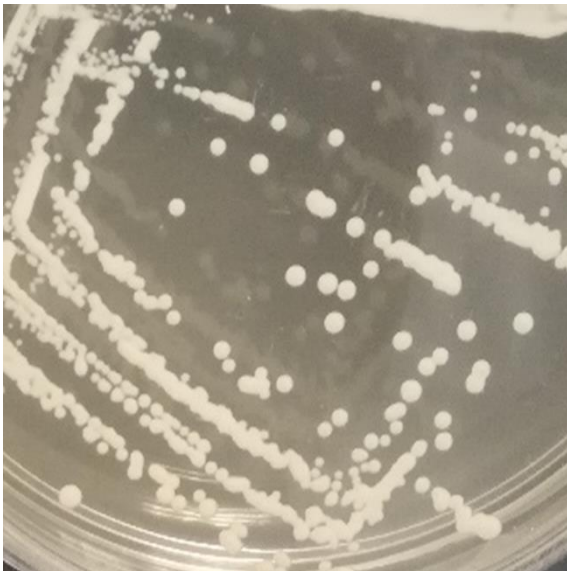


Figura 52. Morfología colonial de *Lb. rhamnosus* ATCC 53103 en agar MRS

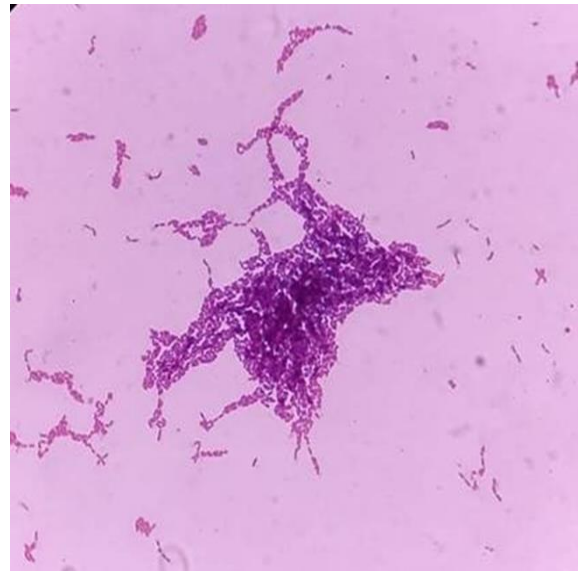


Figura 53. Morfología microscópica de *Lb. rhamnosus* ATCC 53103

Cuadro 11. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de *Lb. rhamnosus* ATCC 53103

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo



Figura 54. Catalasa negativo en *Lb. rhamnosus* ATCC 53103



Figura 55. Oxidasa negativo en *Lb. rhamnosus* ATCC 53103

Cuadro 12. Resultados de prueba de O/F de *Lb. rhamnosus* ATCC 53103

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

O₂ (+): En condiciones aerobio
 O₂ (-): En condiciones anaerobio

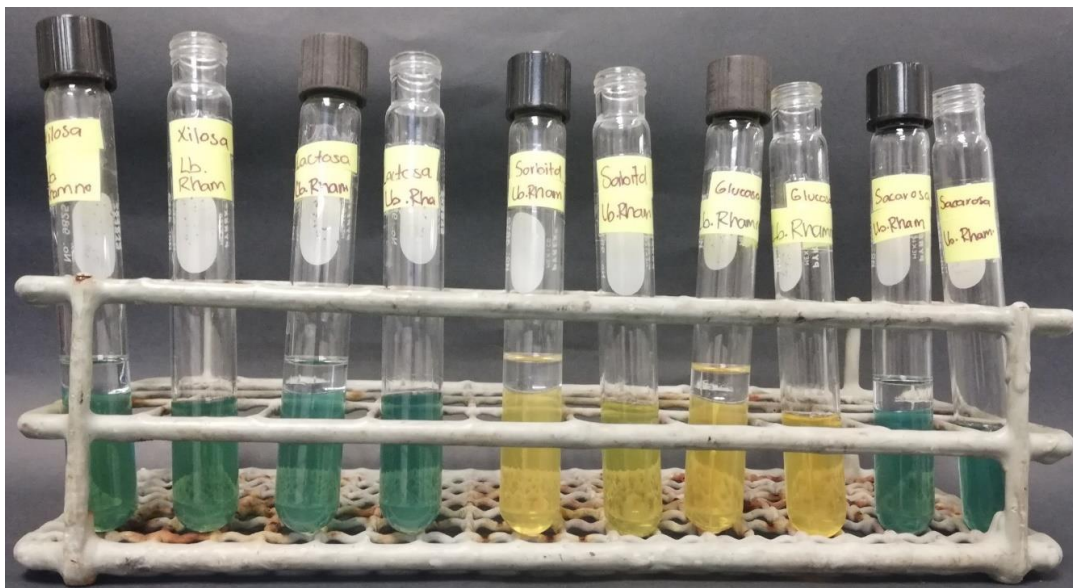


Figura 56. Representación de resultados de la prueba O/F de *Lb. rhamnosus* ATCC 53103

Staphylococcus aureus ATCC 6538P

Cuadro 13. Características macroscópicas y microscópicas de *S. aureus* ATCC 6538P

MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA
Puntiformes de color amarillo, brillantes y opacas, de ≤ 0.5 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Coco Gram (+) inmóviles, de 0.8 – 1 μm , agrupados en racimo



Figura 57. Morfología colonial de *S. aureus* ATCC 6538P en agar BHI

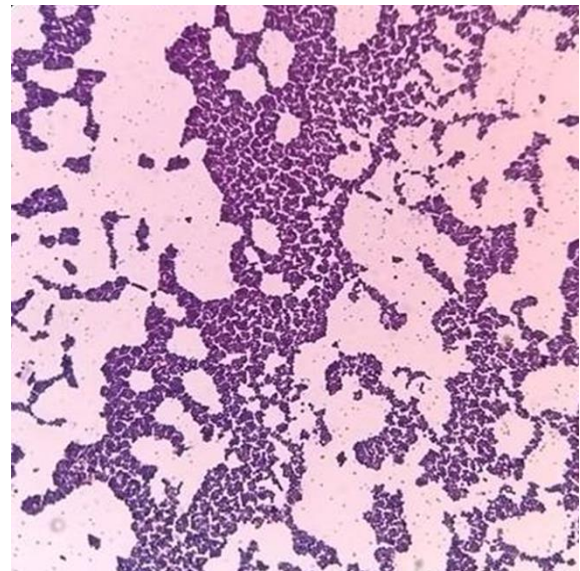


Figura 58. Morfología microscópica de *S. aureus* ATCC 6538P

Cuadro 14. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de *S. aureus* ATCC 6538P

CATALASA	OXIDASA
Positivo	Positivo



Figura 59. Catalasa positivo en *S. aureus* ATCC 6538P

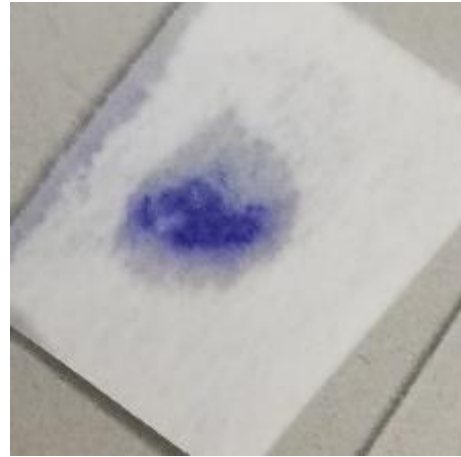


Figura 60. Oxidasa positivo en *S. aureus* ATCC 6538P

Pseudomonas aeruginosa spp.

Cuadro 15. Características macroscópicas y microscópicas de *P. aeruginosa* spp.

MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA
Puntiformes de color verde fluorescente, brillantes y traslucidas, de ≤ 0.5 mm, convexas con borde ondulado, superficie lisa y apariencia cremosa	Bacilos curvos Gram (-) móviles, de 1 μm , aislados o en cadenas cortos

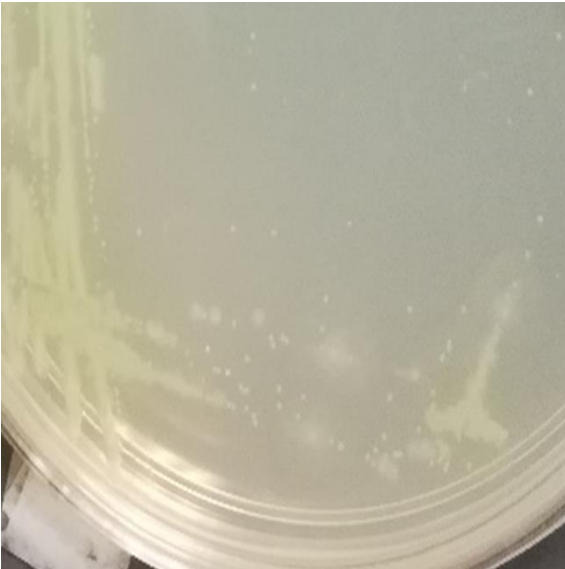


Figura 61. Morfología colonial de *P. aeruginosa* spp. en agar Pseudomona P

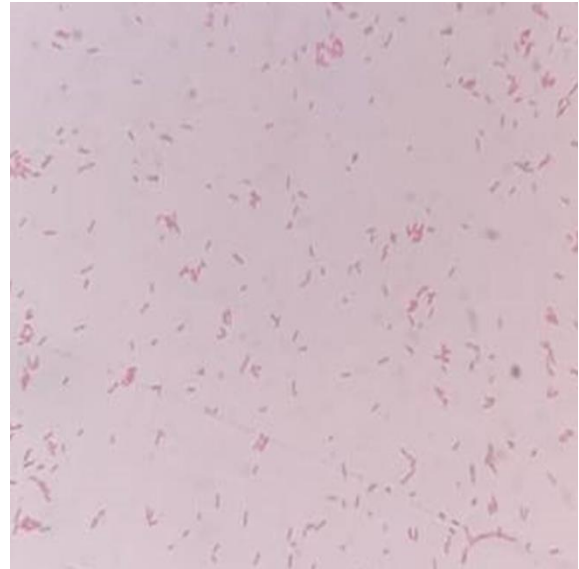


Figura 62. Morfología microscópica de *P. aeruginosa* spp.

Cuadro 16. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de *P. aeruginosa* spp.

CATALASA	OXIDASA
Positivo	Positivo

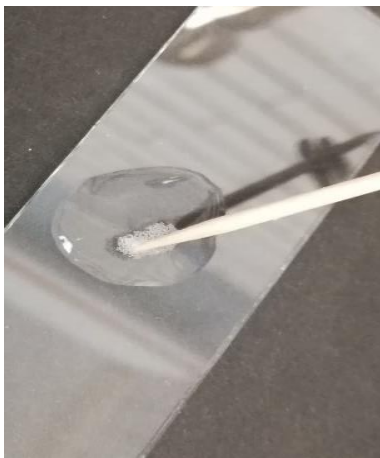


Figura 63. Catalasa positivo en *P. aeruginosa* spp.

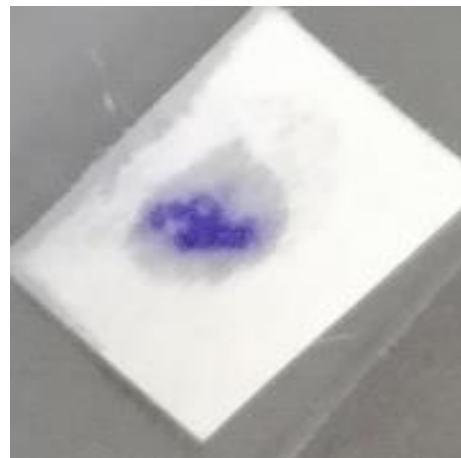


Figura 64. Oxidasa positivo en *P. aeruginosa* spp.

Cepa 1A: *Lactococcus lactis ssp lactis* 1 (83.6% ID - Identificación aceptable)

Cuadro 17. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1A

NICO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA
Yeyuno	Redondas de color blanco, brillantes y traslucidas, de 1 – 1.5 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Cocobacilos Gram (+) inmóviles, de 1 µm, aislados y en racimos.

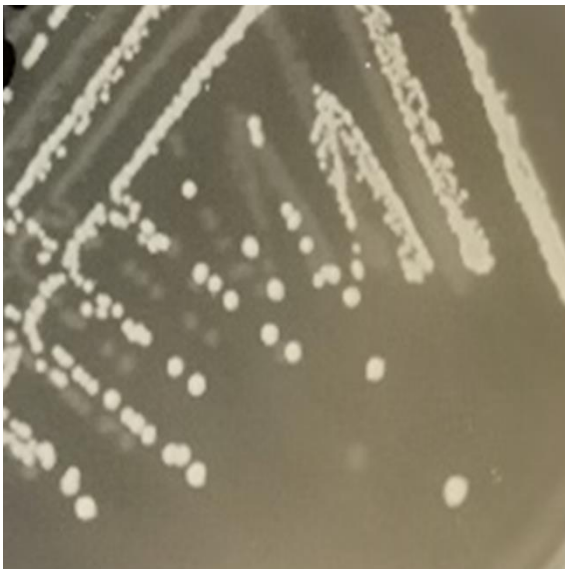


Figura 65. Morfología colonial de la cepa 1A en agar MRS

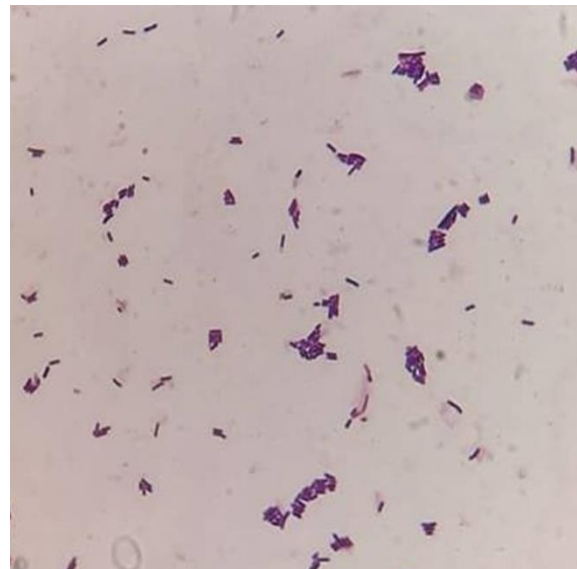


Figura 66. Morfología microscópica de la cepa 1A

Cuadro 18. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1A

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo



Figura 67. Catalasa negativo cepa 1A

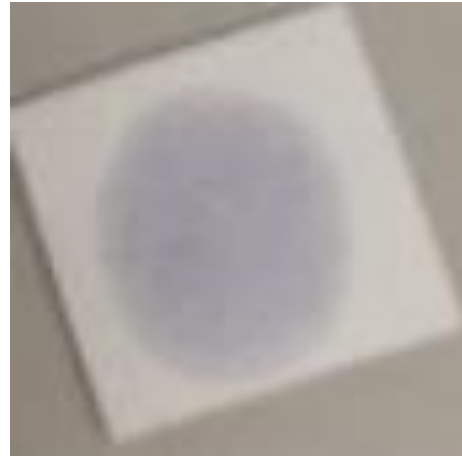


Figura 68. Oxidasa negativo cepa 1A

Cuadro 19. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1A

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂
(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
+	+	+	+			+	+	+	+

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

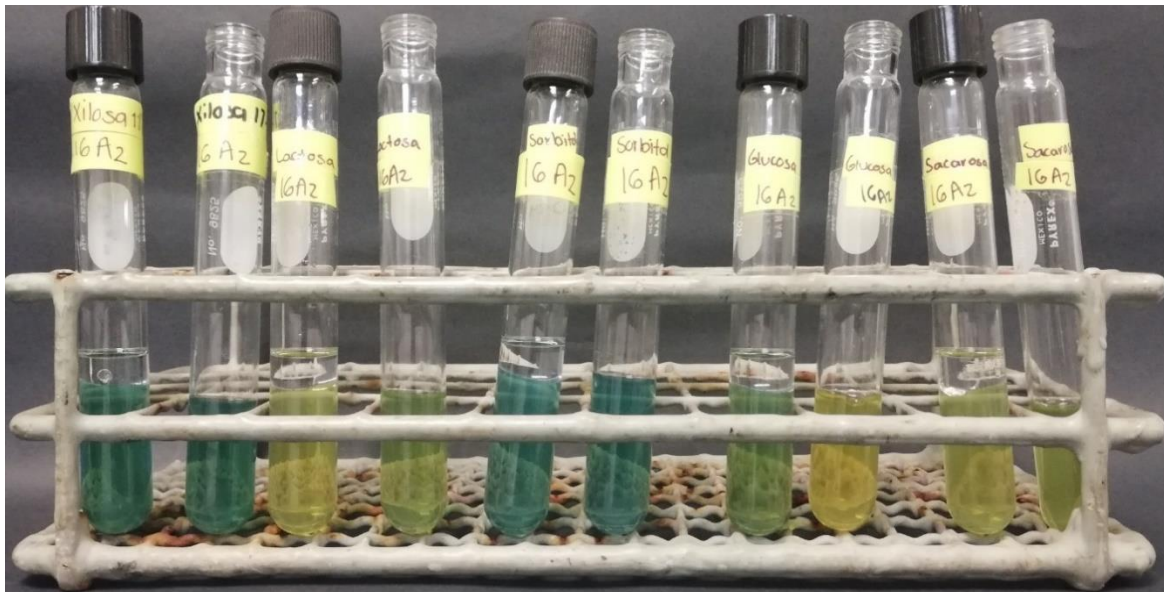


Figura 69. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1A



Figura 70. Tira API® 50 CH de la cepa 1A tras 24 h de incubación a 30 ± 2 °C

Cuadro 20. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1A con la galería API® 50 CH en 24 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	+
3	-	28	+
4	+	29	+
5	+	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	+
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-



Figura 71. Tira API® 50 CH de la cepa 1A tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C

Cuadro 21. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1A con la galería API® 50 CH en 48 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	+
3	-	28	+
4	+	29	+
5	+	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	+
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-

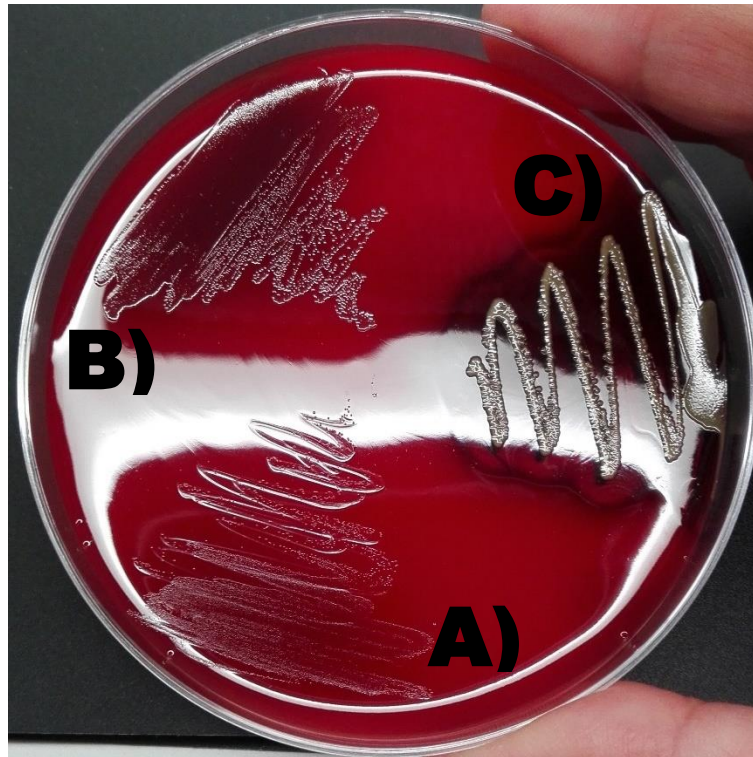


Figura 72. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 1A c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 2A: *Lactococcus lactis* ssp *lactis* 1 (42.3% ID – Identificación Perfil dudoso)

Cuadro 22. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 2A

NICHO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA
Yeyuno	Redondas de color blanco, brillantes y traslucidas, de 0.5 – 1 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Cocobacilos cortos Gram (+) inmóviles, de 1 – 2 μ m, aislados

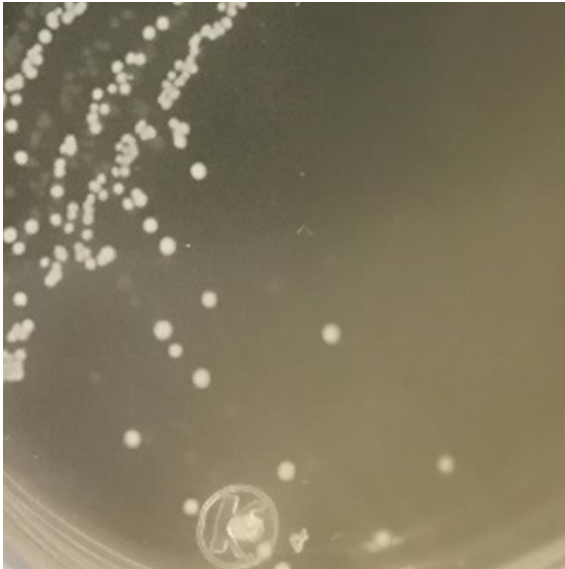


Figura 73. Morfología colonial de la cepa 2A en agar MRS



Figura 74. Morfología microscópica de la cepa 2A

Cuadro 23. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 2A

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo



Figura 75. Catalasa negativo cepa 2A

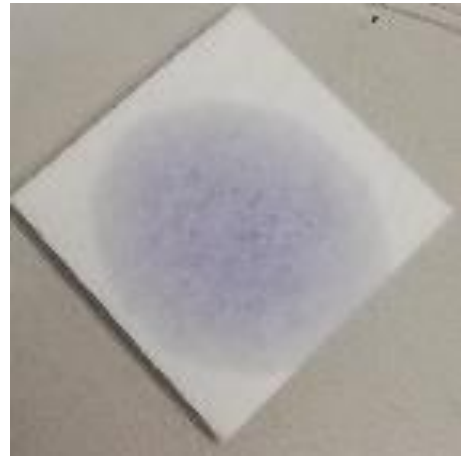


Figura 76. Oxidasa negativa cepa 2A

Cuadro 24. Resultados de prueba de O/F de la cepa 2A

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
		+				+	+	+	+

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

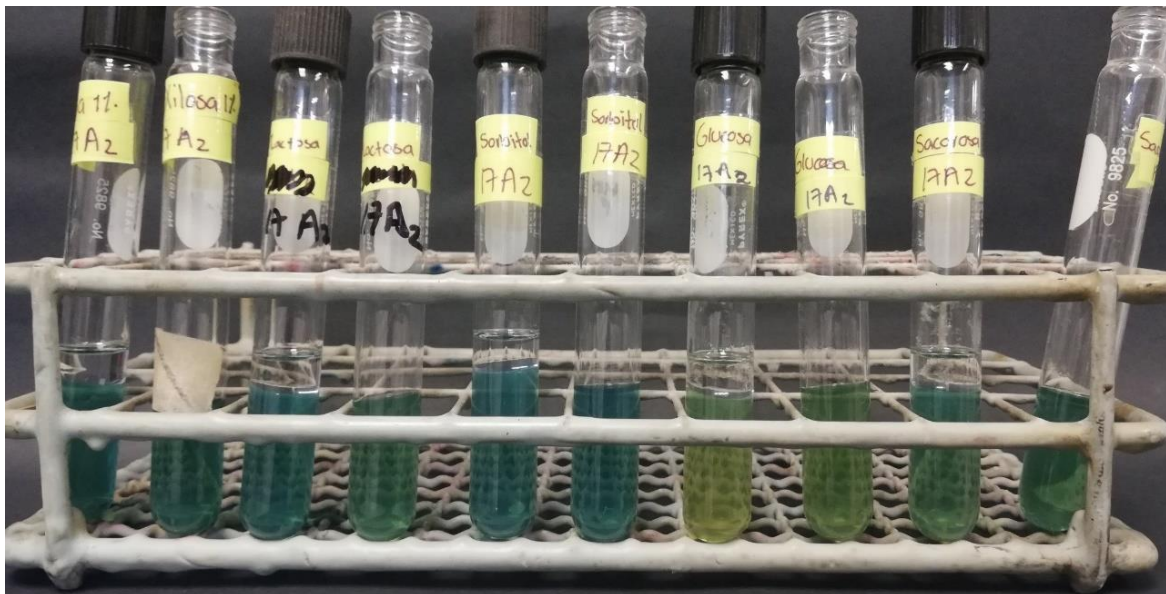


Figura 77. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 2A



Figura 78. Tira API® 50 CH de la cepa 2A tras 24 h de incubación a $30 \pm 2^\circ\text{C}$

Cuadro 25. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 2A con la galería API®
50 CH en 24 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	+
3	-	28	+
4	-	29	+
5	-	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	+
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-



Figura 79. Tira API® 50 CH de la cepa 2A tras 48 h de incubación a $30 \pm 2^\circ\text{C}$

Cuadro 26. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 2A con la galería API® 50 CH en 48 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	+
3	-	28	+
4	-	29	+
5	-	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	+
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-

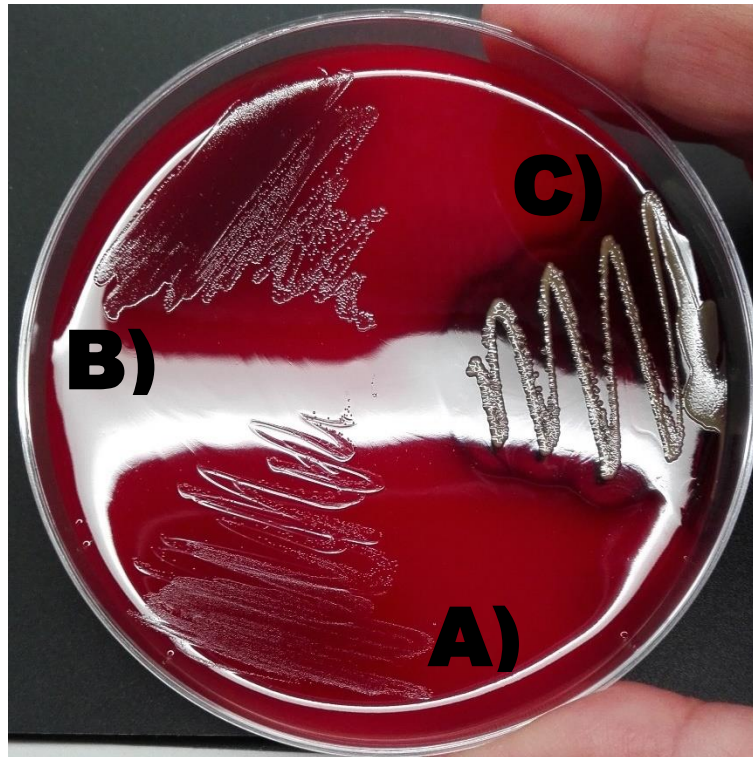


Figura 80. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 2A c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 1B

Cuadro 27. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1B

NICHOS	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
Yeyuno	Puntiformes de color blanco, brillantes y opacas, de 0.5 – 2 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Bacilos cortos Gram (+) inmóviles, de 1 – 2 μm , agrupadas en letras chinas y en cadenas

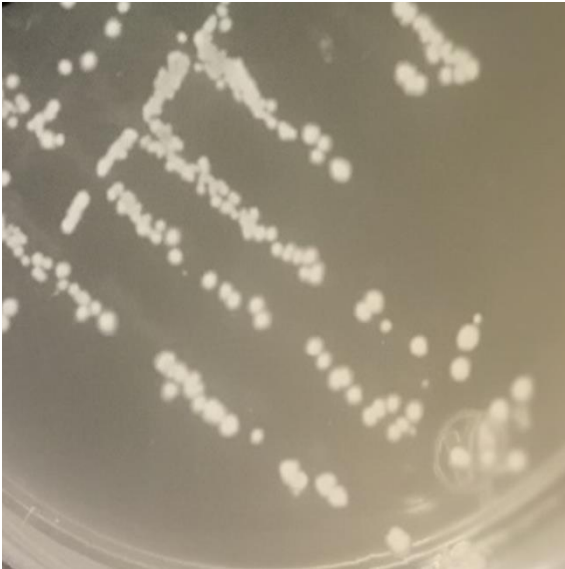


Figura 81. Morfología colonial de la cepa 1B en agar MRS

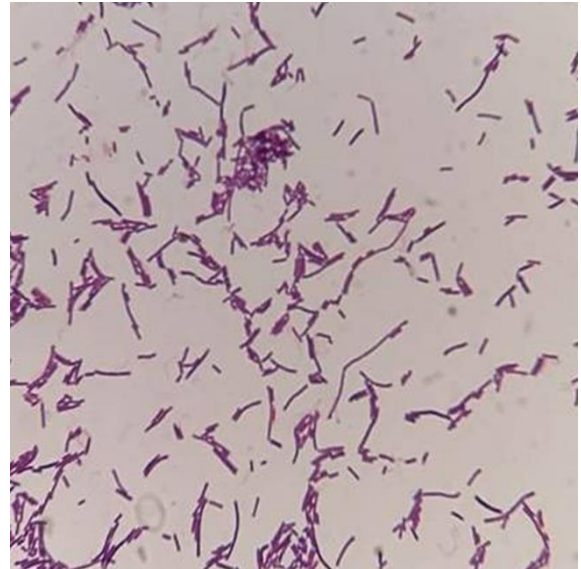


Figura 82. Morfología microscópica de la cepa 1B

Cuadro 28. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1B

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo



Figura 83. Catalasa negativo cepa 1B



Figura 84. Oxidasa negativa cepa 1B

Cuadro 29. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1B

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ 7 (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
+	+	+	+			+	+	+	+

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

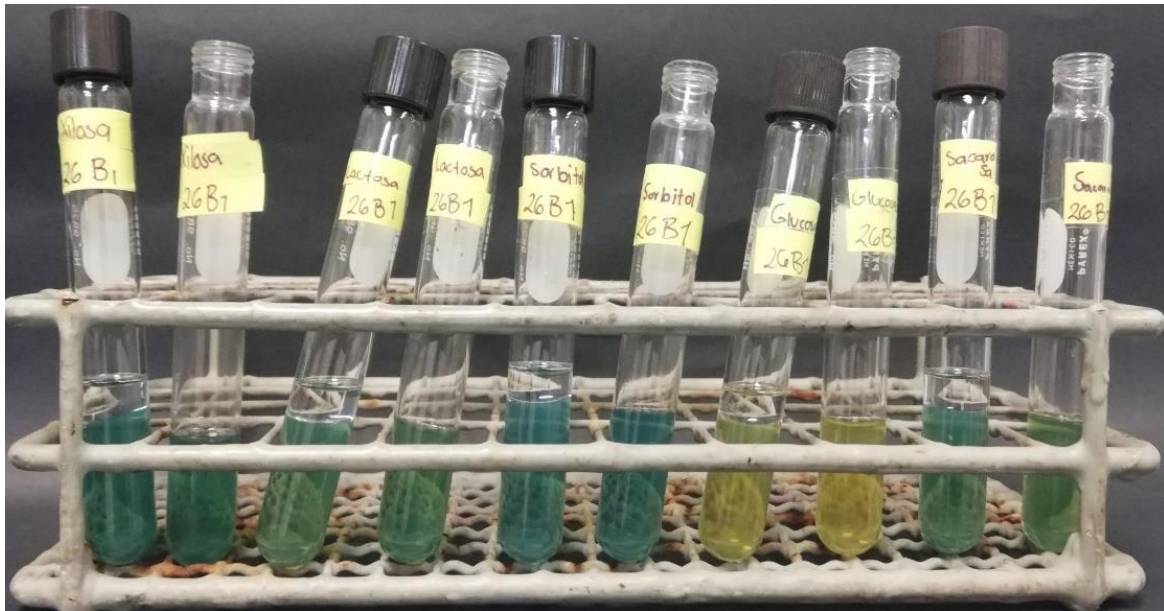


Figura 85. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1B

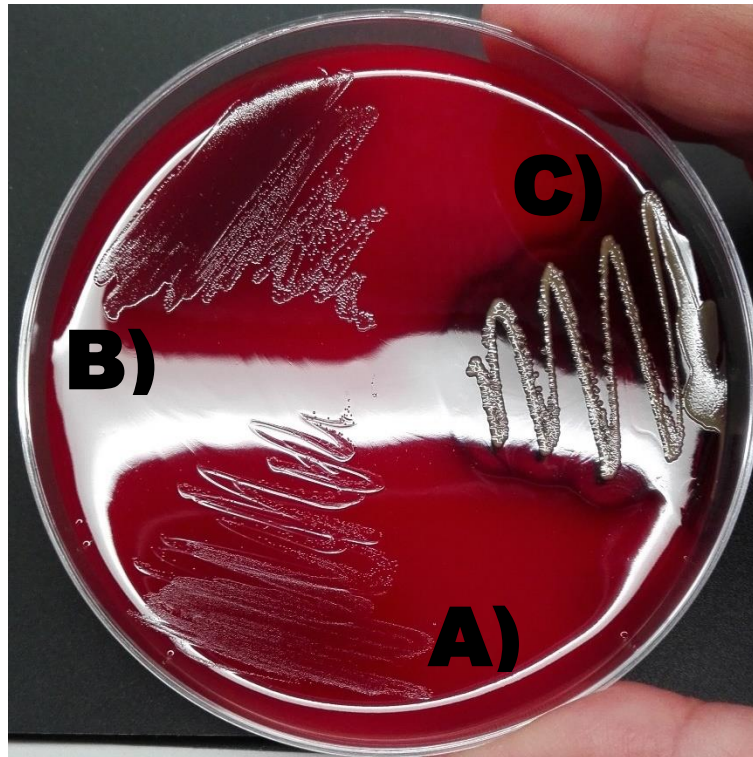


Figura 86. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 1B c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 1C: *Lactobacillus crispatus* (71.4% ID- Identificación Perfil dudoso)

Cuadro 30. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1C

NICHO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA
Yeyuno	Redondos de color blanco, brillantes y traslucidas, de 0.5 – 1 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Diplobacilos cortos Gram (+) inmóviles, de 1 – 2 μ m, aisladas y empalizadas

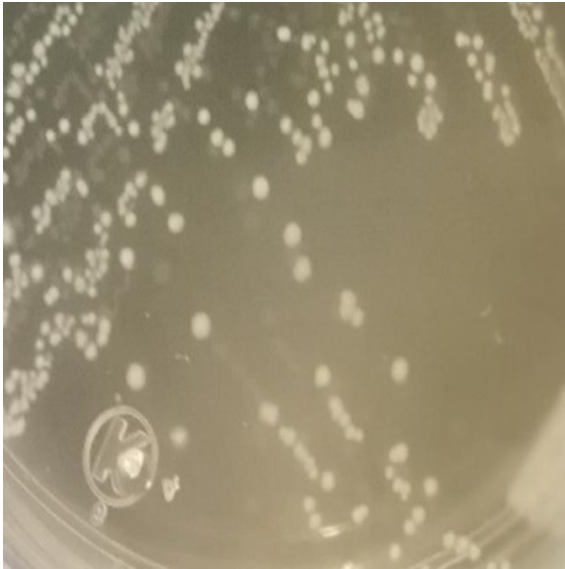


Figura 87. Morfología colonial de la cepa 1C en agar MRS

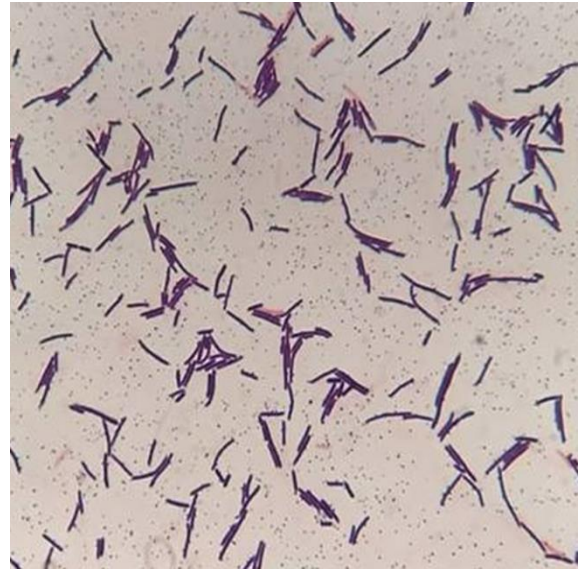


Figura 88. Morfología microscópica de la cepa 1C

Cuadro 31. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1C

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo

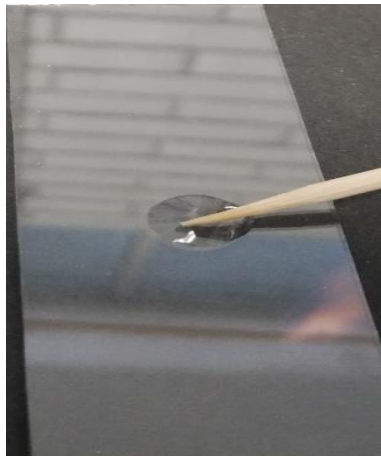


Figura 89. Catalasa negativo cepa 1C



Figura 90. Oxidasa negativo cepa 1C

Cuadro 32. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1C

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
+	+	+	+			+	+	+	

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

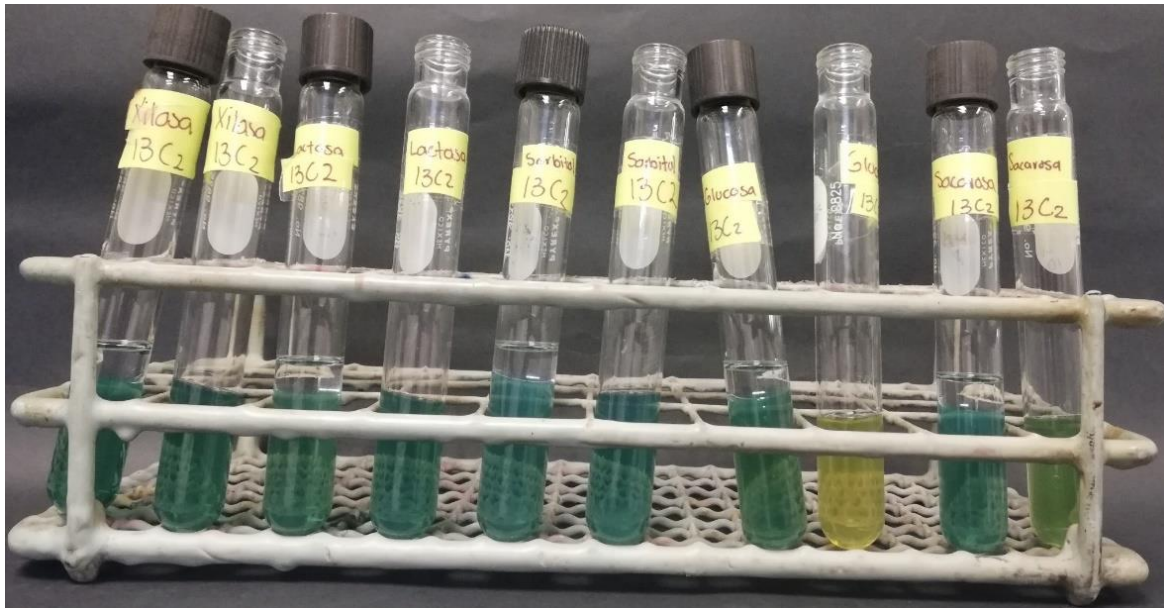


Figura 91. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1C



Figura 92. API® 50 CH de la cepa 1C tras 24 h de incubación a 30 ± 2 °C

Cuadro 33. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1C con la galería API® 50 CH en 24 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	-
3	-	28	+
4	+	29	+
5	+	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	+
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-



Figura 93. Tira API® 50 CH de la cepa 1C tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C

Cuadro 34. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1C con la galería API® 50 CH en 48 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	-
3	-	28	+
4	-	29	+
5	+	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	+
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-



Figura 94. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 1C c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 1D: *Lactobacillus crispatus* (99.5% ID – Identificación Perfil dudoso)

Cuadro 35. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1D

NICHO	MORFOLOGIA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCOPICA
Colon	Redondas de color blanco, brillantes y traslucidas, de 0.5 – 1 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Bacilos cortos Gram (+) inmóviles, de 1 – 2 μm , en empalizadas

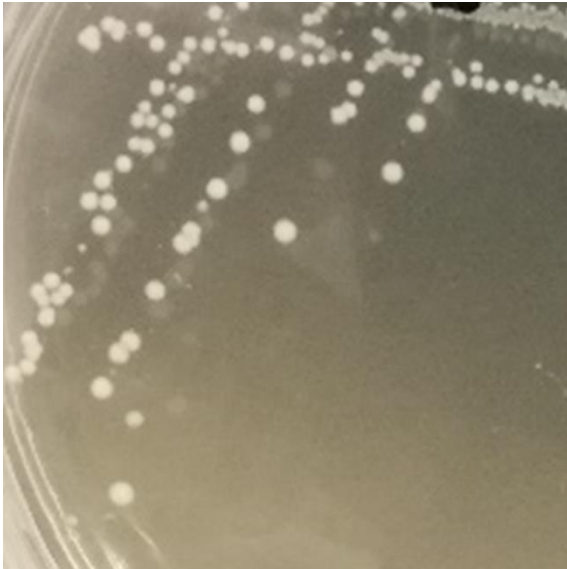


Figura 95. Morfología colonial de la cepa 1D en agar MRS

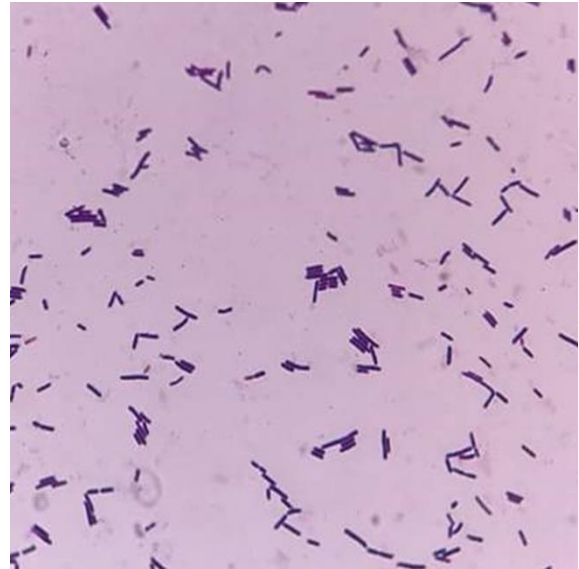


Figura 96. Morfología microscópica de la cepa 1D

Cuadro 36. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1D

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo

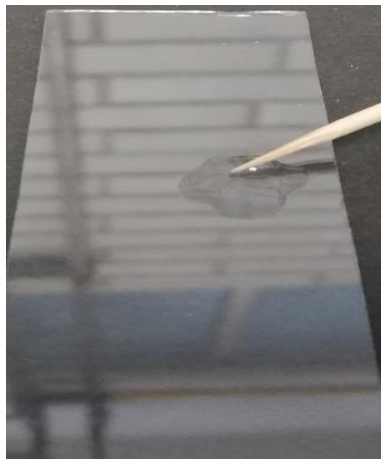


Figura 97. Catalasa negativo cepa 1D

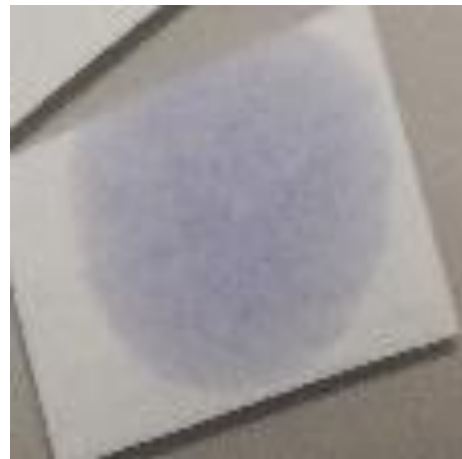


Figura 98. Oxidasa negativo cepa 1D

Cuadro 37. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1D

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
						+			

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

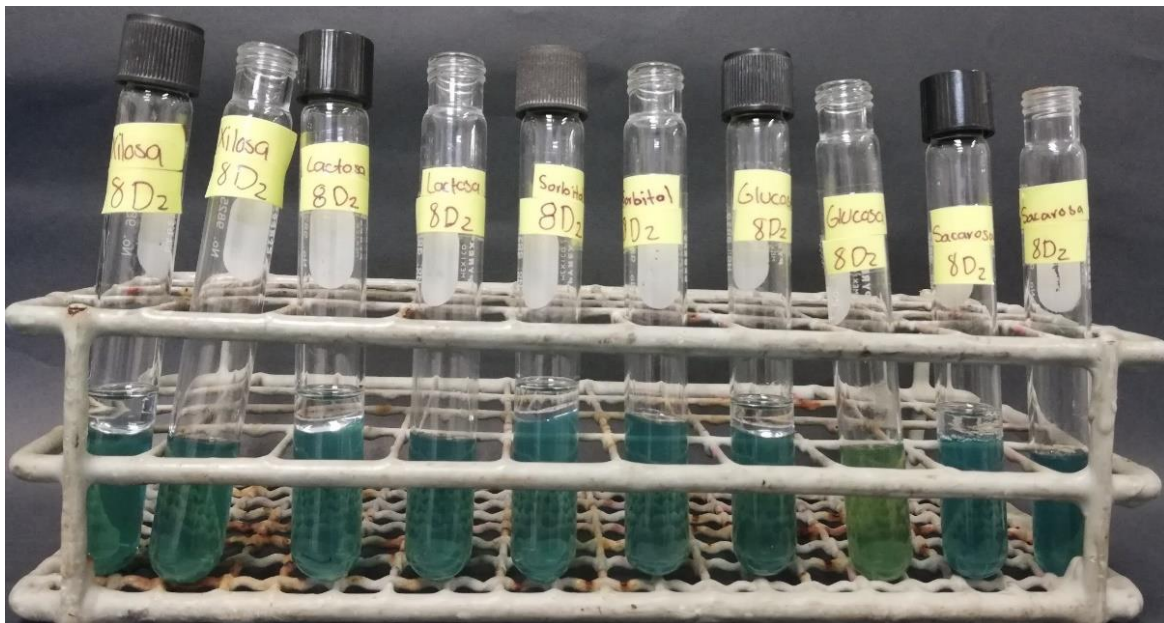


Figura 99. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1D



Figura 100. API® 50 CH de la cepa 1D tras 24 h de incubación a 30 ± 2 °C

Cuadro 38. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1D con la galería API® 50 CH en 24 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	-
3	-	28	+
4	+	29	+
5	+	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	+
11	+	36	-
12	+	37	+
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-

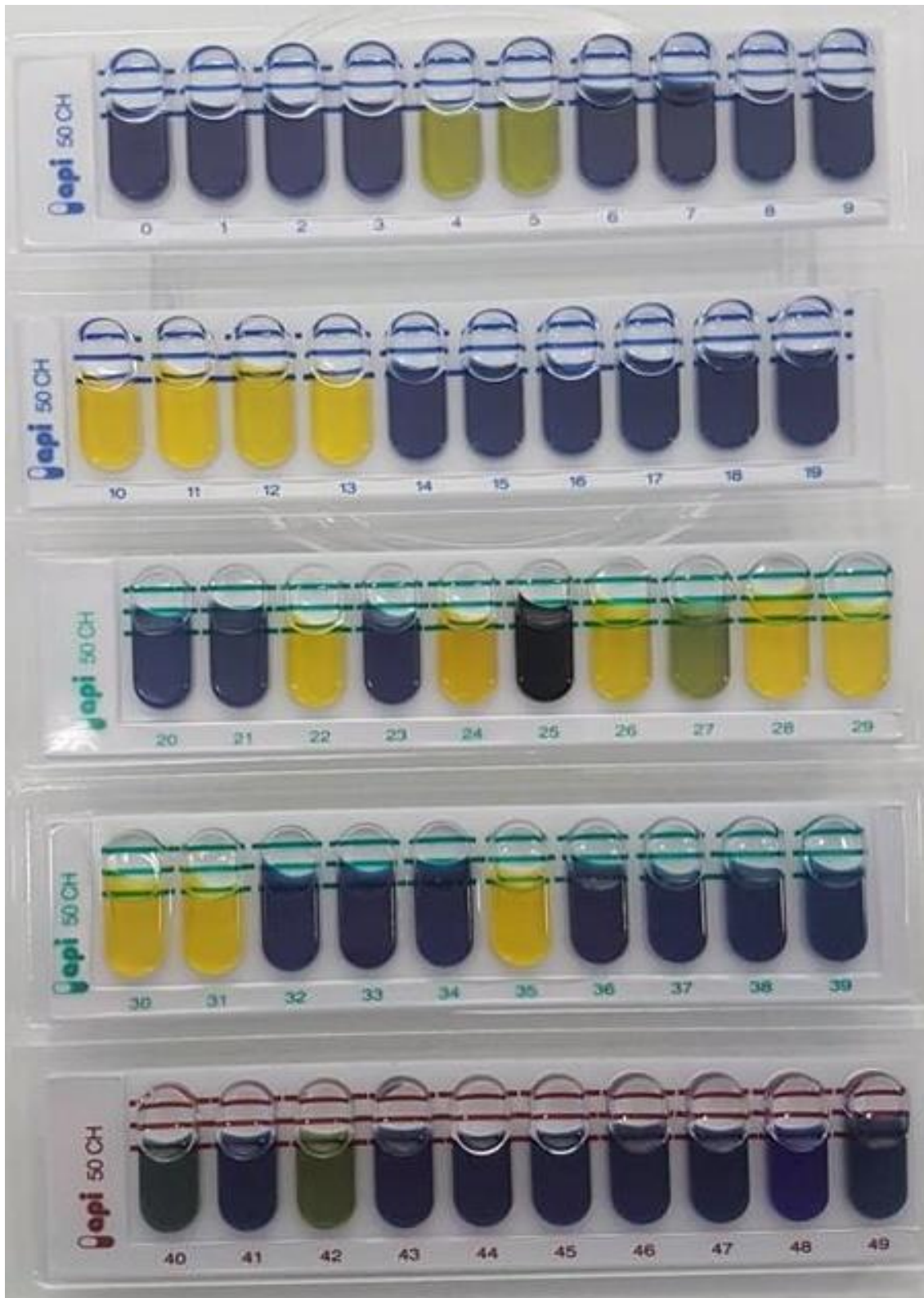


Figura 101. Tira API® 50 CH de la cepa 1D tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C

Cuadro 39. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1D con la galería API® 50 CH en 48 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	-
3	-	28	+
4	+	29	+
5	+	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	+
11	+	36	-
12	+	37	+
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-

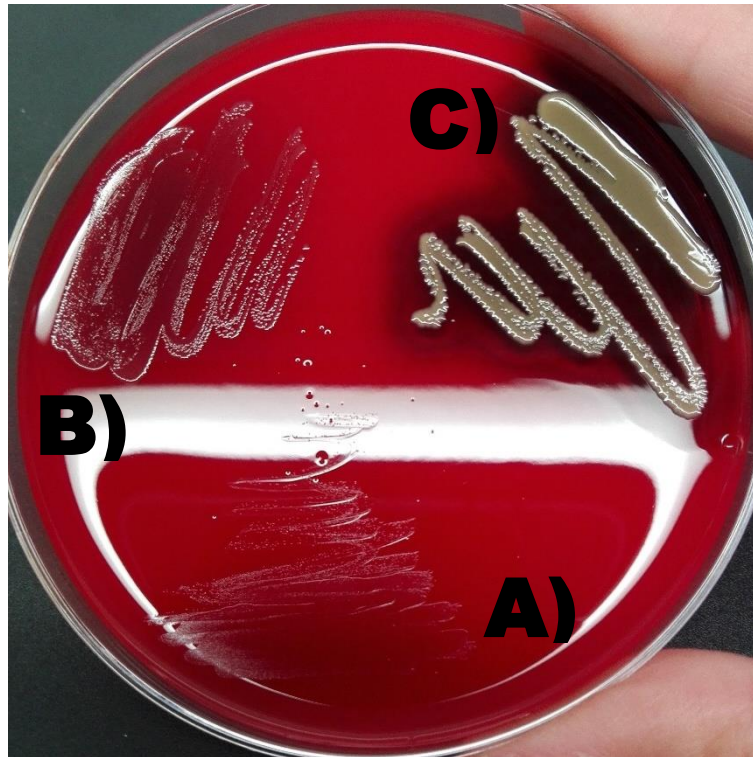


Figura 102. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 1C c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 1E

Cuadro 40. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1E

NICHO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA
Colon	Redondos de color blanco, brillantes y traslucidas, de 1.5 – 2 mm, convexas con borde ondulado, superficie lisa y apariencia cremosa	Cocobacilos Gram (+) inmóviles, de 1 μ m, aislados y en racimos.

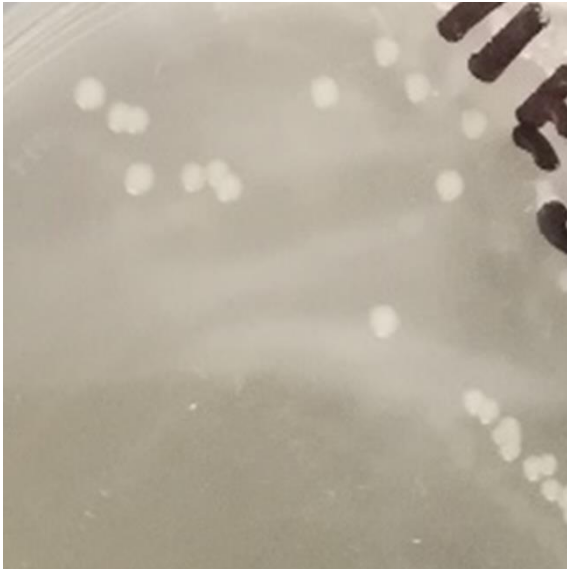


Figura 103. Morfología colonial de la cepa 1E en agar MRS

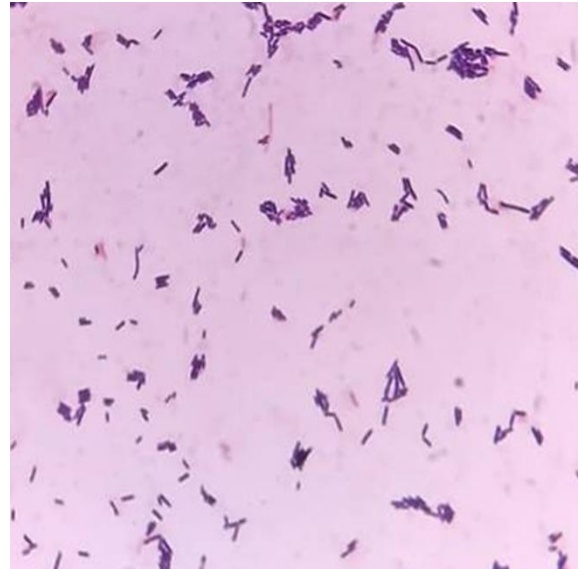


Figura 104. Morfología microscópica de la cepa 1E

Cuadro 41. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1E

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo



Figura 105. Catalasa negativo cepa 1E



Figura 106. Oxidasa negativo cepa 1E

Cuadro 42. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1E

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
+	+					+	+		

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio



Figura 107. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1E

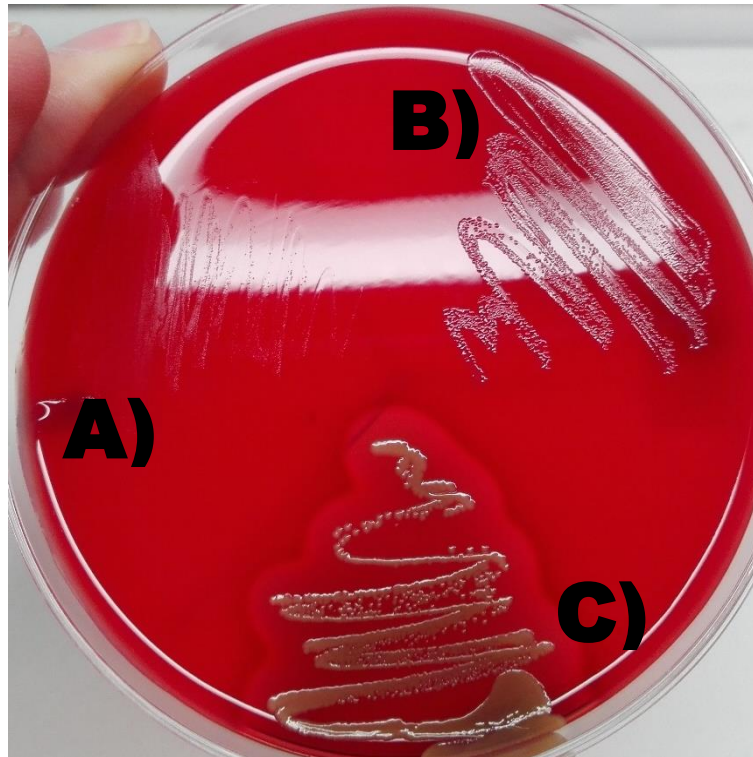


Figura 108. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 1E c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 2E Lactobacillus crispatus (74.8% ID - Identificación no valida)

Cuadro 43. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 2E

NICHO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA
Colon	Redondos de color blanco, brillantes y opacas, de 0.5 – 1 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Bacilos cortos Gram (+) inmóviles, de 1 – 2 μ m, en cadenas y empalizadas

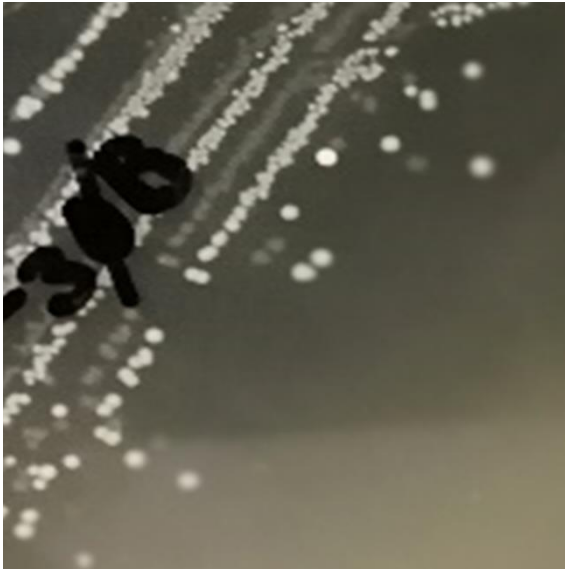


Figura 109. Morfología colonial de la cepa 2E en agar MRS

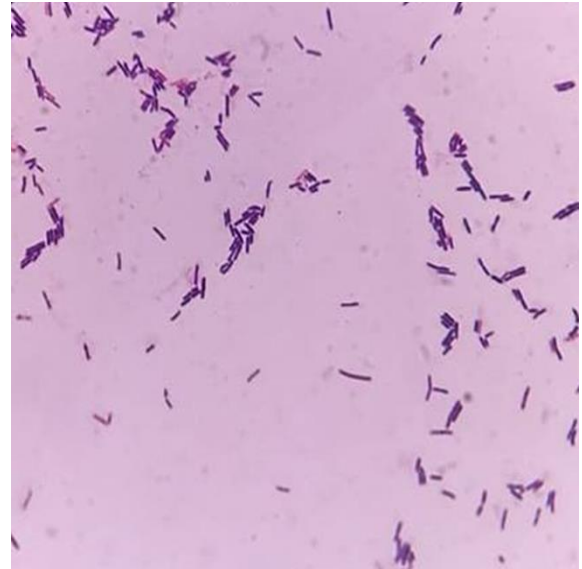


Figura 110. Morfología microscópica de la cepa 2E

Cuadro 44. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 2E

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo

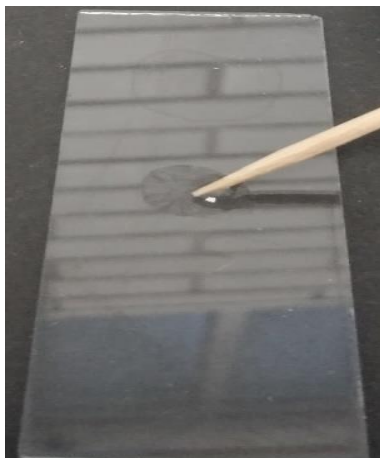


Figura 111. Catalasa negativo cepa 2E

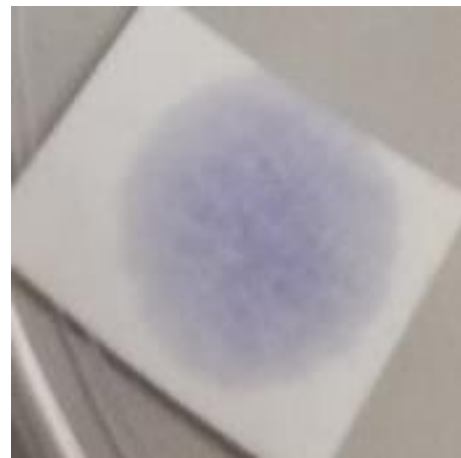


Figura 112. Oxidasa negativo cepa 2E

Cuadro 45. Resultados de prueba de O/F de la cepa 2E

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
+	+		+			+	+		+

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

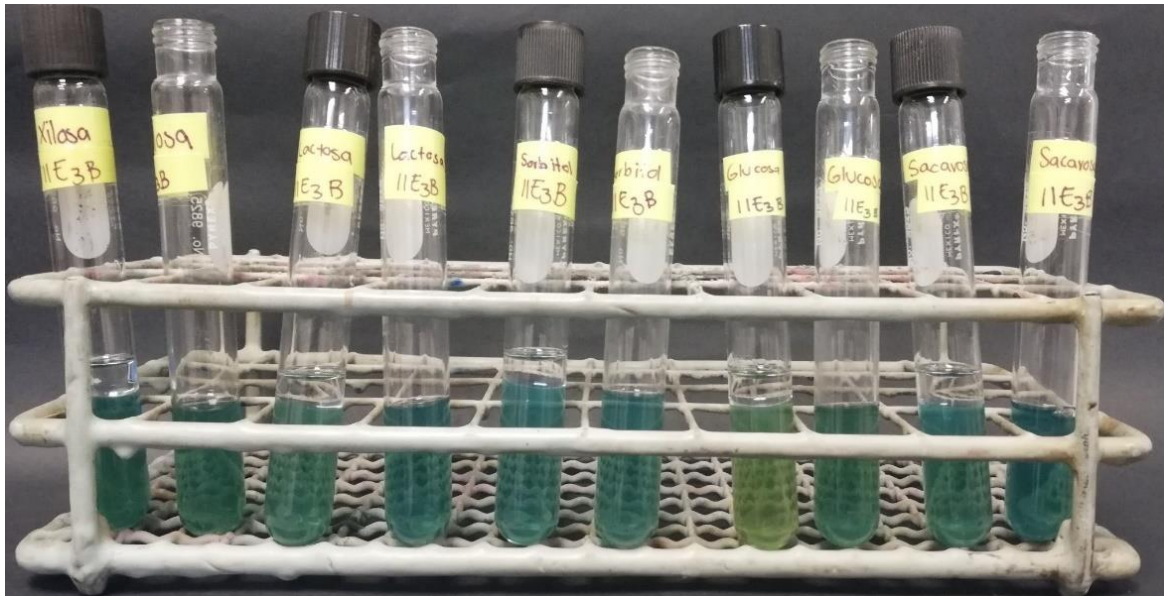


Figura 113. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 2E



Figura 114. Tira API® 50 CH de la cepa 2E tras 24 h de incubación a 30 ± 2 °C

Cuadro 46. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 2E con la galería API® 50 CH en 24 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	-
3	-	28	+
4	-	29	+
5	-	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	+
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-



Figura 115. Tira API® 50 CH de la cepa 2E tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C

Cuadro 47. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 2E con la galería API® 50 CH en 48 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	-
3	-	28	+
4	-	29	+
5	-	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	+
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-

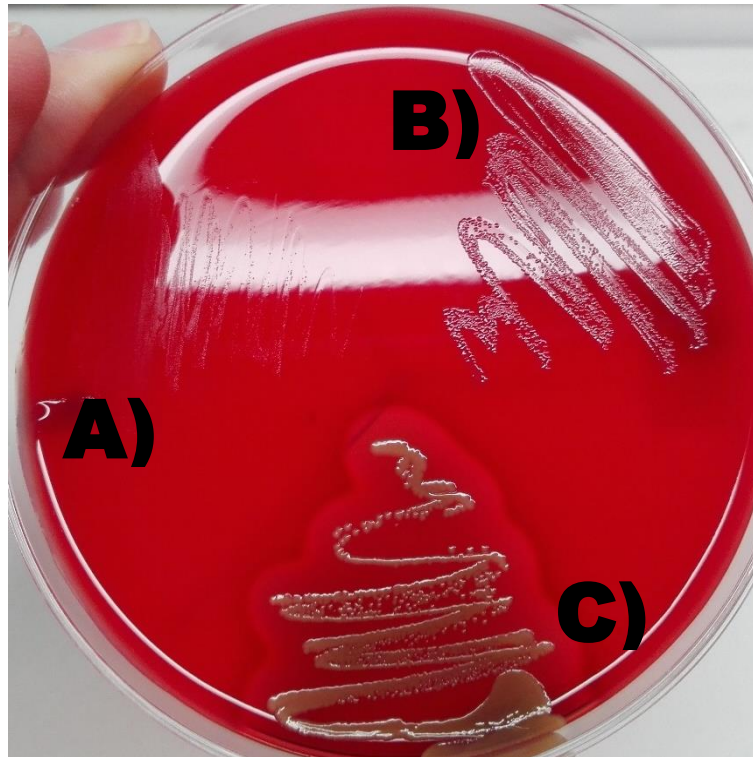


Figura 116. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 2E c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 3E

Cuadro 48. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 3E

NICHOS	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
Colon	Redondas de color blanco, brillantes y opacas, de 0.5 – 1 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Bacilos cortos Gram (+) inmóviles, de 1 – 2 μ m, en cadenas y empalizadas

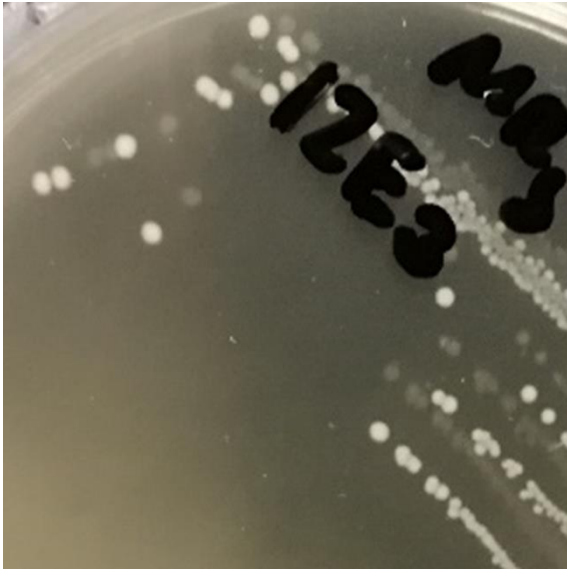


Figura 117. Morfología colonial de la cepa 3E en agar MRS

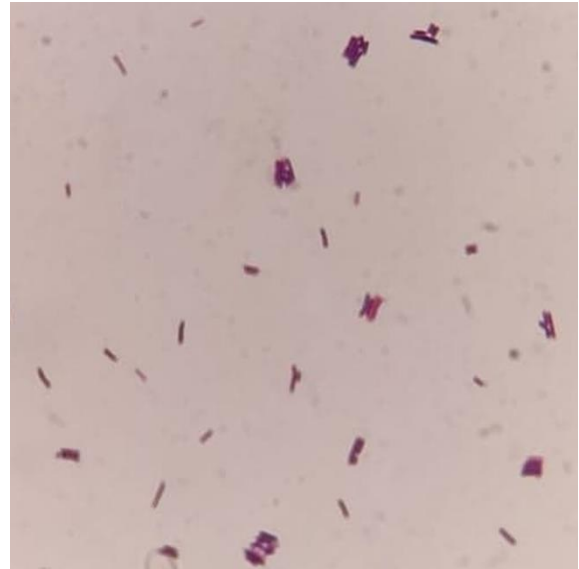


Figura 118. Morfología microscópica de la cepa 3E

Cuadro 49. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 3E

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo



Figura 119. Catalasa negativo cepa 3E

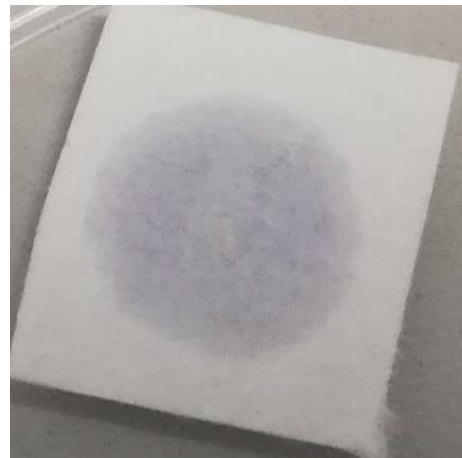


Figura 120. Oxidasa negativo cepa 3E

Cuadro 50. Resultados de prueba de O/F de la cepa 3E

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
+	+					+	+	+	

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

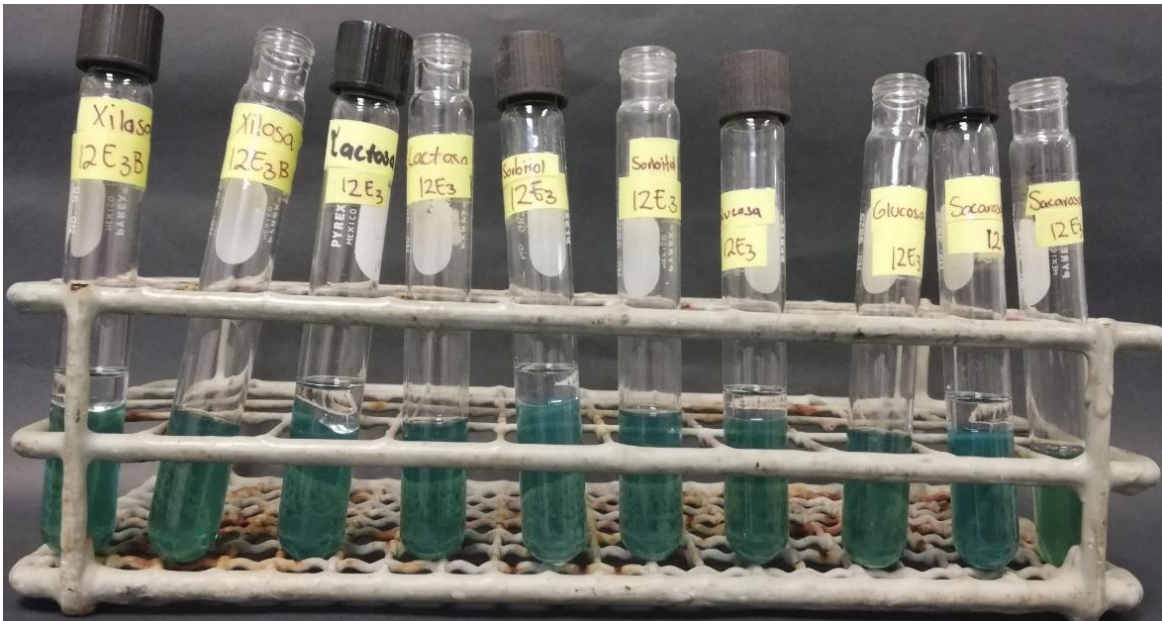


Figura 121. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 3E



Figura 122. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 3E c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 4E: Lactobacillus plantarum 2 (77.4% ID – Identificación Perfil dudoso)

Cuadro 51. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 4E

NICHO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA
Colon	Puntiformes de color blanco, brillantes y opacas, de 0.5 – 1 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Cocobacilos Gram (+) inmóviles, de 1 μ m, en empalizadas



Figura 123. Morfología colonial de la cepa 4E en agar MRS

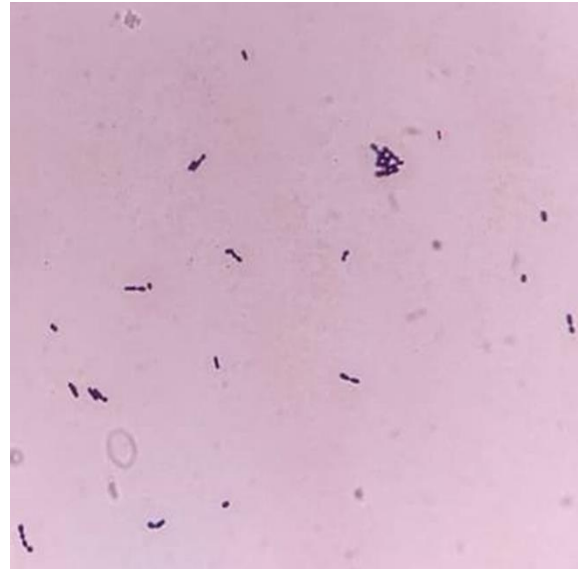


Figura 124. Morfología microscópica de la cepa 4E

Cuadro 52. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 4E

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo

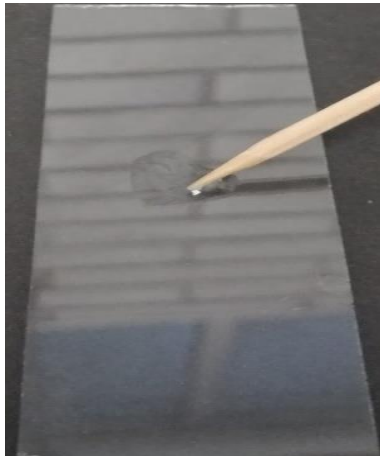


Figura 125. Catalasa negativo cepa 4E

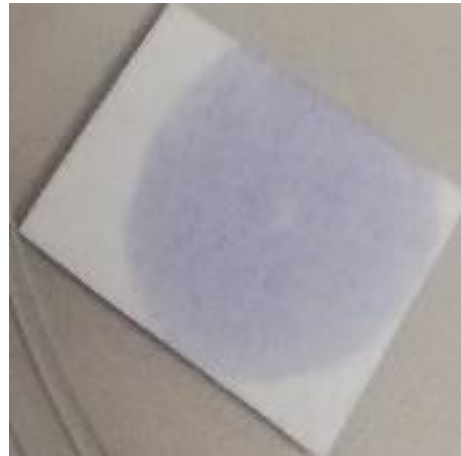


Figura 126. Oxidasa negativo cepa 4E

Cuadro 53. Resultados de prueba de O/F de la cepa 4E

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

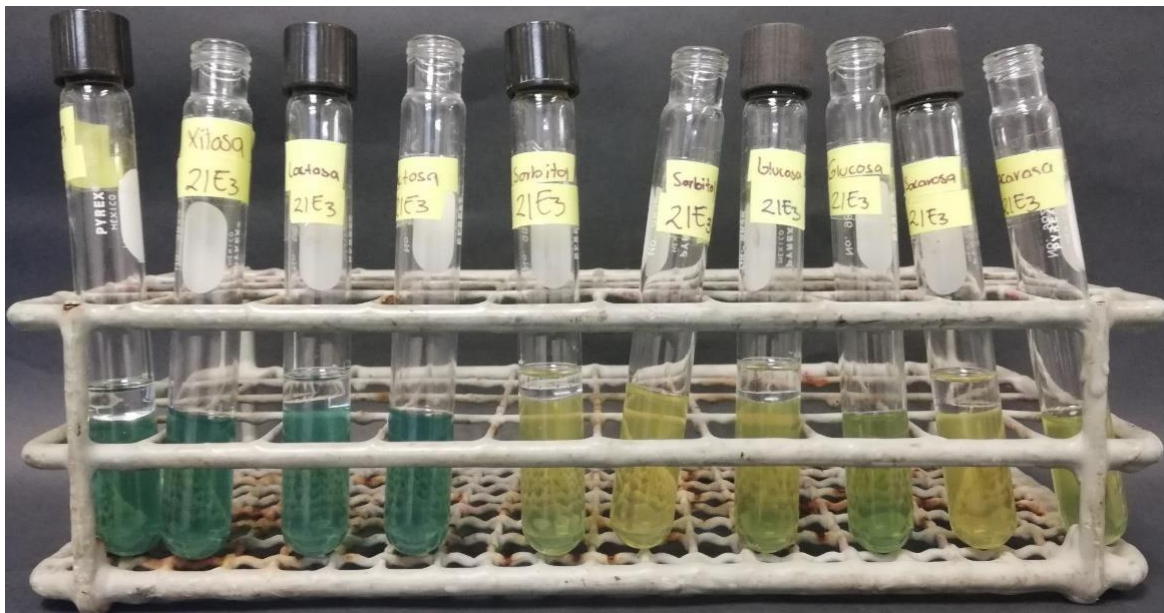


Figura 127. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 4E

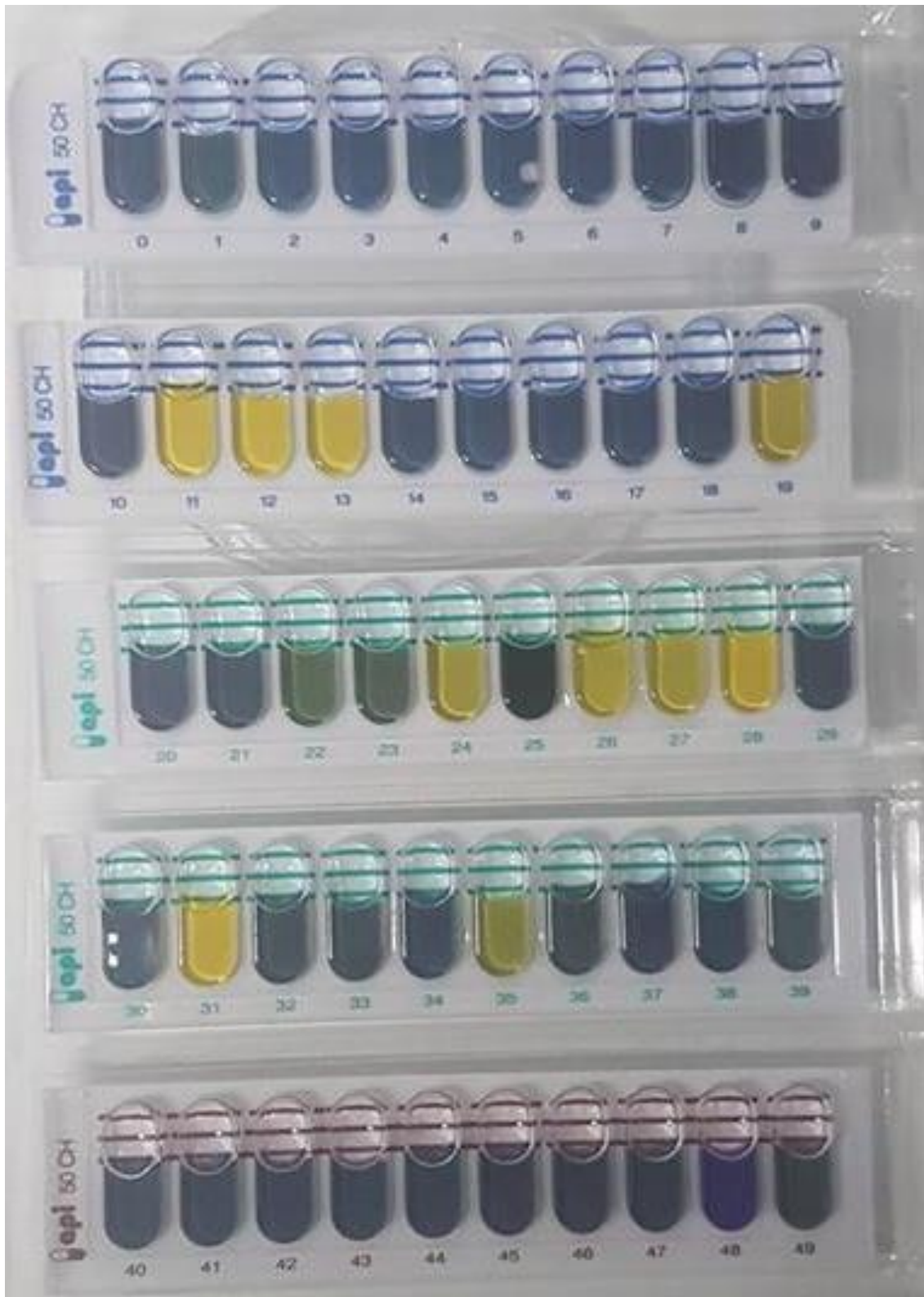


Figura 128. Tira API® 50 CH de la cepa 4E tras 24 h de incubación a $30 \pm 2^\circ\text{C}$

Cuadro 54. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 4E con la galería API® 50 CH en 24 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	+
3	-	28	+
4	-	29	-
5	-	30	-
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	-	35	-
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	+	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	-	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-



Figura 129. Tira API® 50 CH de la cepa 1A tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C

Cuadro 55. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 4E con la galería API® 50 CH en 48 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	+
3	-	28	+
4	-	29	-
5	-	30	-
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	-	35	+
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	+	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	-	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-

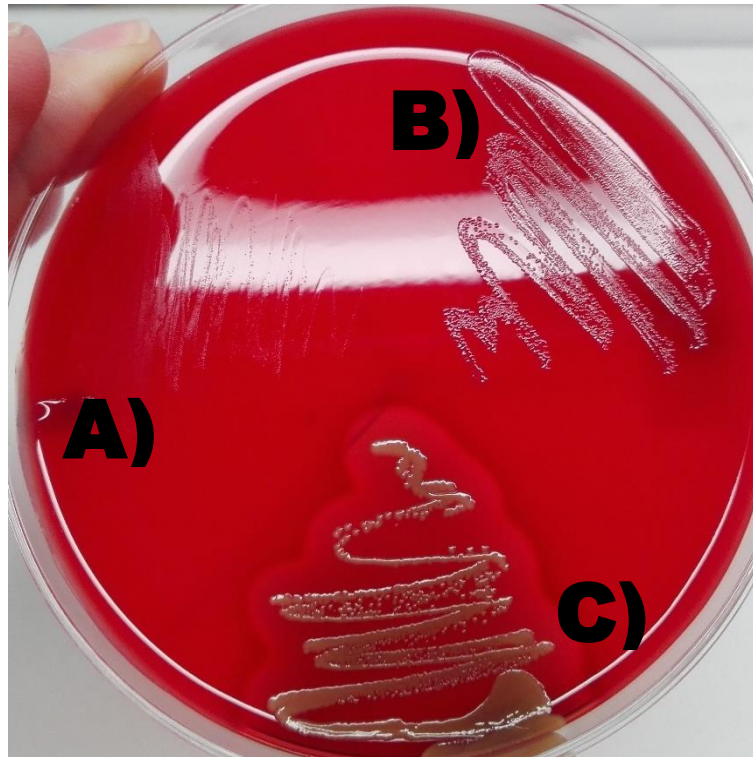


Figura 130. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 4E c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 5E

Cuadro 56. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 5E

NICHOS	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
Colon	Redondas de color blanco, brillantes y traslucidas, de ≤ 0.5 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Bacilos largos Gram (+) inmóviles, de 5 – 7 μm , aisladas y agrupadas en letras chinas



Figura 131. Morfología colonial de la cepa 5E en agar MRS



Figura 132. Morfología microscópica de la cepa 5E

Cuadro 57. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 5E

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo

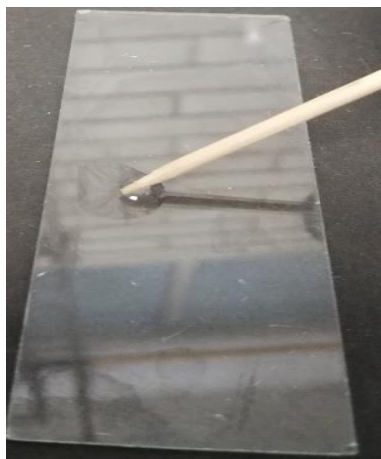


Figura 133. Catalasa negativo cepa 5E



Figura 134. Oxidasa negativo cepa 5E

Cuadro 58. Resultados de prueba de O/F de la cepa 5E

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
+	+	+	+			+	+		

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

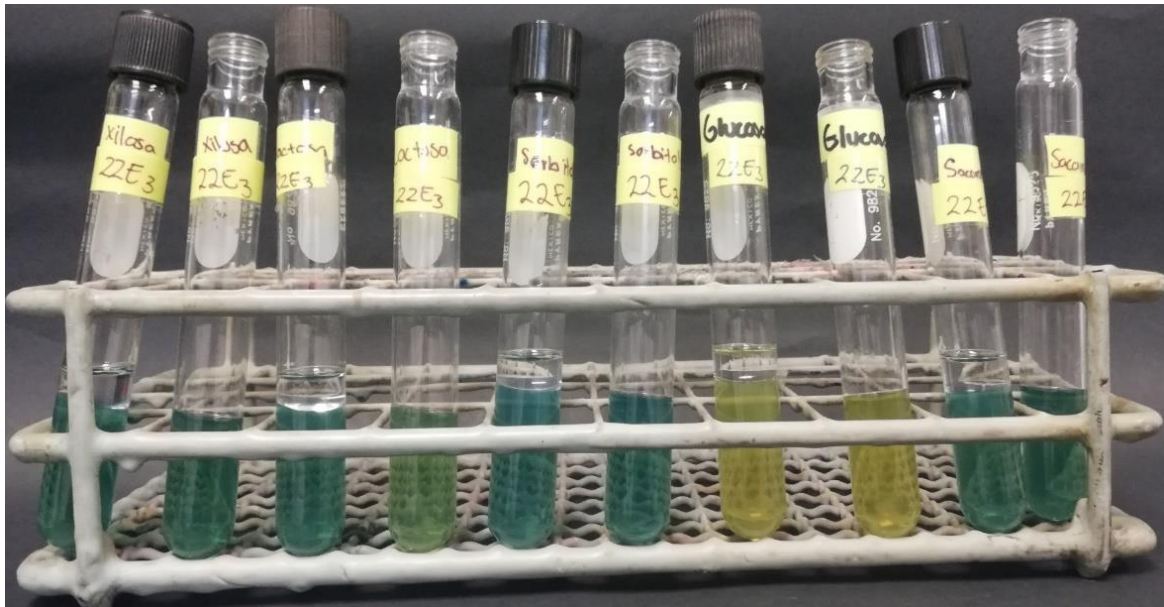


Figura 135. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 5E

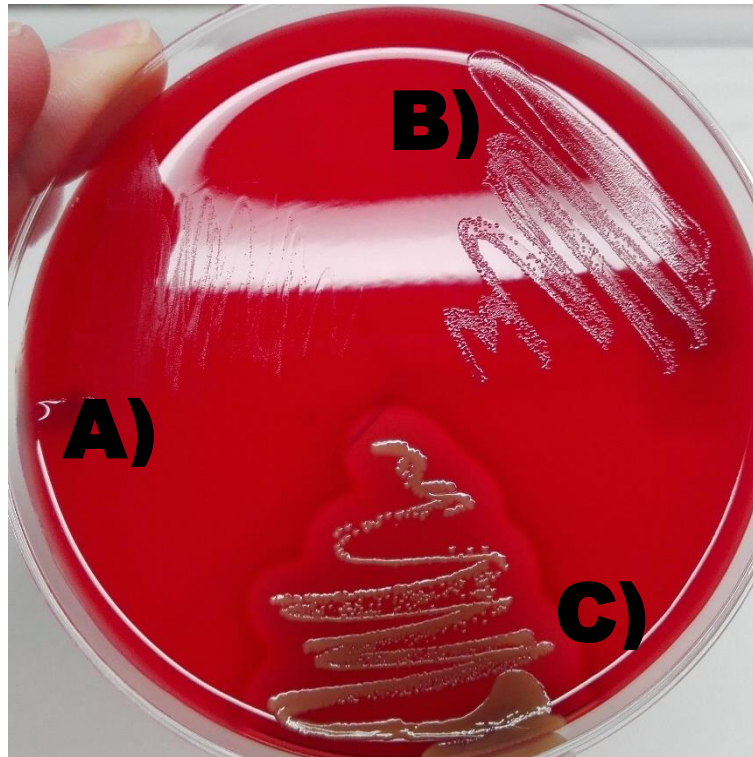


Figura 136. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 5E c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 1F

Cuadro 59. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1F

NICHOS	MORFOLOGIA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCOPICA
Colon	Puntiformes de color blanco, brillantes y traslucidas, de tamaño de 0.5 - 1 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Cocobacilos Gram (+) inmóviles, de 0.5 - 1 µm, aislada y agrupadas en letras chinas

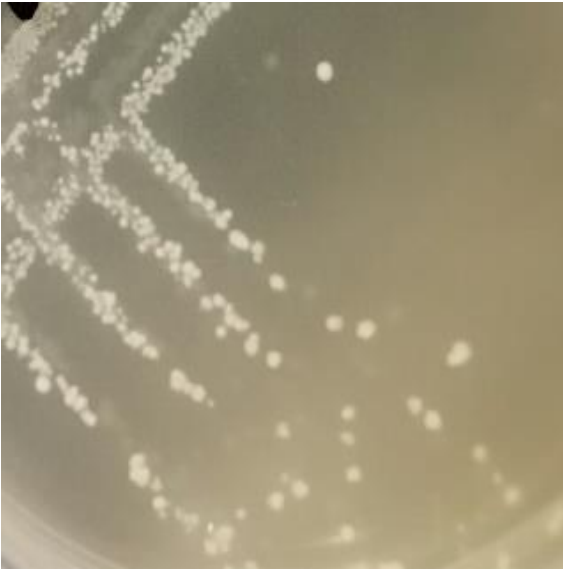


Figura 137. Morfología colonial de la cepa 1F en agar MRS

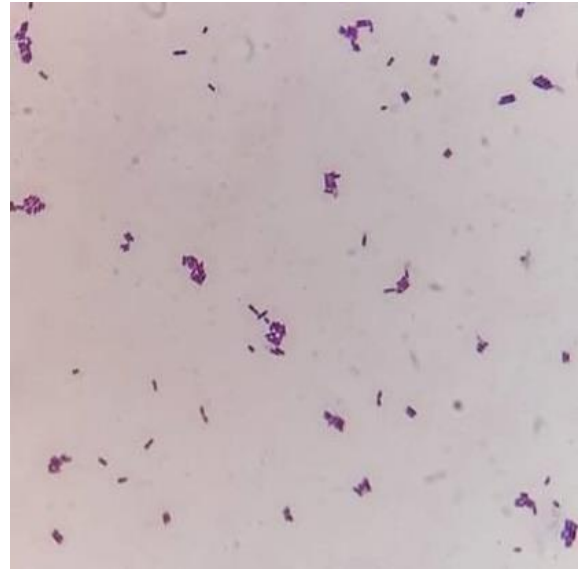


Figura 138. Morfología microscópica de la cepa 1F

Cuadro 60. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1F

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo

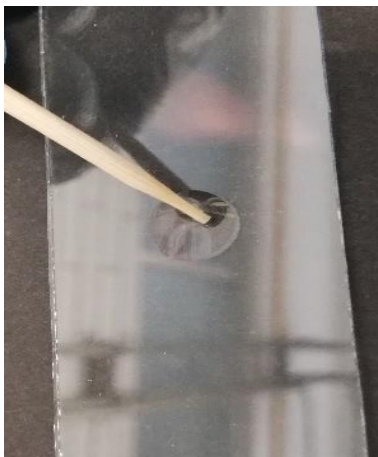


Figura 139. Catalasa negativo cepa 1F

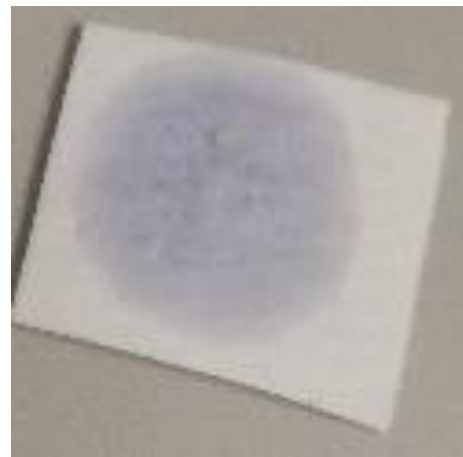


Figura 140. Oxidasa negativo cepa 1F

Cuadro 61. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1F

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
+	+	+	+			+	+		+

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

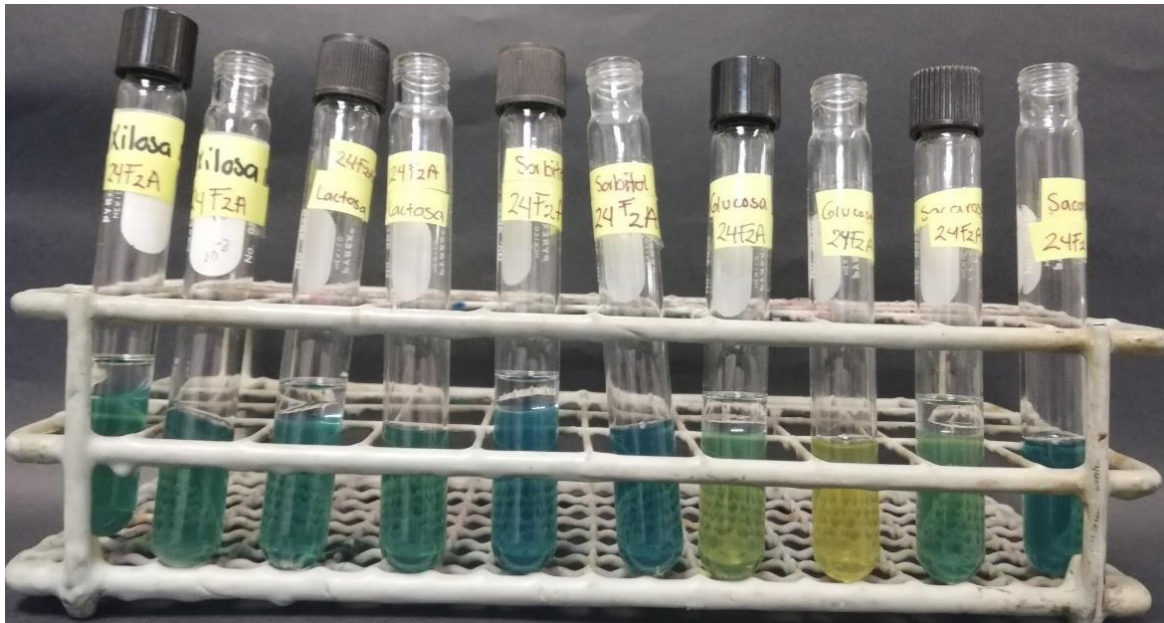


Figura 141. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1F



Figura 142. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 1F c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 2F: Lactococcus lactis ssp lactis 1 (42.3% ID – Identificación Perfil dudoso)

Cuadro 62. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 2F

NICHO	MORFOLOGIA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCOPICA
Colon	Puntiformes de color blanco, brillantes y traslucidas, de 0.5 - 1 mm, convexas con borde ondulado, superficie lisa y de apariencia cremosa	Bacilos cortos Gram (+) inmóviles, de 1 µm, en empalizadas

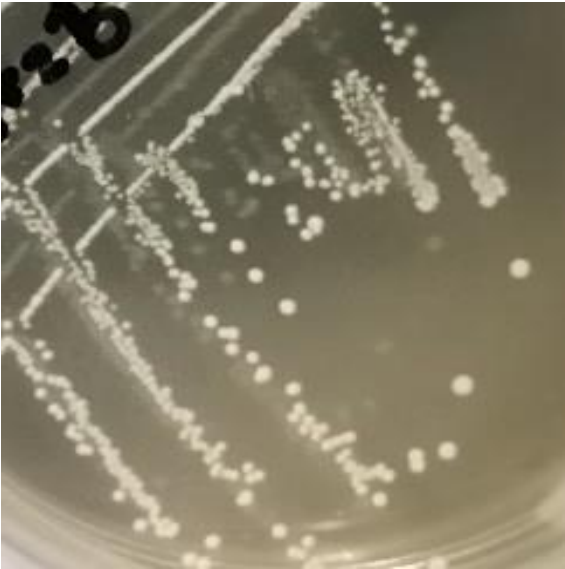


Figura 143. Morfología colonial de la cepa 2F en agar MRS

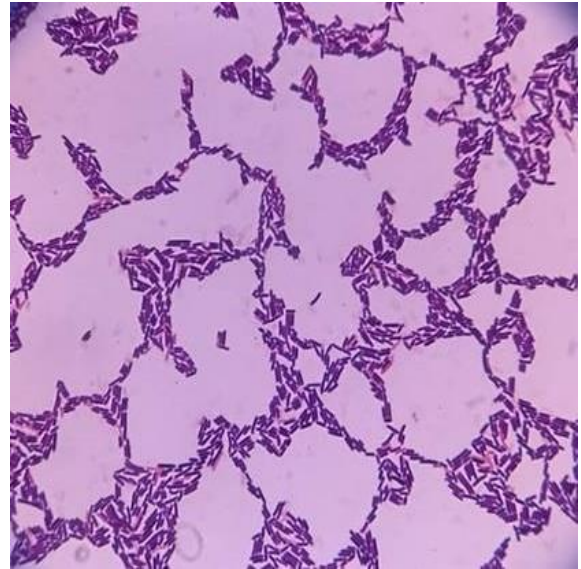


Figura 144. Morfología microscópica de la cepa 2F

Cuadro 63. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 2F

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo

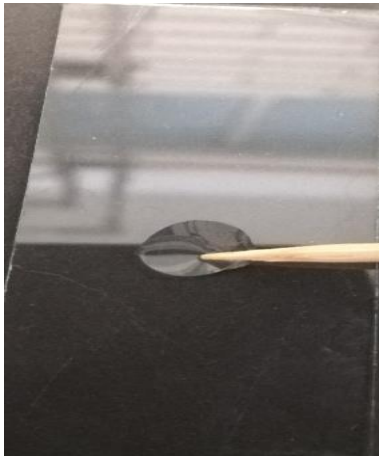


Figura 145. Catalasa negativo cepa 2F



Figura 146. Oxidasa negativo cepa 2F

Cuadro 64. Resultados de prueba de O/F de la cepa 2F

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
		+				+	+		

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

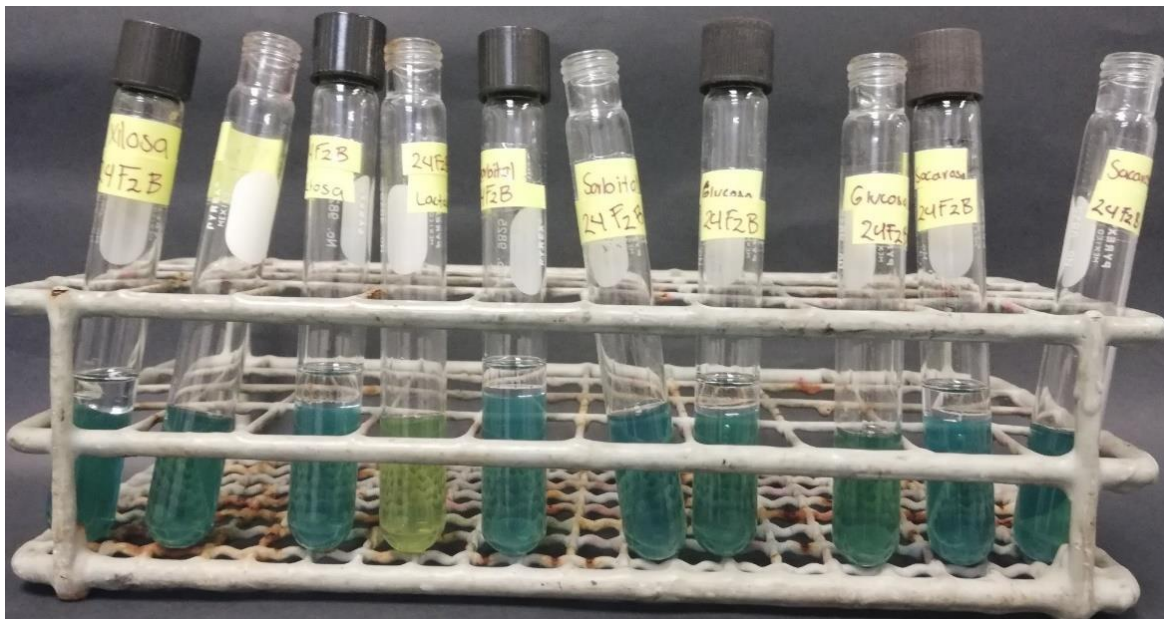


Figura 147. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 2F



Figura 148. Tira API® 50 CH de la cepa 2F tras 24 h de incubación a $30 \pm 2^\circ\text{C}$

Cuadro 65. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 2F con la galería API® 50
CH en 24 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	+
3	-	28	+
4	-	29	+
5	-	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	-
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-



Figura 149. Tira API® 50 CH de la cepa 1A tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C

Cuadro 66. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 2F con la galería API® 50 CH en 48 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	+
3	-	28	+
4	-	29	+
5	-	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	-
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-

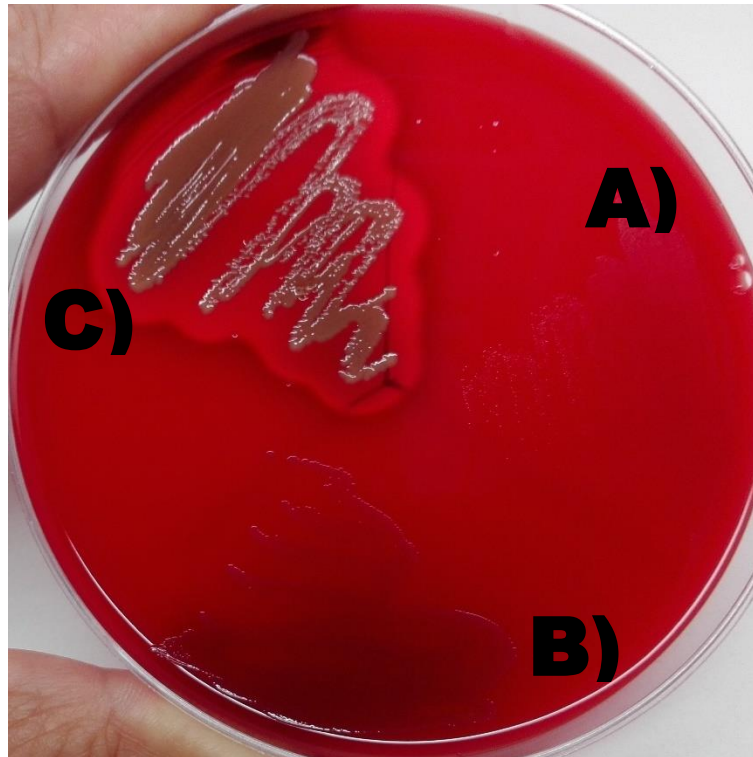


Figura 150. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 2F c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 3F

Cuadro 67. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 3F

NICHOS	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
Colon	Redondas de color blanco, brillantes y opacas, de ≤ 0.5 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Bacilos cortos Gram (+) inmóviles, de 1 μ m, en empalizadas



Figura 151. Morfología colonial de la cepa 3F en agar MRS

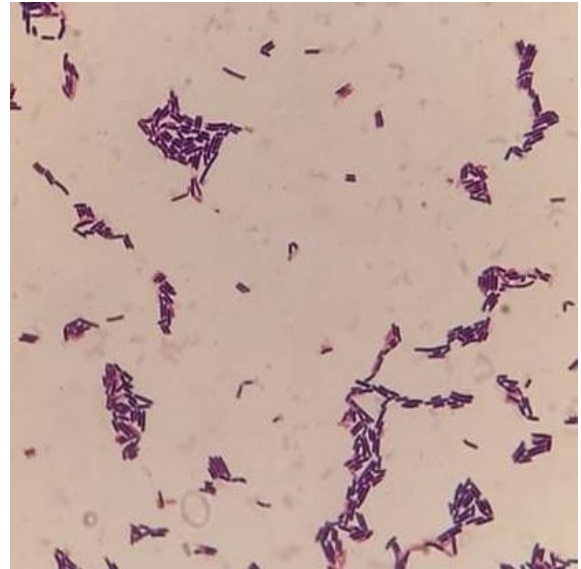


Figura 152. Morfología microscópica de la cepa 3F

Cuadro 68. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 3F

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo



Figura 153. Catalasa negativo cepa 3F

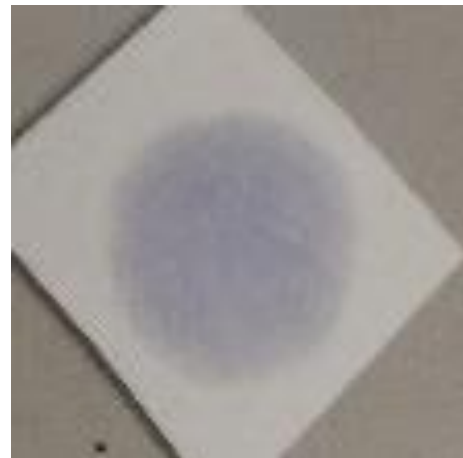


Figura 154. Oxidasa negativo cepa 3F

Cuadro 69. Resultados de prueba de O/F de la cepa 3F

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
+	+					+	+	+	

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

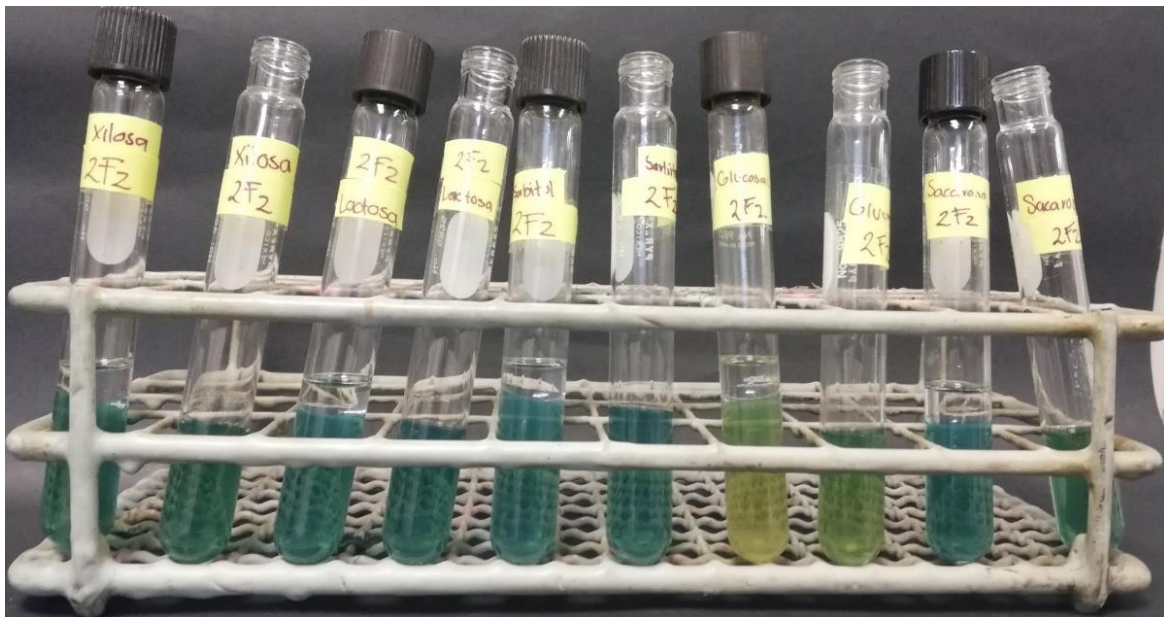


Figura 155. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 3F

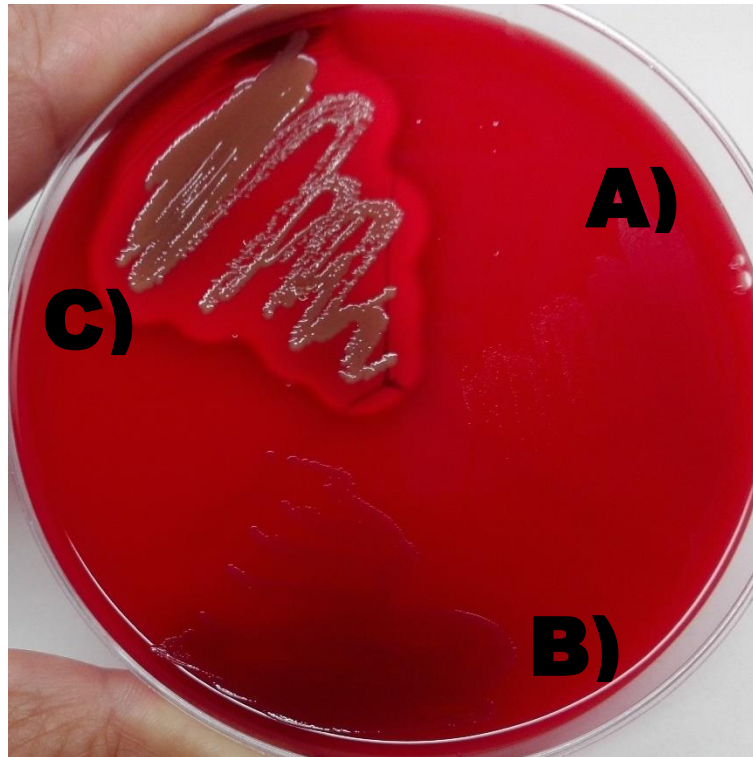


Figura 156. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 3F c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 1G Lactobacillus crispatus (56.5% ID - Identificación Perfil dudoso)

Cuadro 70. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1G

NICHO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
Duodeno	Puntiformes de color blanco, brillantes y opacas, de 0.5 - 1 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Cocobacilos Gram (+) inmóviles, de 0.5 - 1 μ m, aislada y agrupadas en letras chinas



Figura 157. Morfología colonial de la cepa 1G en agar MRS

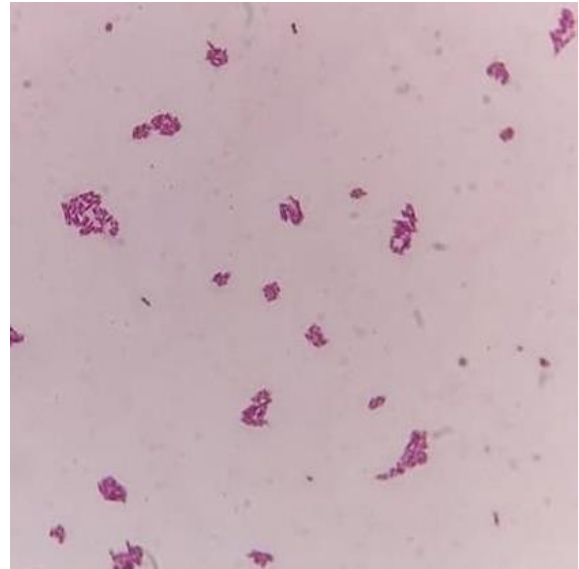


Figura 158. Morfología microscópica de la cepa 1G

Cuadro 71. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1G

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo



Figura 159. Catalasa negativa cepa 1G



Figura 160. Oxidasa negativa cepa 1G

Cuadro 72. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1G

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂
(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
+	+	+	+			+	+	+	+

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

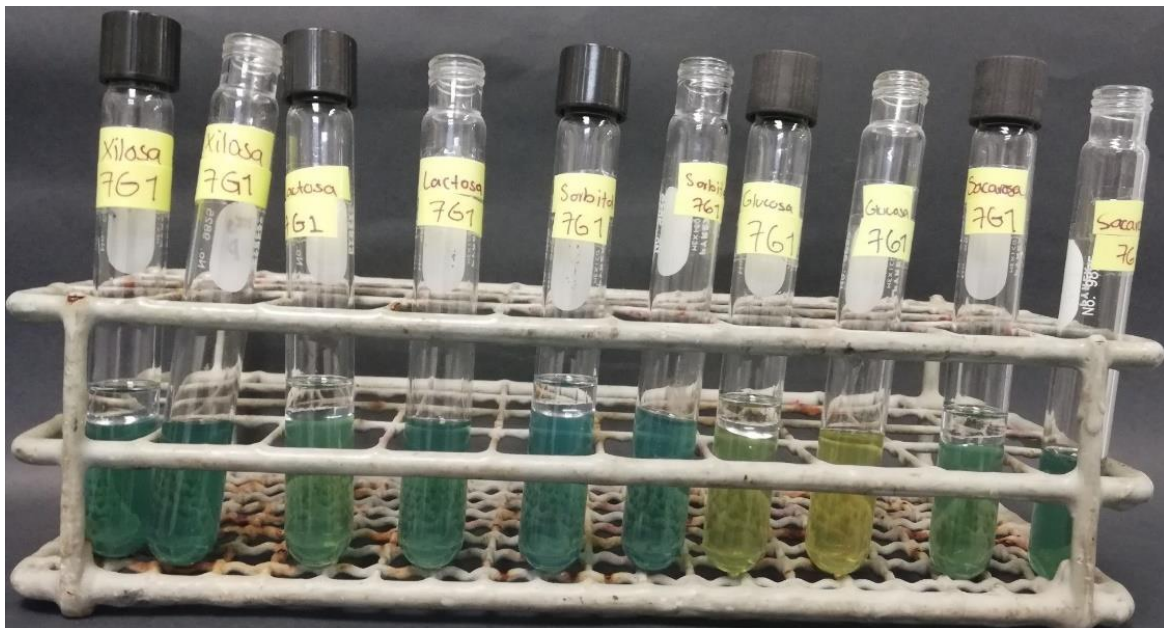


Figura 161. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1G



Figura 162. Tira API® 50 CH de la cepa 1G tras 24 h de incubación a 30 ± 2 °C

Cuadro 73. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1G con la galería API® 50 CH en 24 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	+
3	-	28	+
4	-	29	+
5	-	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	-
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-

Cuadro 74. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1G con la galería API® 50 CH en 48 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	+
3	-	28	+
4	-	29	+
5	-	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	-
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-



Figura 164. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. Lactis* ATCC 0205V b) cepa 1G c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 1H: Lactococcus lactis ssp lactis 1(56.5% ID – Identificación Perfil dudoso)

Cuadro 75. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 1H

NICHO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
Duodeno	Redondas de color blanco, brillantes y traslucidas, de ≤ 0.5 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Cocobacilos Gram (+) inmóviles, de $1 \mu\text{m}$, aislados y en racimos

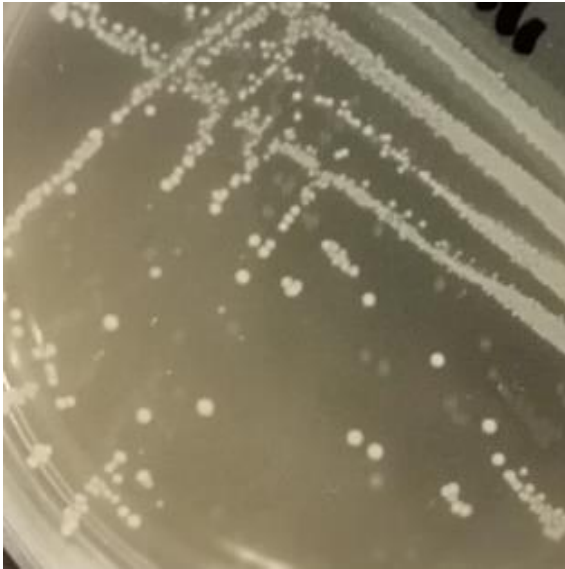


Figura 165. Morfología colonial de la cepa 1H en agar MRS

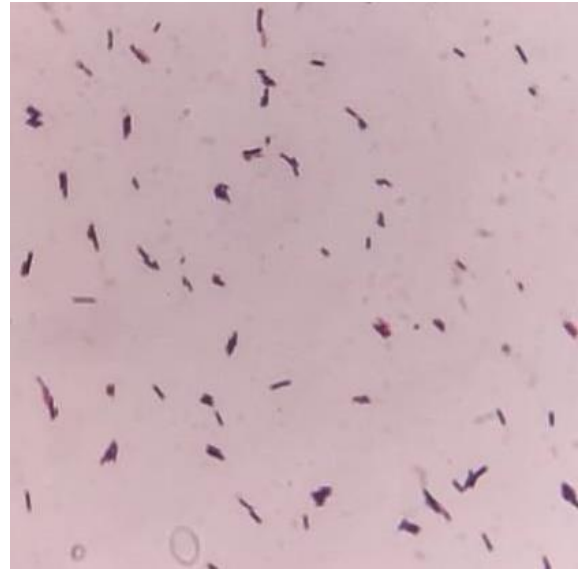


Figura 166. Morfología microscópica de la cepa 1H

Cuadro 76. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 1H

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo

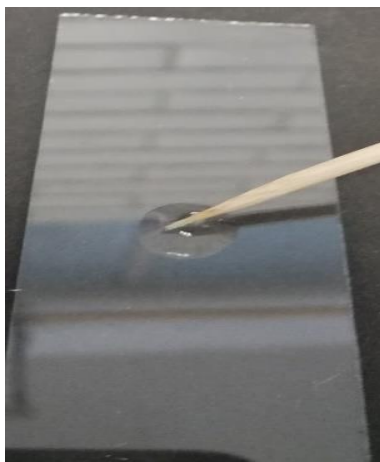


Figura 167. Catalasa negativo cepa 1H



Figura 168. Oxidasa negativo cepa 1H

Cuadro 77. Resultados de prueba de O/F de la cepa 1H

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
+	+					+	+		

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

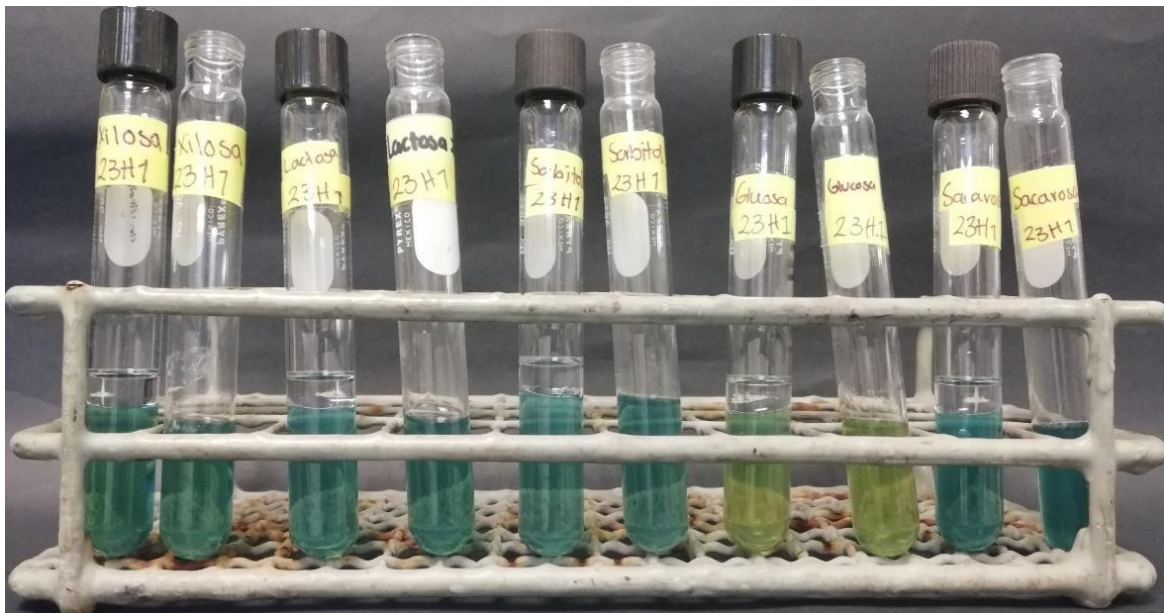


Figura 169. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 1H



Figura 170. Tira API® 50 CH de la cepa 1H tras 24 h de incubación a 30 ± 2 °C

Cuadro 78. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1H con la galería API® 50 CH en 24 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	-
3	-	28	+
4	-	29	+
5	-	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	-
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-



Figura 171. Tira API® 50 CH de la cepa 1H tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C

Cuadro 79. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1H con la galería API® 50 CH en 48 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	+
3	-	28	+
4	-	29	+
5	-	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	-
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-

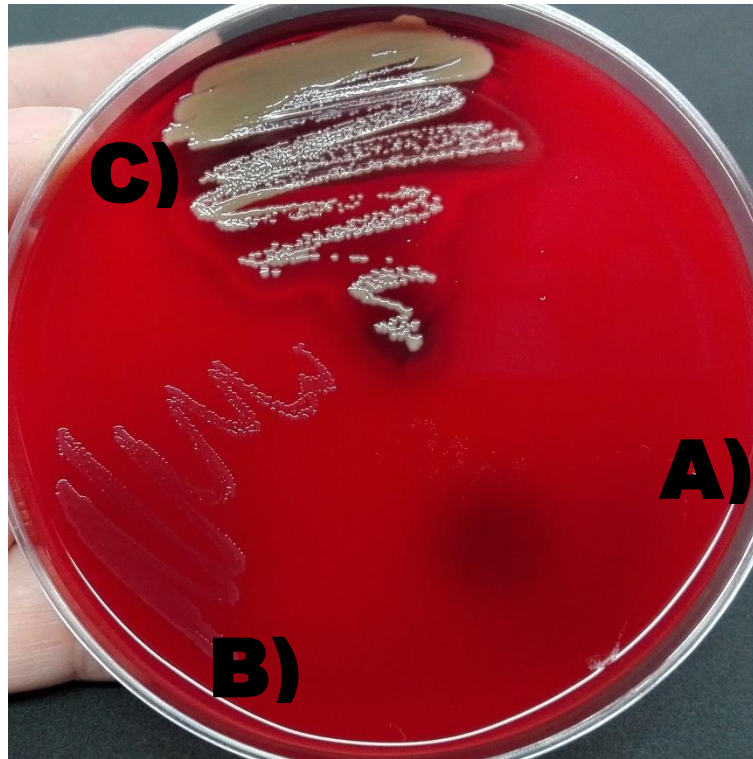


Figura 172. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 1H c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 2H

Cuadro 80. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 2H

NICHO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
Duodeno	Redondas de color blanco, brillantes y traslucidas, de 0.5 - 1 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Bacilos cortos Gram (+) inmóviles, de 1 – 2 μ m, en cadenas y agrupadas en letras chinas

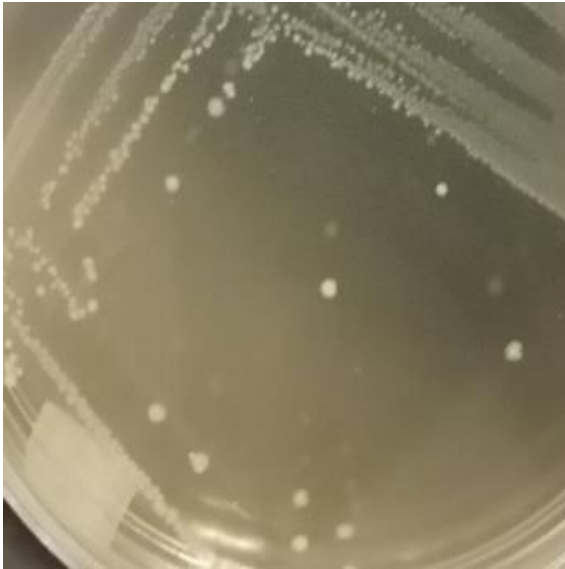


Figura 173. Morfología colonial de la cepa 2H en agar MRS

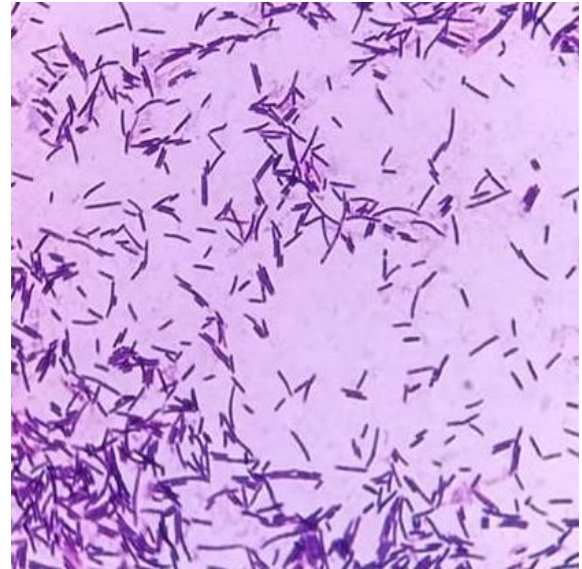


Figura 174. Morfología microscópica de la cepa 2H

Cuadro 81. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 2H

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo



Figura 175. Catalasa negativo cepa 2H



Figura 176. Oxidasa negativo cepa 2H

Cuadro 82. Resultados de prueba de O/F de la cepa 2H

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
+	+	+	+		+	+	+	+	+

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

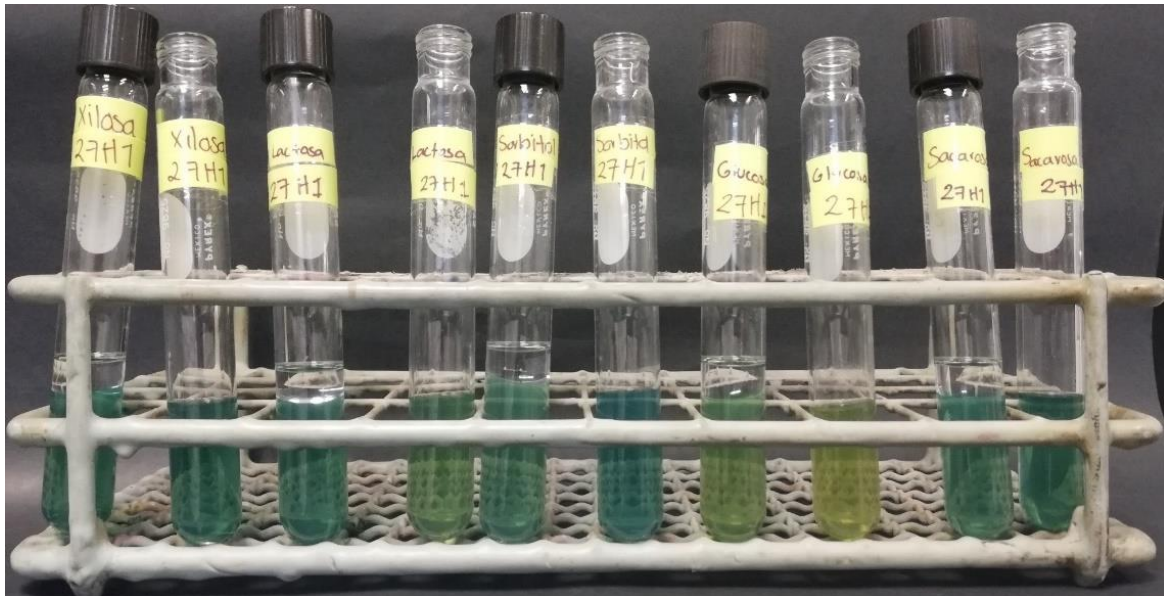


Figura 177. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 2H

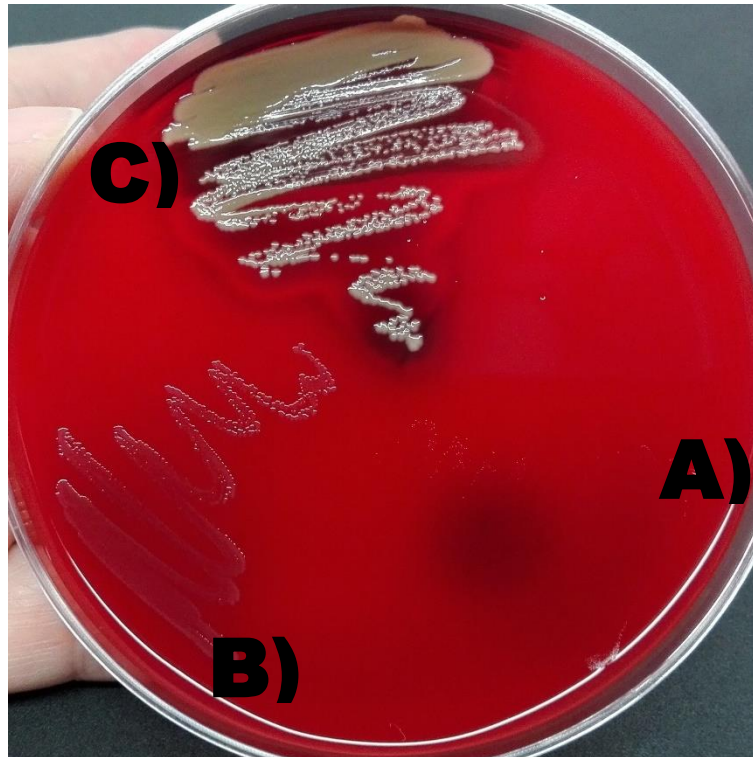


Figura 178. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 2H c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 3H

Cuadro 83. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 3H

NICHOS	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
Duodeno	Redondas de color blanco, brillantes y opacas, de 1 - 2 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Bacilos cortos Gram (+) inmóviles, de 1 – 2 µm, en cadenas y empalizadas

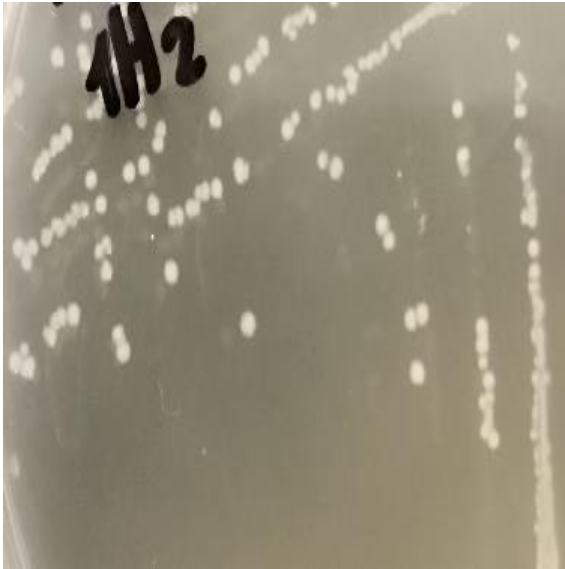


Figura 179. Morfología colonial de la cepa 3H en agar MRS

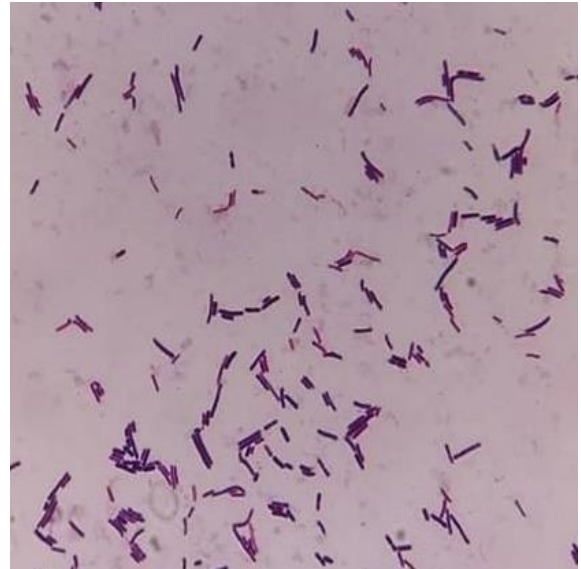


Figura 180. Morfología microscópica de la cepa 3H

Cuadro 84. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 3H

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo

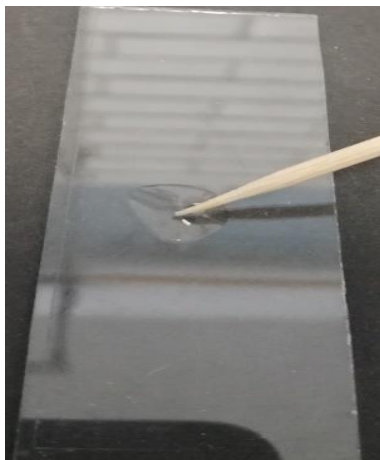


Figura 181. Catalasa negativo cepa 3H

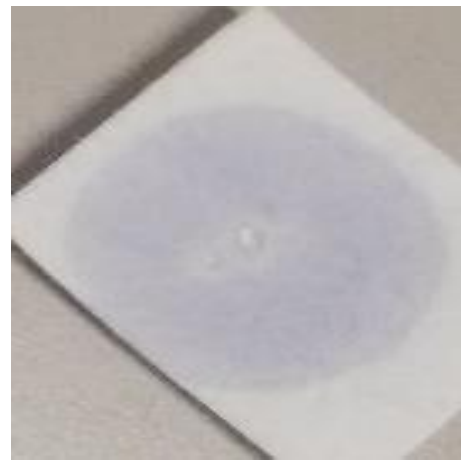


Figura 182. Oxidasa negativo cepa 3H

Cuadro 85. Resultados de prueba de O/F de la cepa 3H

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)	O ₂ (+)	O ₂ (-)
+	+	+				+	+	+	+

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

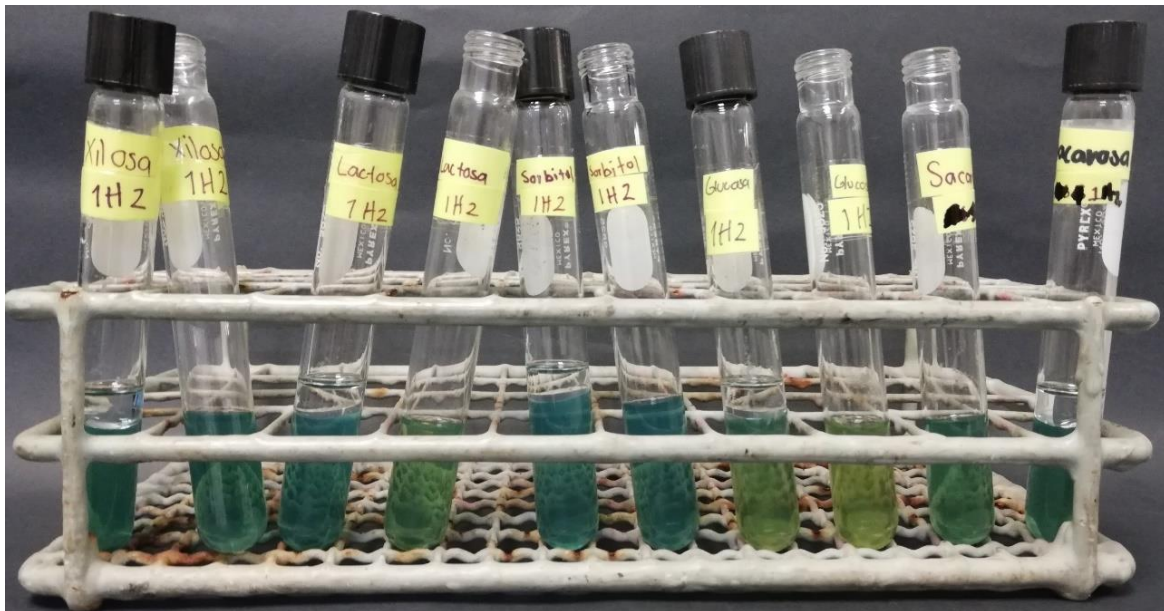


Figura 183. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 3H

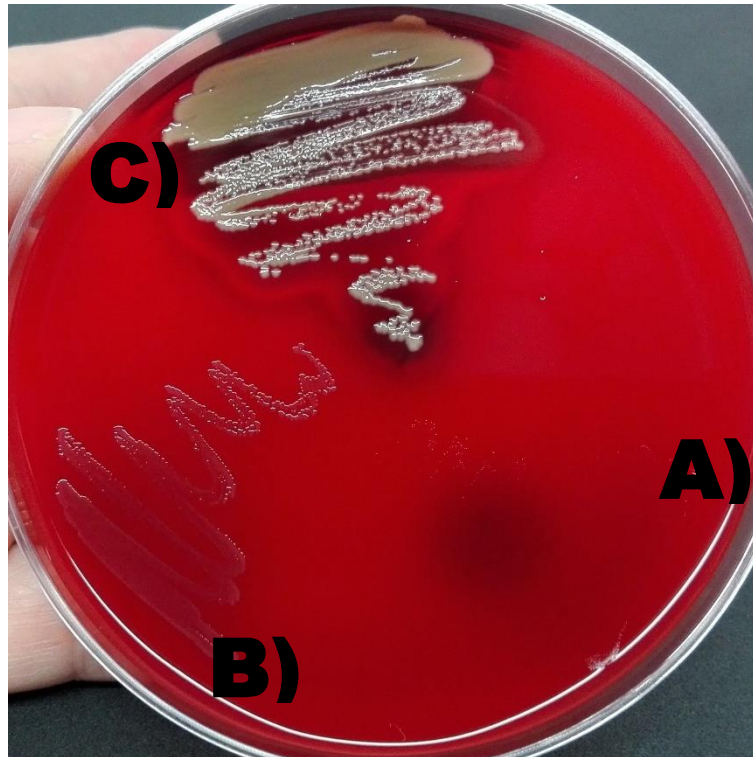


Figura 184. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 3H c) control positivo: *S. aureus* 6538P

Cepa 11: *Lactobacillus crispatus* (77% ID - Identificación no valida)

Cuadro 86. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa 11

NICHO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
Duodeno	Redondas de color blanco, brillantes y traslucidas, de 0.5 - 1 mm, convexas con borde liso, superficie lisa y apariencia cremosa	Bacilos cortos Gram (+) inmóviles, de 1 – μ m, en cadena

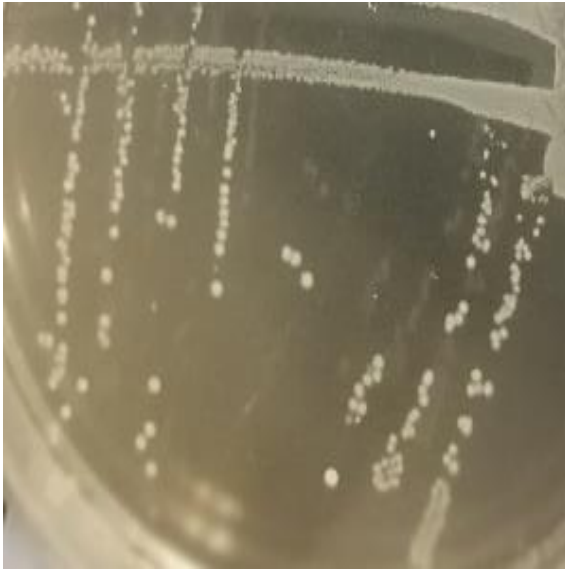


Figura 185. Morfología colonial de la cepa 11 en agar MRS

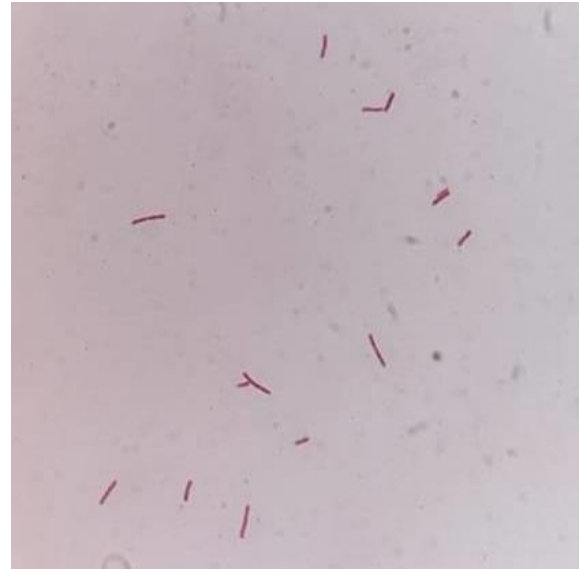


Figura 186. Morfología microscópica de la cepa 11

Cuadro 87. Resultados de las pruebas catalasa y oxidasa de la cepa 11

CATALASA	OXIDASA
Negativo	Negativo

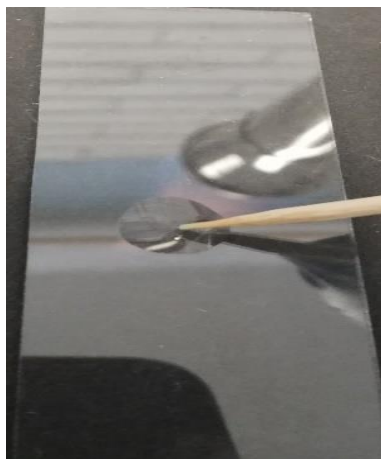


Figura 187. Catalasa negativo cepa 11



Figura 188. Oxidasa negativo cepa 11

Cuadro 88. Resultados de prueba de O/F de la cepa 11

XILOSA		LACTOSA		SORBITOL		GLUCOSA		SACAROSA	
O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂
(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
+	+	+	+			+	+	+	+

O₂ (+): En condiciones aerobio

O₂ (-): En condiciones anaerobio

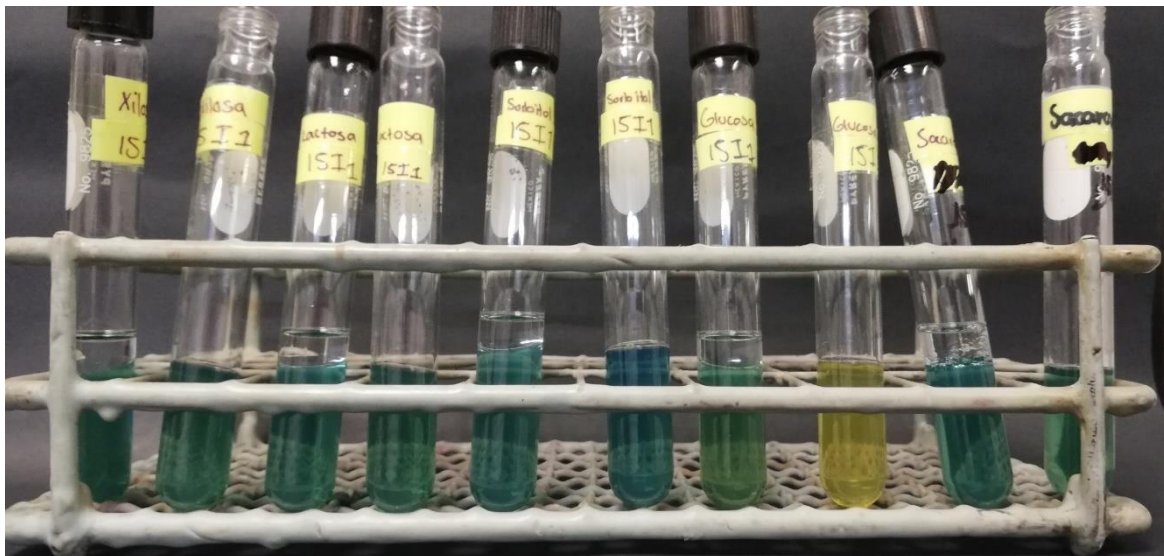


Figura 189. Representación de resultados de la prueba O/F de la cepa 11



Figura 190. Tira API® 50 CH de la cepa 1I tras 24 h de incubación a 30 ± 2 °C

Cuadro 89. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1I con la galería API® 50 CH en 24 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 24 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	-
3	-	28	+
4	-	29	+
5	-	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	+
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-



Figura 191. Tira API® 50 CH de la cepa 1I tras 48 h de incubación a 30 ± 2 °C

Cuadro 90. Perfil de utilización de carbohidratos de la cepa 1I con la galería API® 50 CH en 48 h

NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h	NÚMERO DE MICROTUBO	RESULTADOS A LAS 48 h
0	-	25	+
1	-	26	+
2	-	27	+
3	-	28	+
4	-	29	+
5	-	30	+
6	-	31	+
7	-	32	-
8	-	33	-
9	-	34	-
10	+	35	+
11	+	36	-
12	+	37	-
13	+	38	-
14	-	39	-
15	-	40	-
16	-	41	-
17	-	42	-
18	-	43	-
19	-	44	-
20	-	45	-
21	-	46	-
22	+	47	-
23	-	48	-
24	+	49	-

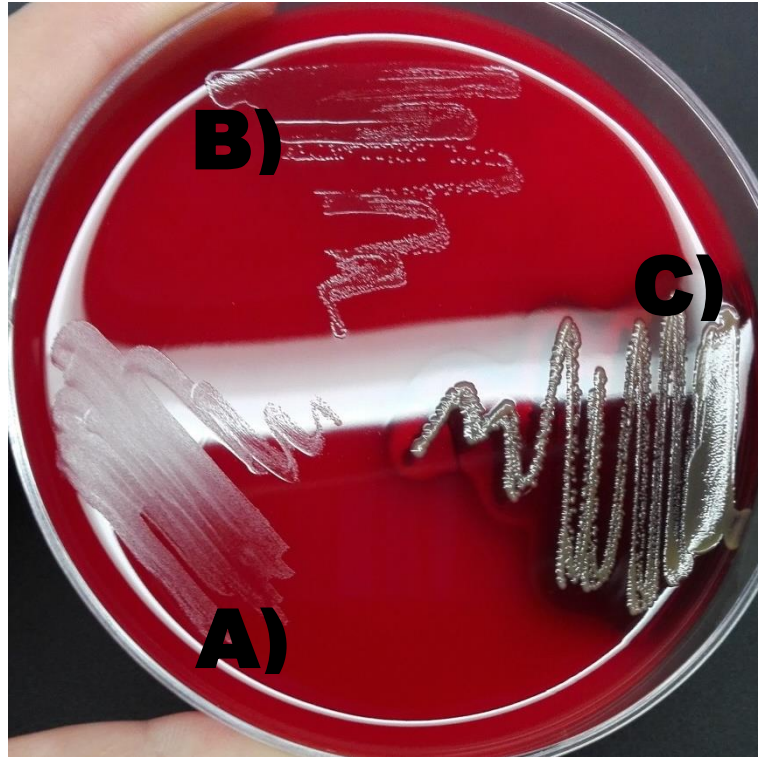


Figura 192. Representación de resultados de hemólisis a) control negativo: *Lc. lactis* ATCC 0205V b) cepa 11 c) control positivo: *S. aureus* 6538P

CONCLUSIONES

- Se lograron aislar cepas de diferentes partes del tracto intestinal (yeyuno, duodeno y colon) de un ratón infante de 4 semanas.
- Se realizaron ajustes metodológicos para el correcto desarrollo de BAL, como el uso de caldo MRS y atmósferas modificadas para obtener mejores cultivos.
- Los ajustes metodológicos realizados para el aislamiento de las cepas a partir de tracto intestinal de ratón infante, llevaron a la obtención de cepas Gram positivas, catalasa, oxidasa y hemolisinas negativas.
- Se identificaron 10 cepas de BAL que corresponden a los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus* mediante el perfil de fermentación de carbohidratos API® 50 CH. Se identificó mediante las pruebas empleadas, la especie *Lactobacillus crispatus* con mayor abundancia en colon y duodeno.
- El sistema API® 50 CH, es una herramienta complementaria en la identificación rápida de BAL, aunque se recomienda realizar pruebas confirmativas mediante el uso de técnicas moleculares para poder corroborar género y especies.
- Se aplicaron condiciones específicas para la preservación de BAL, mediante la suspensión de las cepas en leche descremada al 10% y caldo MRS estériles para su liofilización.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFRC, R. F. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology*, 66(5), 365 -378.
- Alaniz, R., Martín del Campo, C., Juan, A., & Rosas, B. (2006). Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas con Acción Antagónica en Contra de Patógenos Bacterianos de Importancia en Salud Pública. *XVII semana de la investigación científica en el CUCBA. Vía on line*, 703-705.
- Amara, A. A., & Shibl, A. (2015). Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi pharmaceutical journal*, 23(2), 107-114.
- Anderson, M. D. R. P., & Calderón, V. (1999). *Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas*. Ediciones Diaz de Santos pp 306.
- API web (2018). Retrieved Octubre 2, 2018, from: <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Identify>
- Araujo, L. J. Á. (2010). Bacterias lácticas como terapia alternativa para enfermedades inflamatorias intestinales. *Revista de Educación Bioquímica*, 29(1), 2-7.
- Axelsson, L. T. 1993. Chap. 1: Lactic acid bacteria: Classification and physiology En: von Wright A., Salminen, S. *Lactic acid bacteria*. 1er. ed. Marcel Dekker Inc. N. Y. EUA.
- Barman, M., Unold, D., Shifley, K., Amir, E., Hung, K., Bos, N., & Salzman, N. (2008). Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. *Infection and immunity*, 76(3), 907-915.
- Bennett, R. W., Hait, J. M., & Tallent, S. M. (2001). *Staphylococcus aureus. Guide to foodborne pathogens*, 201-220.
- Berkeley, R. C. W., Logan, N. A., Shute, L. A., & Capey, A. G. (1984). Identification of Bacillus species. *Methods in microbiology*, 16, 291-328.
- BioMérieux. (2002). Ficha técnica de referencia para utilizar el método API 50 CHL.
- Cabello, R. R. (2007). *Microbiología y parasitología humana/Microbiology and Human Parasitology: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias/Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases*. Ed. Médica Panamericana pp 876.
- Cachat, E., & Priest, F. G. (2005). *Lactobacillus suntoryeus* sp. nov., isolated from malt whisky distilleries. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(1), 31-34.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281-370.
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., & Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3), 483-499.
- Castro, L. A., & De Rovetto, C. (2006). Probióticos: utilidad clínica. *Colombia Médica*, 37(4).

- CDC – OMS, (2009). Apéndice 2. Medios, reactivos y control de calidad.
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). General characteristics of *Staphylococcus aureus*. *Revista latinoamericana de patología clínica y medicina de laboratorio*, 61(1), 28-40.
- Collado, M. (2004). *Caracterización de cepas del género Bifidobacterium con carácter probiótico* (Doctoral dissertation, Tesis Doctorado. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 2004 283p).
- Cortez, R.J., Aranguren, A.J., Gonzalez, M., Perazzo, Y. & López-Ortega, A.A. (2014). Aislamiento e identificación de bacterias ácido láctico del género *Lactobacillus spp* a partir de heces de perros (*Canis lupus familiaris*) mestizos lactantes. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, 19(1), 5-10.
- Cowan, S. T. (2004). *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge university press.
- De Man, J. C., Rogosa, D., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of applied Bacteriology*, 23(1), 130-135
- Deibel, R. H., & Evans, J. B. (1960). Modified benzidine test for the detection of cytochrome-containing respiratory systems in microorganisms. *Journal of bacteriology*, 79(3), 356.
- Difco™ & BBL™. Ficha técnica de Lactobacilli MRS Broth. 2nd Edition.
- Drider, D., & Rivera, V. M. (2016). *Bacterias ácido lácticas: fundamentos y aplicaciones*. Alfaomega: México.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2014). Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 1: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until October 2014. *EFSA Journal*, 12(12), 3938.
- FAO. (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación.
- FAO/OMS. (2002). Probióticos en los alimentos propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. FAO/OMS.
- Fooks, L. J., Fuller, R., & Gibson, G. R. (1999). Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International dairy journal*, 9(1), 53-61.
- Forbes, B. A. (2009). *Diagnóstico microbiológico*. Ed. Médica Panamericana pp 80-83.
- G. A. (1998). Bacteriological analytical manual. *AOAC International, Gaithersburg*, 12-01.
- Gagnon, M., Hunting, W. M., & Esselen, W. B. (1959). New method for catalase determination. *Analytical Chemistry*, 31(1), 144-146.
- Galindo, A. B. (2004). *Lactobacillus plantarum 44A as a live feed supplement for freshwater fish*, 18.

- Gámez, H. J., Aguirre, D., & Ramírez, C. (2009). Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. *Revista MVZ Córdoba*, 14(2), 1723-1735.
- Gil, L. G. P., & Catalina, A. L. (2018). La microbiota, forjando el órgano invisible. *MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*, (30), 18-22.
- Guarner, F. (2002). El colon como órgano: hábitat de la flora bacteriana. *Nutr Hosp*, 17(Sup 2), 7-10.
- Guerra, N. P., Bernárdez, P. F., Méndez, J., Cachaldora, P., & Castro, L. P. (2007). Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 134(1-2), 89-107.
- Harzallah, D., & Belhadj, H. (2013). Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of human GI mucosal barrier. In *Lactic acid bacteria-R & D for food, health and livestock purposes*.
- Holzapel, W. H., & Wood, B. J. (Eds.). (2014). *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. John Wiley & Sons pp 1-2.
- Honeyman, C. A. S., Rios, M. A. L., & Diez, P. R. H. (2016). Desarrollo de la microbiota gastrointestinal en lactantes y su rol en salud y enfermedad. *ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas*, 41(1), 35-43.
- Huertas, R. A. P. (2010). Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. 8(1), 93-105.
- Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapel, W. H., & Franz, C. M. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 73(3), 730-739.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3), 209-224.
- Kandler, O. and Weiss, N. 1992. Regular nonsporing Gram-positive rods. P. 1208-1260. En P. H. A. Sneath, M. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (Editor). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 10th edition, vol. 2. The Williams and Wilkins Co; Baltimore.
- Kimoto, H., Nomura, M., Kobayashi, M., Okamoto, T., & Ohmomo, S. (2004). Identification and probiotic characteristics of *Lactococcus* strains from plant materials. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 38(2), 111-117.
- Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnóstico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana pp 33.36.
- La Rosa Hernández, D., Gómez Cabeza, E. J., & Sánchez Castañeda, N. (2014). La microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmune del recién nacido. *Revista Cubana de Pediatría*, 86(4), 502-513.
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.). (2011). *Lactic*

- acid bacteria: microbiological and functional aspects*. CRC Press.
- Leandro, J. D. V. (1960). Producción de hemolisinas y concentración de antisueros específicos por congelaciones y descongelaciones sucesivas. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 23(120), 672-692.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728-764.
- Lee, J. Y., Kim, C. J., & Kunz, B. (2006). Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. *Meat Science*, 72(3), 437-445.
- Llorente, A. (1998). *Evaluación de la producción de bacteriocinas de Pediococcus acidilactici bajo diferentes condiciones de cultivo* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Edo. de México.
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3(1), 10-18.
- MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Médica Panamericana pp 73-91:344-353.
- Mattila-Sandholm, T., Blum, S., Collins, J. K., Crittenden, R., De Vos, W., Dunne, C., ... & Marteau, P. (1999). Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends in Food Science & Technology*, 10(12), 393-399.
- Montoya, H. H. (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines. *Editorial Universidad Antioquia. 2da Edición. Colombia 222p*.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Ochoa, S. A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., López-Martínez, B., ... & Xicohtencatl-Cortés, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 70(2), 138-150.
- Olmos, A. F., de la Fuente, C. G., Nieto, J. A. S., & Ramos, S. V. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37.
- OXOID. Especificaciones del producto Agar M.R.S.
- Parzanese, M. (2008). *Tecnología para la industria alimentaria: Liofilización de alimentos* (No. H2720). Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Buenos Aires (Argentina).
- Penders J, Stobberingh EE, Van Den Brandt PA, Thijs C. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy*(2007) 62:1223–36.doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01462

- Penna, F. J. (1998). Diarrea y probióticos. In *Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. Rev Enfer Infec Ped* (Vol. 11, No. 6, p. 182).
- Piskoríková, M. (2010, June). Quality and characterization of existing and new probiotics (EFSA QPS). In *Proceedings of regulatory framework workshop health claim approval of probiotics in the European Union. Issues, barriers, success drivers* (Vol. 18).
- Pulido, R. P., Omar, N. B., Abriouel, H., López, R. L., Cañamero, M. M., Guyot, J. P., & Gálvez, A. (2007). Characterization of lactobacilli isolated from caper berry fermentations. *Journal of applied microbiology*, 102(2), 583-590.
- Rioja, R. G., Kirchner, M. J. A., Funes, V. Á., Meseguer, N. B., Rius, M. C., Díaz, M. A. L., & Bru, C. M. (2009). Hemólisis en las muestras para diagnóstico. *Revista del Laboratorio Clínico*, 2(4), 185-195.
- Ruiz, G. D., & Rodarte, C. W. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev. Latinoamer. Microbiol*, 45(1-2), 30-40.
- Salazar, M. A. M., Sandoval, R. A. S., & Armendáriz, B. J. S. (2013). *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com>
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., & Lee, Y. K. (1999). Probiotics: how should they be defined?. *Trends in food science & technology*, 10(3), 107-110.
- Santini, C., Baffoni, L., Gaggia, F., Granata, M., Gasbarri, R., Di Gioia, D., & Biavati, B. (2010). Characterization of probiotic strains: an application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S98-S108.
- Seija, V. (2008). Género *Staphylococcus*. *Etiopatogenia microbiológica. España: Médica Panamericana*, 257-264.
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36(1), 1-29.
- Tserovska, L., Stefanova, S., & Yordanova, T. (2002). Identification of lactic acid bacteria isolated from katyk, goat's milk and cheese.
- Vantsawa, P. A., Maryah, U. T., & Bulus, T. (2017). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential from Fermented Cow Milk (Nono) in Unguwar Rimi Kaduna State Nigeria. *American Journal of Molecular Biology*, 7(02), 99.
- Von Wright, A., & Axelsson, L. (2012). Lactic acid bacteria: an introduction. In S. Lahtinen, A. Ouwehand, S. Salminen & A. Von Wright, *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects* (1-16). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ... & Whitman, W. B. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Walter, J., Heng, N. C., Hammes, W. P., Loach, D. M., Tannock, G. W., & Hertel, C.

- (2003). Identification of *Lactobacillus reuteri* genes specifically induced in the mouse gastrointestinal tract. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 2044-2051.
- Ward, P., & Roy, D. (2005). Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Le Lait*, 85(1-2), 23-32.
- ZAPATA, S., MUÑOZ, J., RUIZ, O. S., MONTOYA, O. I., & GUTIÉRREZ, P. A. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Vitae*, 16(1).
- Zhang, H., & Cai, Y. (2014). *Lactic Acid Bacteria*. Springer Berlin Heidelberg.