

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

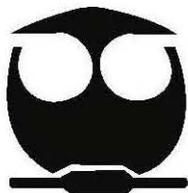
**IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS  
POR CRITERIOS FENOTÍPICOS Y ANÁLISIS DE  
SECUENCIAS DEL GEN ADN RIBOSOMAL 16S**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

**ANIA OLEÑKA CERVANTES SALINAS**



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre y mi hermano por su apoyo y cariño.

A mi asesora Martha Giles Gómez por su infinita paciencia.

A mis amigos por hacer más llevadero el día a día.

A todos mis maestros por compartir conmigo el tesoro del saber.

Gracias.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Q.F.B. Adriana Guadalupe Mejía Chávez  
**VOCAL:** M. en C. Beatriz de Guadalupe Serrano López  
**SECRETARIO:** Q.F.B. Martha Giles Gómez  
**1er. SUPLENTE:** Q.F.B. Agustín Reyo Herrera  
**2º SUPLENTE:** Dra. Gloria Díaz Ruiz

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Departamento de Biología, sección  
cepario, Edificio A, 1er. piso, laboratorio 1-C, Facultad de Química, UNAM.

---

Q.F.B. Martha Giles Gómez

**ASESOR DEL TEMA**

---

Ania Oleñka Cervantes Salinas

**SUSTENTANTE**

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	6
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	7
<b>1. RESUMEN</b>	10
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	12
<b>3. OBJETIVOS</b>	14
<u>3.1 Objetivo general</u>	14
<u>3.2 Objetivos particulares</u>	14
<b>4. ANTECEDENTES</b>	15
<u>4.1 Taxonomía</u>	15
<u>4.2 Identificación bacteriana</u>	18
4.2.1 Ensayos bioquímicos	19
4.2.2 Serotipo	21
<u>4.3 Métodos de identificación de bacterias lácticas</u>	22
4.3.1 Métodos fenotípicos	22
4.3.2 Métodos genotípicos	24
4.3.2.1 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción	25
4.3.2.2 Ribotipificación	26
4.3.2.3 Análisis de ADN polimórfico amplificado al azar	26
4.3.2.4 Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados	27
4.3.2.5 Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado	28
4.3.2.6 Hibridación <i>in situ</i>	28
4.3.3 Métodos aplicables sin cultivo previo	29
4.3.3.1 PCR con cebadores específicos	29
4.3.3.2 Hibridación fluorescente <i>in situ</i>	30
4.3.3.3 Epifluorescencia directa sobre filtro	31
4.3.3.4 Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización y con gradiente de temperatura	31
4.3.4 Cronómetros evolutivos	32
4.3.4.1 Identificación por análisis secuencial del gen ARNr 16S	34
4.3.4.1.1 Árboles filogenéticos	36
<u>4.4 Bacterias lácticas</u>	39
4.4.1 Generalidades	39
4.4.2 Metabolismo	40
4.4.3 Importancia	41
4.4.4 Clasificación	43
4.4.4.1 <i>Streptococcus</i> y otros cocos	46
4.4.4.2 <i>Lactococcus</i>	48

4.4.4.3 <i>Enterococcus</i>	49
4.4.4.4 Los géneros <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> y <i>Pediococcus</i>	49
4.4.4.4.1 <i>Lactobacillus</i>	50
4.4.4.4.2 <i>Leuconostoc</i>	53
4.4.4.4.3 <i>Pediococcus</i>	54
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>56</b>
<u>5.1 Reactivación y purificación en medio APT</u>	58
5.1.1 Reactivación a partir de crioviales a -70°C	58
5.1.2 Reactivación a partir de cepas liofilizadas	58
<u>5.2 Caracterización fenotípica</u>	59
5.2.1 Características morfocoloniales	59
5.2.2 Características microscópicas	59
5.2.3 Prueba de la catalasa	59
5.2.4 Patrones de fermentación de sustratos	60
<u>5.3 Caracterización genotípica</u>	62
5.3.1 Extracción de ADN cromosomal	62
5.3.1.1 Suspensión celular	62
5.3.1.2 Lisis	63
5.3.1.3 Purificación	63
5.3.1.4 Elución, separación final y conservación del ADN extraído	64
5.3.2 Amplificación del gen ribosomal 16S por PCR	66
5.3.3 Purificación del producto de PCR	67
5.3.4 Electroforesis en gel de agarosa	70
5.3.5 Secuenciación del gen ribosomal 16S	71
5.3.6 Identificación <i>in silico</i> de las secuencias obtenidas	72
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>74</b>
<u>6.1 Reactivación y purificación en medio APT</u>	74
<u>6.2 Caracterización fenotípica</u>	74
6.2.1 Características morfocoloniales	74
6.2.2 Características microscópicas	75
6.2.3 Prueba de la catalasa	75
6.2.4 Patrones de fermentación de sustratos	77
<u>6.3 Caracterización genotípica</u>	80
6.3.1 Extracción de ADN cromosomal	80
6.3.2 Amplificación del gen ribosomal 16S por PCR	83
6.3.3 Purificación del producto de PCR	87
6.3.4 Secuenciación del gen ribosomal 16S	90
<u>6.4 Identificación fenotípica y genotípica</u>	92
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>129</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>131</b>

<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	132
<b>10. APÉNDICES</b>	141
<u>10.1 Composición del medio APT (Difco)</u>	141
<u>10.2 Tinción de Gram</u>	142
<u>10.3 Prueba de la catalasa (método del portaobjetos)</u>	144
<u>10.4 Perfiles de fermentación de sustratos para las cepas empleadas</u>	145
<u>10.5 Secuencias parciales del ADNr 16S de las cepas empleadas en formato FASTA</u>	161

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Tabla 1.</b> Algunas características fenotípicas de valor taxonómico.	16
<b>Tabla 2.</b> Diferenciación de los principales géneros de las bacterias lácticas.	46
<b>Tabla 3.</b> Características diferenciales de estreptococos, lactococos y enterococos.	47
<b>Tabla 4.</b> Hábitats del género <i>Lactobacillus</i> .	51
<b>Tabla 5.</b> Principales divisiones dentro del género <i>Lactobacillus</i> basadas en características fenotípicas.	52
<b>Tabla 6.</b> Características de los cebadores empleados.	66
<b>Tabla 7.</b> Mezcla de reacción.	67
<b>Tabla 8.</b> Programación del termociclador.	67
<b>Tabla 9.</b> Características microscópicas y prueba de la catalasa de las cepas.	76
<b>Tabla 10.</b> Resultado de identificación empleando el sistema API 50 CH de BioMérieux.	79
<b>Tabla 11.</b> Comparación de los resultados obtenidos por medio de la identificación fenotípica y genotípica.	93
<b>Tabla 12.</b> Reclasificación sugerida para las bacterias lácticas pertenecientes a la colección del cepario de la Facultad de Química, UNAM.	130

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1.</b> Secuenciación del gen del ARN ribosómico y filogenia.	36
<b>Figura 2.</b> Preparación de un árbol de distancias filogenéticas a partir de secuencias del ARN ribosómico.	38
<b>Figura 3.</b> Fermentación de la glucosa en bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas.	42
<b>Figura 4.</b> Principales grupos filogenéticos de bacterias lácticas y bacterias Gram-positivas relacionadas con bajo y alto % G+C en el ADN.	45
<b>Figura 5.</b> Metodología general seguida en el presente trabajo.	57
<b>Figura 6.</b> Composición de la tira API 50CH.	60
<b>Figura 7.</b> Ensayos negativos (izquierda) y positivos (derecha) en la galería API 50CH.	62
<b>Figura 8.</b> Extracción de ADN cromosomal empleando el UltraClean Microbial DNA Isolation Kit de MoBio Laboratories.	65
<b>Figura 9.</b> Purificación del producto de PCR empleando el kit Pure Link PCR Purification Kit de Invitrogen.	69
<b>Figura 10.</b> Marcador de peso molecular de 1 Kpb de Invitrogen.	71
<b>Figura 11.</b> Cajas de agar APT con colonias.	74
<b>Figura 12.</b> Tiras API después de 48 horas de incubación a 37°C.	78
<b>Figura 13.</b> Gel de agarosa al 1% en el cual se muestra el ADN cromosomal.	81
<b>Figura 14.</b> Gel de agarosa al 1% en el cual se muestra el ADN cromosomal.	82
<b>Figura 15.</b> Gel de agarosa al 1% en el cual se muestra el producto de PCR.	84
<b>Figura 16.</b> Gel de agarosa al 1% en el cual se muestra el producto de PCR.	85
<b>Figura 17.</b> Gel de agarosa al 1% en el cual se muestra el producto de PCR.	86
<b>Figura 18.</b> Gel de agarosa al 1% en el cual se muestra el producto de PCR purificado.	88
<b>Figura 19.</b> Gel de agarosa al 1% en el cual se muestra el producto de PCR purificado.	89

<b>Figura 20.</b> Cromatograma de la secuencia del ADNr 16S de la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 (CFQ L10) obtenido por el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing (Perkin Elmer/Applied Biosystems). Se muestra una secuencia parcial empleando el programa BioEdit.	90
<b>Figura 21.</b> Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 (CFQ L10) en formato FASTA empleando el programa BioEdit.	91
<b>Figura 22.</b> Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Leuconostoc citrovorum</i> CFQ drivac (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI.	96
<b>Figura 23.</b> Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 8042 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI.	99
<b>Figura 24.</b> Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Streptococcus cremoris</i> CFQ ST3 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI.	102
<b>Figura 25.</b> Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Streptococcus cremoris</i> CFQ B035 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI.	104
<b>Figura 26.</b> Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Streptococcus lactis</i> CFQ ST18 drivac (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI.	106
<b>Figura 27.</b> Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Streptococcus durans</i> CFQ B046 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI.	108
<b>Figura 28.</b> Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 (CFQ L10) (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI.	110

- Figura 29.** Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus plantarum* CFQ L9 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. 110
- Figura 30.** Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CFQ (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. 113
- Figura 31.** Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B442 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. 115
- Figura 32.** Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus pentosus* NRRL B227 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. 117
- Figura 33.** Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NRRL B763 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. 119
- Figura 34.** Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus casei* CFQ L3 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. 121
- Figura 35.** Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa de bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Lalacult) (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. 123
- Figura 36.** Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa de bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Yakult) (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. 125
- Figura 37.** Árbol filogenético general que incluye las secuencias parciales del ADNr 16S de todas las cepas estudiadas (negritas) así como las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. 128

## 1. RESUMEN

Los microorganismos han sido caracterizados tradicionalmente por su fenotipo, el conjunto de propiedades celulares observables, como su morfología, propiedades fisiológicas y por la estructura de sus componentes celulares. Actualmente los criterios de caracterización fenotípica se complementan con tipificaciones moleculares.

El cepario de la Facultad de Química, UNAM está implementando dichas técnicas con el fin de asegurar la identidad de las cepas que resguarda y determinar la correlación que tienen con la caracterización fenotípica tradicionalmente utilizada. Se trabajó con cepas de bacterias lácticas pertenecientes a la colección del cepario llevando a cabo la caracterización fenotípica determinando sus características microscópicas, morfocoloniales y prueba de la catalasa, así como con pruebas de fermentación de sustratos. Además se llevó a cabo una caracterización genotípica, para efectuarla se extrajo el ADN cromosomal y se amplificó el gen que codifica para el ARN ribosomal 16S empleando el par de cebadores universales para eubacterias denominados como Eu530F y Eu1449R. Los productos de PCR fueron secuenciados y las secuencias fueron identificadas empleando el programa BLAST del NCBI. Para cada cepa se eligieron las cinco secuencias que mostraban mayor similitud con la consulta con el fin de construir el árbol filogenético consenso.

Se encontró que para las cepas *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8042, *Streptococcus lactis* CFQ ST18 drivac, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (CFQ

L10), *Lactobacillus plantarum* CFQ L9, *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *delbrueckii* NRRL B-763 y la bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Lalacult), que corresponden al 46.6% de las cepas estudiadas se encontró perfecta correlación entre la caracterización fenotípica y la genotípica. Para las cepas *Streptococcus cremoris* CFQ ST3, *Streptococcus cremoris* CFQ B035, *Streptococcus durans* CFQ B046, *Lactobacillus rhamnosus* CFQ y la bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Yakult), que corresponden al 33.3% de las cepas estudiadas se identificó adecuadamente solo por medio de la caracterización genotípica. Para el *Lactobacillus pentosus* NRRL B-227 y el *Lactobacillus casei* CFQ L3 que corresponden al 13.3% restante hubo correlación entre la caracterización fenotípica y la genotípica pero esta fue inconsistente con la clasificación del cepario. La cepa *Leuconostoc citrovorum* CFQ drivac que corresponde al 6.6% de las cepas estudiadas no fue identificada correctamente por ninguno de los dos métodos. En el presente trabajo la identificación genotípica mostró ser un método más confiable de identificación, sin embargo se observó que ambos métodos se complementan, lo que permitió asegurar la identidad de las cepas analizadas.

## 2. INTRODUCCIÓN

La identificación de microorganismos se ha realizado mediante el uso de criterios fenotípicos, lo cual implica el conjunto de propiedades celulares observables como son sus características microscópicas, morfocoloniales, propiedades fisiológicas y bioquímicas así como por la estructura de sus componentes celulares. En la actualidad estos criterios de caracterización fenotípica se complementan con criterios moleculares basados en la tipificación molecular y en el análisis de genes específicos como son los ADN ribosomales 16S. Mediante la identificación genotípica es posible recopilar datos confiables sobre la diversidad e identificación taxonómica de los microorganismos, así como el impacto sobre los factores intrínsecos y extrínsecos en el crecimiento y actividad bioquímica de los mismos (Díaz y Wachter, 2003).

Hasta antes de la realización del presente trabajo, el cepario del Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM, había utilizado únicamente caracterización microscópica y cultivo en el medio selectivo de Man Rogosa Sharpe (MRS) para asegurar la identidad de las cepas de bacterias lácticas que resguarda. Esta fue la primera ocasión en la que se emplearon métodos de identificación rápidos como el sistema API 50CH para complementar la identificación de bacterias pertenecientes al dicho grupo en particular. Así mismo se implementaron por vez primera, técnicas moleculares para la identificación de diferentes cepas bacterianas de interés en la docencia.

El objetivo principal del presente proyecto fue la identificación de bacterias lácticas resguardadas en el cepario, empleando criterios fenotípicos y la secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S como criterio genotípico. Dicha técnica de identificación se implementó con base en los trabajos de Borneman, *et al.*, 1996; Escalante, *et al.*, 2004; Lozano, 2007 y Conca, 2008.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Identificar fenotípica y genotípicamente una colección de cepas de bacterias lácticas provenientes del cepario de la Facultad de Química, UNAM.

#### 3.2 Objetivos particulares

- \* Identificar por medio de criterios fenotípicos:
  - Determinando las características morfocoloniales y microscópicas.
  - Realizando la prueba de la catalasa.
  - Determinando los patrones de fermentación de sustratos.
  
- \* Identificar por análisis de secuencias del gen ribosomal 16S:
  - Extrayendo ADN cromosomal.
  - Amplificando y secuenciando el gen ribosomal 16S e identificando *in silico* las secuencias obtenidas.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Taxonomía

La taxonomía es la ciencia de la clasificación y está constituida por dos subdisciplinas principales, identificación y nomenclatura. Tradicionalmente, la taxonomía bacteriana se ha basado en los análisis fenotípicos como elementos básicos de la clasificación. Dado que las bacterias son tan pequeñas y contienen relativamente pocos caracteres estructurales indicativos de sus raíces evolutivas, la filogenia de los procariotes se ha empezado a conocer sólo a partir de los análisis genotípicos. Sin embargo, los análisis fenotípicos (fenéticos) han tenido tradicionalmente una función importante en la identificación y clasificación bacteriana, especialmente en los campos aplicados, donde la identificación puede no ser un fin en sí misma como, por ejemplo, en el diagnóstico microbiológico clínico.

En la taxonomía bacteriana clásica, se determinan varias características y los resultados se emplean para agrupar los organismos en la escala taxonómica, desde la especie al dominio. Varios aspectos de la morfología, nutrición, fisiología y hábitat son características con valor taxonómico ampliamente utilizadas (Madigan, *et al.*, 2004).

La Tabla 1 divide estas categorías en tópicos específicos de valor taxonómico.

**Tabla 1. Algunas características fenotípicas de valor taxonómico (Madigan, et al., 2004).**

I.	Morfología	Forma, tamaño, agrupación y reacción de Gram.
II.	Movilidad	Por flagelos o por deslizamiento y no móvil.
III.	Nutrición y fisiología	Mecanismo de conservación de la energía (fotótrofo, quimiorganótrofo, quimiolitótrofo); requerimientos gaseosos; temperatura; pH y requerimiento/tolerancia a NaCl; capacidad para usar varias fuentes de carbono, nitrógeno y azufre.
IV.	Otros factores	Pigmentos, inclusiones celulares o capas superficiales, patogenicidad y sensibilidad a los antibióticos.

Para identificar un organismo, los taxónomos clásicos aplican una serie de criterios que van desde generales a específicos (Madigan, et al., 2004). Estos pueden incluir la composición de la pared celular, ácidos grasos celulares, quinonas isoprenoides y otras características de las células. Las características moleculares se han convertido en importantes herramientas taxonómicas, tales como el % G+C del ADN, las propiedades electroforéticas de productos del gen, estudios de hibridación ADN:ADN y estructuras y secuencias del ARN ribosomal (ARNr). Esto ha tenido como resultado cambios dramáticos en la taxonomía bacteriana (Stiles y Holzapfel, 1997).

La determinación del contenido en guanina mas citosina en el ADN genómico de un organismo, generalmente denominado contenido en GC, puede ser una parte de la taxonomía bacteriana clásica. Esta relación de bases en el ADN se expresa como:

$$\frac{G + C}{A + T + G + C} \times 100\%$$

El porcentaje de GC puede variar ampliamente, con valores tan bajos como el 20% y tan altos como el 80% entre los procariotes, un rango más amplio que el observado en eucariotes. El conocimiento del porcentaje de GC de un organismo es útil, aunque generalmente tiene poco valor en la caracterización taxonómica de un organismo debido a que en ocasiones pueden tener idénticos valores GC y aún así estar poco relacionados (tanto taxonómica como filogenéticamente).

Aunque el concepto de especie procariote está evolucionando, se ha adoptado de forma extensiva una taxonomía integrativa denominada taxonomía polifásica que se basa en información genotípica, fenotípica y filogenética y es considerada como un enfoque consensual para la taxonomía bacteriana. Dentro de los criterios genéticos, la taxonomía polifásica incluye, en particular, la secuenciación de la subunidad pequeña del ARN ribosómico y la hibridación genómica (Hutkins, 2006; Domig, *et al.*, 2003; Singh, *et al.*, 2009).

El concepto de especie es importante en microbiología ya que confiere a las cepas seleccionadas identidad taxonómica formal. Una nueva especie se define generalmente a partir de la caracterización de varias cepas. Existen ocho categorías jerárquicas taxonómicas que en orden creciente son: especie, género, familia, orden, clase, phylum, reino y dominio.

En la identificación de un organismo desconocido es esencial que el organismo satisfaga todos los criterios taxonómicos de los niveles superiores al de la especie (Holt, *et al.*, 2000; Madigan, *et al.*, 2004).

## 4.2 Identificación bacteriana

La identificación de una bacteria consiste en la determinación de las características fenotípicas y/o genotípicas y la comparación de estas características con los diferentes taxones de la clasificación considerada. Las características a determinar y su número depende principalmente del tipo de bacteria y del fin que se persigue en la identificación.

El esquema general de identificación de una cepa bacteriana desde el punto de vista bioquímico consistiría en:

- Obtención de un cultivo puro.
- Examen microscópico de células vivas y de frotis teñido con la técnica de Gram, para determinar la forma, agrupación y el Gram del microorganismo en estudio. También es importante determinar la presencia de esporas y otras características morfológicas de interés.
- Determinar las características nutricionales (en general se desprenden de los métodos empleados en el aislamiento y cultivo anteriores); fotoautótrofos, fotoheterótrofos, quimioautótrofos, quimioheterótrofos.
- Realización de pruebas primarias con las cuales se puede determinar el género, grupo de géneros o en algún caso familia a la que pertenece un aislamiento. Las pruebas primarias son: Gram, morfología, catalasa, oxidasa, OF, fermentación de glucosa, esporas, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis y movilidad.

- Realización de pruebas secundarias y terciarias a efectos de llegar a especie. Estas dependerán del género o familia determinado (producción de pigmentos, producción de indol a partir de triptofano, producción de coagulasa, de fenilalanina deaminasa).

#### 4.2.1 Ensayos bioquímicos

Los ensayos bioquímicos tradicionalmente utilizados, llamadas pruebas bioquímicas convencionales, generalmente determinan la actividad de una vía metabólica (conjunto de reacciones químicas) a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no.

Son pruebas simples que se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica bioquímica como presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o determinada vía metabólica, crecimiento a una determinada temperatura, crecimiento en presencia de inhibidores, etc. No significan de ninguna manera un estudio profundo del metabolismo bacteriano. Para llevarlas a cabo, se pueden utilizar diferentes sistemas de trabajo (medios de cultivo, indicador, revelador) que pueden ser distintos aún para el mismo ensayo si se trata de diferentes microorganismos. Por ejemplo se debe suplir con factores de crecimiento el medio de cultivo para estudiar la fermentación de diversos azúcares cuando se sabe que el microorganismo en estudio es exigente.

La realización de una prueba bioquímica implica:

- Cultivar el microorganismo en un medio que contiene un determinado sustrato o inhibidor y luego de la incubación visualizar el crecimiento y la degradación de un sustrato, ya sea por vire de un indicador o por la adición de un revelador de la presencia del sustrato, o de algún producto de su degradación.
- Cultivar el microorganismo en un medio de propagación que contenga el sustrato de una enzima inducible y luego de la incubación demostrar la actividad enzimática.

Para un desarrollo óptimo, en todos los casos se debe tener un cultivo joven de preferencia que la célula se encuentre en fase logarítmica (18-24 horas de incubación) en un medio de cultivo apropiado y controlar parámetros como pH, fuerza iónica, atmósfera y temperatura.

Siempre que se prepara un nuevo lote de medio de cultivo para una prueba, deben llevarse a cabo los correspondientes controles de calidad, sembrando en dicho medio un control positivo y otro negativo para esa prueba.

Existen diferentes sistemas que facilitan la realización de tales ensayos, porque proponen el mejor conjunto de pruebas bioquímicas para la identificación de un grupo bacteriano, porque simplifican la interpretación de un resultado utilizando un valor numérico, porque proveen los reactivos listos para su uso o porque son totalmente automatizables.

Los sistemas comerciales utilizan modificaciones de las pruebas bioquímicas convencionales, ya sea sustratos deshidratados, tiras de papel de filtro impregnadas en reactivos o pequeños compartimentos con medios listos para sembrar. En todos los casos se emplean códigos numéricos para la interpretación de resultados (Holt, *et al.*, 2000). Los sistemas comerciales más comúnmente usados son Enterotube (Roche Diagnostics), API (BioMérieux), ATB (BioMérieux), Minitek (Becton Dickinson Microbiology), BBL Crystal (Becton Dickinson Microbiology), MicroID (Organon Teknika) y RapID One System (Remel) (Entis, *et al.*, 2001).

#### 4.2.2 Serotipo

Para realizar identificaciones más rápidas, o cuando las pruebas bioquímicas no son concluyentes, se recurre al uso de antisueros específicos.

Los antígenos bacterianos pueden ser capsulares (K), somáticos (O) que corresponden al lipopolisacárido de la pared de los Gram negativos, flagelares (H), y los antisueros se identifican con esas letras y el número o letra del antígeno correspondiente.

En una primera identificación se usan sueros polivalentes y para la caracterización serológica se usan sueros monovalentes dentro de cada tipo de antígeno. También se pueden utilizar métodos de cromatografía gaseosa para identificar productos metabólicos, en particular para la identificación de bacterias anaerobias no esporuladas (Holt, *et al.*, 2000).

### 4.3 Métodos de identificación de bacterias lácticas

#### 4.3.1 Métodos fenotípicos

La identificación tradicional de las bacterias lácticas está ampliamente basada en la morfología celular, vía de fermentación de la glucosa (fermentación homoláctica o heteroláctica), crecimiento a diferentes temperaturas, producción de gas a partir de glucosa, tipo de productos del metabolismo primario, particularmente la configuración del ácido láctico producido (L o D), patrones de asimilación o fermentación de carbohidratos o fuentes de nitrógeno, habilidad de crecer a altas concentraciones de sal y tolerancia al medio ácido o básico. Los marcadores quimiotaxonómicos así como la composición de ácidos grasos y los constituyentes de la pared celular, particularmente el puente interpeptídico del peptidoglicano, también pueden ser útiles para su clasificación (Hall, *et al.*, 2001; Axelsson, 1998; Schillinger, *et al.*, 2006).

Las pruebas bioquímicas convencionales para identificar bacterias tienen la desventaja de ser difíciles de manejar pues se deben llevar a cabo múltiples ensayos con una extensa batería de tubos para determinar un patrón de asimilación de sustratos. Para realizar correctamente estas pruebas bioquímicas es fundamental tener colonias perfectamente aisladas, es decir, partir de cultivos puros. Por otro lado, se debe realizar un control periódico de medios y reactivos mediante el empleo de microorganismos positivos y negativos (Hall, *et al.*, 2001; Holt, *et al.*, 2000).

Para resolver estas desventajas, existe el sistema fenotípico miniaturizado de identificación bacteriana especializada API 50 CH (BioMérieux) que emplea una batería de reactivos deshidratados a los cuales se le agrega un inóculo estandarizado con el fin de crear una huella digital fenotípica que se compara con una base de datos provista por el fabricante. Los resultados de este tipo de sistemas automatizados deben ser cuidadosamente interpretados debido a las limitaciones propias del sistema. La calidad de los resultados depende principalmente de la confiabilidad de la base de datos. Generalmente, estos métodos fenotípicos tienen una reproducibilidad relativamente baja así como una resolución taxonómica baja que a menudo no permite diferenciar entre organismos relacionados.

Entre otros métodos para identificar fenotípicamente a las bacterias lácticas se encuentran el análisis de patrones de proteínas de la célula completa obtenidos por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico), así como la espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) (Schillinger, *et al.*, 2006).

Los métodos fenotípicos convencionales no pueden ser aplicados de manera universal. Están sujetos a la variación en la expresión dentro de un mismo aislado debido a condiciones ambientales e incorporación de ADN extracromosomal que puede contener genes que modifiquen las características fenotípicas. Esto puede tener como resultado que bacterias disimiles exhiban patrones fenotípicos similares haciendo parecer que están relacionadas o que cepas similares exhiban

diferentes patrones fenotípicos haciendo parecer que son distintas. Los métodos fenotípicos no son suficientemente sensibles para estudiar genética de poblaciones bacterianas. Debido a la relación cercana u origen clonal de algunas bacterias se requieren métodos más sensibles de tipificación que puedan detectar diferencias sutiles en los cromosomas debido a mutaciones puntuales, pequeñas inserciones, deleciones o rearrreglos (Farber, *et al.*, 2001).

#### 4.3.2 Métodos genotípicos

Durante muchos años se han propuesto una serie de técnicas taxonómicas moleculares para identificar las bacterias con el fin de superar las mencionadas desventajas de los métodos clásicos basados en las características fenotípicas (Torriani, *et al.*, 1999).

Los métodos genotípicos tienen una tipificación más precisa puesto que todos los organismos contienen ácidos nucleicos y con estos métodos se estudia su genoma. Los métodos genotípicos son generalmente rápidos, económicos y sencillos una vez que se han implementado, pero requieren una inversión económica inicial, tiempo y habilidades técnicas para evaluar, interpretar y estandarizar (Farber, *et al.*, 2001).

Diversas técnicas basadas en ADN desarrolladas en las últimas dos décadas son aplicables a la detección e identificación de bacterias lácticas. Una de las principales ventajas de estos métodos es que son independientes de las variaciones en las condiciones de crecimiento de los microorganismos.

Entre los métodos de identificación genotípica se encuentran la secuenciación de regiones del ARNr 16S o 23S, ensayos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y diversas técnicas de huella digital del ADN basándose en ya sea patrones de fragmentos de ADN amplificados por PCR o en análisis de restricción de ADN total o amplicones resultado de una reacción selectiva de PCR (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción RFLP).

La comparación de las secuencias ribosomales de diferentes microorganismos se ha utilizado para construir un árbol filogenético y ha demostrado que es muy similar al elaborado en base a las características fenotípicas o mediante métodos tradicionales. Además, tiene un alto grado de correspondencia con el árbol general construido en base a técnicas microbiológicas clásicas. La base de datos de secuencias de 16S ADNr de las bacterias lácticas ha ido creciendo durante los últimos años y se ha convertido en una herramienta muy útil (Axelsson, 1998).

#### 4.3.2.1 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

El polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) fue la primera técnica en ser utilizada. Se extrae el ADN (el genoma completo) de cada cepa, se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos se separan y visualizan por electroforesis en geles de agarosa. Se obtienen patrones de bandas con buena reproducibilidad pero por lo general son muy complejos. La forma como más se ha utilizado el RFLP es estudiando el polimorfismo de regiones particulares. Se han desarrollado estrategias de identificación de aislados de

*Carnobacterium* basadas en RFLP de la región del espaciador intergénico ribosomal 16S-23S amplificado mediante PCR

#### 4.3.2.2 Ribotipificación

Para hacer una ribotipificación se transfieren los fragmentos a una membrana, se hibridan con una sonda de ARNr marcada y se visualizan únicamente los fragmentos hibridados, que se pueden comparar con cepas de referencia. La ribotipificación ha demostrado ser una herramienta útil para identificar bacterias lácticas asociadas a descomposición de carne y productos pesqueros así como cepas de *Pediococcus* aislados de cerveza.

Se han desarrollado sistemas automatizados de ribotipificación (Qualicon, Wilmington, DE) que reducen el tiempo del ensayo a 8 horas partiendo de colonias aisladas.

#### 4.3.2.3 Análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

El análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), conocido también como PCR cebado arbitrariamente (AP-PCR) consiste en amplificar al azar regiones del ADN extraído de los microorganismos. Los cebadores se escogen al azar, por lo que no es necesario contar con información sobre secuencias específicas del microorganismo a tipificar. Se utilizan temperaturas de alineamiento bajas, de manera que se obtengan productos de PCR que permitan el alineamiento de los cebadores a pesar de que existan una o dos bases que no coincidan. Después de su separación mediante electroforesis en geles de agarosa se obtienen patrones simples de fragmentos de ADN de diferentes tamaños. Se ha empleado para la caracterización de poblaciones microbianas que contribuyen al

deterioro de la carne de res empacada al vacío, en salchichas fermentadas y cepas de *Lactobacillus plantarum* involucradas en descomposición de vino. La amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP-PCR) es una técnica afín que emplea la amplificación de fragmentos por PCR con oligonucleótidos específicos para secuencias simples repetitivas de ADN. Esta técnica ha demostrado utilidad para la discriminación de especies de *Lactobacillus* cercanas tales como *L. plantarum*, *L. paraplantarum* y *L. pentosus*.

#### 4.3.2.4 Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

El polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) es una combinación de PCR y el uso de enzimas de restricción. Se basa en la amplificación por PCR de fragmentos de restricción de ADN genómico. Se realiza en tres etapas: a) Restricción del ADN y ligamiento de los adaptadores. Se realiza la restricción con dos enzimas que producen fragmentos de ADN con dos tipos diferentes de extremos pegajosos. A éstos se ligan adaptadores, que son oligonucleótidos cortos que funcionarán como los sitios de alineamiento de los cebadores. b) Amplificación selectiva de algunos de los fragmentos de restricción. Se usan dos cebadores diferentes conteniendo la misma secuencia que los adaptadores además de varias bases contiguas al sitio de restricción. Se utilizan condiciones estrictas, de manera que se amplifican únicamente los fragmentos en los que las extensiones del cebador (las bases que se añaden) coinciden exactamente con los nucleótidos adyacentes al sitio de restricción. c) Separación de fragmentos por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (geles de secuenciación). Generalmente se obtienen patrones de 50 a 100

fragmentos, con mucha reproducibilidad, debido a las condiciones estrictas del alineamiento. Esta y otras técnicas basadas en el PCR han sido automatizadas mediante el uso de cebadores marcados con fluorescencia. Se ha empleado la técnica para la caracterización de cepas de *Carnobacterium* presentes en carnes, pescados y mariscos.

#### 4.3.2.5 Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA)

El análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA) se basa en la obtención de ADNrs mediante amplificación por PCR usando cebadores universales, el producto se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos se analizan en geles de agarosa. Con esta metodología se obtienen patrones de bandas o “huellas digitales” de cada microorganismo. Se determinan, utilizando diferentes tipos de software, las diferencias entre éstos (de acuerdo con la presencia o ausencia de bandas) y se construyen dendrogramas. Se ha empleado la técnica de 16S-ARDRA para la identificación de bacterias lácticas presentes en mosto y vino (Díaz y Wachter, 2003; Hall, *et al.*, 2001; Schillinger, *et al.*, 2006).

#### 4.3.2.6 Hibridación *in situ*

Otro enfoque es el uso de sondas de oligonucleótidos grupo específicas o especie específicas dirigidas al ARNr para la detección directa de bacterias lácticas por hibridación *in situ* de colonias. Se ha reportado el uso de hibridación *in situ* de colonias con sondas no isotópicas para la enumeración específica de bacterias lácticas en mosto y vino así como la aplicación de sondas de ARNr en hibridación *in situ* de colonias para identificar lactobacilos presentes en carne (Schillinger, *et al.*, 2006).

#### 4.3.3 Métodos aplicables sin cultivo previo

Los resultados de las pruebas realizadas en un esquema de identificación dependiente de cultivo pueden variar dependiendo del tamaño del inóculo, la temperatura y periodo de incubación, la composición del medio de cultivo y el criterio empleado para definir una reacción positiva o negativa, es por eso que existen métodos en los que no se realiza un cultivo previo (Holt, *et al.*, 2000). A continuación se mencionan algunos de los métodos descritos en la literatura.

##### 4.3.3.1 PCR con cebadores específicos

El método independiente de cultivo más rápido para llevar a cabo la detección específica a nivel de género, especie o cepa de bacterias lácticas en una matriz alimentaria es el uso de cebadores específicos para una reacción de PCR con ADN bacteriano extraído de la muestra. Este método permite la detección de ciertos organismos que se espera encontrar en un alimento durante su procesamiento sin la necesidad de aplicar procedimientos de cultivo que consumen tiempo. Por ejemplo, en el proceso de producción de vino es importante saber si se encuentran presentes cepas de *Pediococcus damnosus* pues estas producen glucano que causa una viscosidad inaceptable. Se han desarrollado cebadores específicos a partir de la secuencia del plásmido involucrado en la producción de glucano y se han empleado para detectar específicamente tales cepas de *Pediococcus*. Así mismo se han desarrollado cebadores especie específicos para algunas bacterias lácticas de la carne con el fin de identificar directamente estos organismos en salchichas de baja acidez.

#### 4.3.3.2 Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH, *fluorescent in situ hybridization*) es otra propuesta independiente de cultivo en la cual una sonda de ácido nucleico, que es un oligonucleótido sintéticamente diseñado de ADN o ARN complementario a una secuencia blanco específica (signatura) de un gen diana, principalmente ADNr 16S en ADN bacteriano, se une a dicha secuencia. Algunas sondas de oligonucleótidos pueden hacerse fluorescentes mediante colorantes. Las células bacterianas de la muestra son fijadas e inmovilizadas en filtros de membrana, permeabilizadas para el oligonucleótido marcado fluorescentemente, hibridadas *in situ* con la sonda y luego contadas bajo el microscopio de epifluorescencia. Las sondas de ácidos nucleicos son un poderoso instrumento para identificar y cuantificar microorganismos en la naturaleza. Como se han identificado sondas filogenéticas signatura para especies microbianas individuales, así como para dominios enteros de organismos, el grado de especificidad de un colorante filogenético puede controlarse mediante la secuencia de la sonda fusionada al colorante. Esta técnica ha sido aplicada para la detección de bacterias en medios líquidos y permite la identificación directa y cuantificación de bacterias lácticas con microscopio sin necesidad de cultivo previo y en pocas horas. Diversos autores han demostrado la aplicación de este método rápido para la identificación de especies de bacterias lácticas asociadas a la descomposición de vino (Madigan, *et al.*, 2004; Schillinger, *et al.*, 2006).

#### 4.3.3.3 Epifluorescencia directa sobre filtro (DEFT)

Otro método rápido que emplea microscopia epifluorescente es la epifluorescencia directa sobre filtro (DEFT) que consiste en capturar las células bacterianas en la superficie de los filtros de membrana y teñirlas con un fluorocromo. Ha encontrado aplicaciones en la industria láctea y vitivinícola.

#### 4.3.3.4 Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización y con gradiente de temperatura (DGGE y TGGE)

La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) así como la electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) también pueden emplearse como técnicas independientes de cultivo para detectar y analizar bacterias lácticas (Schillinger, *et al.*, 2006). En éstos métodos, una región variable del gen ARNr 16S es amplificada por PCR y los fragmentos de ADN de igual tamaño que difieren en la secuencia de bases se separan por su perfil de desnaturalización en un gel de electroforesis de acrilamida. La DGGE utiliza un gradiente de una mezcla de urea y formamida que desnaturaliza el ADN. Un fragmento de ADN bicatenario se desplaza por el gel y cuando llega a una determinada concentración “desnaturalizante” las cadenas de ADN se separan y el desplazamiento se interrumpe. Las diferencias en las propiedades de separación de las cadenas dependen en gran parte de las diferencias en la secuencia de bases. Los patrones de bandas resultantes pueden capturarse digitalmente y normalizarse usando patrones de referencia, lo cual permite la identificación de la posición de las bandas por medio de la comparación con aquellas presentes en

una base de datos de cepas tipo bien caracterizadas (Schillinger, *et al.*, 2006; Madigan, *et al.*, 2004). Esta propuesta se empleo en un estudio sobre la identificación de lactobacilos involucrados en los procesos de fermentación de pan de levadura natural y en investigaciones de la microflora de los quesos (Schillinger, *et al.*, 2006).

Debe considerarse que todas son herramientas útiles en el caso que se quiera realizar una identificación. Si es necesario, los métodos tradicionales siempre pueden utilizarse como complemento o para aproximarse aún más al objetivo en algún caso concreto (Hall, *et al.*, 2001; Østlie, *et al.*, 2005).

#### 4.3.4 Cronómetros evolutivos

En la actualidad está claro que ciertas macromoléculas son cronómetros evolutivos, es decir, medidas del cambio evolutivo. Se ha demostrado convincentemente que la distancia evolutiva entre dos organismos puede determinarse por las diferencias en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos de macromoléculas homologas aisladas de cada uno de ellos. Esto se debe a que el número de diferencias en la secuencia de una macromolécula es proporcional al número de cambios mutacionales estables fijados en el ADN que codifica esa molécula en ambos organismos. La evolución se produce a medida que las mutaciones quedan fijadas en las diferentes poblaciones, siendo la biodiversidad el resultado final.

Para determinar las verdaderas relaciones evolutivas entre organismos, es esencial elegir las moléculas adecuadas para los estudios de secuenciación. Esto es importante por varios motivos. Primero, la molécula debe estar universalmente distribuida en el grupo elegido para ser estudiado. Segundo, deben ser funcionalmente homólogos en cada organismo; las comparaciones filogenéticas deben realizarse con moléculas de idéntica función. Tercero, resulta crucial poder alinear apropiadamente las dos moléculas a fin de identificar regiones tanto con homología como con variación de secuencia. Finalmente, la secuencia de la molécula elegida debería cambiar con una velocidad proporcional a la distancia filogenética que se va a determinar. Y, de hecho, cuanto mayor sea la distancia filogenética a determinar, menor será la velocidad de cambio de la molécula; demasiado cambio tiende a enturbiar el registro evolutivo.

Se han evaluado muchas moléculas como cronómetros moleculares y con ellas se han realizado estudios de comparación de secuencias a fin de generar árboles filogenéticos. Estas moléculas son: varios citocromos, proteínas de hierro y azufre tales como las ferredoxinas, y genes de otras proteínas y de los ARNs ribosómicos, componentes claves del sistema de traducción; la ATPasa, complejo enzimático de membrana que puede sintetizar e hidrolizar ATP; y la RecA, proteína requerida para la recombinación genética son los que han proporcionado la información genética más significativa sobre los microorganismos. Todas estas moléculas eran probablemente esenciales incluso para las células más primitivas y así, la variación de secuencia en los genes que las codifican, nos permiten

profundizar en el registro evolutivo. El cronómetro molecular más ampliamente utilizado es el ARN ribosómico (Madigan, *et al.*, 2004).

#### 4.3.4.1 Identificación por análisis secuencial del gen ARNr 16S

Debido a la probable antigüedad de la maquinaria sintetizadora de proteínas los ARNs ribosómicos son moléculas excelentes para discernir las relaciones evolutivas entre los seres vivos. Los ARNs ribosómicos son funcionalmente constantes, están universalmente distribuidos y su secuencia esta moderadamente bien conservada a través de amplias distancias filogenéticas. También, dado el elevado número de diferentes secuencias posibles de moléculas grandes, tales como los ARNs ribosómicos, la similitud de dos secuencias indica alguna relación filogenética. Sin embargo, es el grado de semejanza de las secuencias del ARN ribosómico de dos organismos lo que indica su parentesco evolutivo relativo. A partir del análisis comparativo de secuencias, se pueden construir las genealogías moleculares que conducen a los arboles filogenéticos; éstos muestran la posición evolutiva más probable existente entre los organismos. Hay tres moléculas de ARN ribosómico, que en procariotes tienen tamaños de 5S, 16S y 23S. Los ARNrs bacterianos grandes, 16S y 23S (aproximadamente 1500 y 2900 nucleótidos, respectivamente) contienen varias regiones de secuencia altamente conservada que resulta útil para obtener alineamientos de secuencia apropiados, pero al mismo tiempo, la variabilidad de secuencia suficiente en otras regiones de la molécula para servir como excelentes cronómetros filogenéticos. Dado que el ARN 16S es más manejable experimentalmente que el ARN 23S, se

ha utilizado preferentemente para desarrollar la filogenia tanto de procariotes como de eucariotas. La base de datos de las secuencias del ARNr en el Proyecto de Base de Datos del Ribosoma (RDP) contiene más de 24 000 (16 000 secuencias 16S alineadas y 8000 secuencias 18S alineadas) y puede accederse a ella a través de Internet. Carl Woese en la Universidad de Illinois introdujo en los años 70 el uso de la subunidad pequeña del ARNr como herramienta filogenética y el método se utiliza universalmente en la actualidad (Madigan, *et al.*, 2004).

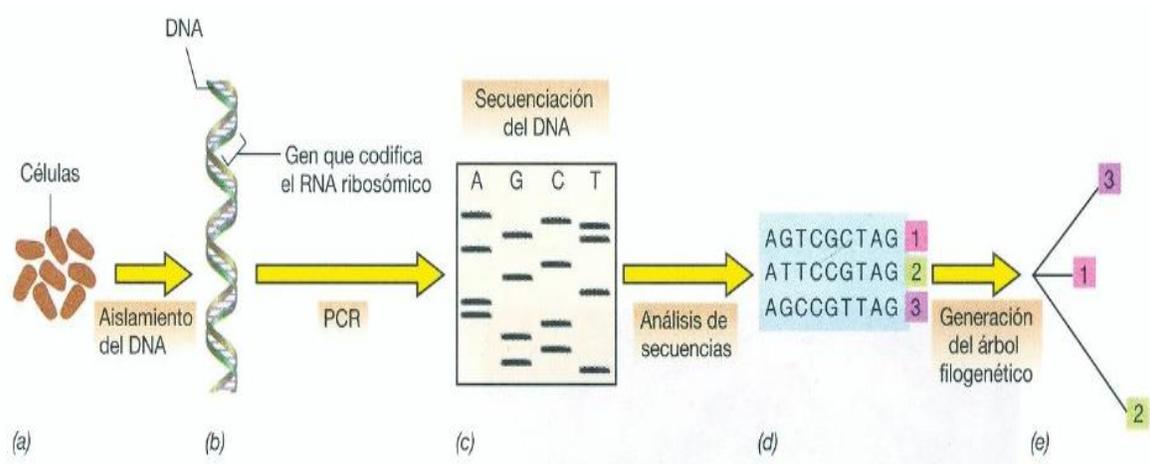
Recientemente la secuenciación de ácidos nucleicos del ARNr 16S se ha convertido en la estrategia más común para distinguir entre organismos, para mostrar relación filogenética y en última instancia clasificar un organismo a nivel de género y especie (Hutkins, 2006; Weisburg, *et al.*, 1991).

Estas secuencias pueden identificarse fácilmente a partir de ADN después de la amplificación por PCR. Comparando la secuencia de un organismo dado con aquellas contenidas en la base de datos del ARNr 16S es posible obtener correspondencia altamente significativa o inferir relaciones si la secuencia es única (Hutkins, 2006).

La metodología de PCR empleando cebadores especie o género específicos puede aplicarse exitosamente para discriminar bacterias lácticas. Usualmente los blancos de éstos cebadores son los genes del ARNr 16S, ARNr 23S o las regiones espaciadoras del ARNr 16S/23S. Así, se han diseñado cebadores especie específicos a partir de la región del espaciador intergénico del ADNr 16S-23S para diversos lactobacilos, incluyendo *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus*

*curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus alimentarius* y *Lactobacillus farciminis* (Schillinger, *et al.*, 2006; Cho, *et al.*, 2009).

La Figura 1 presenta un esquema general de Identificación por medio de secuenciación del gen ARN ribosomal y filogenia.



**Figura 1. Secuenciación del gen del ARN ribosómico y filogenia. (a) Las células procedentes de un cultivo axénico, o de una muestra de un ambiente natural, se rompen; (b) se aísla en gen que codifica el ARN ribosómico y se producen luego muchas copias por la técnica de PCR; (c) el gen es secuenciado, y (d) las secuencias obtenidas se alinean por computadora. Un programa informático realiza comparaciones por pares y genera un árbol (e) que refleja las diferencias en la secuencia del ARN ribosómico del organismo analizado (Madigan, *et al.*, 2004).**

#### 4.3.4.1.1 Árboles filogenéticos

Los métodos para obtener secuencias del ARN ribosómico y generar árboles filogenéticos son actualmente bastante rutinarios e implican una combinación de biología molecular y análisis computarizado. Las nuevas secuencias generadas se comparan con secuencias en la RDP y/o con secuencias obtenidas de otras bases de datos tales como GenBank (USA), DDSS (Japón) o EMLB (Alemania). Luego,

utilizando un programa, se generan varios árboles posibles y se selecciona el que mejor se adapte (*best fit*) a la información evolutiva presente en las secuencias.

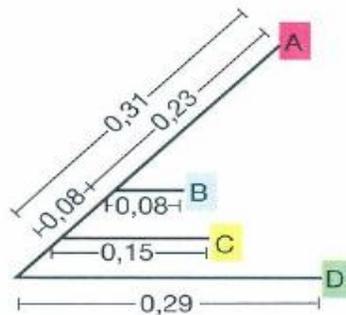
A efectos de comparación de las secuencias de los ARNs, existen varios algoritmos disponibles capaces de realizar el análisis de las secuencias y construir un árbol filogenético. Sin embargo, independientemente del programa utilizado, la secuencia obtenida debe ser en primer lugar alineada con secuencias alineadas previamente utilizando un editor de secuencias. Entonces las secuencias alineadas son importadas en el programa de construcción de árboles elegido para realizar el examen comparativo. Dos algoritmos muy utilizados a estos efectos son: la distancia y la parsimonia. En los métodos de distancia, se alinean las secuencias, y la distancia evolutiva ( $E_D$ ) se calcula mediante el recuento por computadora de todas las posiciones en las que exista una diferencia (Figura 2). A partir de aquí, puede construirse una matriz de distancias que muestra la  $E_D$  entre cada dos secuencias. Luego se introduce un factor de corrección de la  $E_D$  que tiene en cuenta la posibilidad de que en un lugar determinado se hayan producido varios cambios (Figura 2). Por ejemplo, existe una posibilidad baja, pero estadísticamente significativa, de que una base presente en un determinado lugar dos secuencias como resultado de dos acontecimientos mutagénicos, uno que inicialmente cambió la secuencia y otro que restauró la situación original. Estas posibilidades pueden estimarse y esto es lo que hace el factor de corrección. Finalmente, se genera un árbol filogenético en el que las longitudes de las líneas en el árbol son proporcionales a las distancias evolutivas (Figura 2) (Madigan, *et al.*, 2004).

Organismo	Secuencia	Análisis
A	C G U A G A C C U G A C	Para A → B, se producen tres diferencias de un total de 12; por tanto $\frac{3}{12} = 0,25$
B	C C U A G A G C U G G C	
C	C C A A G A C G U G G C	
D	G C U A G A U G U G C C	

(a) Alineamiento y análisis de secuencias

	Distancia evolutiva	Distancia evolutiva corregida
$E_D$ A → B	0,25	0,30
$E_D$ A → C	0,33	0,44
$E_D$ A → D	0,42	0,61
$E_D$ B → C	0,25	0,30
$E_D$ B → D	0,33	0,44
$E_D$ C → D	0,33	0,44

(b) Cálculo de la distancia evolutiva



(c) Árbol filogenético

Figura 2. Preparación de un árbol de distancias filogenéticas a partir de secuencias del ARN ribosómico. La distancia evolutiva ( $E_D$ ) en (b) se calcula como el porcentaje de secuencias no idénticas entre los ARNs de dos organismos cualesquiera. La  $E_D$  corregida es una corrección estadística necesaria para incluir las mutaciones regresivas que restauran el genotipo original o mutaciones adicionales hacia adelante que podrían haber sucedido en el mismo sitio. El árbol (c) se genera mediante análisis computarizado de los datos para encontrar el que mejor se adapta. La longitud total de las ramas que separan dos organismos cualesquiera es proporcional a la distancia evolutiva calculada entre ellos. En los análisis reales se utiliza a menudo un proceso estadístico llamado *bootstrapping*, en el que la computadora genera cientos de versiones del árbol para confirmar que el árbol final es el que mejor se adapta al conjunto de datos. Además, inserciones de varios nucleótidos pueden separar regiones de homología de secuencia en dos organismos y estas inserciones no se consideran en los análisis reales (Madigan, *et al.*, 2004).

## 4.4 Bacterias lácticas

### 4.4.1 Generalidades

Las bacterias lácticas son un grupo de cocos y bacilos Gram-positivos, no esporulados y catalasa negativos (con excepción de algunos pediococos). Son generalmente no móviles y fermentadores obligados produciendo principalmente ácido láctico y algunas veces también ácidos volátiles y CO<sub>2</sub> (Richter, *et al.*, 2001; Rodas, *et al.*, 2003; Hall, *et al.*, 2001).

Los miembros de este grupo carecen de porfirinas y citocromos, no llevan a cabo transporte de electrones vía fosforilación, por lo que obtienen la energía solamente a través de la fosforilación a nivel de sustrato.

Todas estas bacterias crecen anaeróbicamente. No obstante, al contrario que las anaerobias, no son sensibles al oxígeno y pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de él; por ello, se les considera como anaerobios aerotolerantes. La mayoría de las bacterias lácticas obtienen su energía solamente del metabolismo de los azúcares y por esta razón, sus hábitats están restringidos a la presencia de azúcares. Tienen metabolismo biosintético bastante limitado, por lo que requieren medios de cultivo ricos con aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Holt, *et al.*, 2000; Hall, *et al.*, 2001; Marshall y Law, 1984; Madigan, *et al.*, 2004).

La mayoría de las bacterias lácticas prefieren un pH inicial de 6 o 7 para crecer. Algunas de las especies dentro de este grupo pueden desarrollarse en medios con una concentración de NaCl que va desde 6.5 hasta 26.4%. De igual forma, algunas cepas toleran niveles de etanol de hasta 13%. Son generalmente

mesófilas, el mejor crecimiento se da a temperaturas entre 20 y 40°C, con un máximo de 50°C, sin embargo algunas cepas de lactobacilos pueden crecer hasta a 55°C. Por otro lado existen algunas especies psicotrópicas capaces de crecer a temperaturas bajo cero (Schillinger, *et al.*, 2006; Holt, *et al.*, 2000).

#### 4.4.2 Metabolismo

Una diferencia importante entre los subgrupos de las bacterias lácticas radica en que tipos de productos de fermentación generan a partir de los azúcares. El grupo llamado homofermentativo produce solamente el ácido láctico, mientras que el heterofermentativo produce otros compuestos como etanol y CO<sub>2</sub>. La diferencia entre ambos viene marcada por la presencia o ausencia del enzima aldolasa, el enzima clave de la glucólisis (Hall, *et al.*, 2001; Madigan, *et al.*, 2004).

Las bacterias lácticas pueden fermentar la glucosa por medio de dos vías (Figura 3):

- La glucólisis (ruta de Embden-Meyerhof-Parnas), que en condiciones estándar resulta en casi exclusivamente ácido láctico como producto final y el metabolismo se conoce como fermentación homoláctica.
- La ruta de 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa, que además del ácido láctico resulta en cantidades significativas de productos finales como el etanol, acetato y CO<sub>2</sub>. A este tipo de metabolismo se le llama fermentación heteroláctica.

Los productos resultantes de la fermentación pueden alterarse significativamente dependiendo de las condiciones de crecimiento. Estos cambios pueden atribuirse

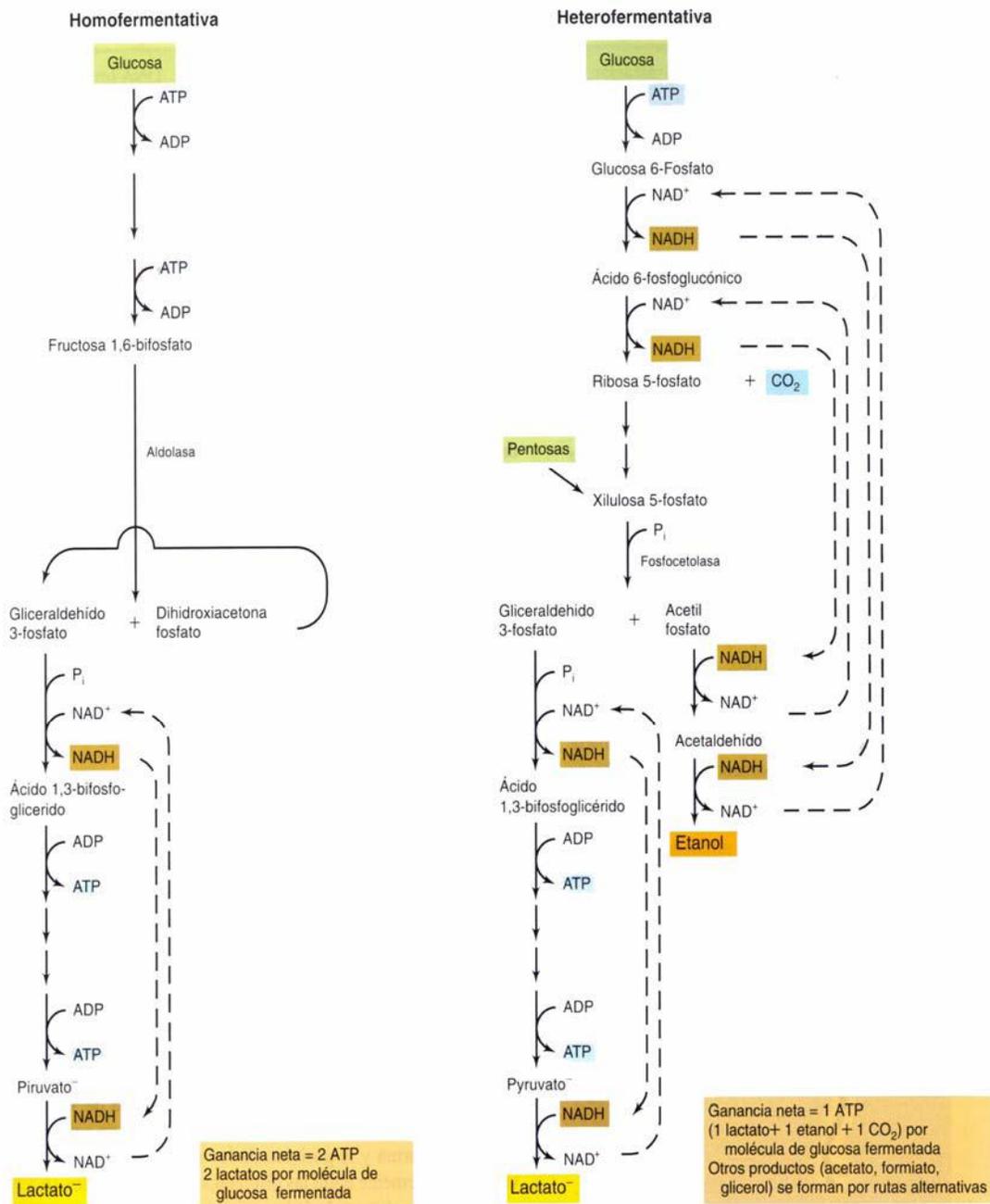
a alguna alteración del metabolismo del piruvato y/o el uso de un aceptor de electrones externo como el oxígeno o componentes orgánicos (Hall, *et al.*, 2001).

#### 4.4.3 Importancia

Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y son conocidas por su actividad en productos alimenticios tales como lácteos, cárnicos y vegetales (Richter, *et al.*, 2001).

Este grupo diverso de organismos se ha usado desde la antigüedad para mejorar el sabor, textura, vida de anaquel y valor nutricional de una amplia gama de alimentos y bebidas. Están asociadas con muchos alimentos fermentados incluyendo lácteos, carne, vegetales, pescado y leguminosas. Además imparten efectos benéficos a la salud humana incluyendo control de alteraciones gastrointestinales tales como la diarrea, inmunomodulación y disminución en los niveles de colesterol (Hall, *et al.*, 2001; Khedid, *et al.*, 2009).

La fermentación reduce la cantidad de carbohidratos disponibles y resulta en moléculas orgánicas de bajo peso molecular que presentan actividad antimicrobiana, siendo las más comunes: ácido láctico, acético y propiónico (Ouwehand, 1998). No obstante, también se conoce que las bacterias lácticas producen además de los ácidos orgánicos, otras sustancias antagonistas, como son el peróxido de hidrogeno y otros radicales libres, diacetilo, acetaldehído, isómeros D de los aminoácidos y otros metabolitos, como moléculas pequeñas no proteicas y bacteriocinas (Piard, *et al.*, 1991; Piard, *et al.*, 1992).



**Figura 3. Fermentación de la glucosa en bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas. Nótese que no se origina ATP en las reacciones que conducen a etanol. Si el oxígeno está presente, muchas bacterias lácticas homofermentativas pueden reducir el oxígeno con NADH (a través de flavinas como intermediarios), con formación de agua; se forma acetato en lugar de etanol y esto permite la producción de un ATP adicional (Madigan, *et al.*, 2004).**

Las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas pueden definirse como compuestos sintetizados en el ribosoma que inhiben el crecimiento de otras bacterias. Pueden exhibir espectro amplio o reducido y parecen estar principalmente dirigidas a otras bacterias lácticas del mismo nicho ecológico. Consecuentemente, la habilidad de producir bacteriocinas le otorga a las cepas productoras una gran ventaja en la competencia con otras bacterias por los mismos nutrientes (Knoll, *et al.*, 2008). La producción de dichos compuestos constituye un fenotipo extendido en el grupo de las bacterias lácticas (Hernández, *et al.*, 1993; Martin, *et al.*, 2005). Estos antimicrobianos tienen aplicaciones comerciales en la conservación de ciertos alimentos (Piard, *et al.*, 1992).

Las bacterias lácticas han sido también utilizadas como organismos probióticos con el objetivo de mejorar la microbiota normal del intestino (Ouwehand, 1998).

#### 4.4.4 Clasificación

La clasificación de las bacterias lácticas es objeto de un intenso estudio taxonómico con una creciente necesidad por un enfoque polifásico incluyendo caracterización fenotípica y filogenética.

Filogenéticamente las bacterias lácticas pertenecen a la rama clostridial de las bacterias Gram-positivas. Tienen menos del 55 % G + C lo que las distingue de las bifidobacterias que tienen más del 55 % G + C y por tanto pertenecen a la rama *Actinomyces* (Stiles y Holzapfel, 1997).

La clasificación de las bacterias lácticas siempre ha sido materia de controversia, pero, históricamente, el género *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* del Grupo D forman el núcleo principal de su clasificación. Las revisiones taxonómicas de este género sugieren que el grupo de bacterias lácticas comprende los siguientes grupos: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* del Grupo D, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weisella*. El género *Bifidobacterium* generalmente está considerado dentro del mismo contexto como una bacteria láctica genuina, pero filogenéticamente no tiene relación alguna ya que tiene una única vía de fermentación de azúcar. La Figura 4 presenta un árbol con los principales grupos filogenéticos dentro del conjunto de las bacterias lácticas y géneros relacionados (Hall, *et al.*, 2001).

Los diversos géneros de bacterias lácticas se han definido sobre la base de su morfología celular, ADN y tipo de fermentación. Los miembros de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, tienen una composición de bases de ADN muy parecida, existiendo muy poca variación de especie a especie. El género *Lactobacillus*, por otra parte, posee miembros con composición de bases de ADN muy diversa y por ello no constituyen un grupo homogéneo. La Tabla 2 presenta algunas de las características de los géneros principales dentro del grupo en cuestión.

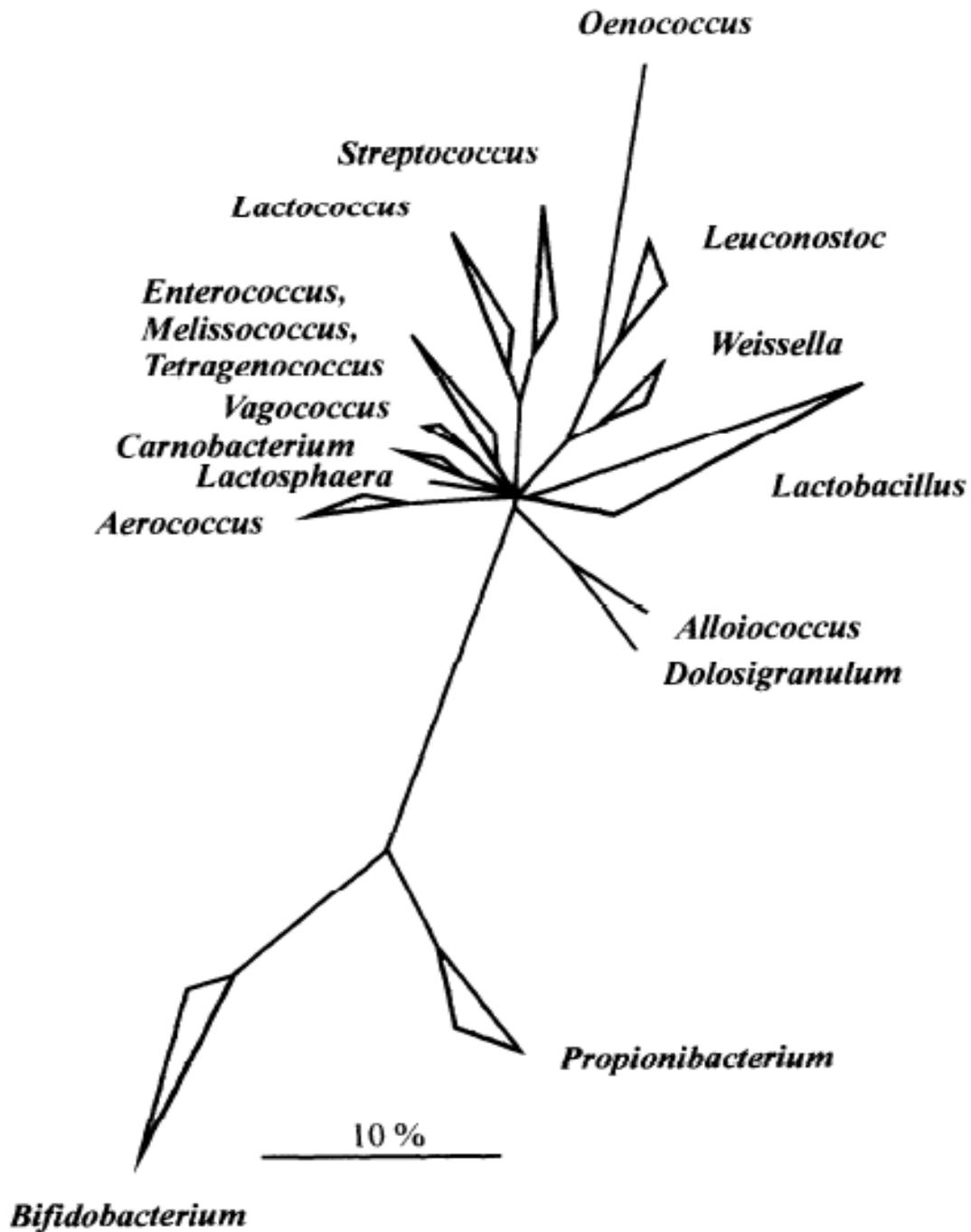


Figura 4. Principales grupos filogenéticos de bacterias lácticas y bacterias Gram-positivas relacionadas con bajo (parte superior) y alto (parte inferior) % G+C en el ADN (Stiles y Holzapfel, 1997).

**Tabla 2. Diferenciación de los principales géneros de las bacterias lácticas (Madigan, et al., 2004).**

<b>Género</b>	<b>Morfología celular y agrupación</b>	<b>Fermentación</b>	<b>ADN (GC mol %)</b>
<i>Streptococcus</i>	Cocos en cadenas	Homofermentativo	34-46
<i>Leuconostoc</i>	Cocos en cadenas	Heterofermentativo	38-41
<i>Pediococcus</i>	Cocos en tétradas	Homofermentativo	34-42
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos en cadenas	Heterofermentativo	32-53
		Homofermentativo	34-53
<i>Enterococcus</i>	Cocos en cadenas	Homofermentativo	38-40
<i>Lactococcus</i>	Cocos en cadenas	Homofermentativo	38-41

#### 4.4.4.1 *Streptococcus* y otros cocos

El género *Streptococcus* contiene una amplia variedad de especies homofermentativas con hábitats muy diversos y con actividades de mucha importancia para el ser humano. Algunas especies son patógenas primarias de mamíferos. Como productores de ácido láctico juegan un papel muy importante en la producción de leches fermentadas, ensilados y una pléyade de productos de fermentación; además, ciertas especies están implicadas en el desarrollo de caries dental (Madigan, et al., 2004). Los estreptococos tienen requerimientos nutrimentales complejos y se desarrollan bien en ambientes con una buena fuente de carbohidratos y proteínas, incluyendo tejidos, tracto intestinal de animales, leche, productos lácteos, material vegetal y otros alimentos (Stiles y Holzapfel, 1997; Holt, et al., 2000).

Para distinguir especies patogénicas y no patogénicas del ser humano, se ha estructurado el género en tres, a saber: *Streptococcus*, *Lactococcus*

(estreptococos de importancia en industria lechera) y *Enterococcus* (estreptococos de origen fecal).

Las especies que se agrupan en el género *Streptococcus* se dividen en dos grupos sobre la base de las características que se enumeran en la Tabla 3:

**Tabla 3. Características diferenciales de estreptococos, lactococos y enterococos (Madigan, et al., 2004).**

Grupo	Grupo de Lancefield	Especie representativa	Tipo de hemólisis	Buen crecimiento		Sobrevive a 60°C durante 30 min	Crecimiento en:		Hábitat
				10°C	45°C		Leche con 0,1% de azul de metileno	Medio con 40% de bilis	
<b><i>Streptococcus</i></b>									
<i>pyogenes</i> Subgrupo	A,B,C,F,G	<i>Streptococcus S. pyogenes</i>	β	-	-	-	-	-	Tracto respiratorio
<i>viridans</i> Subgrupo	-	<i>Streptococcus S. mutans</i>	α	-	+	-	-	-	Boca, intestino
<b><i>Enterococcus</i></b>	D	<i>Enterococcus faecalis</i>	β, α o nada	+	+	+	+	+	Intestino, vagina, plantas
<b><i>Lactococcus</i></b>	N	<i>Lactococcus lactis</i>	Nada	+	-	+	+	+	Plantas, leche

La hemólisis en placas de agar sangre es de considerable importancia. Las colonias que producen estreptolisinas S y O originan β hemólisis (completa). Por otra parte, muchos estreptococos, lactococos y enterococos producen α hemólisis que es la formación de una zona verde alrededor de las colonias debida a la pérdida masiva de potasio por parte de los eritrocitos del agar sangre. Los lactococos, industriales por excelencia, son del grupo N y no son patógenos (Holt, et al., 2000; Madigan, et al., 2004).

El árbol evolutivo de la rama *Clostridium* de las bacterias Gram-positivas, basado en similitud de secuencias del ARNr 16S, indicó que es apropiado separar a los

estreptococos en tres grupos genéticamente distintos: *S. sensu stricto*, *Enterococcus* y *Lactococcus*. Las especies que permanecen en el género *Streptococcus* incluyen a los estreptococos patogénicos y orales (grupo Viridans de Sherman).

*S. thermophilus* es una excepción en este género porque es un organismo iniciador importante. Su taxonomía ha sido controversial. Estudios de hibridación de ADN mostraron que estaba agrupado con los estreptococos orales pero se justificaba asignar una especie separada. Este es el único organismo aún clasificado como *Streptococcus* que se usa como cultivo iniciador en alimentos.

#### 4.4.4.2 *Lactococcus*

Las subespecies de *Lactococcus lactis* son las más importantes de las bacterias lácticas comercialmente empleadas, además de ser un cultivo iniciador industrial tradicional, han sido extensamente estudiadas por sus características bioquímicas y fisiológicas así como su efecto en los alimentos. *Lc. lactis* es comúnmente aislada a partir de material vegetal, pero el hábitat más reconocido para los lactococos son los productos lácteos. Son no móviles, homofermentativos y producen ácido L (+)-láctico a partir de la glucosa sin gas. Por medio de la adquisición del ADN plasmídico codificante para el sistema fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa (PEP-PTS) algunas cepas se adaptan bien a crecer en la leche debido a la eficiente absorción y fermentación de la lactosa. Las cepas de *Lc. lactis* producen un rango de bacteriocinas de las cuales la más importante es el

lantibiótico, nisina, que es de relativo amplio espectro y activo contra bacterias Gram-positivas (Holt, *et al.*, 2000; Stiles y Holzapfel, 1997).

#### 4.4.4.3 *Enterococcus*

Los enterococos producen ácido L (+)-láctico homofermentativamente a partir de glucosa y también derivan energía por degradación de aminoácidos. Tienen el sistema PEP-PTS para la absorción de la lactosa y otros carbohidratos, incluyendo el gluconato. Se emplean como cultivos iniciadores en algunos alimentos y están disponibles comercialmente como probióticos para la prevención y tratamiento de desordenes intestinales. La aplicación de técnicas genéticas para diferenciar los enterococos ha resuelto la incertidumbre en la clasificación de este género (Holt, *et al.*, 2000; Stiles y Holzapfel, 1997).

#### 4.4.4.4 Los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*

Estudios quimiotaxonómicos y filogenéticos han demostrado que entre los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* hay una superposición significativa que no sigue previas líneas divisorias morfológicas o fisiológicas. Los principales agrupamientos basados en estudios de ARNr 16S se enlistan a continuación: (i) El grupo de *Lb. delbrueckii* incluyendo principal, pero no exclusivamente, los lactobacilos homofermentativos; (ii) El grupo de *Lb. casei-Pediococcus*, constituido de homofermentadores estrictos así como heterofermentadores facultativos y estrictos; (iii) El grupo de *Leuconostoc* que incluye algunos lactobacilos heterofermentativos estrictos y ha sido subdividido en tres géneros: *Leuconostoc*,

*Oenococcus* y *Weissella*. Esta subdivisión filogenética se muestra en la Figura 4 (Stiles y Holzapfel, 1997).

#### 4.4.4.4.1 *Lactobacillus*

Estas bacterias son de morfología bacilar variando en su longitud y grosor. La mayoría de las especies son homofermentadoras. Se emplean como cultivos iniciadores para diversas variedades de queso, vegetales fermentados, carnes fermentadas, producción de vino y cerveza, pan de levadura natural y ensilados. Son comunes en todo tipo de derivados lácteos. Los lactobacilos son generalmente más resistentes a las condiciones ácidas que otras bacterias lácticas, siendo capaces de crecer hasta valores de pH de 4. Esta resistencia al pH les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas naturales, aún cuando el pH haya caído tanto, que otras bacterias lácticas ya no pueden crecer. Por ello, son las responsables siempre de terminar la inmensa mayoría de las fermentaciones lácticas. No son patógenos y tienen requerimientos nutricionales complejos. Crecen en hábitats diversos como se muestra en la Tabla 4 (Madigan, *et al.*, 2004; Stiles y Holzapfel, 1997; Singh, *et al.*, 2009; Holt, *et al.*, 2000).

**Tabla 4. Hábitats del género *Lactobacillus* (Stiles y Holzapfel, 1997).**

<b>Humanos</b>
Cavidad oral
Tracto intestinal
Vagina
<b>Otros hábitats</b>
Plantas
Suelo, agua, aguas residuales y abono
Alimentos fermentados (leche, carne y vegetales)
Productos cereales
Ensilados
<b>Descomposición de alimentos</b>
Cerveza
Fruta y cereales molidos
Pescado marinado
Procesamiento del azúcar
Leche
Carne y derivados
Bebidas fermentadas

El género *Lactobacillus* es heterogéneo con un contenido de 33-55% G+C en el ADN pues generalmente se sugiere que en un género bien definido no debe existir un rango mayor al 10% en el contenido de G+C.

El status taxonómico actual de los lactobacilos basado en la subdivisión fenotípica clásica se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5. Principales divisiones dentro del género *Lactobacillus* basadas en características fenotípicas (Stiles y Holzapfel, 1997).**

Negritas indican lactobacilos de importancia en alimentos y como probióticos.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Homofermentadores estrictos	Homofermentadores facultativos	Heterofermentadores estrictos
<b><i>Lb. acidophilus</i></b>	<b><i>Lb. acetotolerans</i></b>	<b><i>Lb. brevis</i></b>
<i>Lb. amylophilus</i>	<i>Lb. agilis</i>	<b><i>Lb. buchneri</i></b>
<i>Lb. amylovorus</i>	<b><i>Lb. alimentarius</i></b>	<b><i>Lb. collinoides</i></b>
<i>Lb. aviarius</i>	<b><i>Lb. bifermentans</i></b>	<b><i>Lb. fermentum</i></b>
ssp. <i>araffinosus</i>	<b><i>Lb. casei</i></b>	<b><i>Lb. fructivorans</i></b>
ssp. <i>aviarius</i>	<i>Lb. coryniformis</i>	<i>Lb. fructosus</i>
<i>Lb. crispatus</i>	ssp. <i>coryniformis</i>	<b><i>Lb. hilgardii</i></b>
<b><i>Lb. delbrueckii</i></b>	ssp. <i>torquens</i>	<b><i>Lb. kefir</i></b>
ssp. <b><i>bulgaricus</i></b>	<b><i>Lb. curvatus</i></b>	<b><i>Lb. malefermentans</i></b>
ssp. <b><i>delbrueckii</i></b>	<i>Lb. graminis</i>	<i>Lb. oris</i>
ssp. <b><i>lactis</i></b>	<i>Lb. hamster</i>	<b><i>Lb. panis</i></b>
<b><i>Lb. farciminis</i></b>	<b><i>Lb. homohiochii</i></b>	<b><i>Lb. parabuchneri</i></b>
<i>Lb. gallinarum</i>	<i>Lb. intestinalis</i>	<b><i>Lb. parakefir</i></b>
<b><i>Lb. gasseri</i></b>	<i>Lb. murinus</i>	<b><i>Lb. pontis</i></b>
<b><i>Lb. helveticus</i></b>	<b><i>Lb. paracasei</i></b>	<b><i>Lb. reuteri</i></b>
<i>Lb. jensenii</i>	ssp. <b><i>paracasei</i></b>	<b><i>Lb. sanfrancisco</i></b>
<b><i>Lb. johnsonii</i></b>	ssp. <b><i>tolerans</i></b>	<b><i>Lb. suebicus</i></b>
<b><i>Lb. kefiranofaciens</i></b>	<b><i>Lb. parapantarum</i></b>	<b><i>Lb. vaccinostercus</i></b>
<b><i>Lb. kefirgranum</i></b>	<b><i>Lb. pentosus</i></b>	<b><i>Lb. vaginalis</i></b>
<b><i>Lb. mali</i></b>	<b><i>Lb. plantarum</i></b>	
<i>Lb. ruminis</i>	<b><i>Lb. rhamnosus</i></b>	
<i>Lb. salivarius</i>	<b><i>Lb. sake</i></b>	
ssp. <i>salicinus</i>		
ssp. <i>salivarius</i>		
<i>Lb. sharpeae</i>		

*Lb. delbrueckii* forma un importante complejo de bacterias que previamente tenían estatus de especies como *Lb. delbrueckii*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis* y *Lb. leichmanii*. Tienen 80% de homología de ADN y por tanto han sido reclasificadas como *Lb. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *bulgaricus* y *lactis*. Todos estos organismos están asociados con vegetales y lácteos que son fermentados a altas temperaturas tal como 40-50°C.

*Lb. casei* está asociado a muchos hábitats, incluyendo productos lácteos, ensilados, boca e intestino humanos y aguas residuales. Está específicamente asociado al pan de levadura natural y a algunas fermentaciones en salmuera de quesos.

*Lb. plantarum* es usada como un cultivo iniciador en algunas salchichas fermentadas y productos cereales; es parte de las bacterias lácticas adventicias que crecen en productos vegetales y cárnicos fermentados y es un microorganismo de descomposición en jugos de cítricos, vino y algunos quesos. Ha sido una especie en la que se han clasificado todos los lactobacilos atípicos. Las cepas clasificadas como *Lb. plantarum* incluyen dos grupos de homología de ADN. Se ha reportado alta similitud de secuencias del ARNr 16S entre *Lb. plantarum* y *Lb. pentosus* confirmando que están cercanamente relacionadas (Stiles y Holzapfel, 1997; Essid, *et al.*, 2009; Singh, *et al.*, 2009).

#### 4.4.4.4.2 *Leuconostoc*

Incluidos en el género *Leuconostoc* están los cocos heterofermentadores.

Este grupo tiene considerables especies específicas de importancia comercial, incluyendo descomposición en el procesamiento del azúcar por producción de dextranas, la fermentación maloláctica (por *Oenococcus*) en producción de vino, producción de componentes de radicales saborizantes como diacetilo o acetoína, productos de la ruptura metabólica del citrato sabor a partir del citrato en fermentaciones lácteas y producción de polisacáridos de dextrano ( $\alpha$ -1,6-glucano)

que tienen amplias aplicaciones en investigación, industria y medicina. Otras especies producen polímeros de fructosa conocidos como levanos.

Se encuentran presentes en concentraciones relativamente bajas en tejidos de plantas vivas y sin daños, pero a medida que la planta madura y durante la cosecha y el ensilado su número aumenta. En alimentos fermentados de origen vegetal, *Leuc. mesenteroides* es generalmente el primer organismo que crece y le siguen lactobacilos más ácido tolerantes (Madigan, *et al.*, 2004; Stiles y Holzapfel, 1997).

El género *Leuconostoc* comprende tres distintas líneas evolutivas. La principal se ha designado como *Leuc. sensu stricto* y está basada en 97-99% de homología en la secuencia del ARNr. Dicha línea ha sido dividida en tres subgrupos: (i) *Leuc. mesenteroides* y *Leuc. pseudomesenteroides*; (ii) *Leuc. lactis* y *Leuc. citreum*; y (iii) los aislados de carne *Leuc. carnosum* y *Leuc. gelidum*.

#### 4.4.4.4.3 *Pediococcus*

Los pediococos son homofermentativos y todas las especies producen L (+)-lactato a partir de la glucosa con *L. dextrinicus*, que produce ácido L (+)-láctico, como única excepción. Este género ha demostrado ser filogenéticamente heterogéneo. Los pediococos se encuentran frecuentemente en bajas concentraciones, asociados a leuconostocs y lactobacilos en vegetales, diversos alimentos y como agentes de descomposición en bebidas alcohólicas como la cerveza. Son cultivos iniciadores de importancia para algunos tipos regionales de salchichas fermentadas. Algunas cepas iniciadoras tales como *P. acidilactici* y *P.*

*pentosaceus* producen también bacteriocinas. Requieren un carbohidrato fermentable para crecer y no se desarrollan bien en la leche puesto que la lactosa requiere una escisión previa.

La fermentación de la glucosa se lleva a cabo por la vía de Embden-Meyerhof con L (+)-lactato como principal producto final bajo condiciones óptimas. El piruvato puede diversificarse hacia otros productos finales.

Algunas especies exhiben extrema tolerancia a la temperatura, pH, y concentración de NaCl (Stiles y Holzapfel, 1997; Waite, *et al.*, 2009; Holt, *et al.*, 2000).

## 5. METODOLOGIA

Las cepas empleadas pertenecen a la colección del cepario de la Facultad de Química, UNAM (WFCC/WDCM-100; World Federation for Culture Collections/World Data Centre for Microorganisms) y se encuentran enlistadas a continuación:

1. *Leuconostoc mesenteroides* NRRL F-512
2. *Leuconostoc citrovorum* CFQ drivac
3. *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8042
4. *Streptococcus cremoris* CFQ ST3
5. *Streptococcus cremoris* CFQ B035
6. *Streptococcus lactis* CFQ ST18 drivac
7. *Streptococcus durans* CFQ B046
8. *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (CFQ L10)
9. *Lactobacillus plantarum* CFQ L9
10. *Lactobacillus rhamnosus* CFQ
11. *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442
12. *Lactobacillus pentosus* NRRL B-227
13. *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *delbrueckii* NRRL B-763
14. *Lactobacillus casei* CFQ L3
15. Bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Lalacult)
16. Bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Yakult)

La metodología seguida en el presente trabajo se esquematiza en la Figura 5.

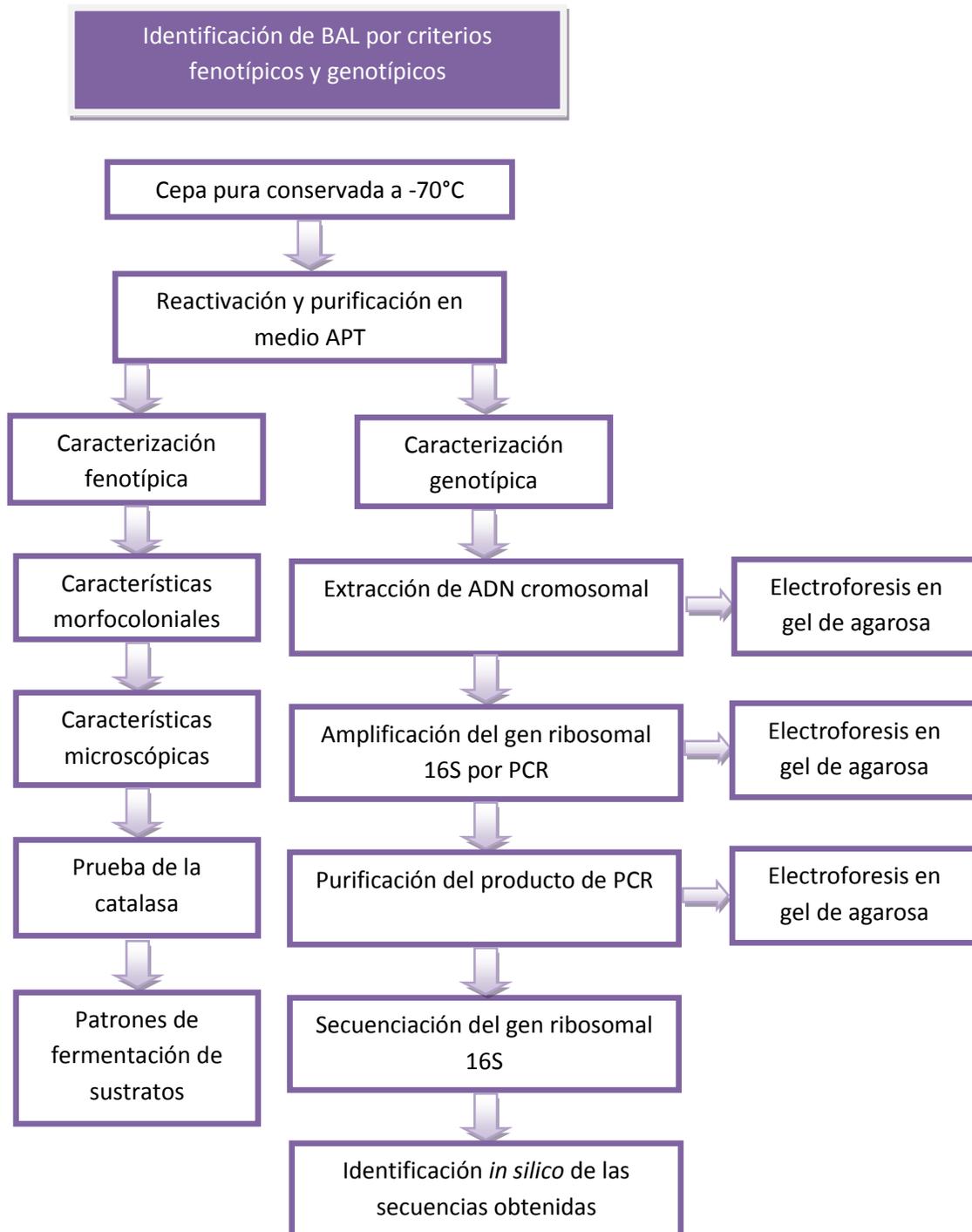


Figura 5. Metodología general seguida en el presente trabajo.

## 5.1 Reactivación y purificación en medio APT

Para todas las siembras se empleó el medio APT (Difco) cuya composición y descripción se encuentra en el Apéndice 9.1.

Todas las siembras se realizaron en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo unidireccional de la marca VECO.

Todas las cepas se incubaron a 37°C por 24 horas con excepción de la cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL F-512, cuyas condiciones de incubación fueron 28°C por 36 horas.

### 5.1.1 Reactivación a partir de crioviales a -70°C

Las cepas se encontraban conservadas en crioviales con medio APT y glicerol al 50% (P/V) a -70°C. Se tomó una asada del crecimiento para transferirlo a tubos de caldo APT y se incubó, dicho procedimiento se llevo a cabo en dos ocasiones consecutivas con el fin de asegurar un máximo enriquecimiento del cultivo. Los cultivos crecidos en el medio liquido fueron transferidos a cajas de agar APT inoculando por agotamiento en cuadrantes con el fin de obtener colonias aisladas de forma tal que se pudieran apreciar claramente las características morfológicas; este procedimiento se llevo a cabo en dos ocasiones consecutivas con el fin de asegurar la pureza de las colonias aisladas. Posteriormente las cepas fueron conservadas por subcultivo en medio APT semisólido con CaCO<sub>3</sub> hasta el momento en que se emplearon.

### 5.1.2 Reactivación a partir de cepas liofilizadas

Para las cepas *Streptococcus durans* CFQ B046, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (CFQ L10), *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442, *Lactobacillus pentosus*

NRRL B-227 y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *delbrueckii* NRRL B-763 se partió de ampollitas de liofilizados. Se abrieron las ampollitas en condiciones de esterilidad y se hidrató el liofilizado con caldo APT. El contenido total se transfirió a tubos con dicho medio y se incubó. Este procedimiento se realizó una vez más hasta que se obtuvo la turbidez adecuada. Dichos cultivos fueron transferidos a caja prosiguiendo de la misma forma que se hizo con las cepas conservadas en crioviales.

## 5.2 Caracterización fenotípica

### 5.2.1 Características morfocoloniales

Se verificó que las características morfocoloniales en el medio de cultivo en placa, agar APT, fueran las esperadas, es decir, puntiformes, convexas, de 1 a 2 mm de diámetro, con bordes definidos, de apariencia cremosa, color de blanquecino a crema y brillantes (Holt, *et al.*, 2000).

### 5.2.2 Características microscópicas

A partir de las colonias aisladas obtenidas de las cajas de agar APT se llevaron a cabo tinciones de Gram con el fin de corroborar la pureza. Se verificó que las bacterias exhibieran características microscopias propias de la cepa en cuestión, tales como el agrupamiento (tétradas, diplococos) y la morfología (cocos ovoides, bacilos largos, bacilos cortos). La metodología se describe en el Apéndice 9.2.

### 5.2.3 Prueba de la catalasa

Las bacterias lácticas carecen de la enzima catalasa, por lo que se verificó que las colonias purificadas cumplieran con esta característica, la metodología se describe en el Apéndice 9.3.

#### 5.2.4 Patrones de fermentación de sustratos

Para complementar la identificación bioquímica se obtuvo un perfil de fermentación de sustratos empleando el sistema API 50 CH de BioMérieux (Ouahghiri, *et al.*, 2005; Sánchez, *et al.*, 2005; Marit, *et al.*, 2004; Ruiz, *et al.*, 2008).

El API 50 CH es un sistema estandarizado compuesto por cincuenta ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos. Se utiliza en combinación con el API 50 CHL Medium para la identificación de los *Lactobacillus* y microorganismos próximos.

La galería API 50 CH está compuesta por cincuenta microtubos y permite el estudio de la fermentación de sustratos pertenecientes a la familia de los hidratos de carbono y derivados (heterósidos, polialcoholes, ácidos urónicos). La composición de la galería se muestra en la Figura 6.

STRIP 0-9 tube / substrate	STRIP 10-19 tube / substrate	STRIP 20-29 tube / substrate	STRIP 30-39 tube / substrate	STRIP 40-49 tube / substrate
0 CONTROL	10 GALactose	20 $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	30 MELibiose	40 D TURanose
1 GLYcerol	11 GLUcose	21 $\alpha$ -Methyl-D-Glucoside	31 Sucrose	41 D LYXose
2 ERYthritol	12 FRUctose	22 N-Acetyl-Glucosamine	32 TREhalose	42 D TAGatose
3 D ARAbinose	13 MaNnosE	23 AMYgdalin	33 INUlin	43 D FUCose
4 L ARAbinose	14 SorBosE	24 ARButin	34 MeLeZitose	44 L FUCose
5 RIBose	15 RHAmnose	25 ESCulin	35 RAFFinose	45 D ARabitoL
6 D XYLose	16 DULcitol	26 SALicin	36 Starch	46 L ARabitoL
7 L XYLose	17 INOsitol	27 CELlobiose	37 GLYcoGen	47 GlucoNaTe
8 ADOnitol	18 MANnitol	28 MALtose	38 XyLiTol	48 2-Keto-Gluconate
9 $\beta$ Methyl-D-Xyloside	19 SORbitol	29 LACTose	39 GENtiobiose	49 5-Keto-Gluconate

**Figura 6. Composición de la tira API 50CH (www.biomerieux.com).**

A partir de cultivos de 24 horas en cajas de agar APT se tomaron con asa bacteriológica colonias aisladas y se suspendieron en el medio API 50 CHL Medium ajustando a una concentración bacteriana de  $6 \times 10^8$  UFC/mL equivalente

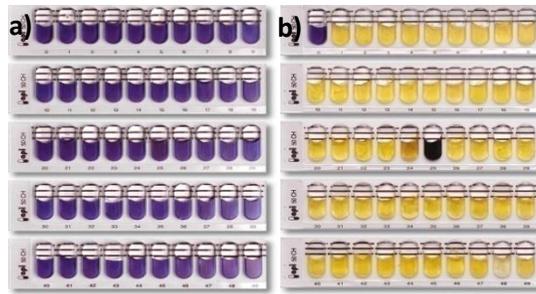
a 2.0 en la escala de McFarland empleando para ello el equipo Densimat de BioMérieux.

El Densimat es un densitómetro destinado a medir la densidad óptica de un inóculo bacteriano realizado en una ampolla de medio líquido. El aparato registra los valores en McFarland, proporcionales a los valores medios de concentraciones bacterianas obtenidas con bacilos Gram-negativos identificados en bacteriología clínica ([www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com)).

Cada uno de los microtubos de la galería fue inoculado con un volumen aproximado de 115 µL de la suspensión y un volumen similar de aceite mineral estéril fue agregado a cada una de las cúpulas con el fin de crear las condiciones de anaerobiosis necesarias para el ensayo.

Durante el período de incubación, la fermentación se tradujo en un cambio de color en el tubo, debido a una producción de ácido en anaerobiosis revelada por el indicador de pH del medio API 50 CHL Medium. El primer tubo, sin principio activo, sirvió como testigo negativo (Paludan-Müller, *et al.*, 1999; Johansson, *et al.*, 1995).

Se interpretaron los resultados a las 24 y 48 horas, otorgando valores negativos (-) a los microtubos en los que no se apreció ningún cambio de color del indicador, positivos (+) a los microtubos en los que se apreció el vire a amarillo o negro en el caso del ensayo de esculina (microtubo 25) y dudoso (?) a los microtubos en los cuales el vire no era tan intenso y se apreciaba una tonalidad verdosa. La variación de los colores al existir una fermentación se muestra en la Figura 7.



**Figura 7. Ensayos a) negativos y b) positivos en la galería API 50CH (www.biomerieux.com).**

El perfil bioquímico obtenido se analizó con el software APIweb de BioMérieux, (V: 1.1.0; 2003), mismo que establece un taxón significativo, así como el porcentaje de identificación obtenido para dicho taxón y otorga una calificación según el tipo de identificación logrado (excelente, muy bueno, bueno, bajo, etc.) (Hall, *et al.*, 2001).

### 5.3 Caracterización genotípica

#### 5.3.1 Extracción de ADN cromosomal

La extracción del ADN cromosomal se llevó a cabo empleando el UltraClean Microbial DNA Isolation Kit de MoBio Laboratories.

En la Figura 8 se esquematiza la metodología de extracción de ADN cromosomal que se describe a continuación.

##### 5.3.1.1 Suspensión celular

A partir de cultivos de 24 horas en cajas de agar APT se realizó una suspensión de las colonias aisladas y purificadas en caldo Infusión cerebro corazón ajustando a una turbidez determinada con el fin de llevar a cabo la extracción de ADN.

#### 5.3.1.2 Lisis

Se emplearon 1.8 mL de dicho cultivo y se centrifugaron con el fin de obtener un paquete celular (*pellet*). Dicho *pellet* se resuspendió en 300  $\mu$ L de una solución que contiene sales y un amortiguador que estabilizó y dispersó homogéneamente las células microbianas antes de realizar la lisis (Bead Solution). La suspensión se transfirió a un tubo de lisis (Micro Bead Tube) y se adicionaron 50  $\mu$ L de una solución que posiblemente tiene un detergente aniónico como el SDS que rompe ácidos grasos y lípidos asociados a la membrana celular (MD1). Se dió vórtex a máxima velocidad por 10 minutos generando condiciones adecuadas de lisis celular para liberar ácidos nucleicos. El tubo fue centrifugado por 1 minuto a 10,000 rpm con el fin de precipitar los restos celulares.

#### 5.3.1.3 Purificación

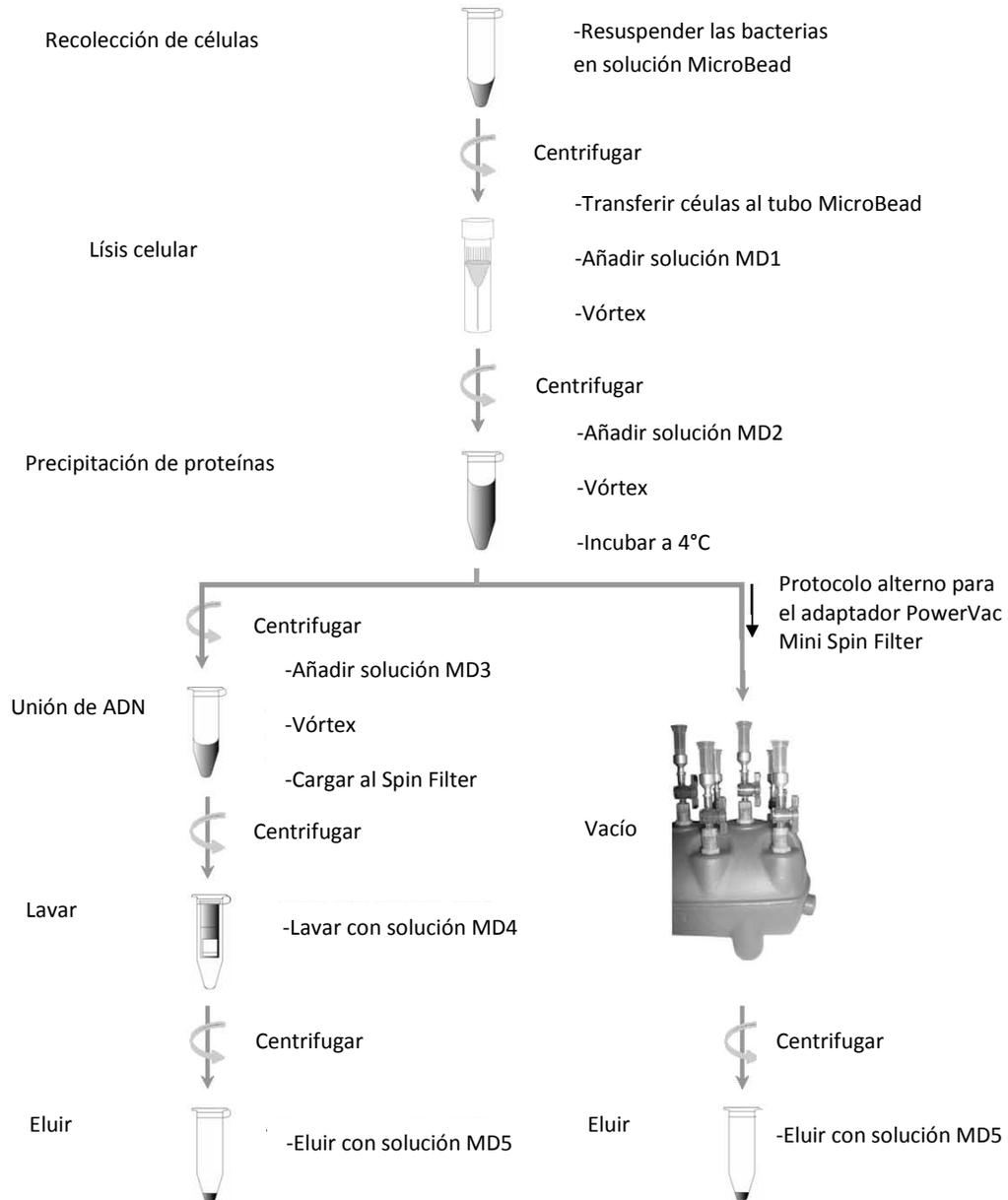
El sobrenadante que contenía el ADN cromosomal se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se le adicionaron 100  $\mu$ L de una solución (MD2) que precipitó material orgánico e inorgánico diferente al ADN, incluyendo restos celulares y proteínas. Se dio vórtex por 5 segundos y se incubaron los tubos a 4°C por 5 minutos. Se centrifugaron los tubos por 1 minuto a 10,000 rpm. Evitando el *pellet*, se transfirió el volumen completo del sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga. Se adicionaron 900  $\mu$ L de una solución salina altamente concentrada (MD3) que generó las condiciones salinas necesarias para la posterior unión del ADN al filtro de membrana. Se dió vórtex por 5 segundos. Se cargaron 700  $\mu$ L en un filtro de membrana (Spin Filter) y se centrifugó descartando el líquido resultante, este paso

se repitió 2 o 3 veces hasta cargar la totalidad del volumen. El ADN quedó selectivamente unido a la membrana del filtro mientras que los contaminantes pasaron a través de él. Se adicionaron 300 µL de la solución de lavado (MD4), que eliminó residuos de sal y otros contaminantes manteniendo el ADN unido al filtro de membrana. Se centrifugó descartando el líquido resultante. Nuevamente se centrifugó y se eliminaron las trazas de la solución de lavado.

#### 5.3.1.4 Elución, separación final y conservación del ADN extraído

El filtro de membrana se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga y se adicionaron 50 µL de la solución amortiguadora de elución 10 mM Tris pH 8 (MD5). Se centrifugó y se desechó el filtro de membrana, quedando en el tubo de microcentrífuga el ADN cromosomal aislado, mismo que se conservó en congelación a 4°C.

## UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit



**Figura 8. Extracción de ADN cromosomal empleando el UltraClean Microbial DNA Isolation Kit de MoBio Laboratories ([www.mobio.com](http://www.mobio.com)).**

### 5.3.2 Amplificación del gen ribosomal 16S por PCR

Para la amplificación del gen ribosomal 16S se utilizó el par de cebadores universales para eubacterias denominados como Eu530F (5'-TGA CTG ACT GAG TGC CAG GAC CCG CGG-3') y Eu1449R (5'-TGA CTG ACT GAG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'). Estos cebadores fueron utilizados por Borneman, *et al.*, 1996, para la amplificación de genes ribosomales a partir de muestras de ADN metagenómico aislados de suelos. Se utilizaron estos cebadores debido a su carácter inespecífico que permitió la amplificación de segmentos de ADN de 1000 pares de bases que comprenden la posición 530 hasta la 1449 de los ADNr 16S de cada uno de los templados obtenidos (Borneman, *et al.*, 1996; Escalante, *et al.*, 2008; Conca, 2008; Lozano, 2007). La Tabla 6 presenta algunas características de los cebadores empleados en este estudio.

**Tabla 6. Características de los cebadores empleados.**

<b>Oligo Eu530F</b>	<b>Oligo Eu1449R</b>
Longitud: 27b	Longitud: 30b
A <sub>260</sub> : 0.525	A <sub>260</sub> : 0.333
%G+C: 66.67	%G+C: 46.67
PM: 8768.40	PM: 9681.00

Se utilizó la enzima ADN Polimerasa Amplificasa de Biogenica. En la Tabla 7 se indican las proporciones de la mezcla de reacción empleada.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador MyCycler Personal Thermal Cycler de Bio-Rad Laboratories con las condiciones de amplificación que se especifican en la Tabla 8.

**Tabla 7. Mezcla de reacción.**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
Templado	1 $\mu\text{L}$
Amortiguador 10X	5 $\mu\text{L}$
Sulfato de Magnesio 50 mM	2.5 $\mu\text{L}$
Mezcla de dNTPs 100 mM	1 $\mu\text{L}$
Primer forward 0.05 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$
Primer reverse 0.05 $\mu\text{M}$	1.7 $\mu\text{L}$
Enzima	0.25 $\mu\text{L}$
Agua	37.55 $\mu\text{L}$
<b>Total</b>	<b>50 <math>\mu\text{L}</math></b>

**Tabla 8. Programación del termociclador.**

1 ciclo de desnaturalización	95°C 5 minutos
30 ciclos de amplificación	Desnaturalización 95°C 1 minuto
	Alineamiento 49.9 °C 1 minuto
	Amplificación 72°C 1 minuto
1 ciclo de amplificación final	72°C 5 minutos
Almacenamiento	4°C $\infty$

Los productos de PCR se almacenan en congelación a 4°C.

### 5.3.3 Purificación del producto de PCR

La purificación del producto de PCR se llevó a cabo empleando el kit Pure Link PCR Purification Kit de Invitrogen.

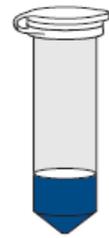
En la Figura 9 se resume la metodología de purificación del producto de PCR amplificado que se describe brevemente a continuación.

El volumen completo del producto de PCR se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de amortiguador de unión (Binding

Buffer High-Cutoff). Se agitó en vórtex para homogenizar. Se transfirió a un tubo de microcentrífuga con un filtro de membrana (Spin Column) y se centrifugó por 1 minuto a 10,000 rpm desechando el líquido resultante. En este paso el amortiguador de unión ajustó las condiciones para la unión selectiva de ADN de doble hebra a la membrana de sílica en presencia de sales caotrópicas. El amortiguador de unión eliminó dímeros de cebadores y productos fallidos de PCR (<300 pb).

Posteriormente se adicionaron 650 µL de amortiguador de lavado (Wash Buffer) a la columna y se centrifugó desechando el líquido resultante, esta operación se llevó a cabo por duplicado con el fin de eliminar cualquier residuo de amortiguador de lavado. En este paso las impurezas como cebadores, dNTPs, enzimas y sales de los productos de PCR fueron removidas lavando con amortiguador.

Finalmente el filtro de membrana se colocó en un tubo de microcentrífuga limpio y se le adicionaron 50 µL de amortiguador de elución (Elution Buffer), el filtro se incubó a temperatura ambiente por un minuto y se centrifugó a máxima velocidad, quedando en el tubo el producto de PCR purificado. En este paso el amortiguador de elución (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) tiene una baja concentración de sales por lo que permitió la elución del ADN de doble hebra ([http://tools.invitrogen.com/manuals/purelink\\_PCR\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/manuals/purelink_PCR_man.pdf)).



Añadir a los productos de PCR el amortiguador de unión apropiado con isopropanol



Transferir la muestra a un tubo de microcentrífuga con filtro de membrana



Adicionar el amortiguador de lavado a la columna



Adicionar el amortiguador de elución y eluir el ADN en un tubo limpio

**Figura 9. Purificación del producto de PCR empleando el kit Pure Link PCR Purification Kit de Invitrogen ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).**

#### 5.3.4 Electroforesis en gel de agarosa

Se corroboró la extracción del ADN cromosomal, la amplificación del gen del ARNr 16S y el producto purificado del mismo por medio de una electroforesis en gel de agarosa.

Los ácidos nucleicos (que están negativamente cargados) migran a través del gel cuando se aplica la corriente eléctrica, a velocidades dependientes de la forma y tamaño de la molécula. Las moléculas pequeñas o compactas migran más rápidamente que las moléculas grandes. Después de un periodo definido de tiempo de migración el gel puede teñirse con un compuesto que se une al ADN. Si se usa bromuro de etidio como colorante, las bandas fluorescen bajo la luz ultravioleta (Madigan, *et al.*, 2004).

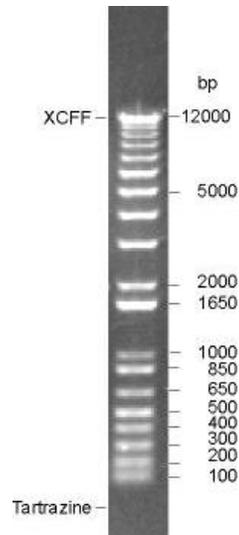
Los geles de electroforesis permiten visualizar al ADN cromosomal como una banda de un peso molecular de alrededor de 12000 pares de bases.

Típicamente se emplea electroforesis en gel para detectar un producto amplificado debido a que los cebadores se unen a regiones específicas bordeando el ADN de interés, el producto amplificado debe visualizarse como una banda de un peso molecular de alrededor de 1500 pares de bases (Entis, *et al.*, 2001).

Se emplearon geles de 25 mL de agarosa al 1% + 5  $\mu$ L de bromuro de etidio. Se utilizó como amortiguador de corrida Tris-Boratos-EDTA (TBE). La concentración del amortiguador TBE fue: 89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico y 2 mM EDTA. Se cargaron marcadores de peso molecular de 1Kpb (Invitrogen; Figura 10) para

verificar que las bandas fueran del tamaño esperado y se aplicó un voltaje de corrida de 100 V.

En la Figura 10 se muestran los perfiles de bandas del marcador de peso molecular empleado.



**Figura 10. Marcador de peso molecular de 1 Kpb de Invitrogen ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).**

### 5.3.5 Secuenciación del gen ribosomal 16S

La secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM. Se empleó el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing en un equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730.

La concentración de ADN requerido fue de 10 ng de templado por cada 100 pares de bases de producto de PCR. Se colocaron 100 ng/ $\mu$ L de templado y 10 pmol de

cada uno de los cebadores (Forward y Reverse) aforando a 50  $\mu$ L con agua. La mezcla ADN/Oligo se entregó en un volumen final de 16 $\mu$ L.

#### 5.3.6 Identificación *in silico* de las secuencias obtenidas

Se llevó a cabo la visualización y edición de las secuencias por medio del programa editor de secuencias biológicas BioEdit, Biological Sequence Alignment Editor ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit)).

Las secuencias editadas fueron alimentadas en el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI, National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) mismo que permite encontrar regiones de similitud en las secuencias biológicas comparando la consulta con aquellas que se encuentran depositadas en dicha base de datos y calculando la significancia estadística de los iguales, permitiendo así identificarlas.

Se eligieron entonces cinco secuencias de las que mostraban mayor similitud con la consulta con el fin de construir un árbol filogenético para la cepa en cuestión. Dichas secuencias en formato FASTA fueron cargadas en el programa ClustalX2 ([www.clustal.org](http://www.clustal.org)) que permitió realizar el alineamiento múltiple de las mismas, arrojando un archivo de alineación en formato .phy.

El archivo de alineación en formato .phy fue posteriormente analizado empleando el paquete de programas de filogenética computacional PHYLIP-3.68 ([evolution.genetics.washington.edu/phylip.html](http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html)). El programa seqboot se empleó para generar 100 replicas del archivo, con el cual se generó una matriz de

distancia mediante la aplicación dnadist usando el algoritmo de Jukes-Cantor, posteriormente el programa neighbor construyó el árbol filogenético y se empleó la aplicación consense con el fin de generar un árbol consenso a partir de las 100 réplicas generadas.

Finalmente el árbol consenso obtenido fue visualizado y editado empleando el programa MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis ([www.megasoftware.net/](http://www.megasoftware.net/)) (Conca, 2008; Lozano, 2007; Luangsakul, *et al.*, 2009).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

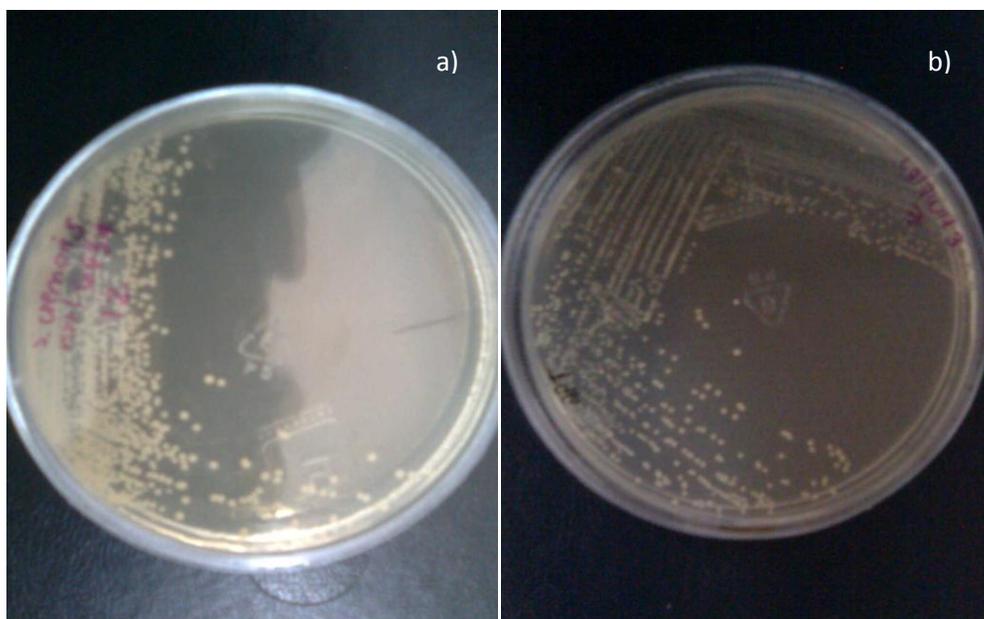
### 6.1 Reactivación y purificación en medio APT

Se obtuvo un crecimiento adecuado de las cepas de bacterias lácticas empleadas en el estudio en el medio APT, tanto en caldo como en cajas de agar.

### 6.2 Caracterización fenotípica

#### 6.2.1. Características morfocoloniales

Como se indicó en la sección 5.2.1, para considerar que las colonias obtenidas en las cajas de agar APT fueran presuntivamente bacterias lácticas se verificó que se trataran de las colonias típicas, es decir, puntiformes, convexas, de 1 a 2 mm de diámetro, con bordes definidos, de apariencia cremosa, color de blanquecino a crema y brillantes.



**Figura 11. Cajas de agar APT con colonias de a) *Streptococcus cremoris* CFQ ST3 y b) Bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Lalacult).**

La Figura 11 es un ejemplo del desarrollo morfocolonial para dos bacterias lácticas empleadas en el estudio, donde se observó el crecimiento para *Streptococcus cremoris* CFQ ST3 y la bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Lalacult). Para esta familia de microorganismos el desarrollo morfocolonial en el medio sólido selectivo APT no es un buen criterio de identidad puesto que todas las cepas presentan las mismas características. Hasta el momento no existen medios diferenciales para los distintos grupos de bacterias lácticas. Por ello dichas características solo fueron un indicativo de que la colonia se purificó adecuadamente, tomando como criterio la uniformidad en forma y diámetro de la misma.

#### 6.2.2 Características microscópicas

Todas las bacterias analizadas resultaron positivas a la tinción de Gram, característica primordial del grupo de las lácticas (Hall, *et al.*, 2001). Para todos los casos se obtuvieron características microscopias propias de la cepa en cuestión, tales como el agrupamiento (tétradas, diplococos) y la morfología (cocos ovoides, bacilos largos, bacilos cortos), los resultados se presentan en la Tabla 9 y se incluye un comparativo con lo reportado en la bibliografía.

#### 6.2.3 Prueba de la catalasa

Para todas las cepas analizadas, se obtuvo un resultado negativo a la prueba de la catalasa, ver Tabla 9 (Holt, *et al.*, 2000).

**Tabla 9. Características microscópicas y prueba de la catalasa de las cepas.**

<b>Microorganismo</b>	<b>Características microscópicas encontradas</b>	<b>Características microscópicas reportadas<sup>a)</sup></b>	<b>Prueba de la catalasa</b>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL F-512	Diplococos Gram (+)	Diplococos Gram (+)	Negativa
<i>Leuconostoc citrovorum</i> CFQ drivac	Cocos en cadenas Gram (+)	Cocos en cadenas Gram (+)	Negativa
<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 8042	Cocos pequeños en tétradas Gram (+)	Cocos en tétradas Gram (+)	Negativa
<i>Streptococcus cremoris</i> CFQ ST3	Cocos ovoides en cadena Gram (+)	Cocos en cadenas Gram (+)	Negativa
<i>Streptococcus cremoris</i> CFQ B035	Cocos ovoides en cadena Gram (+)	Cocos en cadenas Gram (+)	Negativa
<i>Streptococcus lactis</i> CFQ ST18 drivac	Diplococos de mayor tamaño Gram (+)	Diplococos Gram (+)	Negativa
<i>Streptococcus durans</i> CFQ B046	Cocos redondos en cadenas Gram (+)	Cocos en cadenas Gram (+)	Negativa
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 (CFQ L10)	Bacilos cortos en cadena Gram (+)	Bacilos en cadenas Gram (+)	Negativa
<i>Lactobacillus plantarum</i> CFQ L9	Bacilos largos y delgados Gram (+)	Bacilos en cadenas Gram (+)	Negativa
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CFQ	Bacilos largos y delgados en cadena Gram (+)	Bacilos en cadenas Gram (+)	Negativa
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NRRL B-442	Bacilos largos y delgados en cadena Gram (+)	Bacilos en cadenas Gram (+)	Negativa
<i>Lactobacillus pentosus</i> NRRL B-227	Bacilos largos y delgados en cadena Gram (+)	Bacilos en cadenas Gram (+)	Negativa
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subespecie <i>delbrueckii</i> NRRL B-763	Bacilos largos y delgados en cadena Gram (+)	Bacilos en cadenas Gram (+)	Negativa
<i>Lactobacillus casei</i> CFQ L3	Bacilos cortos Gram (+)	Bacilos en cadenas Gram (+)	Negativa
Bacteria láctica aislada de Lalacult	Bacilos largos y delgados en cadena Gram (+)	Bacilos en cadenas Gram (+)	Negativa
Bacteria láctica aislada de Yakult	Bacilos largos y delgados en cadena Gram (+)	Bacilos en cadenas Gram (+)	Negativa

a) (Holt, *et al.*, 2000; Stiles y Holzapfel, 1997; Madigan, *et al.*, 2004)

#### 6.2.4 Patrones de fermentación de sustratos

En la Figura 12 se muestran los resultados de los patrones de fermentación de las cepas *L. plantarum* ATCC 8014 (CFQ L10), *L. rhamnosus* NRRL B-442, *L. delbrueckii* subespecie *delbrueckii* NRRL B-763 y *L. pentosus* NRRL B-227 como ejemplo de los cambios que se obtuvieron después de haber inoculado e incubado los microorganismos empleados en el estudio. Como se indicó en la sección 5.2.4 la fermentación de los diferentes carbohidratos resultó en cambios en el indicador contenido en la tira API 50CH, los cuales fueron amarillos cuando se obtuvo una característica positiva, verde cuando la característica fue dudosa o morada cuando la fermentación fue negativa.

En el Apéndice 9.4 se anexan los perfiles de fermentación de sustratos obtenidos empleando el sistema API 50 CH para uno de los microorganismos empleados en el estudio.

Al emplear el programa APIweb de BioMérieux (V: 1.1.0; 2003) se obtuvo la identidad de cada una de las cepas empleadas durante el estudio. En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos al acceder el número de identificación con los patrones de fermentación generados por cada una de las cepas.

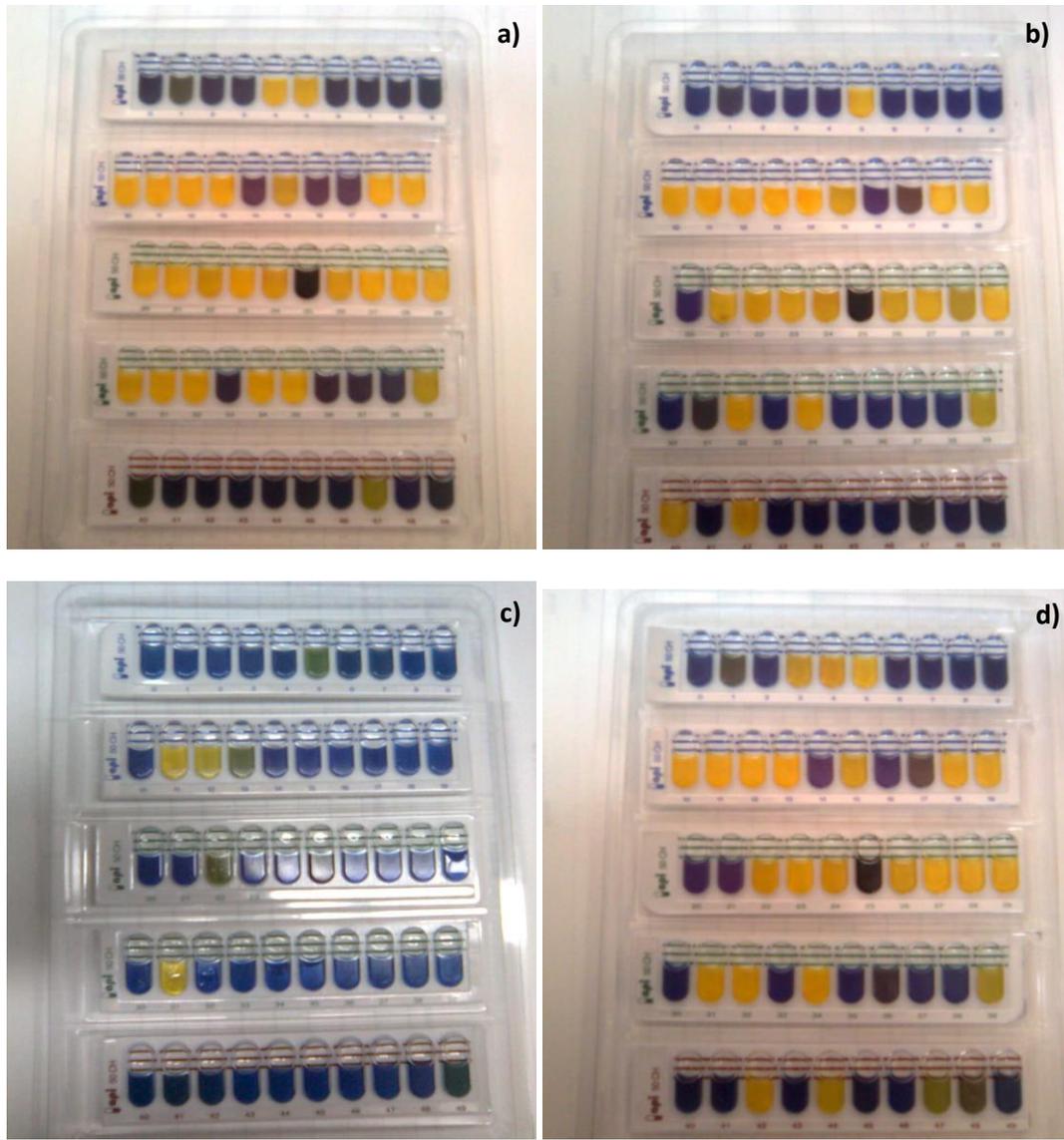


Figura 12. Tiras API después de 48 horas de incubación a 37°C. a) *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (CFQ L10) b) *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442 c) *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *delbrueckii* NRRL B-763 d) *Lactobacillus pentosus* NRRL B-227.

**Tabla 10. Resultado de identificación empleando el sistema API 50 CH de BioMérieux.**

<b>Microorganismo</b>	<b>Taxón significativo</b>	<b>%ID</b>	<b>Calidad de identificación</b>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL F-512	<i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides/dextranicum</i> 1	99.9	Excelente identificación
<i>Leuconostoc citrovorum</i> CFQ drivac	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	99.9	Muy buena identificación
<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 8042	<i>P. acidilactici</i>	99.9	Excelente identificación
<i>Streptococcus cremoris</i> CFQ ST3	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 3	99.8	Muy buena identificación
<i>Streptococcus cremoris</i> CFQ B035	<i>P. pentosaceus</i> 1	92.4	Buena identificación
<i>Streptococcus lactis</i> CFQ ST18 drivac	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	81.0	Identificación aceptable
<i>Streptococcus durans</i> CFQ B046	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	73.7	Baja discriminación
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 (CFQ L10)	<i>L. plantarum</i>	99.9	Excelente identificación
<i>Lactobacillus plantarum</i> CFQ L9	<i>L. plantarum</i>	99.9	Excelente identificación
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CFQ	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 2	89.9	Muy buena identificación en el genero
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NRRL B-442	<i>L. rhamnosus</i>	99.9	Excelente identificación
<i>Lactobacillus pentosus</i> NRRL B-227	<i>L. rhamnosus</i> ( <i>L. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i> )	99.9	Buena identificación
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subespecie <i>delbrueckii</i> NRRL B-763	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	96.8	Excelente identificación
<i>Lactobacillus casei</i> CFQ L3	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	99.7	Muy buena identificación
Bacteria láctica aislada de Lalacult	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	99.6	Muy buena identificación
Bacteria láctica aislada de Yakult	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	92.5	Excelente identificación en el género

### 6.3 Caracterización genotípica

#### 6.3.1 Extracción de ADN cromosomal

Para cada ADN cromosomal de las cepas analizadas, los geles de electroforesis muestran bandas de un peso molecular mayor a 12000 pares de bases, que es el peso esperado. Así mismo, dichas bandas son nítidas, lo cual es un indicio de que el ADN no se encuentra degradado y corroboran la eficiencia de la extracción (Entis, *et al.*, 2001). En las Figuras 13 y 14 se muestran imágenes de los geles de electroforesis digitalizados.

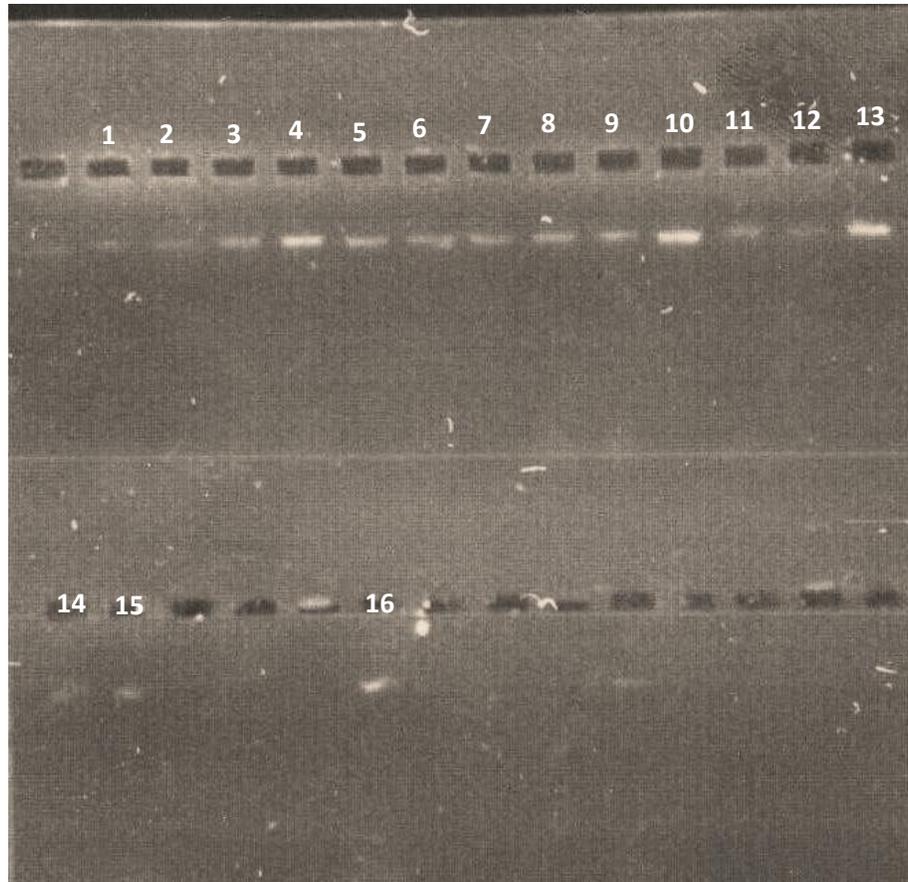


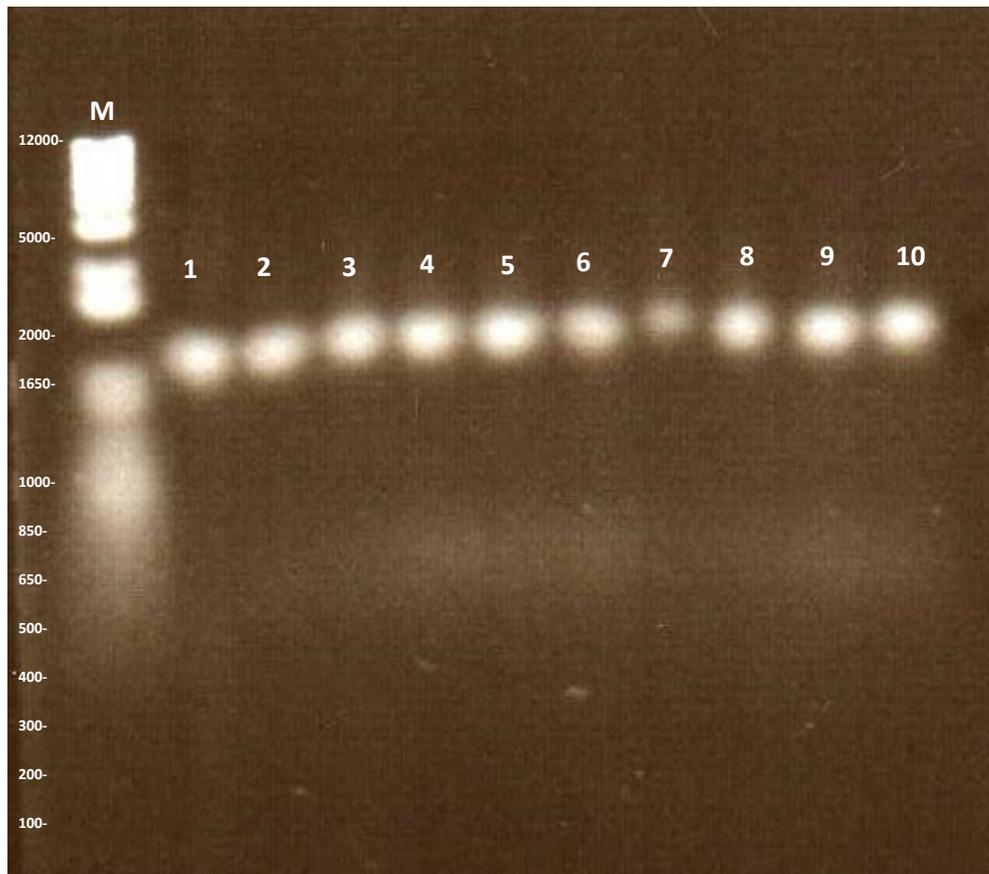
Figura 13. Gel de agarosa al 1% en el cual se muestra el ADN cromosomal de: Carril 1: *Leuconostoc mesenteroides* NRRL F-512 Carril 2: *Leuconostoc citreum* pq7-12 laxa Carril 3: *Leuconostoc citreum* pq3h37-1 mucoide Carril 4: *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8042 Carril 5: *Streptococcus durans* CFQ B046 Carril 6: Bacteria láctica aislada de Lalacult Carril 7: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (CFQ L10) Carril 8: *Lactobacillus plantarum* CFQ L9 Carril 9: *Streptococcus cremoris* CFQ ST3 Carril 10: Bacteria láctica aislada de Yakult Carril 11: *Streptococcus cremoris* NRRL B-634 Carril 12: *Leuconostoc citrovorum* CFQ drivac Carril 13: *Streptococcus cremoris* CFQ B035 Carril 14: *Lactobacillus rhamnosus* CFQ Carril 15: *Streptococcus lactis* CFQ ST18 drivac Carril 16: *Lactobacillus casei* CFQ L3. Cada pozo contiene: 5  $\mu$ L de muestra + 3  $\mu$ L de colorante. Condiciones de corrida: 100 V por 30 minutos.



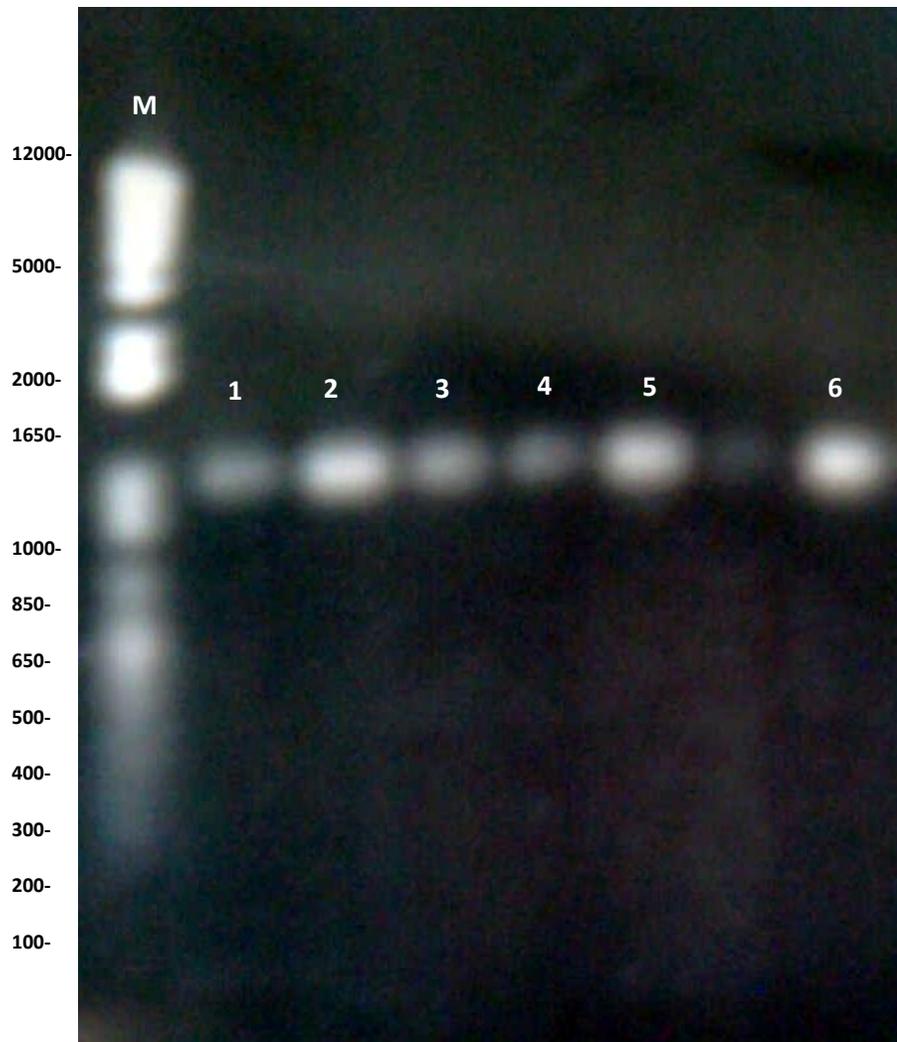
**Figura 14. Gel de agarosa al 1% en el cual se muestra el ADN cromosomal de: M: Marcador de peso molecular Carril 1: *Lactobacillus pentosus* NRRL B-227 Carril 2: *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442 Carril 3: *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* NRRL B-548 Carril 4: *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *delbrueckii* NRRL B-763. Cada pozo contiene: 5  $\mu$ L de muestra + 3  $\mu$ L de colorante. Condiciones de corrida: 100 V por 30 minutos.**

### 6.3.2 Amplificación del gen ribosomal 16S por PCR

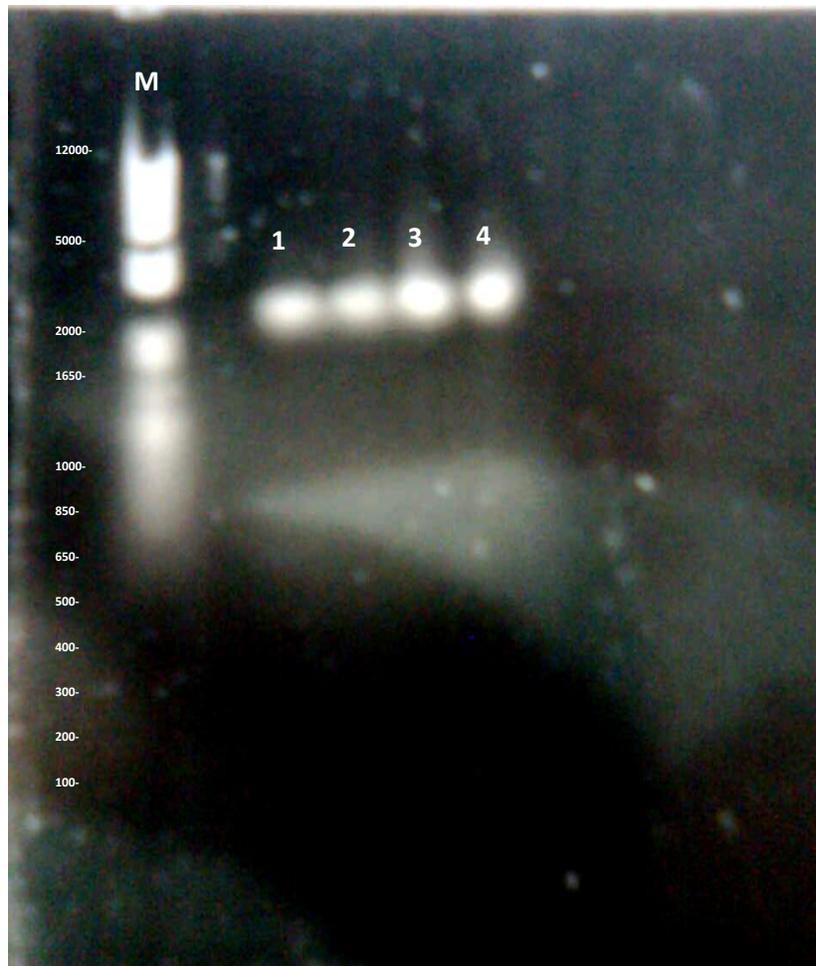
Se logró una adecuada amplificación del gen del ARNr 16S, esto se verificó con la observación de bandas nítidas en los geles de electroforesis. Las digitalizaciones de los geles de electroforesis muestran bandas nítidas que corresponden al peso molecular esperado, de alrededor de 1500 pares de bases (Entis, *et al.*, 2001). En las Figuras 15, 16 y 17 se muestran imágenes de los geles de electroforesis digitalizados.



**Figura 15. Gel de agarosa al 1% en el cual se muestra el producto de PCR de:**  
M: Marcador de peso molecular Carril 1: *Leuconostoc mesenteroides* NRRL F-512 Carril 2: *Leuconostoc citreum* pq7-12 laxa Carril 3: *Leuconostoc citreum* pq3h37-1 mucoide Carril 4: *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8042 Carril 5: *Streptococcus durans* CFQ B046 Carril 6: Bacteria láctica aislada de Lalacult Carril 7: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (CFQ L10) Carril 8: *Lactobacillus plantarum* CFQ L9 Carril 9: *Streptococcus cremoris* CFQ ST3 Carril 10: Bacteria láctica aislada de Yakult.  
Cada pozo contiene: 5  $\mu$ L de muestra + 3  $\mu$ L de colorante. Condiciones de corrida: 100 V por 30 minutos.



**Figura 16. Gel de agarosa al 1% en el cual se muestra el producto de PCR de:**  
M: Marcador de peso molecular Carril 1: *Streptococcus cremoris* NRRL B-634 Carril 2: *Leuconostoc citrovorum* CFQ drivac Carril 3: *Streptococcus cremoris* CFQ B035 Carril 4: *Lactobacillus rhamnosus* CFQ Carril 5: *Streptococcus lactis* CFQ ST18 drivac Carril 6: *Lactobacillus casei* CFQ L3. Cada pozo contiene: 5  $\mu$ L de muestra + 3  $\mu$ L de colorante. Condiciones de corrida: 100 V por 30 minutos.

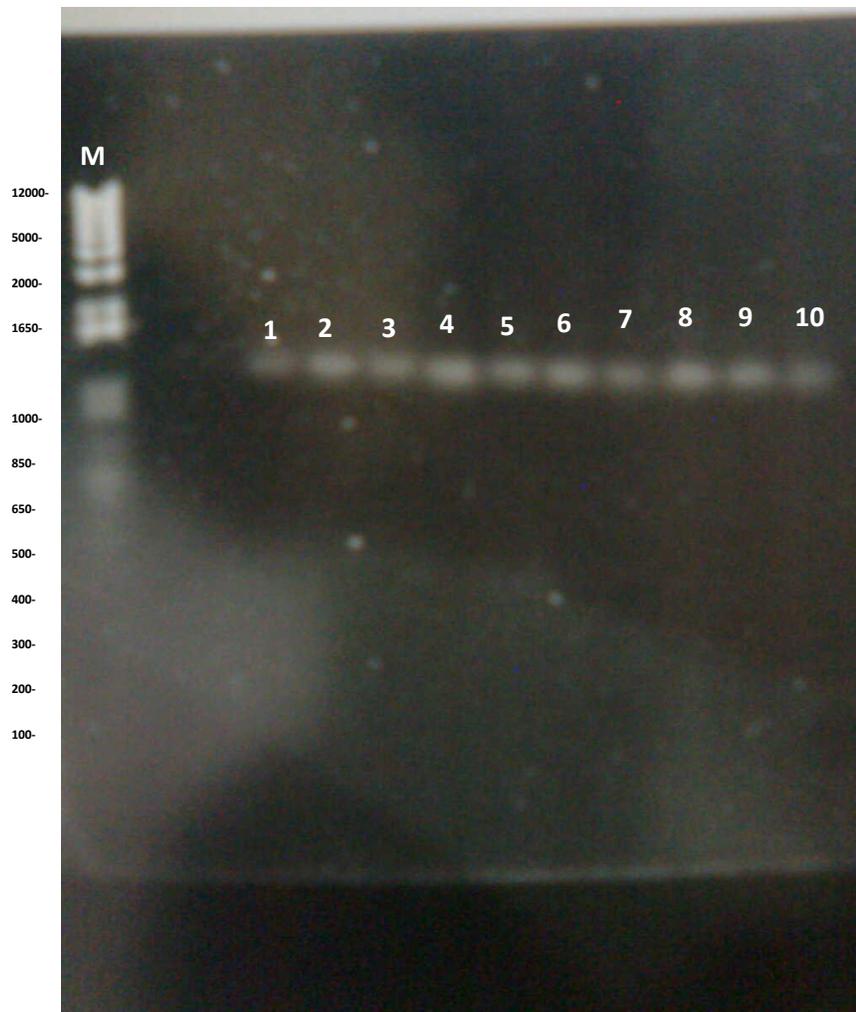


**Figura 17. Gel de agarosa al 1% en el cual se muestra el producto de PCR de:**  
**M: Marcador de peso molecular Carril 1: *Lactobacillus pentosus* NRRL B-227**  
**Carril 2: *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442 Carril 3: *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* NRRL B-548 Carril 4: *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *delbrueckii* NRRL B-763.**

**Cada pozo contiene: 5  $\mu$ L de muestra + 3  $\mu$ L de colorante. Condiciones de corrida: 100 V por 30 minutos.**

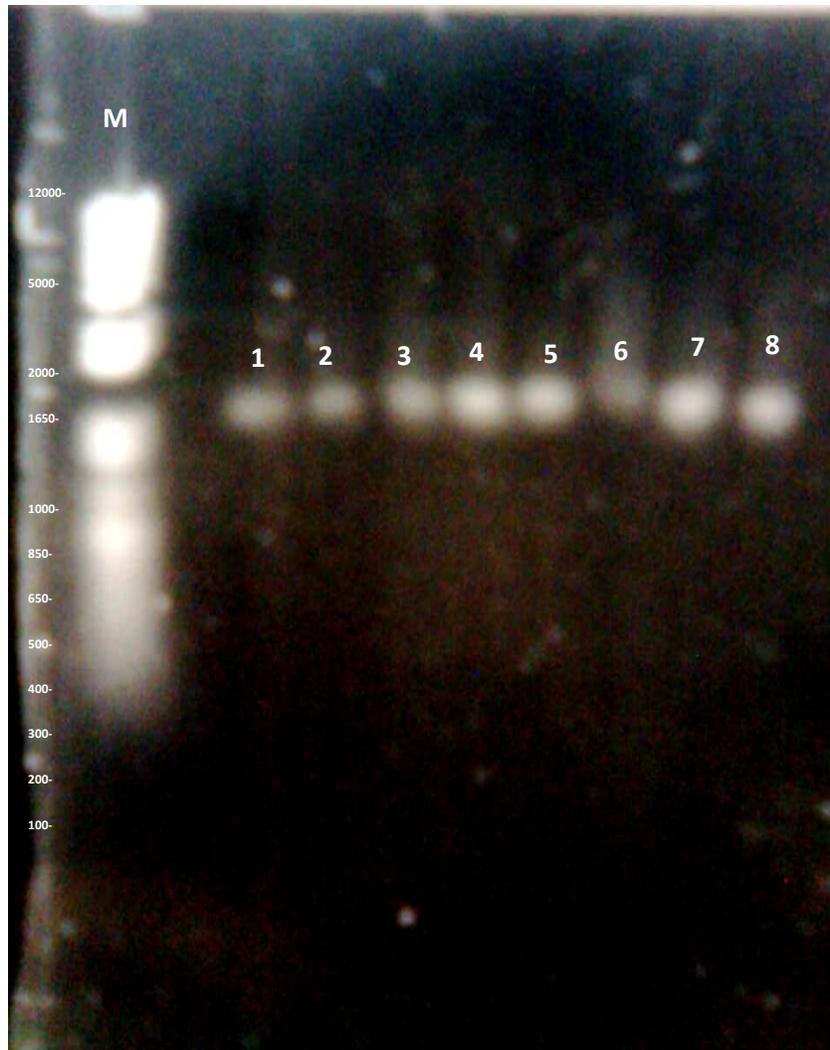
### 6.3.3 Purificación del producto de PCR

En las Figuras 18 y 19 se muestran imágenes de los geles de electroforesis digitalizados. Se logró una adecuada purificación de la amplificación del gen del ARNr 16S, esto se verificó con la observación de bandas nítidas de alrededor de 1500 pares de bases en los geles. Dichos geles confirman que la purificación del producto de PCR fue bien lograda pues se eliminaron por completo todas las bandas de menor peso molecular que no correspondían al gen ribosomal 16S.



**Figura 18.** Gel de agarosa al 1% en el cual se muestra el producto de PCR purificado de: M: Marcador de peso molecular Carril 1: *Leuconostoc mesenteroides* NRRL F-512 Carril 2: *Leuconostoc citreum* pq7-12 laxa Carril 3: *Leuconostoc citreum* pq3h37-1 mucoide Carril 4: *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8042 Carril 5: *Streptococcus durans* CFQ B046 Carril 6: Bacteria láctica aislada de Lalacult Carril 7: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (CFQ L10) Carril 8: *Lactobacillus plantarum* CFQ L9 Carril 9: *Streptococcus cremoris* CFQ ST3 Carril 10: Bacteria láctica aislada de Yakult.

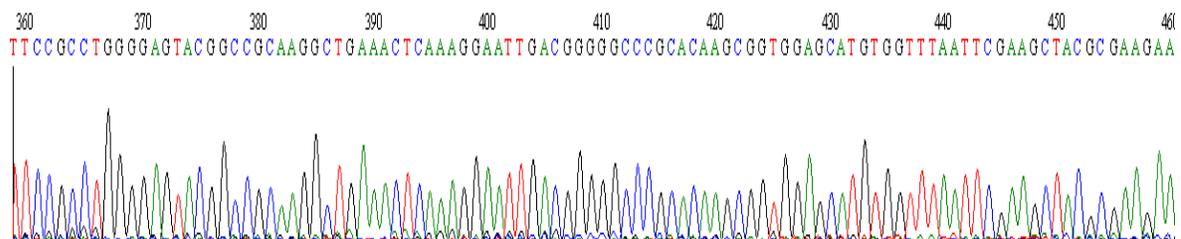
Cada pozo contiene: 5  $\mu$ L de muestra + 3  $\mu$ L de colorante. Condiciones de corrida: 100 V por 30 minutos.



**Figura 19.** Gel de agarosa al 1% en el cual se muestra el producto de PCR purificado de: M: Marcador de peso molecular Carril 1: *Streptococcus cremoris* NRRL B-634 Carril 2: *Leuconostoc citrovorum* CFQ drivac Carril 3: *Streptococcus cremoris* CFQ B035 Carril 4: *Lactobacillus rhamnosus* CFQ Carril 5: *Streptococcus lactis* CFQ ST18 drivac Carril 6: *Lactobacillus pentosus* NRRL B-227 Carril 7: *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442 Carril 8: *Lactobacillus casei* CFQ L3. Cada pozo contiene: 5  $\mu$ L de muestra + 3  $\mu$ L de colorante. Condiciones de corrida: 100 V por 30 minutos.

### 6.3.4 Secuenciación del gen ribosomal 16S

Como se indicó en la sección 5.3.5, cada una de las cepas fue secuenciada por el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing (Perkin Elmer/Applied Biosystems) en la Unidad de Síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM. En la Figura 20 se muestra un segmento del cromatograma de la secuencia del ADNr 16S para la cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (CFQ L10) y en la Figura 21 la secuencia parcial en formato FASTA para dicha cepa, ambos obtenidos por medio del programa BioEdit. El resultado de la secuenciación para el resto de las cepas empleadas en el estudio se muestra en el Apéndice 9.5.



**Figura 20. Cromatograma de la secuencia del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (CFQ L10) obtenido por el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing (Perkin Elmer/Applied Biosystems). Se muestra una secuencia parcial empleando el programa BioEdit.**

CATCTCATAGATTTACCATCTGCTTTCGTCCGTTGTCGGATTTATTGGGC  
GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCT  
CAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAC  
AGTGGAActCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACAC  
CAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAActGACGCTGAGGCTCGAAAG  
TATGGGTAGCAAACAGGATTAGATAccCTGGTAGTCCATACCGTAAACGA  
TGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGC  
ATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAActCAAAGGA  
ATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCT  
ACGCGAAGAActTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATT  
AGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG  
CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAT  
TATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACA  
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT  
GGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGA  
GAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAA  
CTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC  
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAG  
TTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACTTTTAGGAACCAGCCGCCTA  
ATGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCTT

**Figura 21. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (CFQ L10) en formato FASTA empleando el programa BioEdit.**

#### 6.4 Identificación fenotípica y genotípica

Para todos los microorganismos empleados en el estudio los resultados comparativos entre la aproximación fenotípica y por secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S se presentan en la Tabla 11. Se incluye el taxón y el porcentaje con el cual se identificó al mismo por ambas aproximaciones.

**Tabla 11. Comparación de los resultados obtenidos por medio de la identificación fenotípica y genotípica.**

Microorganismo	Identificación fenotípica Sistema API 50CH			Identificación genotípica Secuenciación ADNr 16S	
	Taxón significativo	%ID	Calidad de identificación	Descripción	% de homología en secuencia
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL F-512	<i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides/dextranicum</i> 1	99.9	Excelente identificación	No se logró resolver.	
<i>Leuconostoc citrovorum</i> CFQ drivac	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	99.9	Muy buena identificación	<i>Enterococcus faecalis</i> cepa 3-12	97
<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 8042	<i>P. acidilactici</i>	99.9	Excelente identificación	<i>Pediococcus acidilactici</i> cepa IMAU20075	100
<i>Streptococcus cremoris</i> CFQ ST3	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 3	99.8	Muy buena identificación	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> cepa IMAU50167	99
<i>Streptococcus cremoris</i> CFQ B035	<i>P. pentosaceus</i> 1	92.4	Buena identificación	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> cepa IMAU50167	98
<i>Streptococcus lactis</i> CFQ ST18 drivac	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	81.0	Identificación aceptable	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> cepa IMAU50146	99
<i>Streptococcus durans</i> CFQ B046	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	73.7	Baja discriminación	<i>Enterococcus durans</i> cepa IMAU20072	100
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 (CFQ L10)	<i>L. plantarum</i>	99.9	Excelente identificación	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa 4	100
<i>Lactobacillus plantarum</i> CFQ L9	<i>L. plantarum</i>	99.9	Excelente identificación	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa 4	100
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CFQ	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 2	89.9	Muy Buena identificación en el genero	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> cepa KLDS 1.0644	99
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NRRL B-442	<i>L. rhamnosus</i>	99.9	Excelente identificación	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> cepa KLDS 1.0644	97
<i>Lactobacillus pentosus</i> NRRL B-227	<i>L. rhamnosus</i> ( <i>L. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i> )	99.9	Buena identificación	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> cepa KLDS 1.0644	100
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subespecie <i>delbrueckii</i> NRRL B-763	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	96.8	Excelente identificación	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> cepa: YIT 0080 (= ATCC 9649)	100
<i>Lactobacillus casei</i> CFQ L3	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	99.7	Muy buena identificación	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa KLDS1.0657	98
Bacteria láctica aislada de Lalacult	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	99.6	Muy buena identificación	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa KLDS1.0657	99
Bacteria láctica aislada de Yakult	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	92.5	Excelente identificación en el género	<i>Lactobacillus casei</i> cepa IMAU20006	100

Algunas de las cepas con las que se trabajó se encontraban clasificadas bajo un nombre que no era el que manejaban tanto la base de datos del sistema API 50CH como la base de datos del NCBI, esto es debido a que muchos de los organismos pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas han sufrido revisiones en su nomenclatura o han sido reclasificadas dentro de un nuevo taxón.

Se tuvieron que llevar a cabo dichas correcciones en la clasificación con el fin de identificar a las cepas de manera consensual.

*Leuconostoc mesenteroides* esta reportado como un diplococo Gram-positivo, lo cual es consistente con lo observado en la caracterización microscópica para la cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL F-512 (Tabla 9). Se describe como una bacteria láctica heterofermentativa estricta que fermenta la L-arabinosa, fructosa, esculina, salicina, maltosa, melibiosa, sacarosa, manosa, ribosa y trealosa (Robinson, 1990; Holt, *et al.*, 2000); el resultado obtenido del perfil de fermentación de sustratos contenido en el Apéndice 9.4 concuerda con dicha descripción. Se obtuvo una excelente identificación fenotípica con un 99.9% de identidad para el taxón significativo *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* 1 (Tabla 10), es decir, el sistema identificó a nivel de subespecie a la cepa de interés aún cuando la clasificación del cepario no la especificaba. El resultado de la secuenciación correspondiente a esta cepa no pudo ser analizado debido a que el cromatograma no mostraba picos definidos y por tanto las bases no estaban bien resueltas.

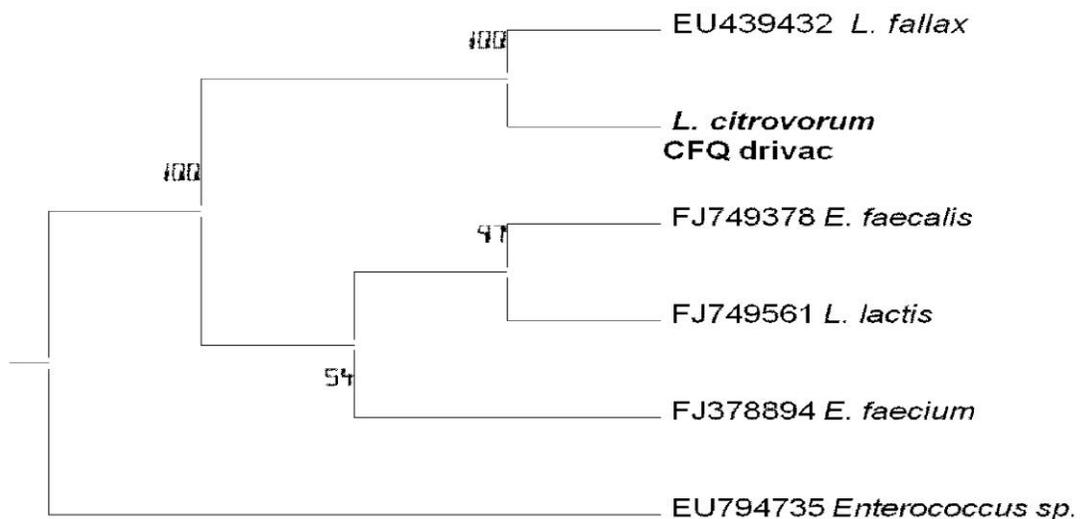
La cepa *Leuconostoc citrovorum* CFQ drivac se describe como una bacteria láctica heterofermentativa estricta que fermenta fructosa, galactosa, lactosa, maltosa, sacarosa y en algunos casos manosa y salicina (Robinson, 1990; Holt, *et al.*, 2000); el resultado obtenido del perfil de fermentación de sustratos contenido en el Apéndice 9.4 concuerda con dicha descripción. Esta especie ha sido renombrada como *Leuconostoc lactis* (Frank, 1992) y el cepario aún registraba la clasificación anterior. *Leuconostoc lactis* esta reportado como un coco en cadena Gram-positivo, lo cual es consistente con lo observado en la caracterización microscópica (Tabla 9). La cepa se identificó fenotípicamente con un 99.9% de identidad, que corresponde a una muy buena calidad de identificación para el taxón *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1 (Tabla 10). Esta incongruencia puede estar relacionada con defectos en el sistema API 50CH puesto que la morfología del microorganismo se corroboró y correspondía a cocos en cadena. Algunos autores señalan que la identificación de bacterias lácticas no es satisfactoria cuando se emplean sistemas miniaturizados (*kits*) (Garvie, 1984). Una desventaja importante que tienen los métodos de identificación que emplean este tipo de sistemas es que la posible identificación del aislado se hace con relación a una base de datos conformada por microorganismos de referencia limitada. Cuando se trata de un microorganismo aislado de origen distinto al de la cepa de referencia, el programa (en este caso Apiweb, BioMérieux) asigna una identificación basada en dicho acervo restringido, resultando de poca precisión.

Al introducir la secuencia de la cepa *Leuconostoc citrovorum* CFQ drivac a la base de datos del NCBI se encontró una homología relativamente baja (97%) para el

*Enterococcus faecalis* cepa 3-12 (Tabla 11) lo cual es inconsistente con la caracterización fenotípica y tampoco concuerda con la clasificación del cepario.

Este fue el único caso en el estudio en el que la caracterización genotípica fue errada en género y especie.

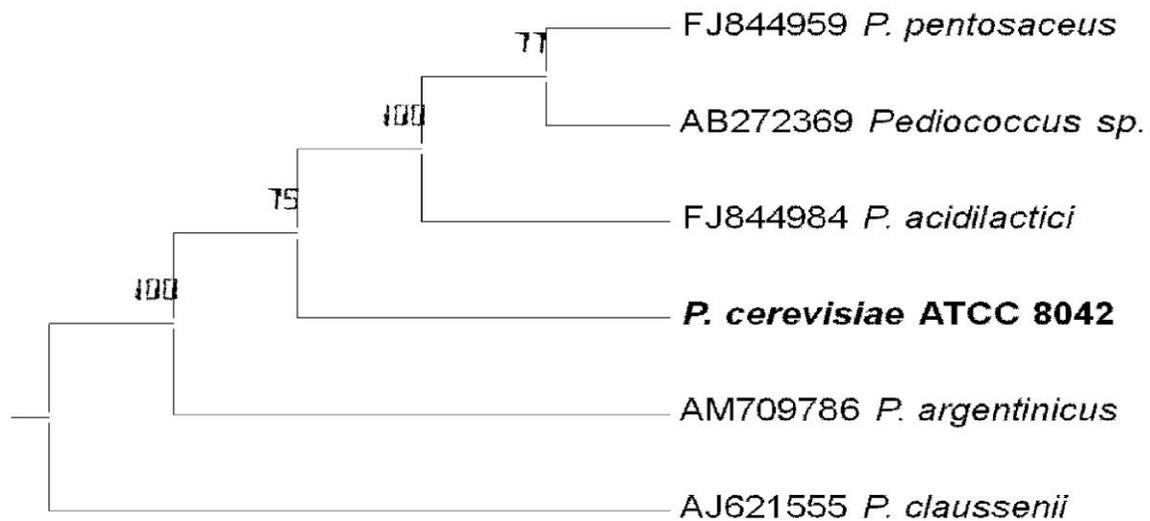
La Figura 22 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa. Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 97 para la rama que corresponde a la especie *Enterococcus faecalis*. Este valor se refiere al número de ocasiones en que dentro del árbol filogenético se mantiene dicha topología de un total de 100. Esto indica que el árbol presentó buena robustez y hay relación filogenética entre ambas cepas.



**Figura 22. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Leuconostoc citrovorum* CFQ drivac (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de accesoión precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.**

Se infiere que esta cepa no pudo ser identificada adecuadamente debido a una combinación de factores que incluyeron defectos en el sistema API 50CH, alguna alteración fenotípica y un error en la clasificación del cepario.

Para la cepa *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8042 se encontraron inconsistencias taxonómicas entre la clasificación del cepario y los resultados obtenidos por medio de los dos métodos de identificación. Esto se debe a que las revisiones taxonómicas indican la reclasificación de la cepa *Pediococcus cerevisiae* a *Pediococcus acidilactici* (Garrity, et al., 2004) y el cepario aún registraba la clasificación anterior. La bibliografía reporta a *Pediococcus acidilactici* como cocos en tétradas Gram-positivos, característica que pudo ser corroborada mediante el análisis microscópico (Tabla 9). Se describe como una bacteria láctica homofermentativa estricta que fermenta esculina, arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, manosa, ramnosa, ribosa, salicina, trealosa y xilosa y no fermenta la lactosa (Robinson, 1990; Garvie, 1984; Holt, et al., 2000), el resultado obtenido del perfil de fermentación de sustratos contenido en el Apéndice 9.4 concuerda con dicha descripción. La cepa se identificó fenotípicamente con un 99.9% de identidad, que corresponde a una excelente identificación (Tabla 10). Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S se identificó con un 100% de homología como un *Pediococcus acidilactici*, lo que ratifica el resultado obtenido mediante la caracterización fenotípica (Tabla 11). La Figura 23 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa. Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie *Pediococcus acidilactici* lo que indica excelente robustez en la topología de dicho árbol y una estrecha relación filogenética entre ambas cepas.

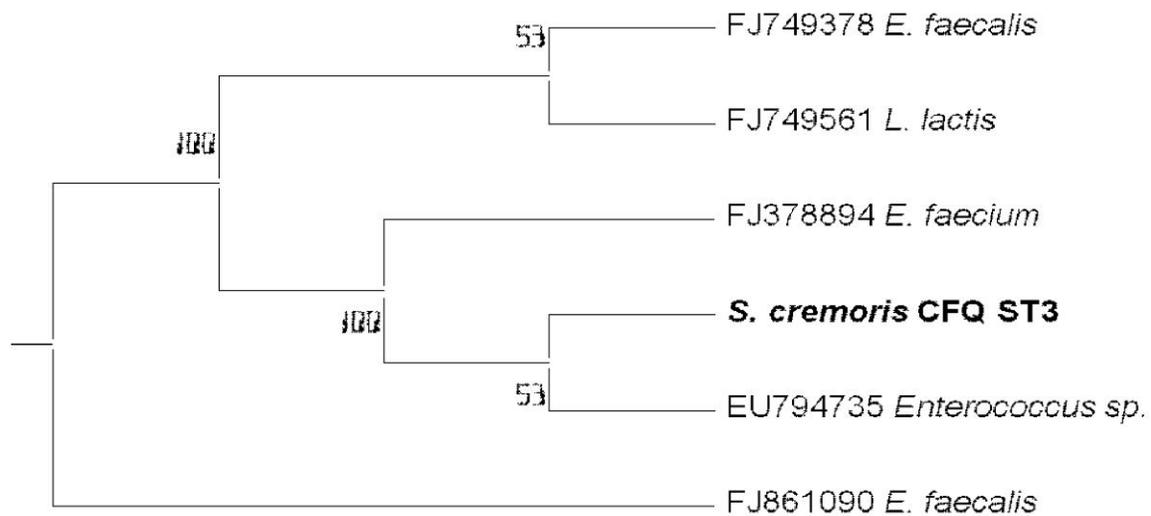


**Figura 23. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8042 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de accesión precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.**

Para esta cepa se obtuvieron altos porcentajes de identificación y correlación entre ambos métodos, así como congruencia con la clasificación del cepario. Se recomienda actualizar la nomenclatura para este microorganismo así como crear un archivo que documente las diferentes revisiones taxonómicas que ha tenido.

En cuanto a la cepa *Streptococcus cremoris* CFQ ST3 el cepario aún tenía registrado el nombre obsoleto. Las revisiones taxonómicas reclasificaron en 1979 a dicha cepa en el nuevo género *Lactococcus* como la especie *lactis* ssp. *cremoris* (Hutkins, 2006). La bibliografía reporta a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* como cocos en cadenas Gram-positivos, característica que pudo ser corroborada mediante el análisis microscópico (Tabla 9). Se describe como una bacteria láctica homofermentativa estricta que fermenta lactosa, ribosa y en algunos casos esculina, salicina y trealosa (Robinson, 1990; Holt, *et al.*, 2000); el resultado obtenido del perfil de fermentación de sustratos contenido en el Apéndice 9.4 concuerda con dicha descripción. Se obtuvo una muy buena identificación con un 99.8% de identidad pero para otro taxón, *L. paracasei* ssp. *paracasei* 3 (Tabla 10). La morfología del microorganismo fue corroborada con el fin de descartar la posibilidad de tener una clasificación errónea y se observó que correspondía a cocos ovoides en cadena, por lo que dicha inconsistencia se atribuye a un defecto del sistema API 50CH. La literatura sugiere que para el género *Lactococcus*, un nivel de propiedades fenotípicas generales no es particularmente útil. Este es un género en el cual una batería de pruebas selectas proporcionaría una identificación más exacta (Garvie, 1984). Algunas pruebas complementarias que podrían realizarse con el fin de corroborar la caracterización fenotípica y hacer más exhaustivo el estudio serían el crecimiento a 40°C, el crecimiento con 4% de NaCl y la hidrólisis de arginina (Garvie, 1984; Holt, *et al.*, 2000). Ahora bien, la identificación genotípica para esta cepa mostró un 99% de homología para el taxón *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, observando que la subespecie no

correspondió a la esperada, sin embargo este método, a diferencia del fenotípico, sí permitió identificar la cepa a nivel de género y especie. Se confirma así que las discrepancias se deben a las fallas inherentes al sistema API 50CH que fueron previamente discutidas en la página 95 (Tabla 11). Algunos autores reportan que muchas especies de bacterias lácticas poseen gran similitud de secuencias en el gen ARNr 16S (Schillinger, *et al.*, 2006; Randazzo, *et al.*, 2009; Benito, *et al.*, 2008) y que la secuenciación de dicho gen carece del poder de resolución para diferenciar organismos al nivel de especie y subespecie (Madigan, *et al.*, 2004), sin embargo Axelsson, 1998 reportó el uso del gen para diferenciar entre subespecies *lactis* y *cremoris* de *Lactococcus*. Es importante enfatizar que en el presente trabajo se emplearon cebadores universales y estos suelen mostrar menor resolución que los cebadores específicos. El uso de estos últimos permitiría llevar a cabo una identificación mas fina que logre discernir entre las subespecies. La Figura 24 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa. Se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 53 en la rama que corresponde a la especie *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* indicio de poca robustez en la topología de este árbol filogenético.

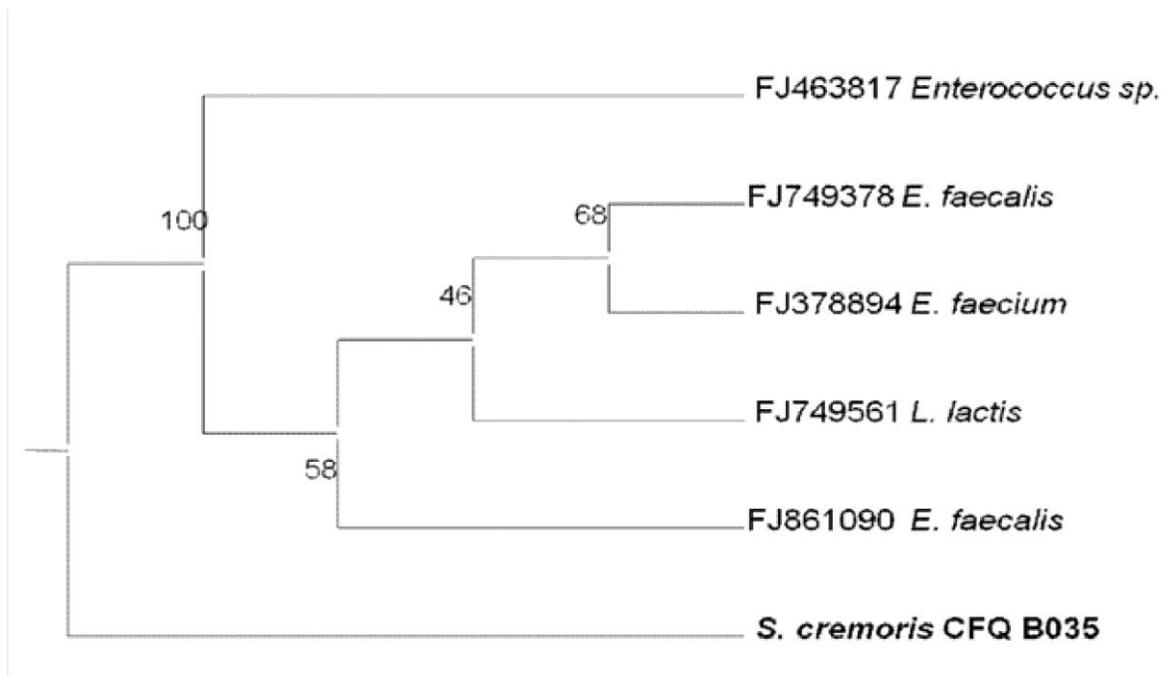


**Figura 24. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Streptococcus cremoris* CFQ ST3 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.**

Esta cepa pudo ser identificada correctamente a nivel de género y especie únicamente por medio del método genotípico, encontrando una discrepancia a nivel de subespecie con respecto a la clasificación del cepario. Para las bacterias de este género en particular se recomienda llevar a cabo análisis fenotípicos mas exhaustivos. Así mismo se sugiere actualizar la nomenclatura del microorganismo.

Al igual que con el microorganismo anterior, el cepario registraba la clasificación obsoleta *Streptococcus cremoris* CFQ B035 en vez del nuevo taxón *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (Hutkins, 2006). Las características microscópicas y bioquímicas que la literatura reporta para la cepa en cuestión se mencionaron anteriormente para la cepa *S. cremoris* CFQ ST3 en la página 100 y se observa que concuerdan con los resultados obtenidos experimentalmente para esta cepa (Tabla 9; Apéndice 9.4). Con respecto a la identificación fenotípica, esta fue para el taxón *P. pentosaceus* 1 con un 92.4% de identidad que corresponde a una buena identificación (Tabla 10) en lo que seguramente constituye un caso de identificación errónea debida a los defectos propios del sistema API 50CH anteriormente discutidos (página 95) y al resto de los resultados de fermentación de sustratos obtenidos en la galería. Al igual que con la cepa anterior se recomienda llevar a cabo algunas pruebas selectas complementarias con el fin de corroborar la caracterización fenotípica (Garvie, 1984; Holt, *et al.*, 2000). En la identificación de la secuencia del gen ARNr 16S se obtuvo un 98% de homología con un *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (Tabla 11) observando que la subespecie no correspondió a la esperada, sin embargo este método, a diferencia del fenotípico, si permitió identificar la cepa a nivel de género y especie. Se confirma así que las discrepancias se deben a las fallas del programa API 50CH y nuevamente se recomendaría el uso de cebadores específicos con el fin de alcanzar una mejor resolución entre las subespecies.

La Figura 25 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa. Se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 46 para la rama que corresponde a la especie *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* indicando poca robustez en el árbol.

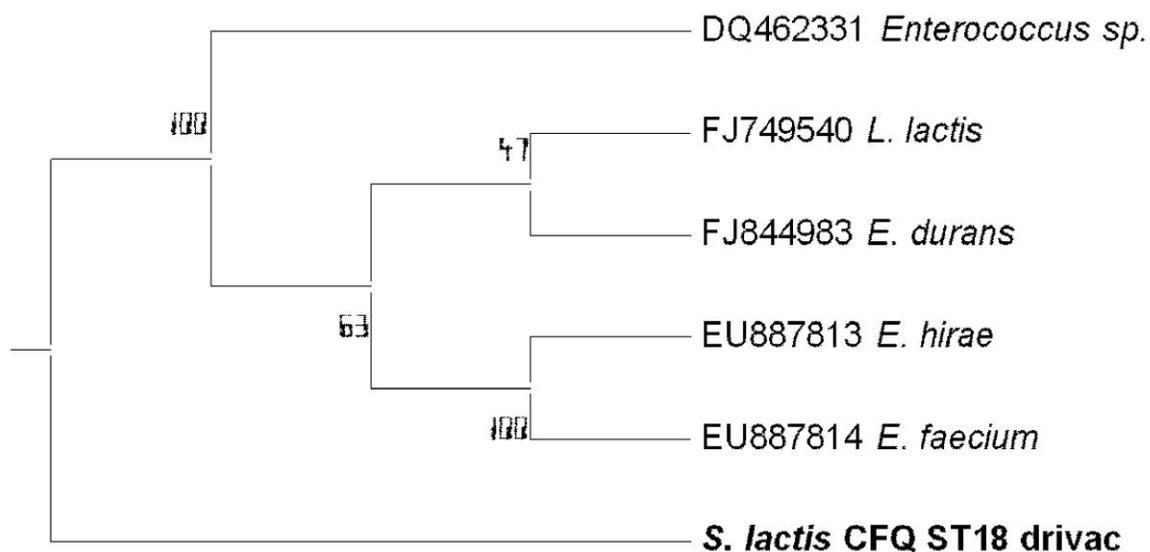


**Figura 25. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Streptococcus cremoris* CFQ B035 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.**

Al igual que en el caso anterior, sólo se logró identificar correctamente a esta cepa empleando el enfoque genotípico y la subespecie encontrada no fue la esperada. Para este género en particular se recomienda llevar a cabo pruebas fenotípicas complementarias con el fin de llevar a cabo una mejor identificación fenotípica y el empleo de oligonucleótidos específicos que permitan discernir entre subespecies.

La cepa *Streptococcus lactis* CFQ ST18 drivac se encontraba clasificada bajo el taxón arcaico siendo el nombre actualizado *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (Hutkins, 2006). La bibliografía reporta a dicha bacteria como diplococos Gram-positivos, característica que pudo ser corroborada mediante el análisis microscópico (Tabla 9). Se describe como una bacteria láctica homofermentativa estricta que fermenta lactosa, maltosa, ribosa y en ocasiones esculina, arabinosa, salicina, sacarosa, trealosa y xilosa (Robinson, 1990; Holt, *et al.*, 2000); el resultado obtenido del perfil de fermentación de sustratos contenido en el Apéndice 9.4 concuerda con dicha descripción. La cepa fue identificada fenotípicamente correctamente incluso a nivel de subespecie sin embargo el porcentaje de identidad fue relativamente bajo (81%) y la calidad de la identificación fue aceptable (Tabla 10). Algunas pruebas complementarias que podrían realizarse con el fin de corroborar la caracterización fenotípica serían el crecimiento a 40°C, el crecimiento con 4% de NaCl y la hidrólisis de arginina (Garvie, 1984; Holt, *et al.*, 2000). La comparación de datos obtenida con las secuencias depositadas en la base de datos de NCBI mostró para este microorganismo un 99% de homología como un *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, lo que ratifica el resultado obtenido mediante la caracterización fenotípica con un porcentaje más confiable (Tabla 11).

La Figura 26 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa. Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 47 en la rama que corresponde a la especie *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* que es un valor bajo, indicando poca robustez en el árbol.

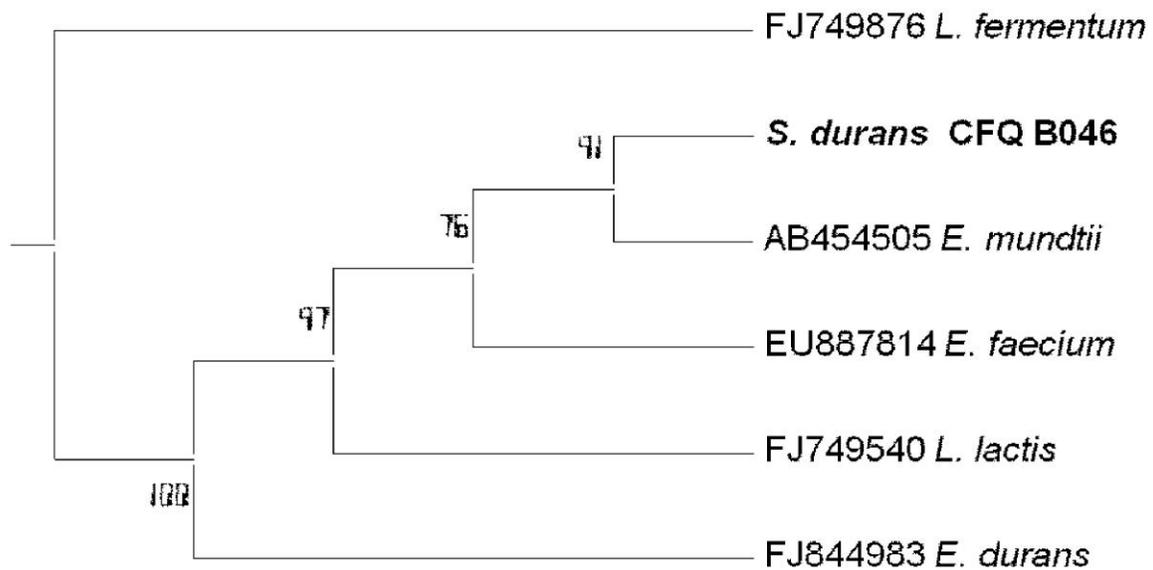


**Figura 26. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Streptococcus lactis* CFQ ST18 drivac (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de accesión precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.**

El resultado de la identificación fenotípica para esta cepa fue el esperado sin embargo el porcentaje de identidad no resultaba del todo satisfactorio. No obstante, la caracterización genotípica permitió corroborar el resultado obtenido y aunque el valor de *bootstrapping* es menor al esperado, es la información arrojada por los dos métodos lo que permite asegurar la identidad de la cepa.

Para el caso de la cepa *Streptococcus durans* CFQ B046 dicho taxón ha sido reclasificado y la nueva clasificación corresponde a *Enterococcus durans* (Garrity, et al., 2004). La bibliografía lo reporta como cocos en cadenas Gram-positivos, característica que pudo ser corroborada mediante el análisis microscópico (Tabla 9). Se describe como una bacteria láctica homofermentativa estricta que fermenta maltosa, lactosa, trealosa, salicina y esculina (Demeter, 1969; Holt, et al., 2000); el resultado obtenido del perfil de fermentación de sustratos contenido en el Apéndice 9.4 concuerda con dicha descripción. La cepa se identificó fenotípicamente con un 52.5% de identidad para el taxón significativo *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 por lo cual se decidió repetir la prueba partiendo de un cultivo liofilizado. Sin embargo, se volvió a obtener el mismo taxón aunque con mayor porcentaje de identificación, 73.7% que corresponde a una baja discriminación (Tabla 10). Este pudo ser un indicio de que la cepa se encontraba mal clasificada o que el sistema API 50CH no mostró la sensibilidad adecuada pues probablemente el resto del perfil de sustratos fermentados correspondió mejor con el taxón arrojado por el programa. En contraparte los resultados obtenidos mediante la secuenciación del gen ARNr 16S homologaron a un 100% con un *Enterococcus durans* (Tabla 11), lo que confirma que la caracterización fenotípica no mostro la sensibilidad adecuada por las razones que han sido expuestas previamente. Nuevamente se recomendaría llevar a cabo algunas pruebas específicas que ayudarían a afinar la identificación fenotípica tales como tipo de hemólisis, crecimiento a pH 9.6, crecimiento en presencia de NaCl y de azul de metileno.

La Figura 27 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa. Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie *Enterococcus durans* indicando excelente robustez y una clara relación filogenética entre ambas especies.



**Figura 27. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Streptococcus durans* CFQ B046 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de accesoión precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.**

Este microorganismo fue identificado adecuadamente sólo por medio del método genotípico y es recomendable la realización de pruebas complementarias que permitan la correcta identificación fenotípica del mismo.

La bibliografía reporta a *Lactobacillus plantarum* como bacilos largos en cadenas cortas Gram-positivos, característica que pudo ser corroborada mediante el análisis microscópico para las 2 cepas de *Lactobacillus plantarum*, la ATCC 8014 (CFQ L10) y la CFQ L9 (Tabla 9). Se describe como una bacteria láctica homofermentativa facultativa que fermenta esculina, amigdalina, celobiosa, fructosa, galactosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, melibiosa, rafinosa, ribosa, salicina, sorbitol, sacarosa y trealosa (Robinson, 1990). Los resultados obtenidos del perfil de fermentación de sustratos se encuentran en el Apéndice 9.4 y concuerdan con esta descripción. Ambas cepas se identificaron fenotípicamente con un 99.9% de identidad, que corresponde a una excelente identificación (Tabla 10). El análisis de la secuencia del ADNr 16S indicó que para las dos cepas de *Lactobacillus plantarum*, la cepa CFQ L9 y la ATCC 8014 (CFQ L10) se obtuvo un 100% de identidad que además correspondió con el resultado de la caracterización fenotípica (Tabla 11). Las Figuras 28 y 29 corresponden a los árboles filogenéticos que se construyeron para estas cepas. Con el programa para la construcción de dichos árboles se obtuvieron valores de *bootstrapping* iguales de 64 para la rama que corresponde a la especie *Lactobacillus plantarum* indicando una robustez relativamente baja en la topología del árbol. Se observa similitud en los árboles construidos para ambas cepas.

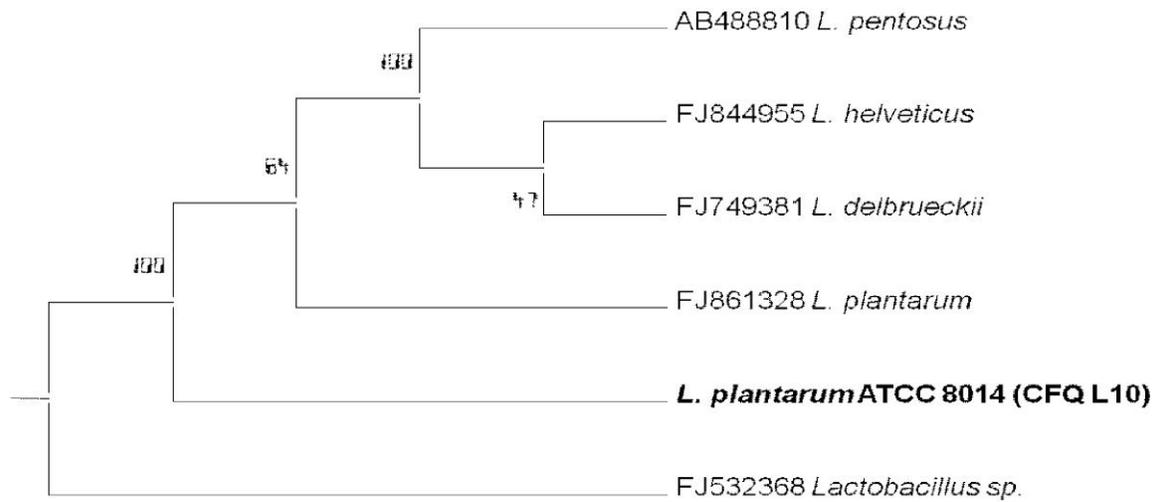


Figura 28. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (CFQ L10) (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

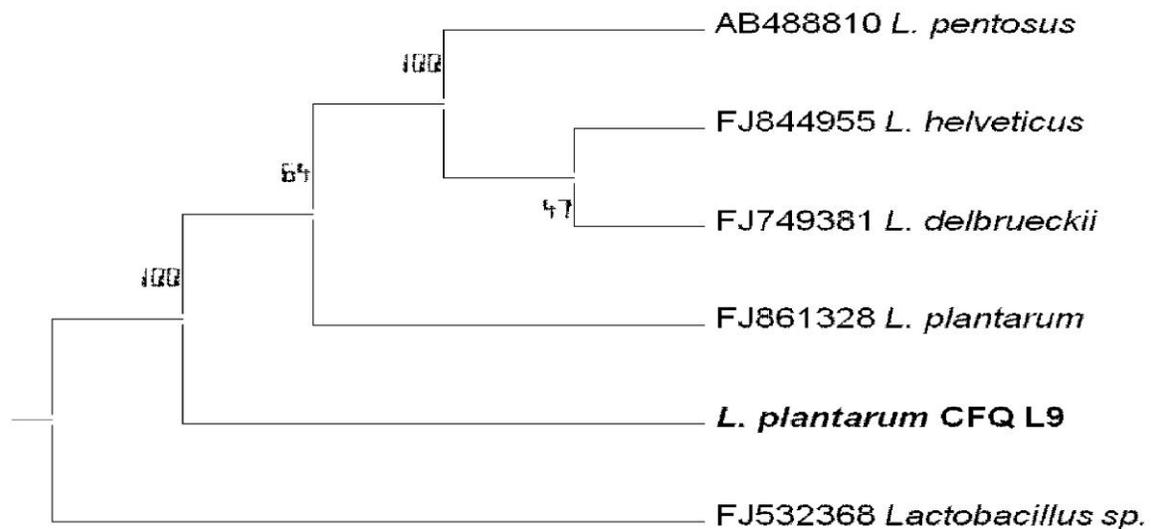


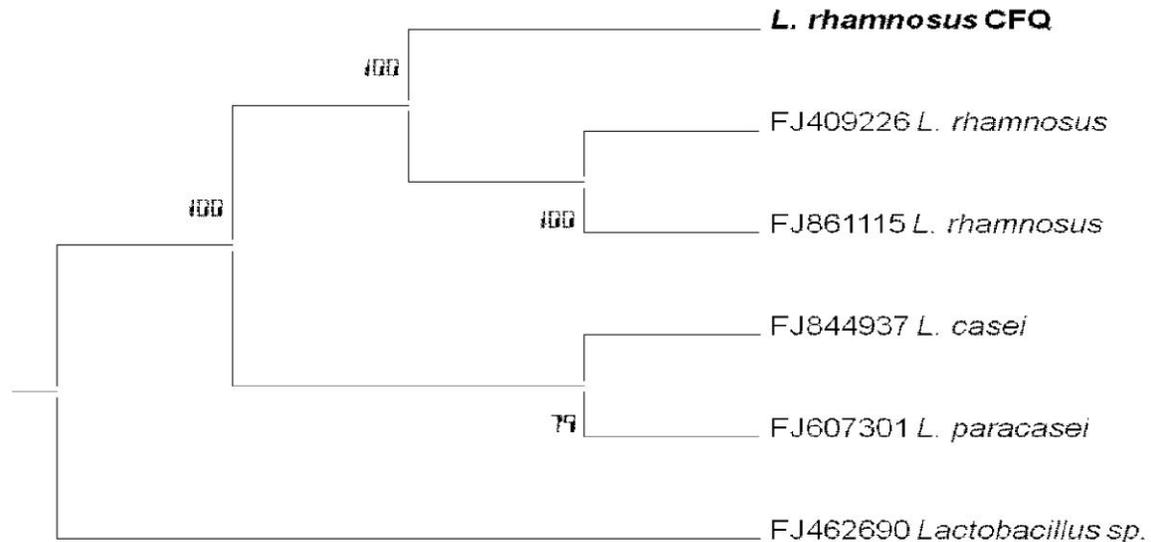
Figura 29. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus plantarum* CFQ L9 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Estas dos cepas fueron identificadas correctamente por medio de ambos métodos y con altos porcentajes de identidad encontrando correlación entre ambas aproximaciones así como correspondencia con la clasificación registrada en el cepario.

La bibliografía reporta a *Lactobacillus rhamnosus* como bacilos largos en cadenas cortas Gram-positivos, característica que pudo ser corroborada mediante el análisis microscópico para la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CFQ (Tabla 9). Se describe como una bacteria láctica homofermentativa facultativa que puede fermentar amigdalina, celobiosa, esculina, gluconato, manitol, melezitosa, ribosa, sorbitol y sacarosa (Hammes y Vogel, 1995; Holt, *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos del perfil de fermentación de sustratos se encuentran en el Apéndice 9.4 y se observa una inconsistencia para el caso del carbohidrato melezitosa. La cepa se identificó fenotípicamente con un 89.9% de identidad para el taxón *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 2, que corresponde a una muy buena identificación en el género (Tabla 10). Dicho resultado refleja que el sistema no posee la sensibilidad necesaria para discernir entre ambas especies. Algunos autores reportan que la diferenciación entre especies del género *Lactobacillus* requiere cierta experiencia pues muchas de las pruebas dan reacciones débiles y dependen de la composición del medio y de las condiciones exactas de cultivo (Holt, *et al.*, 2000; Kao, *et al.*, 2007).

Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S se identificó con un 99% de homología para el taxón esperado (Tabla 11) confirmando que el sistema API sólo permite identificar correctamente a la cepa a nivel de género. La Figura 30 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa. Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la

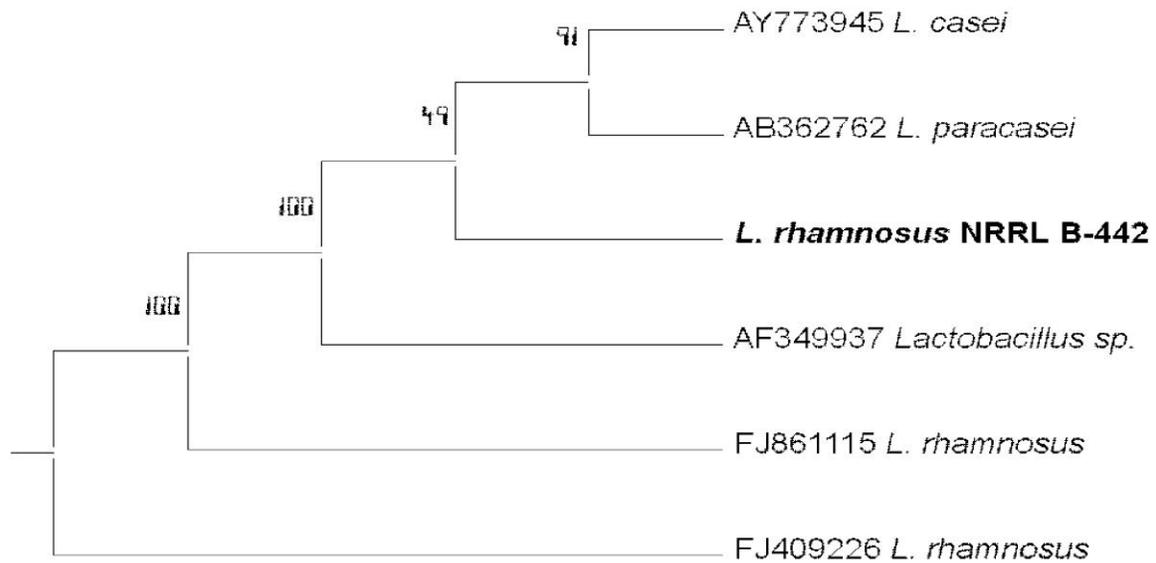
especie *Lactobacillus rhamnosus* lo cual indica una muy buena robustez del mismo y elevada correspondencia filogenética entre ambas cepas.



**Figura 30. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CFQ (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de accesión precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.**

Esta cepa fue identificada fenotípicamente de forma correcta solo a nivel de género empleando el sistema API 50 CH, sin embargo la aproximación genotípica si permitió la correcta identificación a nivel de especie de la misma.

El análisis microscópico para la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442 dio como resultado una morfología bacilar, de células largas agrupadas en cadenas cortas Gram-positivas, dicho resultado concuerda con lo que la bibliografía reporta para dicha especie (Tabla 9). Los resultados obtenidos del perfil de fermentación de sustratos se encuentran en el Apéndice 9.4 y se observa discrepancia con respecto a dos carbohidratos, el gluconato y la sacarosa, reportados en la bibliografía como se mencionó con anterioridad para la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CFQ en la página 112. No obstante la cepa se identificó fenotípicamente con un 99.9% de identidad, que corresponde a una excelente identificación (Tabla 10). La aproximación genotípica presentó un 97% de homología con un *Lactobacillus rhamnosus*, lo que ratifica el resultado obtenido mediante la caracterización fenotípica (Tabla 11). La Figura 31 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa. Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama correspondiente a la especie *Lactobacillus rhamnosus* indicando buena robustez y estrecha relación filogenética entre ambas cepas.

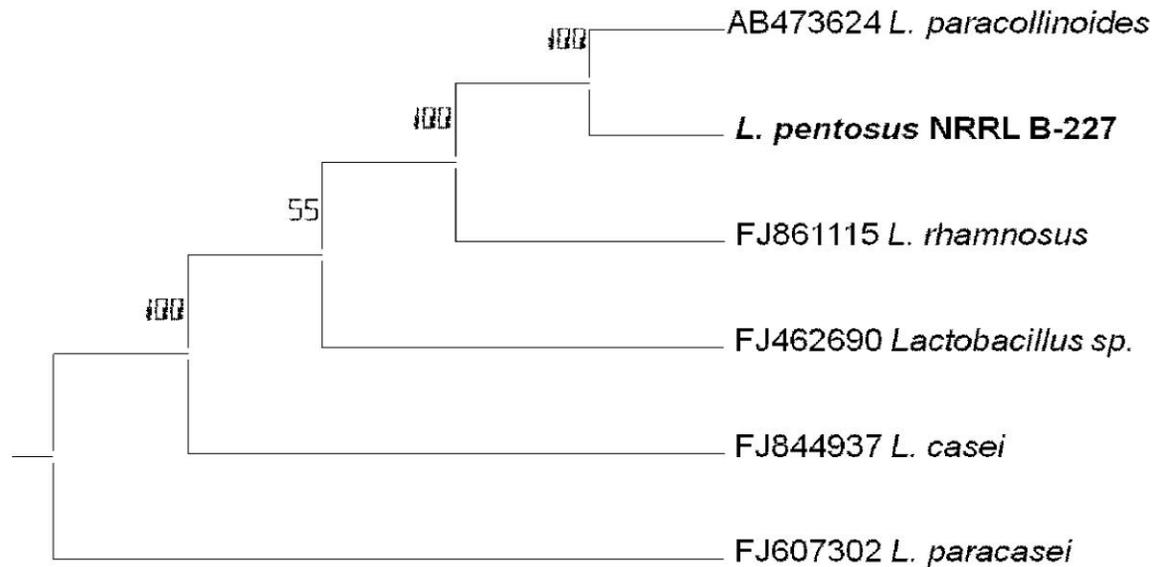


**Figura 31. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B442 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de accesión precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.**

Para este microorganismo se encontró correspondencia entre ambos métodos de identificación así como congruencia con la clasificación del cepario.

La bibliografía reporta a *Lactobacillus pentosus* como bacilos largos en cadenas cortas Gram-positivos, característica que pudo ser corroborada mediante el análisis microscópico para la cepa de *Lactobacillus pentosus* NRRL B-227 (Tabla 9). Se describe como una bacteria láctica homofermentativa facultativa y entre los carbohidratos que fermenta están la amigdalina, arabinosa, celobiosa, gluconato, manitol, melibiosa, rafinosa, ribosa, sorbitol, sacarosa, xilosa y en ocasiones melezitosa (Hammes y Vogel, 1995; Holt, *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos del perfil de fermentación de sustratos se encuentran en el Apéndice 9.4 y se observa discrepancia para tres de los carbohidratos: melibiosa, rafinosa y xilosa. La cepa se identificó fenotípicamente con un 99.9% de identidad, que corresponde a una buena identificación (Tabla 10) para el taxón *L. rhamnosus* (*L. casei* ssp. *rhamnosus*) Esto puede estar relacionado con una discrepancia en las clasificaciones, puesto que esta cepa era de reciente adquisición y se partió de un liofilizado del Agricultural Research Service Culture Collection, siendo mínimas las posibilidades de alteraciones en el fenotipo y/o error en la clasificación. Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S se identificó con un 100% de homología para el taxón *L. rhamnosus* lo cual corresponde con lo obtenido por medio de la caracterización fenotípica y confirma que existe una discrepancia en las tipificaciones con respecto a lo que reportaba el Agricultural Research Service Culture Collection (Tabla 11). La Figura 32 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa. Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100

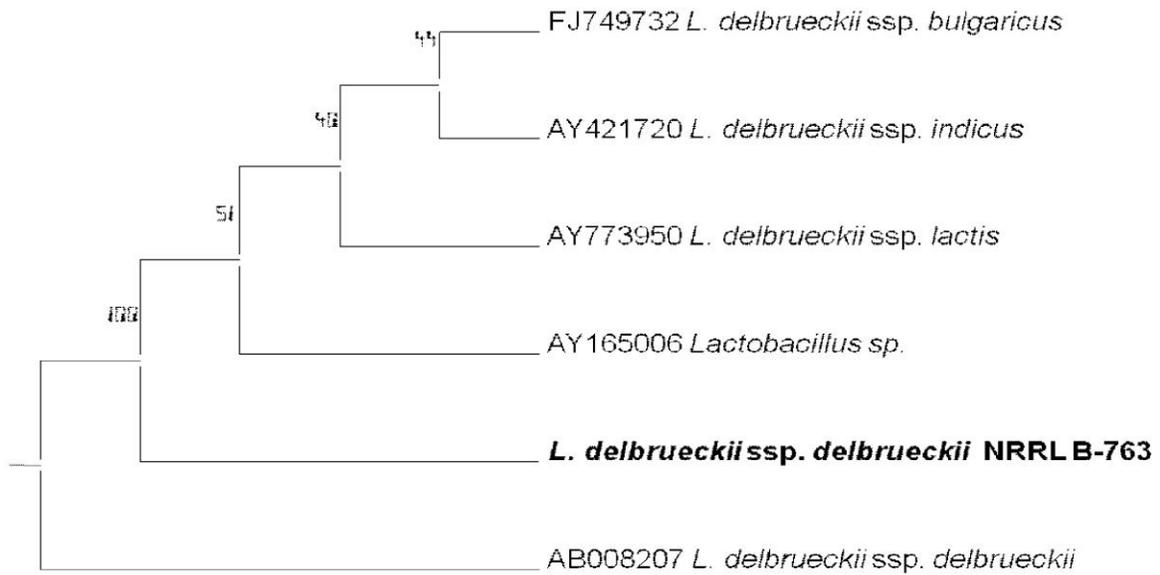
para la rama correspondiente la especie *L. rhamnosus* indicando buena robustez del árbol y estrecha relación filogenética entre ambas cepas.



**Figura 32. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus pentosus* NRRL B227 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.**

Esta bacteria se identificó con altos porcentajes de identidad encontrando consistencia entre ambos métodos pero no con la clasificación del cepario.

Por medio de un análisis microscópico de la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *delbrueckii* NRRL B-763 se pudo corroborar la morfología del microorganismo que la bibliografía reporta como bacilos largos en cadenas cortas Gram-positivos (Tabla 9). Se describe como una bacteria láctica homofermentativa facultativa que fermenta fructosa, manosa y sacarosa mientras que no puede fermentar amigdalina, galactosa, lactosa, manitol, melibiosa, rafinosa y salicina (Hammes y Vogel, 1995; Robinson, 1990; Holt, *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos del perfil de fermentación de sustratos se encuentran en el Apéndice 9.4 y concuerdan con lo reportado en la bibliografía. La cepa se identificó fenotípicamente con un 96.8% de identidad, que corresponde a una excelente identificación (Tabla 10). Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S se identificó con un 100% de homología para el taxón esperado, lo que ratifica el resultado obtenido mediante la caracterización fenotípica (Tabla 11). La Figura 33 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa. Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 para la rama que corresponde a la especie *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *delbrueckii* que indica muy buena robustez y estrecha relación filogenética entre ambas cepas.



**Figura 33. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NRRL B763 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.**

Para esta cepa se obtuvieron muy altos porcentajes de identidad para ambos métodos de identificación y hubo correlación entre los resultados obtenidos por medio de ambas aproximaciones, así como congruencia con el taxón esperado.

La cepa de *Lactobacillus casei* CFQ L3 se encuentra descrita en la bibliografía como una bacteria láctica homofermentativa facultativa que fermenta esculina, amigdalina, celobiosa, fructosa, galactosa, maltosa, manitol, manosa, melezitosa, ribosa, salicina, sorbitol, sacarosa y trealosa (Robinson, 1990; Holt, *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos del perfil de fermentación de sustratos se encuentran en el Apéndice 9.4 y se observa que son congruentes con lo descrito. Son bacilos cortos en cadena Gram-positivos, característica que pudo ser corroborada mediante el análisis microscópico (Tabla 9). La cepa se identificó fenotípicamente con un 99.7% de identidad como *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1, que corresponde a una muy buena identificación (Tabla 10). Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S se identificó con un 98% de homología para el taxón *L. paracasei* (Tabla 11) dicho resultado es consistente con la caracterización fenotípica. Se observa que aún haciendo uso de métodos genotípicos es difícil llevar a cabo la diferenciación entre especies del género *Lactobacillus*; Kao, *et al.*, 2007 reportó no poder discernir entre las cepas *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus* aún haciendo uso de cebadores especie específicos. La Figura 34 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa. Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 61 en la rama que corresponde a la especie *Lactobacillus paracasei* que aunque es un valor más bajo que el esperado, indica mayor robustez para esta especie que para *Lactobacillus casei* (*bootstrapping* de 59).

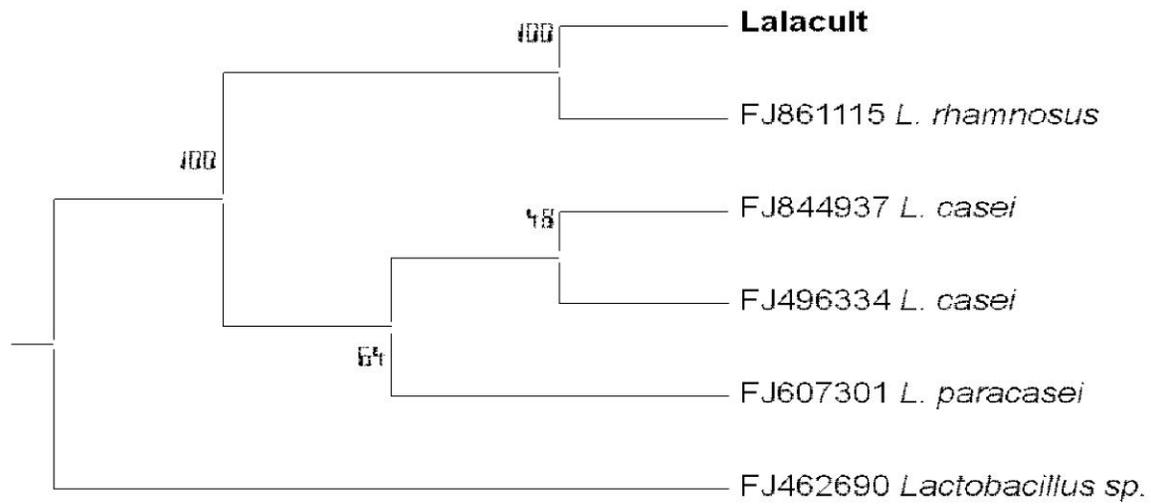


**Figura 34. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus casei* CFQ L3 (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de accesoión precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.**

Para esta cepa se encontraron altos porcentajes de identidad y correlación entre ambos métodos, no obstante la identificación fue inconsistente con la clasificación del cepario.

Las características microscópicas que exhibió la bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Lalacult) fueron bacilos largos y delgados en cadenas Gram-positivos (Tabla 9). Los resultados obtenidos del perfil de fermentación de sustratos se encuentran en el Apéndice 9.4 La cepa se identificó fenotípicamente con un 99.6% de identidad como *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1, que corresponde a una muy buena calidad de identificación (Tabla 10). La literatura reporta que dicha cepa fermenta amigdalina, celobiosa, esculina, gluconato, manitol, melezitosa, ribosa, sacarosa y en ocasiones sorbitol (Hammes y Vogel, 1995). El perfil obtenido muestra discrepancia solo para el caso de la amigdalina. Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S se identificó con un 99% de homología como un *L. paracasei*, lo que ratifica el resultado obtenido mediante la caracterización fenotípica (Tabla 11). Este microorganismo es muy utilizado en este tipo de producto lácteo fermentado pues imparte efectos benéficos a la salud humana incluyendo control de alteraciones gastrointestinales, inmunomodulación, disminución en los niveles de colesterol así como el efecto probiótico (Hall, *et al.*, 2001; Khedid, *et al.*, 2009; Ouwehand, 1998).

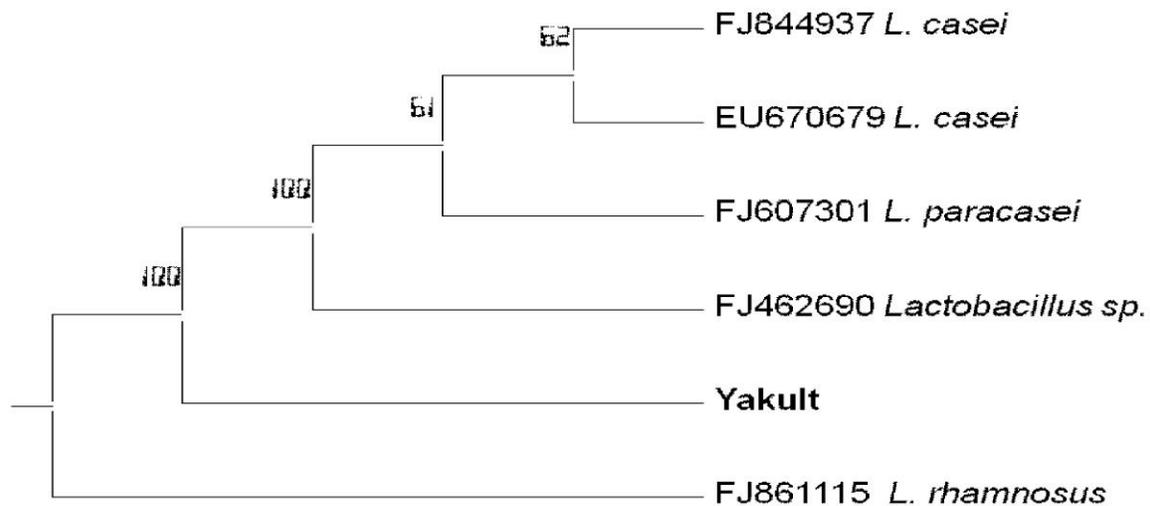
La Figura 35 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa. Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 64 para la rama que corresponde a la especie *L. paracasei* ssp. *paracasei*. El valor de *bootstrapping* indica una menor robustez con el género arrojado por el API 50CH pero mayor con *L. rhamnosus*.



**Figura 35. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa de bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Lalacult) (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.**

Se identificó a esta cepa de manera consensual por medio de ambas aproximaciones.

La cepa de la bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Yakult), era declarada por el fabricante como *Lactobacillus casei shirota*. La bibliografía reporta a *Lactobacillus casei shirota* como bacilos largos en cadenas cortas Gram-positivos, característica que pudo ser corroborada mediante el análisis microscópico (Tabla 9). Se describe como una bacteria láctica homofermentativa facultativa (Holt, *et al.*, 2000) que fermenta los carbohidratos que se describieron para la cepa *L. casei* CFQ-L3 (página 120). Los resultados obtenidos del perfil de fermentación de sustratos se encuentran en el Apéndice 9.4 y con excepción de la melezitosa corroboran con lo reportado. La cepa se identificó fenotípicamente con un 92.5% de identidad para el taxón *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1, que corresponde a una excelente identificación en el género (Tabla 10). Dicho resultado refleja que el sistema carece de la sensibilidad para discernir entre ambas especies. La secuencia de esta bacteria fue identificada con un 100% de homología para el taxón esperado, *Lactobacillus casei* (Tabla 11) confirmando así lo declarado por el fabricante y que el sistema API no posee la sensibilidad requerida para discernir correctamente entre las especies *casei* y *paracasei*. La Figura 36 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa. Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 62 para la rama de la especie *Lactobacillus casei*, que indica una robustez relativamente baja con el género esperado.



**Figura 36. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa de bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Yakult) (negritas) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.**

La cepa fue identificada a nivel de género y especie correspondiendo con lo reportado por el fabricante por medio del método genotípico mientras que el método fenotípico solo la identificó correctamente a nivel de género.

Con los resultados obtenidos para las dos últimas cepas se deduce que es factible aplicar la metodología empleada en el presente trabajo para llevar a cabo la identificación de aislados de bacterias provenientes de productos lácteos fermentados comerciales, en los cuales es de suma importancia contar con técnicas analíticas rápidas y precisas que permitan tener un control de calidad y monitoreo adecuado de las cepas probióticas (Kao, *et al.*, 2007).

La Figura 37 corresponde al árbol filogenético general que incluye todas las secuencias de las cepas analizadas en este estudio así como algunas cepas de referencia que fueron incluidas con el fin de observar las relaciones filogenéticas entre estos microorganismos.

*Lactobacillus* y *Pediococcus* forman parte de un solo grupo que está dividido en dos subgrupos: 1) el grupo de *Lb. delbrueckii* que incluye a muchos de los lactobacilos homofermentativos estrictos y algunos lactobacilos heterofermentativos facultativos y 2) el grupo *Lb. casei-Pediococcus* que comprende al resto de los homofermentativos estrictos, todos los heterofermentativos y la mayoría de los heterofermentativos facultativos. En la rama superior del árbol se observa el agrupamiento de los *Pediococcus* junto con los *Lactobacillus plantarum*.

Los géneros *Lactococcus* y *Streptococcus* están más relacionados filogenéticamente entre ellos que a cualquier otro género dentro del grupo de las bacterias lácticas y esto se puede apreciar en la topología del árbol pues ambos géneros se encuentran agrupados dentro de la misma rama, en la cual también se localizan los *Enterococcus* (Axelsson, 1998; Schleifer y Ludwig, 1995).

Así mismo se aprecia como el *Lactobacillus delbrueckii* se encuentra posicionado en una rama independiente.

Las ramas inferiores del árbol comprenden al resto de los microorganismos del género *Lactobacillus* analizados en el estudio.

Se observa que en general el árbol presenta valores altos de *bootstrapping* indicando muy buena robustez y la asociación de las ramas es congruente en

género y especie. Así mismo también se observa congruencia con respecto a los árboles elaborados de manera individual para cada cepa.

Para todas las cepas empleadas en el estudio, el agrupamiento de los géneros en las distintas ramas corrobora lo descrito en la bibliografía.

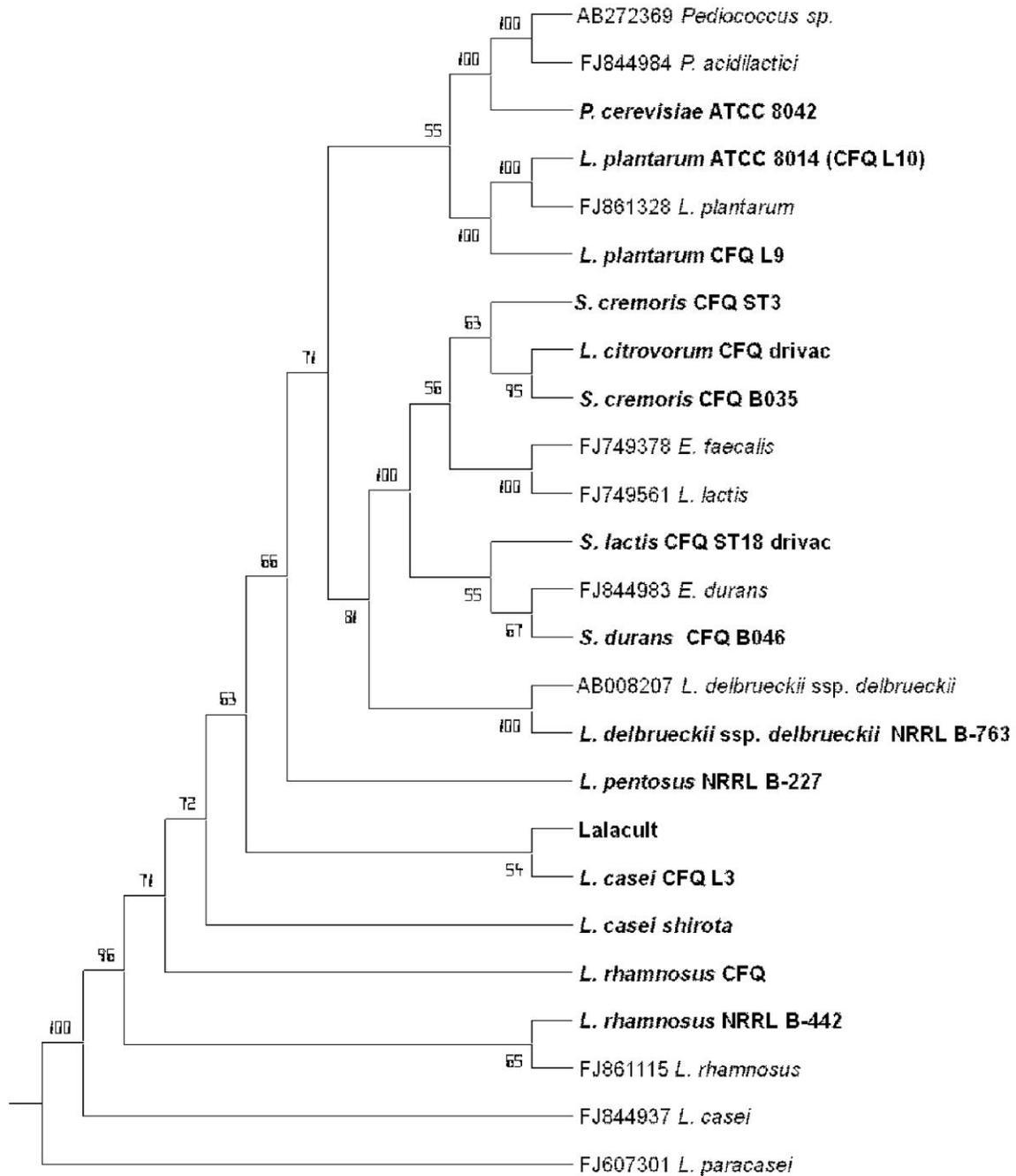


Figura 37. Árbol filogenético general que incluye las secuencias parciales del ADNr 16S de todas las cepas estudiadas (negritas) así como las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

## 7. CONCLUSIONES

En el caso de la identificación por medio de criterios fenotípicos, se observó que todas las cepas estudiadas exhibieron características morfológicas, microscópicas y bioquímicas reportadas en la literatura. En contraposición, la identificación arrojada por el programa API 50CH al ingresar los patrones de fermentación de sustratos obtenidos mostró discrepancias para algunas de las cepas a nivel de especie y/o género.

La caracterización genotípica demostró ser una herramienta de identificación mucho más confiable y certera.

La técnica de PCR se ejecuta rutinariamente con el fin de discriminar a nivel de género y especie. En algunos de los casos fue posible identificar incluso la subespecie de la cepa analizada.

Si bien las técnicas de caracterización genética proveen el tipo de identificación más confiable incluso a nivel de subespecie, las pruebas fenotípicas juegan un papel funcional importante. Los resultados más precisos en estudios taxonómicos se obtienen al emplear atributos tanto fenotípicos como genotípicos para llevar a cabo la identificación.

Durante el presente trabajo se observó que fue el uso de la información que ambos métodos proporcionaron lo que permitió asegurar la identidad de las cepas analizadas.

Finalmente, en la Tabla 12 se presenta la reclasificación recomendada de acuerdo al estudio realizado en el presente trabajo.

**Tabla 12. Reclasificación sugerida para las bacterias lácticas pertenecientes a la colección del cepario de la Facultad de Química, UNAM.**

Cepa		Método de identificación
Clasificación anterior	Reclasificación sugerida	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL F-512	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Fenotípico
<i>Leuconostoc citrovorum</i> CFQ drivac	-	Ninguno
<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 8042	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Ambos
<i>Streptococcus cremoris</i> CFQ ST3	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Genotípico
<i>Streptococcus cremoris</i> CFQ B035	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Genotípico
<i>Streptococcus lactis</i> CFQ ST18 drivac	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Ambos
<i>Streptococcus durans</i> CFQ B046	<i>Enterococcus durans</i>	Genotípico
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 (CFQ L10)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ambos
<i>Lactobacillus plantarum</i> CFQ L9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ambos
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CFQ	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Genotípico
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NRRL B-442	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Ambos
<i>Lactobacillus pentosus</i> NRRL B-227	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Ambos
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subespecie <i>delbrueckii</i> NRRL B-763	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subespecie <i>delbrueckii</i>	Ambos
<i>Lactobacillus casei</i> CFQ L3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Ambos
Bacteria láctica aislada de Lalacult	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Ambos
Bacteria láctica aislada de Yakult	<i>Lactobacillus casei</i>	Genotípico

## **8. PERSPECTIVAS**

Debido a las discrepancias que se encontraron en la caracterización fenotípica, se sugiere llevar a cabo pruebas complementarias con base en la bibliografía para afinar la identificación.

Actualizar la clasificación del cepario conforme a los resultados arrojados por este trabajo.

Llevar a cabo una segunda fase de identificación en la cual se empleen cebadores específicos para este grupo de bacterias en particular.

## 9. BIBLIOGRAFIA

Garvie, E.I. (1984). Taxonomy and Identification of Bacteria Important in Cheese and Fermented Dairy Products. En: Davies, F.L. y Law, B.A. (Eds.) *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Elsevier Applied Science Publishers, 1a edición, 35-66.

Escalante, A. Rodríguez, M. E., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 235: 273-279.

Richter, R.L. y Vedamuthu, E.R. (2001). Milk and Milk Products. En: Downes, F. P. e Ito, K. (Eds.) *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, American Public Health Association, 4a edición, 490.

Hall, Paul A. *et al.*, (2001). Acid-producing microorganisms. En: Downes, F. P. e Ito, K. (Eds.) *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, American Public Health Association, 4a edición, 201-207.

Ouwehand, A. (1998). Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. En: Salminen S. y Von Wright, S. (Eds.) *Lactic Acid Bacteria, microbiological and functional aspects*, Marcel Dekker INC, 2a edición, 617.

Piard, J.C. y Desmazeud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria 1. Oxygen metabolites and end products from catabolism. *Lait*, 71: 525-541.

Piard, J.C. y Desmazeud, M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria 2. Bacteriocines and other antibacterial substances. *Lait*, 72: 113-142.

Hernández, P.E. *et al.*, (1993). Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos. *Microbiología SEM*, 9: 37-48.

Axelsson, L. (1998). Lactic Acid Bacteria. Classification and Physiology. En: Salminen S. y Von Wright, S. (Eds.) *Lactic Acid Bacteria, microbiological and functional aspects*, Marcel Dekker INC, 2a edición, 16-43.

Farber, J. M. *et al.*, (2001). Molecular Typing and Differentiation. En: Downes, F. P. e Ito, K. (Eds.) *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, American Public Health Association, 4a edición, 127.

Torriani, S. *et al.*, (1999). Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* ssp. *Lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4351-4356.

Borneman, J., Skroch, P.W., O'Sullivan, K.M., Palus, J.A., Rumjanek, N.G., Jansen, J.L., Nienhhius, J. (1996). Molecular microbial diversity in an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1935-1943.

Escalante, A., *et al.*, (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 126-134.

Entis, P. *et al.*, (2001). Rapid Methods for Detection, Identification, and Enumeration. En: Downes, F. P. e Ito, K. (Eds.) *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, American Public Health Association, 4a edición.

Madigan, M. T. *et al.*, (2004). Brock. *Biología de los Microorganismos*, Pearson Educación, S. A., 10ª edición, Madrid, 303-619.

Schillinger, U. *et al.*, (2006). Lactic acid bacteria. En: Blackburn, C. (Ed.). *Food Spoilage Microorganisms*, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge.

Stiles, M. E. y Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *International Journal of food microbiology*, 36: 1-29.

Hutkins, Robert W. (2006). *Microbiology and technology of fermented foods*, IFT Press, 1a edición, Chicago, 15-35.

Conca, R. (2008). Aislamiento e identificación de cepas de bacterias lácticas productoras de nuevos polisacáridos extracelulares del pulque. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 41-44.

Lozano, M. (2007). Análisis de la diversidad de bacterias Gram-positivas presentes en aguamiel y en el inicio de la fermentación del pulque, por técnicas microbiológicas y moleculares. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 36-39.

Weisburg, W.G. *et al.*, (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697-703.

Waite, J.G. *et al.*, (2009). Isolation and identification of spoilage microorganisms using food-based media combined with rDNA sequencing: Ranch dressing as a model food. *Food microbiology*, 26: 235-239.

Paludan-Müller, C. *et al.*, (1999). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Thai low-salt fermented fish product and the role of garlic as substrate for fermentation. *International journal of food microbiology*, 46: 219-229.

Johansson, M-L. *et al.*, (1995). Phenotypically based taxonomy using API 50CH of lactobacilli from Nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *International journal of food microbiology*, 25: 159-168.

Khedid, K. *et al.*, (2009). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological research*, 164: 81-91.

Essid, I. *et al.*, (2009). Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science*, 81: 203–208.

Frank, H.K. (1992). *Dictionary of food microbiology*, Technomic Publishing Company, 1a edición, Suiza, 251.

Randazzo, C. L. *et al.*, (2009). Polyphasic characterization of bacterial community in fresh cut salads. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 484-490.

Domig, K. J. *et al.*, (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus spp.* 2. pheno- and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 165–188.

Singh, S. *et al.*, (2009). Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 448–457.

Martin, R. *et al.*, (2005). Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 267– 277.

Ouadghiri, M. *et al.*, (2005). Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiology Letters*, 251: 267–271.

Rodas, A. *et al.*, (2003). 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. *Systematic and Applied Microbiology*. 26: 412-422.

Knoll, C. *et al.*, (2008). Genetic screening of lactic acid bacteria of oenological origin for bacteriocin-encoding genes. *Food Microbiology*. 25: 983–991.

Luangsakul, N. *et al.*, (2009). Lactic Acid Bacteria and Yeasts Isolated from the Starter Doughs for Chinese Steamed Buns in Thailand. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 1404-1412.

Cho, K. *et al.*, (2009). Novel multiplex PCR for the detection of lactic acid bacteria during kimchi fermentation. *Molecular and Cellular Probes*, 23: 90–94.

Sanchez, I. *et al.*, (2005). Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli isolated from Spanish goat cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 355– 362.

Marit, H. *et al.*, (2004). Phenotypic and PCR-based characterization of the microflora in Norvegia cheese during ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 287– 299.

Østlie, H. M. *et al.*, (2005). Phenotypic and PCR-based characterization of the microflora in Prast cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 15: 911– 920.

Ruiz, P. *et al.*, (2008). Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiology*, 25: 942–948.

Makela, P. *et al.*, (1992). Classification of ropy slime-producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA homology, and identification of *Lactobacillus sake* and *Leuconostoc amelibiosum* as dominant spoilage organisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 16: 167-172.

Benito, M. J. *et al.*, (2008). Rapid differentiation of lactic acid bacteria from autochthonous fermentation of Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science*, 80: 656–661.

Garrity, G. M. *et al.*, (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes *Bergey's manual of systematic bacteriology*, *Bergey's Manual Trust*, 2a edición, Nueva York, 195.

Díaz, G. y Wacher, C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista latinoamericana de microbiología*, Vol. 45, No. 1-2: 30-40.

Holt, J. G. *et al.*, (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Lippincott Williams & Wilkins, 9a edición, Philadelphia, 1-21; 527-570.

Robinson, R. K. (1990). *Dairy microbiology Vol. 2: The microbiology of milk products*, Elsevier Science Publishers Ltd., 2a edición, Londres, 140.

Demeter, K. J. (1969). *Lactobacteriología*, Editorial Acribia, Zaragoza, 126-127.

Deibel, R. H. *et al.*, (1957). Microbiological assay for thiamin using *Lactobacillus viridescens*. *Journal of Bacteriology*. 74: 818.

Hammes, W. P. y Vogel, R. F. (1995). The genus *Lactobacillus*. En: Wood, B. J. B. y Holzapel, W. H. (Eds.) *The lactic acid bacteria Vol. 2: The genera of lactic acid bacteria*, Blackie Academic & Professional, 1a edición, Londres, 19-54.

Schleifer, K. H. y Ludwig, W. (1995). Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. En: Wood, B. J. B. y Holzapel, W. H. (Eds.) *The lactic acid bacteria Vol. 2: The genera of lactic acid bacteria*, Blackie Academic & Professional, 1a edición, Londres, 7-18.

Kao, Y.-T. *et al.*, (2007). Identification of *Lactobacillus* spp. In probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Food Research International* 40: 71-79.

Marshall, V. M. y Law, B. A. (1984). The Physiology and Growth of Dairy Lactic-acid Bacteria. En: Davies, F.L. y Law, B. A. (Eds.) *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Elsevier Applied Science Publishers, 1a edición, 67-98.

## 10. APÉNDICES

### 10.1 Composición del medio APT (Difco)

<b>Ingrediente</b>	<b>g/l</b>
Extracto de levadura	7.5
Digerido pancreático de caseína	12.5
Dextrosa	10.0
Citrato de sodio	5.0
Hidrocloruro de tiamina	0.001
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	5.0
Cloruro de manganeso	0.14
Sulfato de magnesio	0.8
Sulfato ferroso	0.04
Polisorbato 80	0.2
Agar	15.0

pH  $6.7 \pm 0.2$

Medio empleado para cultivar bacterias lácticas heterofermentativas y otros organismos que requieran altas concentraciones de tiamina. La peptona es fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El extracto de levadura provee vitaminas del complejo B que estimulan el crecimiento bacteriano. La dextrosa es la fuente de carbohidratos. El cloruro de manganeso, sulfato de magnesio y sulfato ferroso provee iones empleados por los lactobacilos en la replicación. El polisorbato 80 es fuente de ácidos grasos (Hall, *et al.*, 2001; Deibel, *et al.*, 1957).

## 10.2 Tinción de Gram

Los fundamentos de la técnica se basan en las diferencias en la estructura física y química de la pared celular en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

La pared celular de las bacterias Gram-positivas posee una gruesa capa de peptidoglucano, además de dos clases de ácidos teicoicos: Anclado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática, se encuentra el ácido lipoteicoico, y más en la superficie, el ácido teicoico que está anclado solamente en el peptidoglucano (también conocido como mureína)

Por el contrario, la capa de peptidoglucano de las Gram-negativas es delgada, y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior (de composición distinta a la interna) por medio de lipoproteínas. Tiene una capa delgada de peptidoglucano unida a una membrana exterior a través de lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido.

Por lo tanto, ambos tipos de bacterias se tiñen diferencialmente debido a estas diferencias constitutivas de su pared. La clave es el peptidoglucano, ya que es el material que confiere su rigidez a la pared celular bacteriana, y las Gram-positivas lo poseen en mucha mayor proporción que las Gram-negativas.

La diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración, se debe a que la membrana externa de las Gram-negativas es soluble en solventes orgánicos, como por ejemplo la mezcla de alcohol/acetona. La capa de peptidoglucano que

posee es demasiado delgada como para poder retener el complejo de cristal violeta/yodo que se formó previamente, y por lo tanto este complejo se escapa, perdiéndose la coloración azul-violácea. Pero por el contrario, las Gram-positivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de peptidoglicanos, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico, sino que este actúa deshidratando los poros cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta/yodo, y manteniendo la coloración azul-violácea. Se describe a continuación la metodología empleada.

- Preparar los frotis bacterianos.
- Teñir con cristal violeta 1 min.
- Lavar con abundante agua el exceso de colorante.
- Cubrir con Lugol 1 min.
- Lavar con agua el exceso de lugol.
- Decolorar con alcohol-acetona o simplemente con alcohol hasta que la preparación deje de perder color (30 seg)
- Lavar con abundante agua para eliminar el resto de disolvente.
- Teñir con safranina 1 min.
- Lavar con agua para eliminar el colorante de contraste.
- Secar la preparación.
- Examinar al microscopio.

### 10.3 Prueba de la catalasa (método del portaobjetos)

La catalasa es una enzima cuya función es proteger a las células del efecto tóxico del peróxido de hidrógeno producido en distintas reacciones redox, descomponiéndolo en agua y oxígeno molecular. Se describe a continuación la metodología empleada.

- Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18-24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
- Agregar con gotero o pipeta Pasteur una gota de  $H_2O_2$  al 30% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.
- Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo) (Demeter, 1969).

#### 10.4 Perfiles de fermentación de sustratos para las cepas empleadas

##### Perfil de fermentación de sustratos para la cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL F-512 obtenido con la galería API 50 CH.

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	-	-	1
ERY	-	-	2
DARA	-	-	3
LARA	+	+	4
RIB	+	+	5
DXYL	+	+	6
LXYL	-	-	7
ADO	-	-	8
MDX	-	-	9
GAL	-	-	10
GLU	+	+	11
FRU	+	+	12
MNE	+	+	13
SBE	-	-	14
RHA	-	-	15
DUL	-	-	16
INO	-	-	17
MAN	±	±	18
SOR	-	-	19
MDM	-	-	20
MDG	+	+	21
NAG	±	±	22
AMY	-	-	23
ARB	+	+	24
ESC	+	+	25
SAL	±	±	26
CEL	-	-	27
MAL	+	+	28
LAC	±	±	29
MEL	+	+	30
SAC	+	+	31
TRE	+	+	32
INU	-	-	33
MLZ	-	-	34
RAF	+	+	35
AMD	-	-	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	-	-	39
TUR	+	+	40
LYX	-	-	41
TAG	-	-	42
DFUC	-	-	43
LFUC	-	-	44
DARL	-	-	45
LARL	-	-	46
GNT	±	±	47
2KG	±	±	48
5KG	±	±	49

**Perfil de fermentación de sustratos para la cepa *Leuconostoc citrovorum*  
CFQ drivac obtenido con la galería API 50 CH.**

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	±	±	1
ERY	-	-	2
DARA	-	-	3
LARA	-	-	4
RIB	+	+	5
DXYL	-	-	6
LXYL	-	-	7
ADO	-	-	8
MDX	-	-	9
GAL	+	+	10
GLU	+	+	11
FRU	+	+	12
MNE	+	+	13
SBE	-	-	14
RHA	-	-	15
DUL	-	-	16
INO	±	±	17
MAN	±	±	18
SOR	-	-	19
MDM	-	-	20
MDG	-	-	21
NAG	+	+	22
AMY	±	±	23
ARB	+	+	24
ESC	+	+	25
SAL	+	+	26
CEL	+	+	27
MAL	+	+	28
LAC	±	±	29
MEL	-	-	30
SAC	±	±	31
TRE	±	±	32
INU	-	-	33
MLZ	±	±	34
RAF	-	-	35
AMD	±	±	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	±	+	39
TUR	-	-	40
LYX	-	-	41
TAG	+	+	42
DFUC	-	-	43
LFUC	-	-	44
DARL	-	-	45
LARL	-	-	46
GNT	±	±	47
2KG	-	-	48
5KG	-	-	49

**Perfil de fermentación de sustratos para la cepa *Pediococcus cerevisiae*  
ATCC 8042 obtenido con la galería API 50 CH.**

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	-	-	1
ERY	-	-	2
DARA	-	-	3
LARA	+	+	4
RIB	+	+	5
DXYL	+	+	6
LXYL	-	-	7
ADO	-	-	8
MDX	-	-	9
GAL	+	+	10
GLU	+	+	11
FRU	+	+	12
MNE	+	+	13
SBE	-	-	14
RHA	±	±	15
DUL	-	-	16
INO	-	-	17
MAN	-	-	18
SOR	-	-	19
MDM	-	-	20
MDG	-	-	21
NAG	+	+	22
AMY	±	±	23
ARB	±	±	24
ESC	+	+	25
SAL	±	±	26
CEL	+	+	27
MAL	-	-	28
LAC	-	-	29
MEL	-	-	30
SAC	-	-	31
TRE	+	+	32
INU	-	-	33
MLZ	-	-	34
RAF	-	-	35
AMD	-	-	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	±	+	39
TUR	-	-	40
LYX	-	-	41
TAG	±	±	42
DFUC	-	-	43
LFUC	-	-	44
DARL	-	-	45
LARL	-	-	46
GNT	±	-	47
2KG	-	-	48
5KG	-	-	49

**Perfil de fermentación de sustratos para la cepa *Streptococcus cremoris*  
CFQ ST3 obtenido con la galería API 50 CH.**

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	±	±	1
ERY	-	-	2
DARA	-	-	3
LARA	-	-	4
RIB	+	+	5
DXYL	-	-	6
LXYL	-	-	7
ADO	-	-	8
MDX	-	-	9
GAL	+	+	10
GLU	+	+	11
FRU	+	+	12
MNE	+	+	13
SBE	-	-	14
RHA	-	-	15
DUL	-	-	16
INO	±	±	17
MAN	+	+	18
SOR	-	-	19
MDM	-	-	20
MDG	-	-	21
NAG	+	+	22
AMY	±	±	23
ARB	+	+	24
ESC	+	+	25
SAL	+	+	26
CEL	+	+	27
MAL	+	+	28
LAC	±	±	29
MEL	-	-	30
SAC	±	±	31
TRE	±	±	32
INU	-	-	33
MLZ	±	±	34
RAF	-	-	35
AMD	-	-	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	+	+	39
TUR	-	-	40
LYX	-	-	41
TAG	+	+	42
DFUC	-	-	43
LFUC	-	-	44
DARL	-	-	45
LARL	-	-	46
GNT	±	±	47
2KG	-	-	48
5KG	-	-	49

**Perfil de fermentación de sustratos para la cepa *Streptococcus cremoris*  
CFQ B035 obtenido con la galería API 50 CH.**

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	±	±	1
ERY	-	-	2
DARA	-	-	3
LARA	-	-	4
RIB	+	+	5
DXYL	-	-	6
LXYL	-	-	7
ADO	-	-	8
MDX	-	-	9
GAL	+	+	10
GLU	+	+	11
FRU	+	+	12
MNE	+	+	13
SBE	-	-	14
RHA	-	-	15
DUL	-	-	16
INO	±	±	17
MAN	±	±	18
SOR	-	-	19
MDM	-	-	20
MDG	-	-	21
NAG	+	+	22
AMY	±	±	23
ARB	+	+	24
ESC	+	+	25
SAL	+	+	26
CEL	+	+	27
MAL	+	+	28
LAC	±	±	29
MEL	-	-	30
SAC	±	±	31
TRE	±	±	32
INU	-	-	33
MLZ	±	±	34
RAF	-	-	35
AMD	-	-	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	+	+	39
TUR	-	-	40
LYX	-	-	41
TAG	+	+	42
DFUC	-	-	43
LFUC	-	-	44
DARL	-	-	45
LARL	-	-	46
GNT	±	±	47
2KG	-	-	48
5KG	-	-	49

**Perfil de fermentación de sustratos para la cepa *Streptococcus lactis* CFQ  
ST18 drivac obtenido con la galería API 50 CH.**

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	-	-	1
ERY	-	-	2
DARA	-	-	3
LARA	-	-	4
RIB	+	+	5
DXYL	-	-	6
LXYL	-	-	7
ADO	-	-	8
MDX	-	-	9
GAL	+	+	10
GLU	+	+	11
FRU	+	+	12
MNE	+	+	13
SBE	-	-	14
RHA	-	-	15
DUL	-	-	16
INO	-	-	17
MAN	-	-	18
SOR	-	-	19
MDM	-	-	20
MDG	-	-	21
NAG	+	+	22
AMY	±	±	23
ARB	+	+	24
ESC	+	+	25
SAL	+	+	26
CEL	+	+	27
MAL	+	+	28
LAC	±	±	29
MEL	+	+	30
SAC	+	+	31
TRE	±	±	32
INU	-	-	33
MLZ	-	-	34
RAF	-	-	35
AMD	-	-	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	±	±	39
TUR	-	-	40
LYX	-	-	41
TAG	±	±	42
DFUC	-	-	43
LFUC	-	-	44
DARL	-	-	45
LARL	-	-	46
GNT	-	-	47
2KG	-	-	48
5KG	-	-	49

**Perfil de fermentación de sustratos para la cepa *Streptococcus durans* CFQ B046 obtenido con la galería API 50 CH.**

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	-	-	1
ERY	-	-	2
DARA	-	-	3
LARA	-	-	4
RIB	+	+	5
DXYL	-	-	6
LXYL	-	-	7
ADO	-	-	8
MDX	-	-	9
GAL	±	±	10
GLU	+	+	11
FRU	+	+	12
MNE	+	+	13
SBE	-	-	14
RHA	-	-	15
DUL	-	-	16
INO	-	-	17
MAN	-	-	18
SOR	-	-	19
MDM	-	-	20
MDG	-	-	21
NAG	+	+	22
AMY	±	±	23
ARB	+	+	24
ESC	+	+	25
SAL	+	+	26
CEL	+	+	27
MAL	+	+	28
LAC	+	+	29
MEL	+	+	30
SAC	+	+	31
TRE	±	±	32
INU	-	-	33
MLZ	-	-	34
RAF	-	-	35
AMD	-	-	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	+	+	39
TUR	-	-	40
LYX	-	-	41
TAG	±	±	42
DFUC	-	-	43
LFUC	-	-	44
DARL	-	-	45
LARL	-	-	46
GNT	-	-	47
2KG	-	-	48
5KG	-	-	49

**Perfil de fermentación de sustratos para la cepa *Lactobacillus plantarum*  
ATCC 8014 (CFQ L10) obtenido con la galería API 50 CH.**

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	-	-	1
ERY	-	-	2
DARA	-	-	3
LARA	+	+	4
RIB	+	+	5
DXYL	-	-	6
LXYL	-	-	7
ADO	-	-	8
MDX	-	-	9
GAL	+	+	10
GLU	+	+	11
FRU	+	+	12
MNE	+	+	13
SBE	-	-	14
RHA	±	±	15
DUL	-	-	16
INO	-	-	17
MAN	+	+	18
SOR	+	+	19
MDM	+	+	20
MDG	+	+	21
NAG	+	+	22
AMY	+	+	23
ARB	+	+	24
ESC	+	+	25
SAL	+	+	26
CEL	+	+	27
MAL	+	+	28
LAC	+	+	29
MEL	+	+	30
SAC	+	+	31
TRE	+	+	32
INU	-	-	33
MLZ	+	+	34
RAF	+	+	35
AMD	-	-	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	±	±	39
TUR	-	-	40
LYX	-	-	41
TAG	-	-	42
DFUC	-	-	43
LFUC	-	-	44
DARL	-	-	45
LARL	-	-	46
GNT	±	±	47
2KG	-	-	48
5KG	-	-	49

**Perfil de fermentación de sustratos para la cepa *Lactobacillus plantarum*  
CFQ L9 obtenido con la galería API 50 CH.**

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	-	±	1
ERY	-	-	2
DARA	-	-	3
LARA	+	+	4
RIB	+	+	5
DXYL	-	-	6
LXYL	-	-	7
ADO	-	-	8
MDX	-	-	9
GAL	+	+	10
GLU	+	+	11
FRU	+	+	12
MNE	+	+	13
SBE	-	-	14
RHA	±	±	15
DUL	-	-	16
INO	-	-	17
MAN	+	+	18
SOR	+	+	19
MDM	+	+	20
MDG	+	+	21
NAG	+	+	22
AMY	+	+	23
ARB	+	+	24
ESC	+	+	25
SAL	+	+	26
CEL	+	+	27
MAL	+	+	28
LAC	+	+	29
MEL	+	+	30
SAC	+	+	31
TRE	+	+	32
INU	-	-	33
MLZ	+	+	34
RAF	-	+	35
AMD	-	-	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	+	+	39
TUR	-	-	40
LYX	-	-	41
TAG	-	-	42
DFUC	-	-	43
LFUC	-	-	44
DARL	±	±	45
LARL	-	-	46
GNT	±	±	47
2KG	-	-	48
5KG	-	-	49

**Perfil de fermentación de sustratos para la cepa *Lactobacillus rhamnosus*  
CFQ obtenido con la galería API 50 CH.**

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	-	-	1
ERY	-	-	2
DARA	-	-	3
LARA	-	-	4
RIB	+	+	5
DXYL	-	-	6
LXYL	-	-	7
ADO	±	±	8
MDX	-	-	9
GAL	+	+	10
GLU	+	+	11
FRU	+	+	12
MNE	+	+	13
SBE	+	+	14
RHA	-	-	15
DUL	-	-	16
INO	-	-	17
MAN	+	+	18
SOR	±	±	19
MDM	-	-	20
MDG	±	±	21
NAG	+	+	22
AMY	±	±	23
ARB	±	±	24
ESC	+	+	25
SAL	+	+	26
CEL	+	+	27
MAL	+	+	28
LAC	-	-	29
MEL	-	-	30
SAC	±	±	31
TRE	+	+	32
INU	-	-	33
MLZ	-	-	34
RAF	-	-	35
AMD	-	-	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	±	±	39
TUR	+	+	40
LYX	-	-	41
TAG	+	+	42
DFUC	-	-	43
LFUC	-	-	44
DARL	-	-	45
LARL	-	-	46
GNT	±	±	47
2KG	-	-	48
5KG	-	-	49

**Perfil de fermentación de sustratos para la cepa *Lactobacillus rhamnosus*  
NRRL B-442 obtenido con la galería API 50 CH.**

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	-	-	1
ERY	-	-	2
DARA	-	-	3
LARA	-	-	4
RIB	+	+	5
DXYL	-	-	6
LXYL	-	-	7
ADO	-	-	8
MDX	-	-	9
GAL	+	+	10
GLU	+	+	11
FRU	+	+	12
MNE	+	+	13
SBE	+	+	14
RHA	±	±	15
DUL	-	-	16
INO	-	-	17
MAN	+	+	18
SOR	±	±	19
MDM	-	-	20
MDG	+	+	21
NAG	+	+	22
AMY	+	+	23
ARB	+	+	24
ESC	+	+	25
SAL	+	+	26
CEL	+	+	27
MAL	±	±	28
LAC	+	+	29
MEL	-	-	30
SAC	-	-	31
TRE	+	+	32
INU	-	-	33
MLZ	+	+	34
RAF	-	-	35
AMD	-	-	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	-	±	39
TUR	+	+	40
LYX	-	-	41
TAG	+	+	42
DFUC	-	-	43
LFUC	-	-	44
DARL	-	-	45
LARL	-	-	46
GNT	-	-	47
2KG	-	-	48
5KG	-	-	49

**Perfil de fermentación de sustratos para la cepa *Lactobacillus pentosus*  
NRRL B-227 obtenido con la galería API 50 CH.**

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	-	-	1
ERY	-	-	2
DARA	±	±	3
LARA	+	+	4
RIB	+	+	5
DXYL	-	-	6
LXYL	-	-	7
ADO	-	-	8
MDX	-	-	9
GAL	+	+	10
GLU	+	+	11
FRU	+	+	12
MNE	+	+	13
SBE	-	-	14
RHA	±	±	15
DUL	-	-	16
INO	-	-	17
MAN	+	+	18
SOR	±	±	19
MDM	-	-	20
MDG	-	-	21
NAG	+	+	22
AMY	±	±	23
ARB	+	+	24
ESC	+	+	25
SAL	+	+	26
CEL	+	+	27
MAL	+	+	28
LAC	+	+	29
MEL	-	-	30
SAC	+	+	31
TRE	+	+	32
INU	-	-	33
MLZ	+	+	34
RAF	-	-	35
AMD	-	-	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	±	±	39
TUR	-	-	40
LYX	-	-	41
TAG	+	+	42
DFUC	-	-	43
LFUC	+	+	44
DARL	-	-	45
LARL	-	-	46
GNT	±	±	47
2KG	±	±	48
5KG	-	-	49

**Perfil de fermentación de sustratos para la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *delbrueckii* NRRL B-763 obtenido con la galería API 50 CH.**

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	-	-	1
ERY	-	-	2
DARA	-	-	3
LARA	-	-	4
RIB	±	±	5
DXYL	-	-	6
LXYL	-	-	7
ADO	-	-	8
MDX	-	-	9
GAL	-	-	10
GLU	+	+	11
FRU	±	±	12
MNE	±	±	13
SBE	-	-	14
RHA	-	-	15
DUL	-	-	16
INO	-	-	17
MAN	-	-	18
SOR	-	-	19
MDM	-	-	20
MDG	-	-	21
NAG	±	±	22
AMY	-	-	23
ARB	-	-	24
ESC	±	±	25
SAL	-	-	26
CEL	-	-	27
MAL	-	-	28
LAC	-	-	29
MEL	-	-	30
SAC	±	±	31
TRE	-	-	32
INU	-	-	33
MLZ	-	-	34
RAF	-	-	35
AMD	-	-	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	-	-	39
TUR	-	-	40
LYX	-	-	41
TAG	-	-	42
DFUC	-	-	43
LFUC	-	-	44
DARL	-	-	45
LARL	-	-	46
GNT	-	-	47
2KG	-	-	48
5KG	±	±	49

**Perfil de fermentación de sustratos para la cepa *Lactobacillus casei* CFQ L3  
obtenido con la galería API 50 CH.**

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	-	-	1
ERY	-	-	2
DARA	-	-	3
LARA	-	-	4
RIB	+	+	5
DXYL	-	-	6
LXYL	-	-	7
ADO	-	-	8
MDX	-	-	9
GAL	+	+	10
GLU	+	+	11
FRU	+	+	12
MNE	+	+	13
SBE	+	+	14
RHA	-	-	15
DUL	±	±	16
INO	-	-	17
MAN	+	+	18
SOR	±	±	19
MDM	-	-	20
MDG	±	±	21
NAG	±	+	22
AMY	±	±	23
ARB	±	±	24
ESC	+	+	25
SAL	±	+	26
CEL	+	+	27
MAL	+	+	28
LAC	+	+	29
MEL	-	-	30
SAC	+	+	31
TRE	+	+	32
INU	±	±	33
MLZ	+	+	34
RAF	-	-	35
AMD	-	-	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	±	±	39
TUR	+	+	40
LYX	-	-	41
TAG	+	+	42
DFUC	-	-	43
LFUC	-	-	44
DARL	-	-	45
LARL	-	-	46
GNT	±	±	47
2KG	-	-	48
5KG	-	-	49

**Perfil de fermentación de sustratos para la cepa de bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Lalacult) obtenido con la galería API 50 CH.**

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	-	-	1
ERY	-	-	2
DARA	-	-	3
LARA	-	-	4
RIB	+	+	5
DXYL	-	-	6
LXYL	-	-	7
ADO	-	-	8
MDX	-	-	9
GAL	+	+	10
GLU	+	+	11
FRU	+	+	12
MNE	+	+	13
SBE	+	+	14
RHA	-	-	15
DUL	-	-	16
INO	-	-	17
MAN	+	+	18
SOR	+	+	19
MDM	-	-	20
MDG	-	-	21
NAG	+	+	22
AMY	-	-	23
ARB	+	+	24
ESC	+	+	25
SAL	+	+	26
CEL	+	+	27
MAL	±	±	28
LAC	+	+	29
MEL	-	-	30
SAC	+	+	31
TRE	+	+	32
INU	±	+	33
MLZ	+	+	34
RAF	-	-	35
AMD	-	-	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	±	±	39
TUR	+	+	40
LYX	-	-	41
TAG	+	+	42
DFUC	-	-	43
LFUC	-	-	44
DARL	-	-	45
LARL	-	-	46
GNT	±	±	47
2KG	-	-	48
5KG	-	-	49

**Perfil de fermentación de sustratos para la cepa de bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Yakult) obtenido con la galería API 50 CH.**

	24 h	48 h	
0	-	-	0
GLY	-	-	1
ERY	-	-	2
DARA	-	-	3
LARA	-	-	4
RIB	+	+	5
DXYL	-	-	6
LXYL	-	-	7
ADO	±	±	8
MDX	-	-	9
GAL	+	+	10
GLU	+	+	11
FRU	+	+	12
MNE	+	+	13
SBE	+	+	14
RHA	-	-	15
DUL	-	-	16
INO	-	-	17
MAN	+	+	18
SOR	±	±	19
MDM	-	-	20
MDG	±	±	21
NAG	+	+	22
AMY	±	±	23
ARB	±	±	24
ESC	+	+	25
SAL	±	±	26
CEL	±	±	27
MAL	+	+	28
LAC	+	+	29
MEL	-	-	30
SAC	±	±	31
TRE	+	+	32
INU	-	-	33
MLZ	-	-	34
RAF	-	-	35
AMD	-	-	36
GLYG	-	-	37
XLT	-	-	38
GEN	±	±	39
TUR	+	+	40
LYX	-	-	41
TAG	+	+	42
DFUC	-	-	43
LFUC	-	-	44
DARL	-	-	45
LARL	-	-	46
GNT	±	±	47
2KG	-	-	48
5KG	-	-	49

10.5 Secuencias parciales del ADNr 16S de la cepas empleadas en formato FASTA

```
AAGCGATTGCAAGCGGTTTCTTAAGTCAGATGACCAAGCCCCGGCTCCC
CGGGGAGGGTCATTGGAAATTGGGATGATGAGTGCCAAAGAGGAGAGTGG
AATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTG
GCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
GCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAA
GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCT
TTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTA
GTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCG
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCA
```

**Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Leuconostoc citrovorum* CFQ drivac en formato FASTA empleando el programa BioEdit.**

TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGT  
GGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATG  
GGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAT  
TACTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTA  
AGTAATCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGAATTG  
ACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCTACGC  
GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAACCTAAGAGATTAGGC  
GTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACT  
AGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACC  
GGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC  
TACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAAACCGCGAGGTT

**Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8042 en formato FASTA empleando el programa BioEdit.**

TTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGC  
GAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGG  
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC  
TAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGC  
ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG  
GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA  
GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTCCCCACTCTAGAGATAGAGCTTT  
CCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT  
CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGT  
TGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA  
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC  
ACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATG

**Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Streptococcus cremoris* CFQ ST3 en formato FASTA empleando el programa BioEdit.**

CCGGGGAGGGGGATGGAAATTGGGGTGATGAGTGCCAAAGAGGAGAGTGG  
AATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTG  
GCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGG  
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT  
GCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAA  
GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA  
CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG  
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCT  
TTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT  
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTA  
GTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCG  
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT

**Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Streptococcus cremoris* CFQ B035 en formato FASTA empleando el programa BioEdit.**

GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAG  
TGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGT  
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA  
GTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATT  
AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT  
GACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG  
CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAG  
CTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC  
GTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGT  
TAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAAC  
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG  
CTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCAAAGTCGCGAGGC

**Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Streptococcus lactis* CFQ ST18  
drivac en formato FASTA empleando el programa BioEdit.**

AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCA  
ACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG  
TGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCA  
GTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCG  
TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG  
AGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT  
TAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT  
TGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC  
GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGA  
GCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT  
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTG  
TTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAA  
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG

**Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Streptococcus durans* CFQ B046 en formato FASTA empleando el programa BioEdit.**

TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC  
TGTCTGGTCTGTAAGTACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAG  
GATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTG  
GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCT  
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGC  
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTAC  
CAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGG  
GACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATG  
TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT  
TAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG

**Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus plantarum* CFQ L9 en formato FASTA empleando el programa BioEdit.**

TGCGGGGAAATGGTGCATATATATATGGA AAAACACCAGTGGGGAAGGCG  
GCTGTCTGGTCTGTAAGTACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAAC  
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGT  
TGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGC  
CTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCC  
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT  
ACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCG  
GGGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGA  
TGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGC

**Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CFQ en formato FASTA empleando el programa BioEdit.**

TAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTT  
AACCGAGGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACA  
GTGGA ACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCATGCATATATGTAAGAACACA  
ACTGCAGAGGGGAAGGCGGGTGTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCTCG  
AAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGAAA  
ACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCCCCTTCAGTGCCGCAGCTA  
ACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA  
AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGA  
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGA  
GATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTG  
TCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  
TTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGT

**Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442 en formato FASTA empleando el programa BioEdit.**

GTGGA ACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACC  
AGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGC  
ATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGAT  
GAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCA

**Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus pentosus* NRRL B-227 en formato FASTA empleando el programa BioEdit.**

TGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCA  
GTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCA  
TGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATG  
AGCGCTAGGTGTTGGGGACTTTCCAGTCCTCAGTGCCGCAGCAAACGCAT  
TAAGCGCTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT  
TGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC  
GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTGCGCTACACCTAGAGATAGG  
TGGTTCCTTCGGGGACGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCT  
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCT  
TTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAAGAGACTGCCGGTGACAAA  
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGG  
GCTACACACGTGCTACAATGGGCAGTACAACGAGAAGCGAACCCGCGAGG

**Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *delbrueckii* NRRL B-763 en formato FASTA empleando el programa BioEdit.**

TTGTAGCCCCTTTTTTCGGCTGATGTCCATTTCTCGGCTTAGCCAGGAACG  
TGTCAGAACTGGAAACTGAAGTGCAAAGAGGACAGTGGA ACTCCATGT  
GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGCGGAAGGCGG  
CTGTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACA  
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTT  
GGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCC  
TGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG  
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT CGAAGCAACGCGAAGAACCTTA  
CCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGG  
GGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGAT  
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCA  
TTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG  
GGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC  
TACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTC  
TTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAG

**Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Lactobacillus casei* CFQ L3 en formato FASTA empleando el programa BioEdit.**

AAGGTGTCACAAAACCTGGAAAACCTTGAGTGCAAAAAAGGACAGTGGAAC  
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGA  
AGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAG  
CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTA  
GGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCAT  
TCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG  
GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA  
ACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCC  
CTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCG  
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTG  
CCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG  
AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC  
ACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCT

**Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa de bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Lalacult) en formato FASTA empleando el programa BioEdit.**

TCAAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCA  
GTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCA  
TGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATG  
AATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAT  
TAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT  
TGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC  
GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAG  
GTTTCCCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT  
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGA  
CTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAA  
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG  
GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGG

**Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa de bacteria láctica aislada de un producto lácteo fermentado (Yakult) en formato FASTA empleando el programa BioEdit.**