



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE BACTERIAS  
ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS  
A PARTIR DE PRODUCTOS LÁCTEOS  
EN EL ESTADO DE HIDALGO

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**Q U Í M I C O**  
**E N**  
**A L I M E N T O S**

PRESENTA

MARINETH ORTIZ BALDERAS

ASESORES: DRA. ARMIDA ZÚÑIGA ESTRADA

DRA. EVA MARIA SANTOS LÓPEZ

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO 2006.





Los resultados del presente trabajo fueron presentados en el Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria 2004, Monterrey Nuevo León; con las ponencias:

1. Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) de productos lácteos en el Estado de Hidalgo.
2. Calidad Microbiológica de quesos elaborados artesanalmente en el Estado de Hidalgo.

En el Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria 2005, Monterrey Nuevo León; con la ponencia:

1. Identificación de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos.

# ÍNDICE

RELACIÓN DE FIGURAS	i
RELACIÓN DE TABLAS	iii
ABREVIATURAS	iv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
2.1. Bacterias ácido lácticas	4
2.1.1. Características generales	4
2.1.2. Clasificación	5
2.1.3. Metabolismo	5
2.1.3.1. Metabolismo de la lactosa	9
2.1.3.2. Metabolismo de las pentosas y de los pentitoles	11
2.1.3.3. Producción de acetaldehído	11
2.1.3.4. Metabolismo aerobio	15
2.1.4. Importancia	15
2.1.5. Métodos de estudio	18
2.1.6. Identificación de las bacterias ácido lácticas mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas	19
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>27</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
Objetivo general	28
Objetivos particulares	28
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
5.1. Materiales	29
5.1.1. Material y equipo de laboratorio	29
5.1.2. Reactivos	29
5.1.3. Cepas	31

5.2. Métodos	31
5.2.1. Tinción de Gram	31
5.2.2. Prueba de catalasa	32
5.2.3. Prueba de oxidasa	32
5.3. Desarrollo experimental	32
5.3.1. Aislamiento de bacterias ácido lácticas	32
5.3.2. Identificación de las cepas de BAL por medio de pruebas bioquímicas	33
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
6.1. Aislamiento de cepas de bacterias ácido lácticas	36
6.2. Morfología macroscópica y microscópica y pruebas bioquímicas presuntivas.	36
6.3. Identificación de las cepas de BAL por medio de pruebas bioquímicas	39
6.4. Distribución de cepas por tipo de queso	47
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>67</b>
<b>9. ANEXO</b>	<b>73</b>

## RELACIÓN DE FIGURAS

Núm.	Título	Página
1	Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Embden-Meyerhof-Parnas).	7
2	Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (vía de las pentosas).	8
3	Operón de la lactosa.	10
4	Vías metabólicas para la fermentación de la lactosa por <i>Streptococcus salivarius</i> subesp. <i>thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbruekii</i> subesp. <i>bulgaricus</i> .	12
5	Las vías de la piruvato formiato-liasa y de la piruvato deshidrogenasa (a): piruvato formiato-liasa; (b): piruvato deshidrogenasa; c): acetaldehído deshidrogenasa; (d): etanol deshidrogenasa; (e): fosfoacetil transferasa; (f): acetato quinasa.	14
6	Esquema general de pruebas morfológicas e identificación bioquímica por el sistema API 50CHL.	34
7	Hoja de interpretación de datos API 50 CH.	35
8	Distribución de cepas BAL en estudio por género.	40
9	Distribución de cepas identificadas.	41
10	Porcentaje de cepas BAL correspondientes al género <i>Lactobacillus</i> identificadas bioquímicamente mediante el sistema API 50 CHL.	42
11	Porcentaje de cepas de BAL aisladas a partir de diferentes tipos de alimentos lácteos.	49
12	Distribución de cepas aisladas a partir de queso Oaxaca.	51
13	Distribución de cepas aisladas a partir de queso panela.	52
14	Distribución de cepas aisladas a partir de queso canasto.	53
15	Distribución de cepas aisladas a partir de queso manchego.	54
16	Distribución de cepas aisladas a partir de queso doble crema.	55

## RELACIÓN DE FIGURAS

17	Distribución de cepas aisladas a partir de queso blanco.	56
18	Distribución de cepas aisladas a partir de requesón.	57
19	Distribución de cepas aisladas a partir de queso molido.	58
20	Distribución de cepas aisladas a partir de queso ranchero.	59
21	Distribución de cepas aisladas a partir de queso botanero.	60
22	Distribución de cepas aisladas a partir de queso cotija.	61
23	Distribución de cepas aisladas a partir de leche.	62

## RELACIÓN DE TABLAS

Núm.	Título	Página
1	Cepas aisladas de los productos lácteos estudiados.	37
2	Morfología microscópica y pruebas bioquímicas presuntivas de las 280 cepas aisladas.	38
3	Perfil bioquímico para las cepas BAL identificadas mediante el sistema API 50 CHL	43
4	Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso Oaxaca.	50
5	Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso panela.	51
6	Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso canasto.	53
7	Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso manchego.	54
8	Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso doble crema.	55
9	Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso blanco.	56
10	Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de requesón.	57
11	Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso molido.	58
12	Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso ranchero.	59
13	Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso botanero.	60
14	Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso cotija.	61
15	Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de de leche.	62
16	Relación de cepas de BAL identificadas mediante morfología microscópica y pruebas bioquímicas por el sistema API 50 CHL.	76

## ABREVIATURAS

ADH	Etanol deshidrogenasa
BAL	Bacterias ácido lácticas
°C	Grados Celsius
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
FDP	Fructuosa difosfato
h	Hora
Min	Minutos
ml	Mililitros
μl	Microlitros
MRS	Medio de Man-Rogosa-Sharpe
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
LDH	Lactato deshidrogenasa
PEP	Fosfoenol piruvato
PTS	Fosfotransferasa
β-gal	β-D-galactosidasa
β-P-gal	β-D-fosfogalactosidasa



# 1. INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de la humanidad, las bacterias y otros microorganismos responsables de la transformación de alimentos, eran evidentemente desconocidos por quienes las utilizaban. Cuando se estudiaron ciertos microorganismos que causaban alteraciones en los alimentos se encontró que en lugar de provocar pérdidas económicas o afectar la salud de los consumidores, daban lugar a la formación de gran número de productos fermentados, los cuales fueron bien aceptados por la población (Davies y Gasson, 1984; Gilliland, 1985).

El descubrimiento de las bacterias ácido lácticas (BAL) fue probablemente accidental, debido a su acción sobre la leche, pero su utilización fue perpetuada en forma de cultivos iniciadores, mediante la recuperación de una parte del medio de fermentación (Jay, 1992).

Actualmente las BAL se utilizan en forma de cultivos iniciadores; el desarrollo de la industria de transformación, en particular de la industria láctea, ha llevado a la producción de fermentos industriales o cultivos iniciadores para la elaboración de leches fermentadas, cremas, mantequillas y quesos; así también en la elaboración de productos cárnicos y bebidas alcohólicas. Los géneros más ampliamente utilizados para este fin han sido *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Jay, 1992).

El desarrollo de las BAL en los alimentos propicia un acentuado ambiente hostil para el crecimiento y sobrevivencia de otras bacterias, principalmente las patógenas. Los efectos inhibitorios y destructivos no sólo son el resultado de una acidificación del medio, si no que intervienen otros mecanismos, entre ellos la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), antibióticos, ácidos grasos, bacteriocinas y agotamiento de nutrientes, lo que provoca un aumento en la vida de anaquel de los productos (Daeschel, 1989).

Las BAL tienen la propiedad de producir ácido láctico y en muchos casos, otros ácidos, que no sólo contribuye a la mayoría de las propiedades sensoriales de los alimentos

fermentados, sino también son responsables de la inhibición de bacterias patógenas y deterioradas que pueden afectar la calidad y seguridad del alimento (Starmer, 1979).

Existe otro grupo de compuestos que son producidos por diversas especies de BAL y que han despertado el interés de muchos investigadores ya que muestran actividad antibacteriana contra una variedad de diversas bacterias tanto patógenas como responsables del deterioro de alimentos (Daeschel, 1989).

El aislamiento y caracterización bioquímica de las cepas de BAL, permite incrementar el conocimiento acerca del potencial de cepas de BAL autóctonas, para ser utilizadas como cultivos iniciadores, lo que representa tener un mejor control sobre los procesos de fermentación, permitiendo incrementar la vida de anaquel y la calidad microbiológica del producto terminado (Hoover y Steenson, 1993).

El objetivo de este proyecto de investigación consistió en identificar mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas una colección de 280 cepas de BAL, las cuales fueron aisladas a partir de diferentes alimentos fermentados producidos en forma artesanal en el Estado de Hidalgo.

La identificación de las 280 cepas de BAL que se encontraban conservadas mediante condiciones de liofilización y congelación en viales con caldo MRS y 20% de glicerol a  $-20^{\circ}\text{C}$ , consistió en verificar su pureza, así como la observación de sus características morfológicas en placas con agar MRS, posteriormente se realizó la observación de la morfología microscópica utilizando la tinción de Gram, así como las pruebas de catalasa y oxidasa.

La identificación bioquímica de las 280 cepas de BAL aisladas de productos lácteos, se realizó mediante la utilización de un sistema miniaturizado, que fue el método API 50 CHL.

El sistema API 50 CHL médium, destinado a la identificación del género *Lactobacillus* y microorganismos próximos permitió realizar el estudio de fermentación de los 49 azúcares de la galería API 50 CHL. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico y permiten la identificación del microorganismo con la ayuda de un programa informático.

Al terminar este trabajo de investigación se logró obtener un banco de cepas de BAL definitivamente identificadas y caracterizadas, que potencialmente pueden ser utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración de alimentos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

En 1857 Pasteur descubrió a los microorganismos que causaban alteraciones en los alimentos, realizando estudios sobre la fermentación láctica, alcohólica y butírica, denominándolos lactobacterias, lo cual marcó el antecedente para la aplicación de las BAL en los procesos de elaboración de queso y derivados de la leche (Esquivel et al., 1987).

En el año de 1890, Weigman estableció lo que fue el primer cultivo iniciador reconocido y más tarde, en 1899 definió a las BAL como aquellas bacterias que formaban leche ácida a partir del azúcar de la leche (Fernández, 1981; Esquivel et al., 1987).

#### 2.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Fue en 1919 cuando Orla-Jensen estableció los criterios de taxonomía de las BAL basados en morfología y comportamiento fisiológico, describiéndolas como bacilos y cocos Gram positivos no esporulados, inmóviles o muy poco móviles. El producto final y principal del metabolismo fermentativo de los azúcares es el ácido láctico, la mayoría de las especies son catalasa negativas mientras que otras muestran catalasa positivas. Según las condiciones de crecimiento son microaerofílicos o anaerobios; sus requerimientos nutricionales son complejos ya que son quimiorganótrofos en tanto que con base a sus requerimientos de temperatura son mesofílicos o termofílicos (Starmer, 1979).

Por otro lado, las BAL son generalmente consideradas inmóviles. De 59 especies que fueron evaluadas sólo 5 mostraron movilidad, que es el caso de *Streptococcus faecalis*, *S. faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lb. curvatus* y *Lb. ruminis* (Starmer, 1979).

Actualmente las BAL se identifican como cocos o bacilos Gram positivos no esporulados, fermentadores de carbohidratos con producción de ácido láctico, tolerantes a

los ácidos (es decir que se desarrollan a pH bajos), catalasa y oxidasa negativas y microaerófilos (Fernández, 1981; Wood y Holzapel, 1995).

### 2.1.2. CLASIFICACIÓN

Los géneros tradicionales de las BAL, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, han sido ampliados para incluir en este grupo de bacterias los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus*. Las carnobacterias son cepas que antiguamente se clasificaban como lactobacilos, mientras que los otros tres géneros se clasificaban como estreptococos. Al haber sido separados los enterococos y lactococos, la especie más importante de este último grupo en los alimentos es *Streptococcus thermophilus*; también *Streptococcus diacetylactis* se clasifica como una cepa de *Lactococcus lactis subsp lactis*, que utiliza el citrato (Jay, 1992).

Algunas especies de *Aerococcus*, *Erysipelothrix* y los géneros de *Eubacterium*, *Microbacterium*, *Peptostreptococcus* y *Propionibacterium*, están relacionadas en algunos aspectos con los cuatro géneros de BAL anteriormente citados; pero generalmente se consideran que no encajan en el grupo. Si bien el grupo de las BAL está definido vagamente con límites imprecisos, todos sus representantes comparten la propiedad de producir ácido láctico a partir de las hexosas (Jay, 1992).

### 2.1.3. METABOLISMO

Las BAL sólo pueden obtener energía a través de la fermentación de los azúcares (Pérez y Pérez, 1984). Dentro de los géneros que conforman al grupo de las BAL, los *Streptococcus* son generalmente homofermentativos, *Leuconostoc* son heterofermentativos y *Lactobacillus* comprende tanto homofermentativas como heterofermentativas; pero para poder diferenciar entre BAL homofermentativas o heterofermentativas se debe considerar lo siguiente:

Homofermentativos: se designan a aquellos microorganismos que producen del 90 al 97% de ácido láctico a partir de la lactosa; poseen las enzimas aldosa y hexosa isomerasa, utilizando la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para la producción de dos moléculas de lactato por molécula de glucosa consumida (figura 1). Por lo tanto todos los representantes de los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus*, junto con algunos lactobacilos son homofermentativos (Jay, 1992; Wood y Holzapfel, 1995).

Heterofermentativos: Se designan aquellas bacterias que producen un 50% de ácido láctico y cantidades apreciables de etanol, aldehídos y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>); es decir que producen cantidades equimolares de lactato, etanol y CO<sub>2</sub>, a partir de las hexosas; poseen sólo la enzima fosfocetolasa por lo que siguen las vías monofosfato de hexosa o de las pentosas (figura 2). Todas las especies de *Leuconostoc*, así como algunos lactobacilos, son microorganismos heterofermentativos (Jay, 1992; Wood y Holzapfel, 1995).

En la fermentación homoláctica, por cada mol de lactosa utilizado se forman 4 moléculas de lactato y 5 moléculas de ATP (2 por la vía de la glucosa y 3 por la de la galactosa). La fermentación heteroláctica de la misma molécula sólo produce 3 moléculas de lactato y 4 moléculas de ATP (Jay, 1992).

Las especies heterofermentativas son incapaces de poseer la fructuosa difosfato, por consiguiente la fructuosa-difosfato-aldosa está ausente o reprimida.

Existen también las bacterias heterofermentativas facultativas, las cuales utilizan la vía de EMP o la vía de las pentosas para dar como productos en su mayoría ácido láctico, ácido acético y etanol (Sneath et al., 1986).

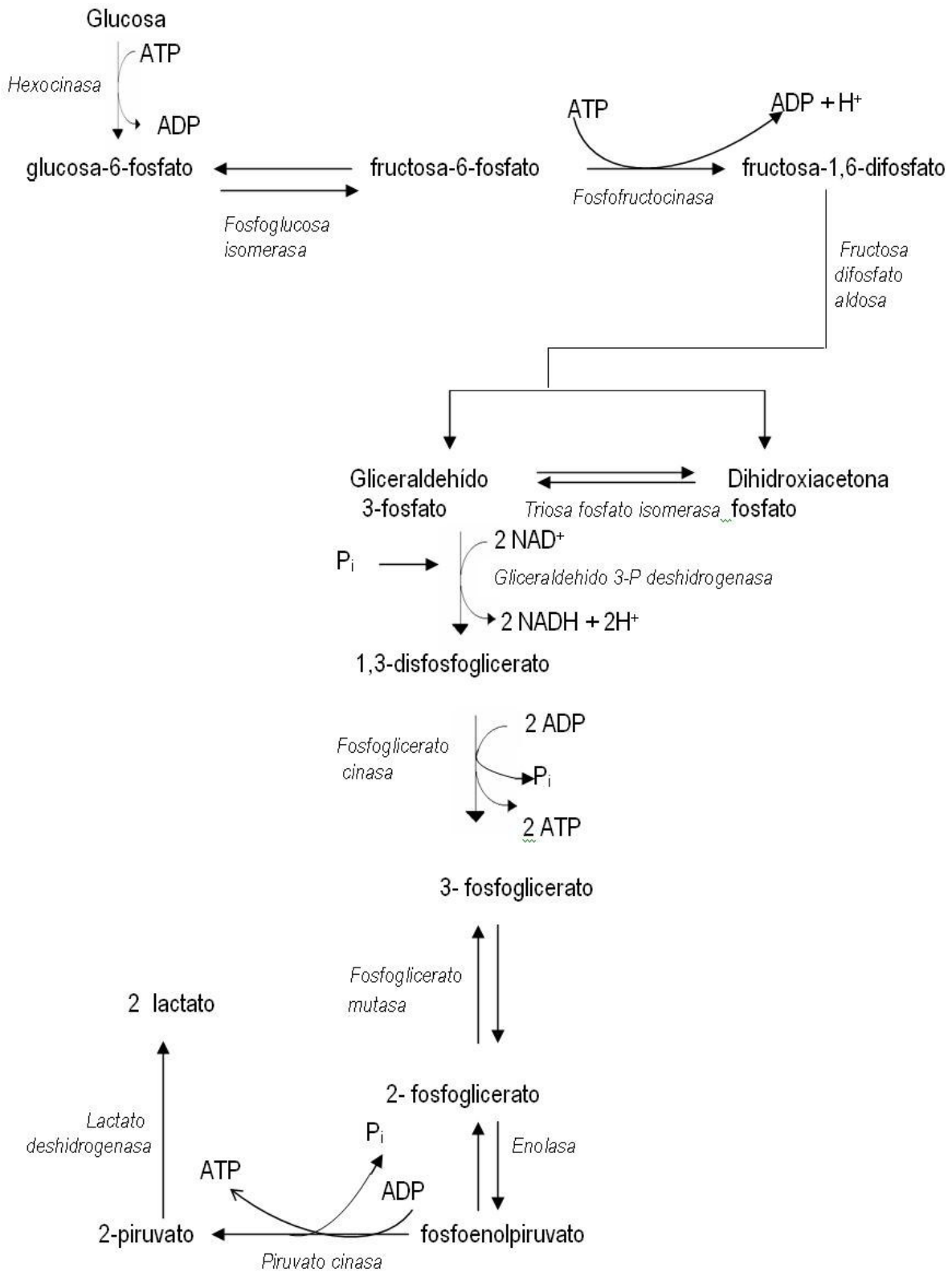


Figura 1. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Embden-Meyerhof-Parnas) (Nelson et al., 2000; Stryer, 1994).

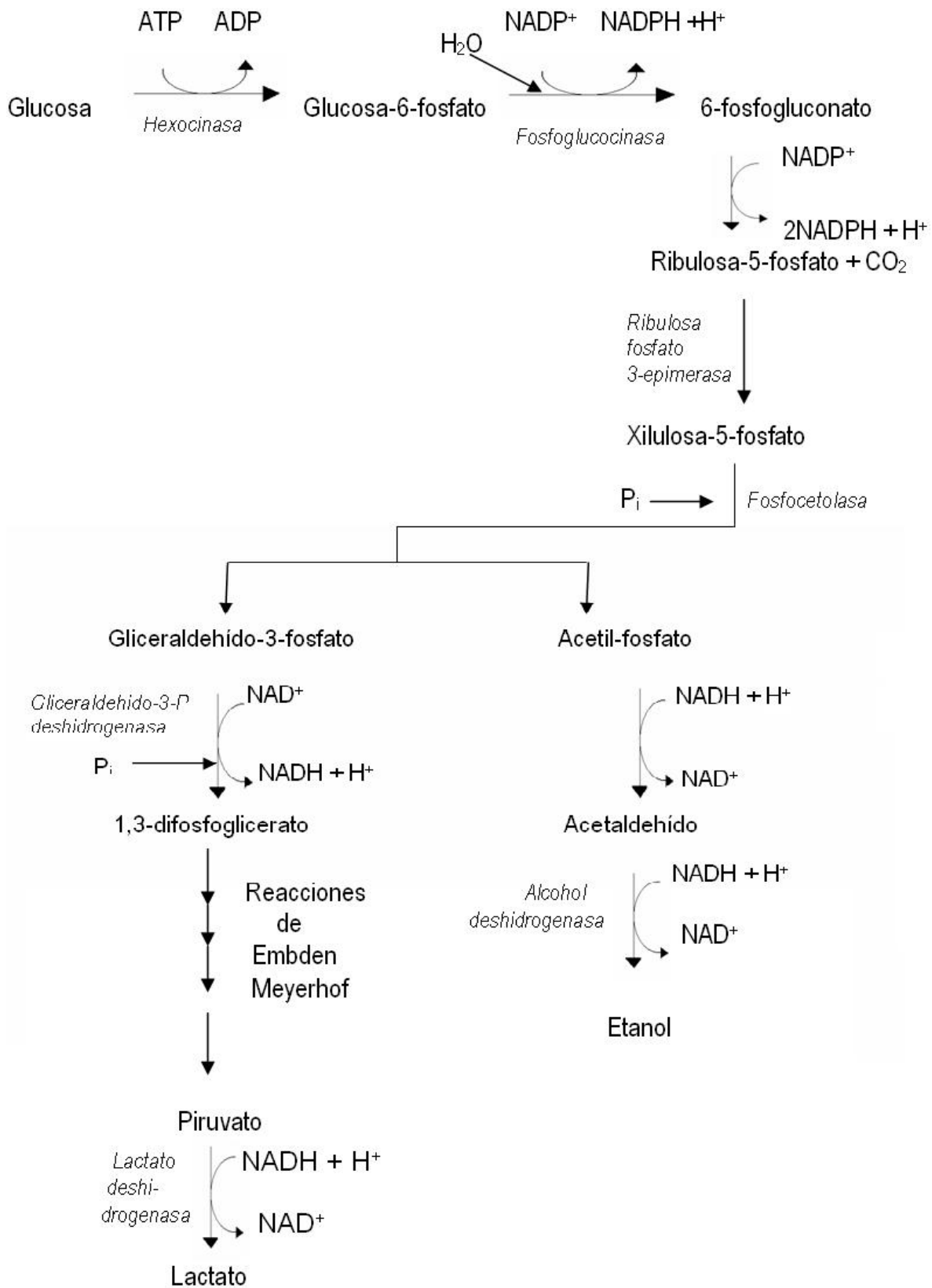


Figura 2. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (vía de las pentosas) (Nelson et al., 2000; Stryer, 1994).



### 2.1.3.1. Metabolismo de la lactosa

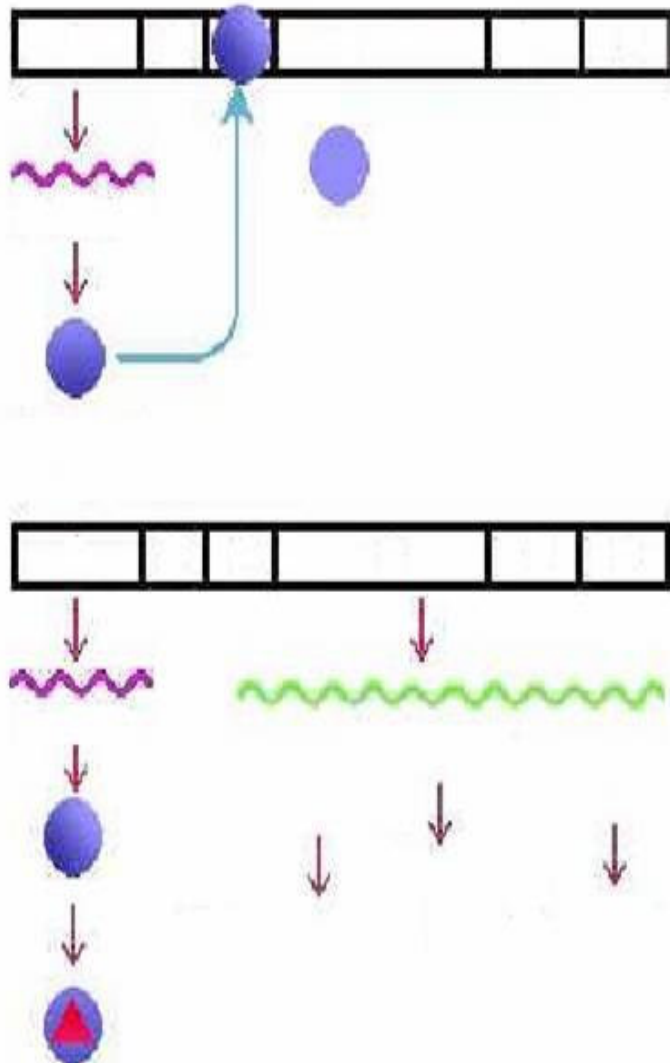
La lactosa, que es un disacárido de glucosa y galactosa unidas por un enlace  $\beta$ -1-4, es el azúcar más importante presente en la leche, representando del 4 al 5% de lactosa (Pérez y Pérez, 1984).

El metabolismo de la lactosa se activa a través de un sistema enzimático regulado genéticamente, conocido como operón de la lactosa. En ausencia de la lactosa este operón está regulado por otro gen, un gen regulador *i* que codifica un represor. El represor ejerce un control negativo ya que se une al operador e inhibe la transcripción de los genes estructurales (Stryer, 1988).

El operón de la lactosa está formado por un gen promotor (*p*), un gen operador (*o*) y 3 genes estructurales (*z*, *y*, *a*). Los elementos regulatorios son el promotor y el operador, que por estar localizados en la misma molécula de DNA que codifica los genes estructurales se llaman cis-actantes. En estos sitios regulatorios se unen moléculas que controlan la transcripción. Estas moléculas son trans-actantes, porque no están físicamente ligados a los genes que regulan (figura 3) (Stryer, 1988).

La transferencia a través de la membrana celular es la primera etapa en la utilización de la lactosa por *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subesp. *bulgaricus*, la cual está mediada por la acción de una galactósido permeasa. Además, estos microorganismos poseen  $\beta$ -D-galactosidasa ( $\beta$ -gal), enzima que hidroliza la lactosa en el interior de la célula hasta D-glucosa y  $\beta$ -D-galactosa (Hickey et al., 1986; Hutkins et al., 1987).

Sin embargo, algunas cepas de *S. salivarius* subesp. *thermophilus* utilizan el sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa, que fosforila la lactosa al entrar a la célula. La lactosa fosfato es entonces metabolizada por la enzima  $\beta$ -D-fosfogalactosidasa ( $\beta$ -P-gal), produciendo D-glucosa y galactosa-6 fosfato (Hickey et al., 1986; Hutkins et al., 1985b).



p= promotor  
o= operador  
z,y,a= genes estructurales

Figura 3. Operón de la lactosa (Stryer, 1988).

La galactosa-6-fosfato se metaboliza a triosa fosfato, por la vía de la tagatosa fosfato; y la glucosa a su vez es fosforilada por la enzima hexocinasa y posteriormente es metabolizada por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas.

Algunas cepas son capaces de fermentar la galactosa; en este caso la galactosa es fosforilada por acción de la enzima galactocinasa y la galactosa-1-fosfato puede entrar en la vía de Leloir, en donde la galactosa-1-fosfato se convierte en glucosa-1-fosfato y posteriormente en glucosa-6-fosfato, para entrar en la vía de EMP. Las posibles vías de utilización de la lactosa se muestran en la figura 4 (Hickey et al., 1986; Hutkins et al., 1985a).

#### 2.1.3.2. Metabolismo de las Pentosas y de los Pentitales

Algunas especies de *Lactobacillus* heterofermentativos pueden utilizar las pentosas y los pentitales (arabitol, xilitol); estos compuestos penetran gracias a permeasas específicas y a continuación son convertidos en D-xilulosa-5-fosfato y finalmente en lactato y acetato. Las enzimas de la vía de las pentosas serían inducidas por su sustrato específico (Klander, 1983).

Estas bacterias poseen un metabolismo homofermentativo en presencia de hexosas y un metabolismo heterofermentativo en presencia de pentosas y también se puede hablar de especies homofermentativas facultativas (Klander, 1983).

#### 2.1.3.3. Producción de acetaldehído

La producción de acetaldehído es de gran importancia para las bacterias del yogur; sin embargo éste compuesto es producido en cantidad variable por las BAL, por ejemplo se encuentra en baja concentración en *Lc. lactis subesp. lactis* o *Lc. lactis subesp. cremoris* (Marshall y Cole, 1984).

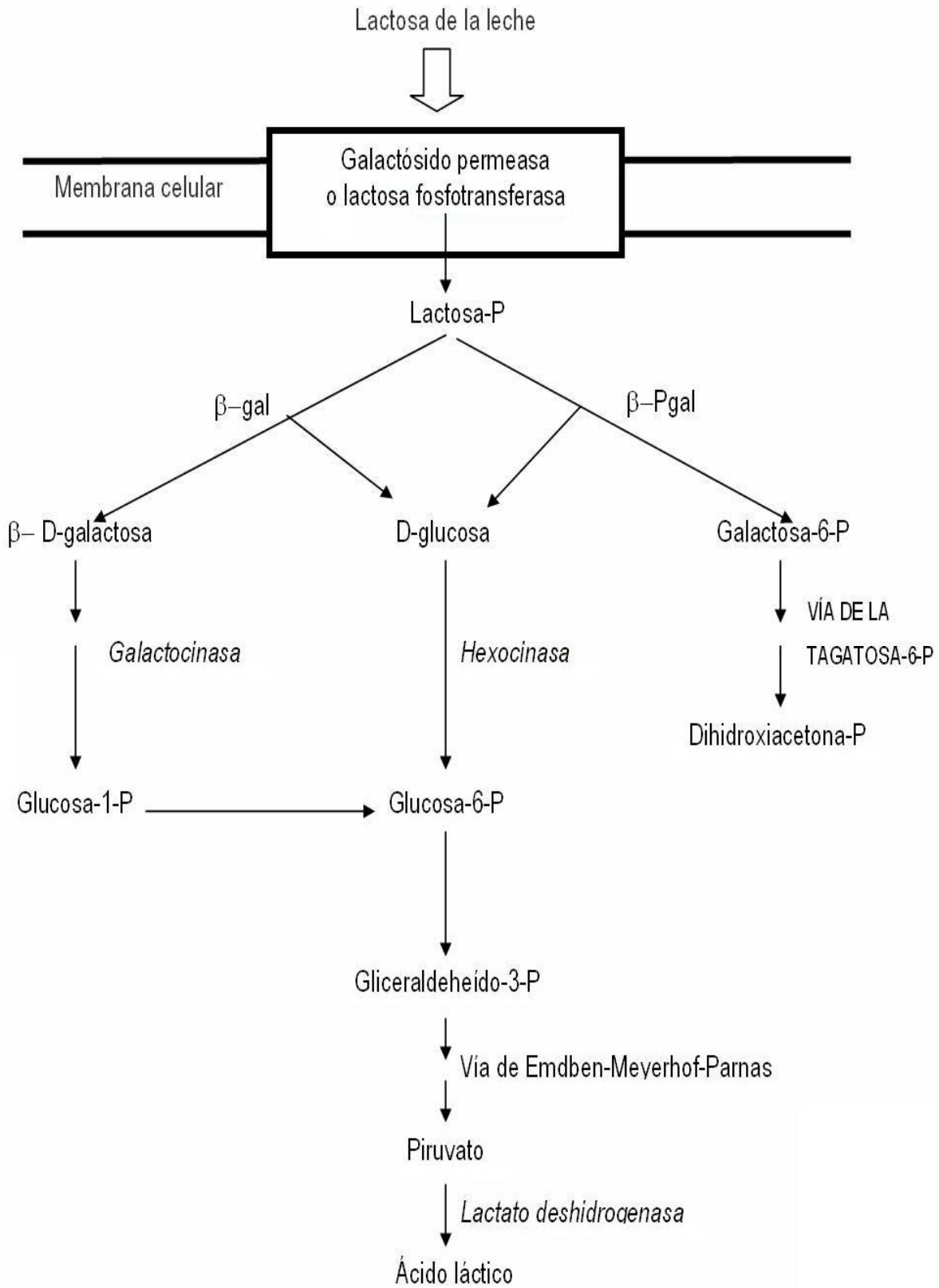


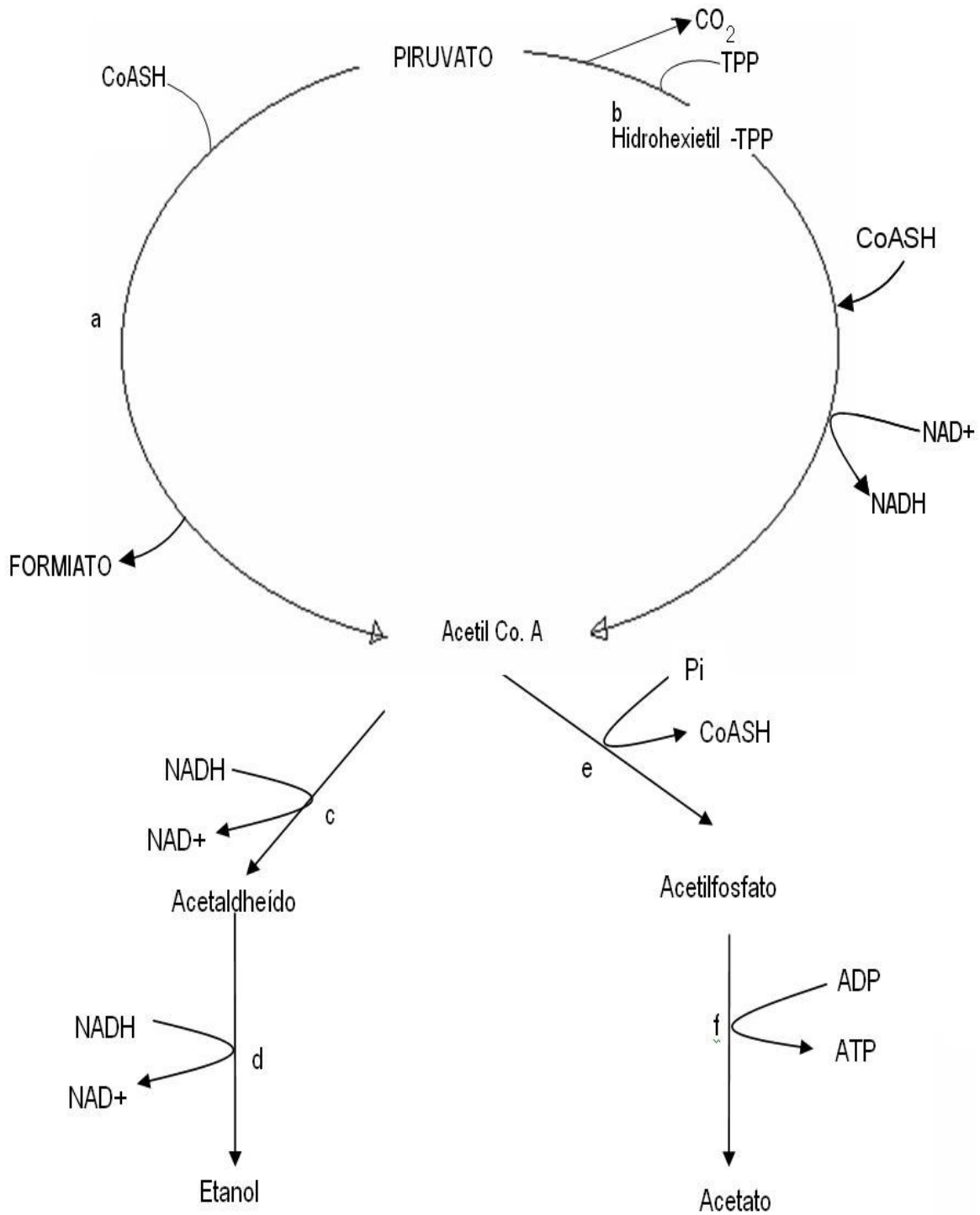
Figura 4. Vías metabólicas para la fermentación de la lactosa por *S. salivarius* subesp. *thermophilus* y *Lb. delbruekii* subesp. *bulgaricus* (Hutkins, 1985b).

El acetaldehído está considerado como el compuesto aromático más importante del yogur; éste compuesto es producido durante el crecimiento de *S. thermophilus* o de *Lb. delbruekii subesp. bulgaricus* (Accolas et al., 1980; Marshall y Cole, 1984). En el yogur, según Botazzi y Vescao (1969) para obtener una cantidad óptima de acetaldehído, en promedio 10-15 mg por ml, depende en gran parte de la acción de los lactobacilos termófilos; pero se debe tomar en cuenta que la acetona puede alterar el aroma del producto; considerándose las mejores cepas aquellas que producen 2.8 veces más de acetaldehído que de acetona.

Los precursores del acetaldehído son el piruvato y el acetil-CoA derivados del metabolismo de los azúcares (figura 5). Por ejemplo, en *S. thermophilus* una parte del acetaldehído podría provenir del piruvato no transformado por lactato por la LDH no estimulada o inhibida por la FDP; sin embargo hay que considerar a los aminoácidos que pueden participar en esta síntesis (Lee et al., 1976).

En el caso particular de una hiperproducción de acetaldehído por las bacterias del yogur, podría explicarse por la ausencia del etanol deshidrogenasa (ADH) y por lo tanto la incapacidad de producir etanol a partir de este compuesto. En efecto las especies que poseen la ADH como *Lactobacillus acidophilus* o *Leuconostoc cremoris* no producen (o pueden muy poco) acetaldehído a pesar de la presencia de la treonina aldosa. Si suministra treonina a *Lb. acidophilus*, la indisponibilidad de NADH + H<sup>+</sup> impide la formación de etanol (Lee et al., 1976; Marshall y Cole, 1984; Schmitt et al., 1988).

Finalmente el acetaldehído puede ser producido por fermentación heteroláctica de los glúcidos. En los *Leuconostoc* desprovistos de piruvato Descarboxilasa, sería el acetil-fosfato el precursor de este compuesto (figura 5) (Leveau y Bouix, 2000).



TPP: tiamina pirofosfato

Figura 5. Las vías de la piruvato formiato-liasa y de la piruvato deshidrogenasa (a): piruvato formiato-liasa; (b): piruvato deshidrogenasa; (c): acetaldeído deshidrogenasa; (d): etanol deshidrogenasa; (e): fosfoacetil transferasa; (f): acetato quinasa (Lee et al., 1976).

#### 2.1.3.4. Metabolismo aerobio

La relación de las BAL con el oxígeno es compleja ya que tienen la incapacidad de sintetizar las porfirinas hémicas, estas bacterias poseen un metabolismo fermentativo y son así pues consideradas como anaerobias; sin embargo su sensibilidad al oxígeno puede ser muy variable según las cepas, siendo desde anaerobia estricta o aerotolerante hasta insensible. Una característica muy importante en las BAL es que tienen la ausencia de una catalasa hémica; esto sucede en todos los géneros, por ello se les asigna el nombre de pseudocatalasas. El aporte de hematina permite a *Enterococcus faecalis* y algunas cepas de *Lc. lactis* sintetizar porfirinas hémicas y citocromos funcionales (Leveau y Bouix, 2000).

En general las BAL son capaces de transformar el oxígeno molecular ( $O_2$ ) en peróxido ( $H_2O_2$ ) o en agua ( $H_2O$ ); estas reacciones son catalizadas por enzimas específicas generalmente en presencia de un sustrato a oxidar (Condon, 1983, 1987).

La producción de ciertos derivados del oxígeno molecular por ciertas BAL es conocida desde tiempos remotos; esa producción puede inhibir hasta cepas concurrentes debido a que en presencia de aire, el peróxido, si no es destruido por una peroxidasa, puede acumularse autoinhibiéndose la cepa productora. Cabe mencionar como dato importante que la inhibición por el peróxido puede ser amplificada en la leche por la presencia de lactoperoxidasa y de tiocianato, al ser tóxico el hipotiocianato producido (Condon, 1983; Reiter, 1985).

#### 2.1.4. IMPORTANCIA

Las BAL son organismos industrialmente importantes reconocidos por su capacidad fermentativa, así como por sus beneficios nutricionales y para la salud humana. Las especies usadas para la fermentación de alimentos pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Estos microorganismos han sido aislados de granos, plantas verdes, productos lácteos y cárnicos, vegetales fermentados y de las mucosas de animales. Desde que se usaron en forma empírica para retardar el

deterioro de los alimentos a través de fermentaciones naturales, han tenido aplicación comercial como cultivos iniciadores en las industrias de lácteos, panadería, cárnicos, vegetales y bebidas alcohólicas (Leveau y Bouix, 2000; Havenar y Huis In't Veld, 1992).

- Las bacterias lácticas y los productos cárnicos

La flora espontánea predominante de la fermentación de los productos cárnicos está constituida por lactobacilos. En 1940, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* y *Lb. fermentum* fueron propuestos en los Estados Unidos para la fabricación de salchichones, pero las dificultades para liofilizar de estas especies hizo que abandonasen a favor de los *Pediococcus*, primer cultivo iniciador comercial disponible para los productos cárnicos. En 1974 se desarrolló un cultivo iniciador concentrado congelado formado por *Lb. plantarum* sólo o en cultivo mixto en asociación con otras BAL como *Pediococcus acidilactis* (Bacus y Brown, 1985).

Según Gibbs (1987) los *Pediococcus* y *Lactobacillus* utilizados inhiben a las salmonelas, los estafilococos o a *Clostridium botulinum* durante la fabricación de salchichas y tocino. La adición de diversas bacterias lácticas a la carne fresca permite una mejor conservación.

- Las bacterias lácticas y los productos vegetales

La utilización de cultivos puros de BAL para la fermentación de productos vegetales como pepinos, coles, aceitunas y otros productos es todavía muy limitada y la regla es todavía la fermentación natural de estos productos por las BAL presentes en su superficie y difíciles de eliminar (Fleming et al., 1985).

- Las bacterias lácticas en la Industria láctea

Los cultivos iniciadores lácticos son muy importantes en la industria agroalimentaria y en particular en la industria láctea de transformación. Los fermentos lácticos comerciales se cultivan generalmente en forma de cultivos iniciadores que sirven para sembrar las cubas de fabricación.



Una de las técnicas recientes son los cultivos iniciadores concentrados congelados o liofilizados que permiten una siembra directa de las cubas (Gilliland, 1985).

Las cualidades requeridas en las cepas de cultivos iniciadores son múltiples. Deben en primer lugar ser capaces de transformar el alimento, por ejemplo la leche, en un nuevo producto que posea propiedades definidas y constantes. Deben permitir una buena conservación del alimento y defenderlo en particular contra el deterioro por otros microorganismos; la acidificación es uno de los medios utilizados (Leveau y Bouix, 2000).

El crecimiento de estas bacterias en la leche y su actividad en los quesos tienen consecuencias beneficiosas para el alimento: la fermentación de la lactosa hasta ácido láctico acidifica el medio y juntamente con la proteólisis de las caseínas provoca la coagulación de la leche y la sinéresis de la cuajada. Algunas cepas como el *Lc. lactis* biovar *diacetylactis* o ciertos *Leuconostoc* son fuente de diacetilo, componente principal del aroma de la mantequilla y de otros productos lácteos. Los fermentos lácticos termófilos *S. thermophilus* y *Lb. bulgaricus* producen acetaldehído sobre todo a partir de ciertos aminoácidos presentes en la leche o producidos por la proteólisis (Daeschel, 1989).

#### - Las bacterias lácticas y los productos de panificación

La utilización de cultivos iniciadores industriales bacterianos en la industria de la panificación está todavía en la fase inicial. Un cultivo iniciador industrial que contiene una sola especie (*Lb. sanfrancisco*) se utiliza en los Estados Unidos para fabricar pan francés. Un cultivo de *Lb. plantarum* y de *Candida tropicalis* ha sido puesto a punto en Francia para la fabricación de pan (Suhigara, 1985).

Otras especies de lactobacilos pueden aislarse de las fermentaciones de panificación: *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei* asociadas con *Leuconostoc mesenteroides subesp. mesenteroides* y *Lc. cremoris* y con *S. thermophilus*; estas especies podrían servir para la fabricación de fermentos industriales (Suhigara, 1985).

### 2.1.5. MÉTODOS DE ESTUDIO

En general las BAL son exigentes en sus demandas nutricionales pues requieren de carbohidratos, aminoácidos y una variedad de factores de crecimiento (Leveau y Bouix, 2000).

Actualmente se utilizan varios medios de cultivo, tanto selectivos como diferenciales, para el aislamiento y recuento de BAL a partir de alimentos, entre los que se encuentran el agar MRS (Man-Rogosa-Sharpe), el agar APN (Actidiona-polimixina-nitrito), el agar Lee y el agar de Chalmers (Morales, 1989).

Agar MRS. En este medio, en general se tiene un buen desarrollo de bacterias lácticas aisladas de productos lácteos y fuentes humanas al agrupar la acción estimulante del citrato, acetato de sodio, tween 80 y sales de  $Mn^{2+}$ , pero no permite un buen desarrollo de BAL provenientes de cereales y otros vegetales.

Este medio es recomendado para la conservación de las BAL a corto plazo (Reuter, 1985).

Agar APN. Su carácter selectivo se lo confiere el nitrito, el cual es tolerado por las bacterias lácticas, la actidiona inhibidor de levaduras y la polimixina inhibidor de bacterias Gram negativas.

Las bacterias lácticas en este medio forman colonias blancas puntiformes, pero algunas llegan a medir 2-3 mm de diámetro (Fernández y Hernández, 1985).

Agar de Lee. Permite diferenciar a *S. thermophilus* más que a *Lb. bulgaricus* por la diferente acción fermentativa sobre los azúcares que contiene el medio, los cuales son lactosa y sacarosa. Los estreptococos forman colonias amarillas y el virre del indicador (púrpura de bromocresol) se observa en casi toda la placa, lo cual se produce por la

fermentación de ambos carbohidratos y los lactobacilos forman colonias blancas y el vire del indicador se observa solamente alrededor de la colonia ya que solo fermenta la lactosa (Morales, 1989).

Agar de Chalmers. En este medio de cultivo se pueden diferenciar por su morfología colonial, las BAL pertenecientes a los géneros: *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* de otros microorganismos Gram positivos, Gram negativos, levaduras y hongos filamentosos.

La morfología colonial que presentan las BAL en este medio es: el tamaño de la colonia varía desde puntiforme hasta 2 mm de diámetro, las colonias son rojas, rojas-rosas o bien rosas y todas presentan un halo rosa claro y son de aspecto aperlado.

Es importante señalar que para los medios MRS, APN y Lee se requiere la comprobación de los microorganismos tanto en base a su morfología microscópica como su identificación por medio de las pruebas de catalasa y oxidasa, pero en el caso del medio de Chalmers no se requiere de pruebas confirmativas adicionales para verificar que se trata de bacterias lácticas (Reuter, 1985).

#### 2.1.6. IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS

En tiempos pasados la taxonomía de las BAL se basó en gran parte en su reacción a la tinción Gram, en la carencia general de capacidad para producir catalasa y en la producción de ácido láctico de una configuración determinada, junto con la capacidad para fermentar diversos carbohidratos (Jay, 1992).

Para poder caracterizar bioquímicamente a las bacterias lácticas que conforman un cultivo iniciador, se cuenta en el laboratorio con métodos de identificación basados

inicialmente en sus características morfológicas tanto microscópicas como macroscópicas o coloniales que se realizan a partir de aislamiento en los medios recomendados (Alais, 1980).

Para llegar a una identificación fina de las cepas, se consideran además las características fisiológicas y bioquímicas que se enlistan a continuación (Alais, 1980):

- Crecimiento a diferentes temperaturas (10, 37 y 45°C)
- Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl (2, 4 y 6.5%).
- Producción de amoniac a partir de arginina.
- Fermentación de carbohidratos:
  1. D(-)fructuosa
  2. D-galactosa
  3. D(+)galactosa
  4. Dl-arabinosa
  5. D(+)-trehalosa
  6. Ramnosa
  7. D(+)-glucosa
  8. Maltosa
  9. D(+)-rafinosa
  10. Manosa
  11. D(+)-xilosa
  12. Dextrosa
  13. Lactosa
  14. Amigdalina
  15. Celobiosa
  16. Melezitosa
  17. Melobiosa
  18. Ribosa
  19. Salicina
  20. Sorbitol
  21. Sucrosa

- Producción de acetoína.
- Hidrólisis de esculina
- Actividad reductora (leche tornasolada)
- Sobrevivencia a tratamiento térmico

La identificación de las BAL puede ser llevada a cabo por pruebas bioquímicas y fisiológicas, o actualmente, por métodos moleculares.

Las pruebas de identificación bioquímica y fisiológica puede realizarse mediante métodos convencionales (generalmente en tubo) o por micrométodos que incluso pueden ser semi o automatizados.

#### A) Métodos convencionales

La identificación de bacterias lácticas se realiza mediante una serie de pruebas convencionales muy extensa, que involucra una gran cantidad de material, medios de cultivo (comúnmente para los métodos convencionales, se emplean tubos de vidrio 13 x 100 mm a los que es necesario adicionar por lo menos 3 ml de medio de cultivo) y tiempo siendo el costo elevado; por tal motivo los métodos convencionales actuales de identificación bioquímica y fisiológica están cayendo en desuso, ya que, a pesar de que pueden dar información muy amplia, no son usados (Pereda et al., 1990).

#### B) Micrométodos

Debido a su eficacia los micrométodos pueden ser empleados para la identificación bioquímica de bacterias lácticas, disminuyendo material y tiempo de realización lo que reduce el tiempo de reacción de las pruebas y por tanto, resulta ser menos costosos que los métodos tradicionales; además, es posible introducir un número mayor de pruebas bioquímicas y llevarlas a cabo repetidas veces. No es recomendable realizar la prueba de producción de amoniaco a partir de la arginina, debido a la dificultad que representa para observar el vire del indicador en un volumen tan pequeño.

Los medios usados en los micrométodos son similares en composición a los empleados en las técnicas convencionales, excepto que los primeros no deben ser adicionados de agentes solidificantes como agar o gelatina.

La omisión de estos agentes solidificantes ocasiona necesariamente otras modificaciones en la composición y procedimiento final de las pruebas.

Es necesario tener sumo cuidado con el manejo de las microplacas, debido al alto riesgo de contaminación que representa el hecho de encontrarse los pozos tan cercanos (Pereda et al., 1990). Para la caracterización de bacterias por medio de los micrométodos se requiere del uso de placas de hemaglutinación.

Las placas de hemaglutinación han sido utilizadas por Pereda et al., (1990); estas consisten de 96 pozos de 0.25 ml de capacidad y están fabricadas en poliestireno (Jayne, 1976).

Las placas de hemaglutinación se pueden esterilizar de varias formas: empleando una solución de ácido peracético al 2%, con luz ultravioleta, con gases como el óxido de etileno, o con hipoclorito de sodio.

Esta última es la opción más frecuente ya que es fácil y resulta ser de bajo costo. Para tal efecto las placas se lavan con agua corriente, seguida de un detergente suave como Extrán o Decon, enseguida se enjuagan perfectamente y se sumergen en una solución de hipoclorito de sodio por aproximadamente 30 minutos. Para retirar el exceso de hipoclorito, las placas se enjuagan levemente con agua destilada estéril y se procede a secarlas (Jayne, 1976).

Los micrométodos son la base del desarrollo de la tecnología de los métodos rápidos actualmente utilizados para la identificación de las BAL.

Algunos métodos rápidos que actualmente son empleados para la identificación bacteriana son los siguientes:

- API-20E

El sistema API consiste de una serie de 20 cúpulas plásticas fijadas a una superficie; estas cúpulas contienen los medios o sustratos deshidratados, para las diferentes pruebas.

Estos sustratos son rehidratados con agua destilada estéril agregándola gota a gota con una pipeta Pasteur (Cox et al., 1976).

- Enterotube

Es un sistema para usar en la identificación de Enterobacterias, definida como bastones Gram negativa, aerobios o anaerobios facultativos y oxidasa negativa. Consiste en tubos de plástico con ocho compartimentos para pruebas bioquímicas diferentes.

Para la inoculación de los enterotubos es necesario tocar con el asa una sola colonia, la cual se emplea para todas las pruebas (Cox et al., 1976).

- Minitex

El Minitex es un sistema relativamente nuevo. En este sistema se impregnan discos de papel con diferentes sustratos y se colocan en cajas de plástico con 0.05 ml del cultivo crecido en caldo, para incubar durante toda la noche.

La identificación se basa en reacciones coloridas en los discos después de la incubación.

En contraste con otros sistemas el Minitex permite seleccionar de entre 34 discos diferentes, sólo la prueba o pruebas que se requieren (Cox et al., 1976).

- R-B.

El nombre de R-B deriva de los nombres de sus coinventores William Rollender y Orville Becford.

Consiste de un sistema de cuatro tubos que permiten la determinación simultánea de 14 características bioquímicas diferentes de un cultivo.

En estudios realizados en 2200 cultivos de enterobacterias aisladas de diferentes orígenes se realizó una correcta identificación empleando este sistema (Cox et al., 1976).

### C) Métodos moleculares

Para la caracterización de las BAL a nivel de género y especie la mayoría de los laboratorios hacen uso de las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Pero el progreso en las técnicas moleculares ha dado lugar a cambios en la taxonomía de las BAL, estableciendo nuevas relaciones filogenéticas. Mas recientemente se usa el secuenciado de rRNA, la composición de bases del DNA, el tipo de peptidoglucano de la pared celular y la especificidad inmunológica de sus enzimas (Jay, 1992).

Para realizar una correcta clasificación de las BAL es necesario conjugar diferentes métodos de clasificación e incluir nuevas técnicas moleculares.

En la relación a técnicas moleculares dirigidas a la identificación de BAL cabe mencionar la hibridación DNA-DNA, análisis del perfil de plásmidos y análisis de perfiles restricción de DNA genómico ya sea mediante RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) o electroforesis de campos pulsantes (PFGE), secuenciación de los genes-rRNA en especial del 16s rRNA que permite el establecimiento de las relaciones filogenéticas entre especies, PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y métodos basados en el empleo de sondas ya sean específicas para hibridación *in situ* o universales (ribotificación) (Björkroth et al., 1996; Satokari et al., 2000).



Si bien es posible pensar que las BAL se han originado a partir de un antepasado común, dentro del grupo al que pertenecen existen elevados grados de divergencia así como elevados grados de parentesco.

La composición de bases del DNA (expresada en moles % de G+C) de las bacterias lácticas estudiadas oscila desde un mínimo de 35 en *Lb. salivarius* hasta un máximo de 53 en *Lb. fermentum*. Entre las bacterias homolácticas y las heterolácticas existe una considerable coincidencia parcial. En base a la composición de bases de su DNA, se situaron 15 especies de lactobacilos en tres grupos. El Grupo I contenía a aquellos lactobacilos cuyo contenido de G + C en moles % estaba comprendido entre 32,4 y 38,3 e incluye a *Lb. jugurti*, *Lb. helveticus*, *Lb. salivarius*, *Lb. bulgaricus* y a *Lb. bulgaricus*. El Grupo II contenía de 42,7 a 48,0 moles % de G + C e incluye a *Lb. bucheneri*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. viridescens* y a *Lb. plantarum*. El Grupo III contenía de 49,0 a 59,1 moles % de G + C e incluye a *Lc. lactis*, *Lb. leichmannii*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. fermentum* y *Lc. cellobiosus* (Jay, 1992).

Mientras que las especies del Grupo I son todas homofermentativas, los Grupos I y III contienen tipos homolácticos y tipos heterolácticos. La diversidad del parentesco de este grupo de bacterias también ha sido puesta de manifiesto tanto por hibridación del DNA como por estudios inmunológicos. Con respecto a la hibridación del DNA, se ha demostrado que las cepas de *Lb. jugurti* y de *Lb. helveticus* comparten una homología de su DNA comprendida entre el 85 y 100%; *Lb. leichmannii*, *Lb. delbrueckii*, *Lc. lactis*, *Lb. bulgaricus* comparten entre el 78 y el 100%; y *Lb. fermentum* y *Lb. cellobiosus* comparten del 77 al 100% de homología de su DNA. Estudios recientes demostraron que *Lb. bulgaricus* comparte una homología de su DNA del 86% con *Lb. jugurti*, del 4.8% con *Lb. helveticus* y no comparte ningún porcentaje de homología con *Lb. jugurti* (Jay, 1992).

El concepto de ribotificación fue establecido en la década de los 80 y es cada vez más empleado en la identificación de especies bacterianas lácticas (Björkroth et al., 1996;

Satokari et al., 2000). Combina la técnica de transferencia Southern de fragmentos de restricción de DNA con la hibridación mediante el uso de sondas obtenidas de RNA ribosómico de *Escherichia coli* permitiendo la discriminación tanto de especies como de cepas individuales de bacterias. El método implica la separación e identificación de los genes que codifican rRNA presentes en varias copias en el genoma bacteriano y que hace posible establecer las especies basándose en las diferencias en los fragmentos de restricción correspondientes a dichos genes rRNA (Björkroth et al., 1996).

Se ha informado de estudios de hibridación DNA-DNA en el género *Leuconostoc*. Utilizando cuatro preparados de DNA de referencia, en un total de 45 cepas que representaban a seis especies, se diferenciaron seis grupos de homología. En 19 cepas de *Ln. mesenteroides*, se determinaron tres grupos de hibridación diferentes (Jay, 1992).

En las bacterias lácticas no se ha demostrado la transformación natural es decir la transferencia de moléculas de ADN aislado a células naturalmente competentes, la transferencia de los vectores recombinados ha sido realizada lo más frecuentemente por transformación (ADN bacteriano) o transfección (ADN fágico) de los protoplastos de las células-hospedadoras (Leveau y Bouix, 2000).

Por esta técnica, las cepas no curadas son poco o nada transformables. Existen variaciones también dentro de una especie: en *Lc. lactis* el biovar *diacetylactis* no ha sido transformado; pocas cepas de la subespecie *cremoris* son transformables (Leveau y Bouix, 2000). Eventualmente, en las cepas poco o nada transformables la transferencia de genes puede realizarse por fusión de los protoplastos (Leveau y Bouix, 2000).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Para la identificación de bacterias ácido lácticas a nivel de género y especie se requiere de una batería amplia de pruebas bioquímicas y fisiológicas; permitiendo así el uso de ellas para cultivos iniciadores en alimentos.

El contar con un banco de cepas de bacterias ácido lácticas, aisladas de alimentos elaborados artesanalmente en la región, y debidamente caracterizadas inicialmente mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas, permitirá dar continuidad a los estudios de investigación en esta línea y potencialmente ser utilizadas como cultivos iniciadores.

## **4. OBJETIVOS**

### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar cepas de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos, mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas.

### 4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Recuperar cepas de bacterias ácido lácticas conservadas por congelación y liofilización.
- Identificar cepas de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de alimentos, mediante pruebas bioquímicas.
- Identificar cepas de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de alimentos, mediante micrométodos y métodos rápidos.
- Obtener un banco de cepas de BAL caracterizadas bioquímica y fisiológicamente.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 MATERIALES

#### 5.1.1. MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO

- Material de vidrio propio de un laboratorio de Microbiología.
- Equipo de laboratorio; incubadora, autoclave, baño María, centrífuga, micropipetas.
- Material desechable: cajas petri, galerías API 50 CH, cámaras de incubación.
- Programa informático de identificación por API 50 CH (BioMerieux, 2002).

#### 5.1.2. REACTIVOS

- Reactivos para la tinción de Gram:

Solución de cristal violeta

Solución de yodo de Gram al 1%

Solución de safranina al 0.25%

Solución de alcohol cetona 70:30

- Peróxido de hidrógeno al 30% para la prueba de catalasa.
- Clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%, para la prueba de oxidasa.
- Aceite de parafina para sellar microtubos de la galería.
- La composición de la galería API 50CH puede verse a continuación en la relación de ensayos (BioMerieux, 2002):

Filas de 0-9

Tubo	Ensayo	Componentes activos	Cantidad (mg/microtube)
0	-	Testigo	-
1	GLY	Glicerol	1.64
2	ERY	Eritrol	1.44
3	DARA	D-arabinosa	1.4
4	LARA	L-arabinosa	1.4
5	RIB	D-ribosa	1.4
6	DXYL	D-xilosa	1.4
7	LXYL	L-xilosa	1.4
8	ADO	D-adonitol	1.36
9	MDX	Metil-βD-xilopiranosida	1.28

Filas de 10-19

Tubo	Ensayo	Componentes activos	Cantidad (mg/microtube)
10	GAL	D-galactosa	1.4
11	GLU	D-glucosa	1.56
12	FRU	D-fructuosa	1.4
13	MNE	D-mannosa	1.4
14	SBE	L-sorbosa	1.4
15	RHA	L-rhamnosa	1.36
16	DUL	Dulcitol	1.36
17	INO	Inositol	1.4
18	MAN	D-manitol	1.36
19	SOR	D-sorbitol	1.36

Filas de 20-29

Tubo	Ensayo	Componentes activos	Cantidad (mg/microtube)
20	MDM	Metil- $\alpha$ D-manopiranosida	1.28
21	MDG	Metil- $\alpha$ D-glucopiranosida	1.28
22	NAG	N-acetilglucosamina	1.28
23	AMY	Amigdalina	1.08
24	ARB	Arbutina	1.08
25	ESC	Esculina citrato férrico	1.16 0.152
26	SAL	Salicina	1.04
27	CEL	D-celobiosa	1.32
28	MAL	D-maltosa	1.4
29	LAC	D-lactosa (origen bovino)	1.4

Filas de 30-39

Tubo	Ensayo	Componentes activo	Cantidad (mg/microtube)
30	MEL	D-melibiosa	1.32
31	SAC	D-sacarosa	1.32
32	TRE	D-trehalosa	1.32
33	INU	Inulina	1.28
34	MLZ	D-melezitosa	1.32
35	RAF	D-rafinosa	1.56
36	AMD	Almidón	1.28

37	GLYG	Glicógeno	1.28
38	XLT	Xilitol	1.4
39	GEN	Gentiobiosa	0.5

#### Filas de 40-49

Tubo	Ensayo	Componentes activo	Cantidad (mg/microtube)
40	TUR	D-turanosa	1.32
41	LYX	D-lixosa	1.4
42	TAG	D-tagatosa	1.4
43	DFUC	D-fucosa	1.28
44	LFUC	L-fucosa	1.28
45	DARL	D-arabitol	1.4
46	LARL	L-arabitol	1.4
47	GNT	Gluconato potásico	1.84
48	2 Kg	2-Cetogluconato potásico	2.12
49	5 kg	5-Cetogluconato potásico	1.8

Los medios de cultivo utilizados fueron agar y caldo de Man Rogosa y Sharpe, agar soya triptica y medio 50 CHL; sus ingredientes se muestran en anexo.

#### 5.1.3. CEPAS

##### CEPAS BAL:

Aisladas a partir de alimentos fermentados (quesos tipo panela, Oaxaca, etc.); mediante un trabajo previo, realizado por Clavel (2006) de nuestro equipo de trabajo.

#### 5.2. MÉTODOS

##### 5.2.1. TINCIÓN DE GRAM

Depositar sobre un portaobjetos limpio una gota de agua destilada, posteriormente tomar una parte de una colonia de la muestra a analizar con la ayuda de un asa de siembra, mezclar con la gota de agua, dejar secar y fijar a la flama. Cubrir con la solución de cristal violeta durante 1 min, desechar el colorante y lavar ligeramente al chorro del agua, posteriormente aplicar la solución de yodo durante 1 min, desechar y lavar al chorro del

agua. Con el portaobjetos inclinado, agregar gota a gota la solución de alcohol-cetona y lavar al chorro del agua. Por último cubrir con safranina durante 10 a 20 seg, desechar el colorante y lavar al chorro del agua (Macfarland, 1990).

#### 5.2.2. PRUEBA DE CATALASA

Tomar con un asa de inoculación el centro de una colonia obtenida de un cultivo puro de 10 a 24 h y colocar sobre un portaobjetos, agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre el cultivo y observar la inmediata formación de burbujas (liberación de gas) tomando lo anterior como prueba positiva. Se incluye un testigo negativo (Macfarland, 1990).

#### 5.2.3. PRUEBA DE OXIDASA

Adicionar sobre el crecimiento de una colonia de un cultivo del microorganismo unas gotas del reactivo para oxidasa (clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%) y observar si la colonia tiende a cambiar de color (rosa-rojo-negro); la presencia de estos colores señala la positividad de la prueba (Macfarland, 1990).

### 5.3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 5.3.1. AISLAMIENTO DE CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las cepas de BAL se aislaron a partir de 33 muestras de alimentos lácteos, entre los que se encontraban: quesos tipo panela, Oaxaca, canasto, manchego, ranchero, botanero, doble crema, cotija, queso molido, requesón y leche los cuales fueron adquiridos de diversos lugares del estado de Hidalgo, principalmente.

Las cepas aisladas se conservaron en viales conteniendo caldo MRS y 20% de glicerol en congelación a - 20°C, así como liofilizadas utilizando glutamato de sodio como soporte (Clavel, 2006).



### 5.3.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE BAL POR MEDIO DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Para realizar la identificación bioquímica de las cepas de BAL, se utilizó el sistema API 50 CHL, el cual permite la identificación de cepas del género *Lactobacillus* y géneros relacionados de BAL. El sistema API 50 CHL consta de una serie de galerías que contienen los sustratos fermentables de 49 carbohidratos.

El llenado de los microtubos con el medio 50 CHL, adición del inóculo, incubación, lectura e interpretación de las pruebas se realizó de acuerdo con la metodología descrita previamente en una ficha técnica incluida en el sistema API 50 CHL y que se describe a continuación (figura 6) (BioMerieux, 2002):

#### 1. Selección de las colonias

- Se utilizaron cepas congeladas, por lo que se realizaron 2 subcultivos en caldo MRS.
- Se cultivó la cepa sobre medio MRS con agar 24 h a 30° C. Se verificó su pertenencia a las BAL.

#### 2. Preparación de la galería: Se consultó la ficha técnica API 50 CH (BioMerieux, 2002).

##### Preparación del inóculo

- Se preparó el API 50 CHL Médium como se indica en anexos de este trabajo.
- Se tomó la suspensión del subcultivo centrifugando la muestra a 3000 rpm por 15 minutos.
- Se desechó el sobrenadante.
- Se adicionaron 2 ml de agua destilada estéril a la muestra y se homogeneizó por agitación.
- Se transfirieron 200 µl de la muestra homogeneizada a 10 ml de medio 50 CHL Médium.

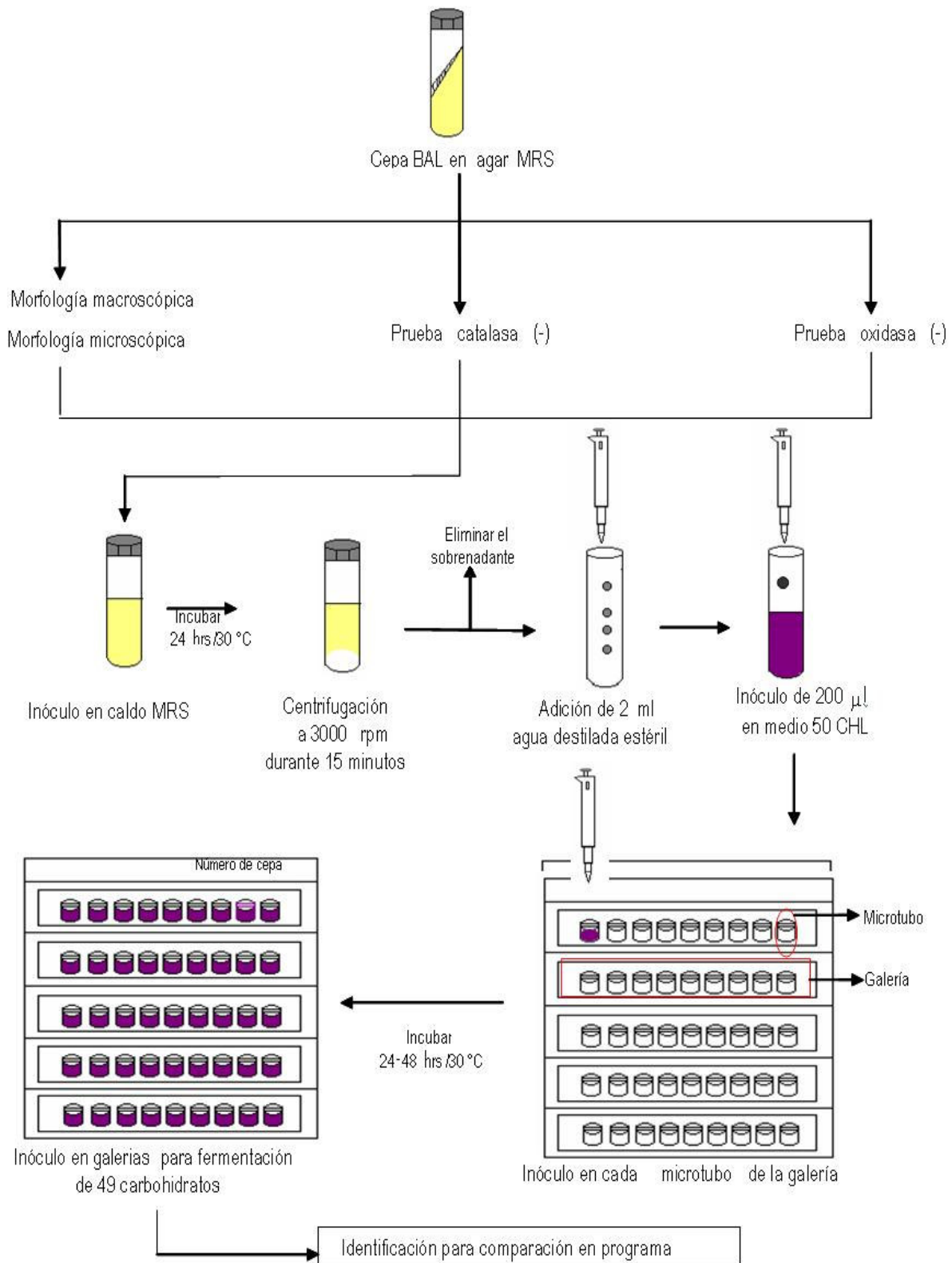


Figura 6. Esquema general de pruebas morfológicas e identificación bioquímica por el sistema API 50CHL (BioMerieux, 2002).

- Se homogeneizó por agitación.  
Esta suspensión se utilizó de inmediato.

### Inoculación de la galería

- Se adicionó el medio API 50 CHL Médium a los microtubos y se recubrieron las celdas con aceite de parafina estéril.
- Las galerías se incubaron a 30°C en anaerobiosis durante 48 h.

### Lectura de la galería

Se consultó la ficha técnica API 50 CHL (BioMerieux, 2002).

- Se leyeron los microtubos después de 24 y 48 h de incubación a 30°C.
- En cada microtubo se investigó la acidificación producida por la fermentación del carbohidrato, que se traduce en un cambio de color del indicador púrpura de Bromocresol que es púrpura en condiciones neutras o alcalinas pasando a color amarillo en condiciones ácidas por la fermentación. En el ensayo de esculina (microtubo no. 25) se observa un viraje de color púrpura a negro.
- Se anotaron los resultados en la hoja contenida en el sistema (figura 7).

### Interpretación

- El perfil bioquímico así obtenido pudo ser identificado a partir de la base de datos (V5.0), con la ayuda del programa informático de identificación (figura 7).

The image shows the API 50 CH interpretation sheet. At the top left is the logo 'api 50 CH' and 'CE 12188'. To the right is a 'REF.' field. Below the logo is a grid of 49 microtubes, numbered 0 to 49. Below the grid are several fields for recording test results: 'Inoc./Inok./Υλικό ενοφθαλμισμού', 'Incub./Inkub./Θερμοκρασία επώασης', 'Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy', and 'Ident. / Ταυτοποίηση'. The BioMerieux logo is on the right side.

Figura 7. Hoja de interpretación de datos API 50 CH.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1. AISLAMIENTO DE CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

Como ya se mencionó las cepas de BAL fueron aisladas mediante un trabajo previo, las cuales se conservan tanto en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  en viales conteniendo caldo MRS y glicerol al 20%, como liofilizadas utilizando glutamato de sodio como soporte (Clavel, 2006).

A partir de los 33 productos lácteos descritos en la tabla 1, se aislaron y purificaron 332 cepas, de las cuales 280 correspondieron a cepas de BAL (Clavel, 2006). A cada una de estas cepas se les realizaron pruebas de identificación mediante morfología microscópica y macroscópica, pruebas bioquímicas presuntivas y por micrométodos utilizando el sistema API 50 CHL, cuyos resultados se muestran a continuación:

### **6.2. MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS PRESUNTIVAS.**

En las placas de agar MRS, las cepas BAL formaron colonias cuyo tamaño fue de 1 a 2 mm, de color blanco cremoso, forma redonda, puntiformes, bordes enteros, superficie convexa, consistencia butirosa y consistencia húmeda; lo que corresponde a sus características ya reportadas (Fernández, 1985).

Con respecto a la morfología microscópica, de las 280 cepas de BAL aisladas, morfológicamente se identificaron 182 como bacilos cortos Gram positivos, 68 como cocobacilos Gram positivos y 30 cocos Gram positivos, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 1. Cepas de BAL aisladas de los productos lácteos estudiados.

Producto lácteo	Cantidad	Origen	No. de cepas de BAL
Queso Oaxaca	14	- Mercado de Tulancingo - Mercado de Actopan - Tienda de Tulancingo - Mercado de Tulancingo - Mercado de Actopan - Mercado de Tulancingo - Tienda en Actopan - Mercado de Actopan - Tienda en Singuilucan - Mercado en Tezontepec - Tienda en Tezontepec - Jaltepec - Mercado de Tulancingo - Acatlán	125
Queso Panela	5	- Mercado de Tulancingo - San Miguel Regla - Huehutla - Mercado de Actopan - Mercado de Singuilucan	43
Queso Canasto	4	- Mercado de Pachuca - Acatlán - Ciudad de México - Central de Abastos de Pachuca	29
Queso Manchego	2	- Pachuca - Jaltepec	16
Queso Doble Crema	1	- Mercado de Pachuca	11
Leche	1	- Mercado de Atotonilco	10
Queso Blanco	1	- Central de abastos de Pachuca	10
Requesón	1	- Mercado de Tulancingo	9
Queso Molido	1	- Central de Abastos de Pachuca	8
Queso Ranchero	1	- Pachuca	7
Queso Botanero	1	- Pachuca	7
Queso Cotija	1	- Tehuacan Puebla	5
	33		280

Tabla 2. Morfología microscópica y pruebas bioquímicas presuntivas de las 280 cepas aisladas.

Morfología	Código de cepas	Prueba Catalasa	Prueba Oxidasa	Porcentaje (Total)
Bacilos cortos Gram Positivos	0101, 0102, 0103, 0104, 0105, 0106, 0107, 0108, 0109, 0202, 0203, 0204, 0205, 0206, 0207, 0208, 0209, 0210, 0401, 0402, 0403, 0405, 0406, 0409, 0410, 0411, 0412, 0501, 0502, 0503, 0504, 0505, 0506, 0508, 0509, 0602, 0603, 0604, 0605, 0606, 0607, 0608, 0609, 0610, 0701, 0702, 0703, 0707, 0803, 0804, 0805, 0806, 0808, 0905, 0906, 0909, 0910, 1001, 1004, 1005, 1008, 1102, 1103, 1104, 1105, 1108, 1109, 1202, 1205, 1206, 1207, 1209, 1303, 1308, 1309, 1310, 1404, 1406, 1407, 1409, 1501, 1503, 1506, 1601, 1602, 1604, 1605, 1608, 1609, 1701, 1702, 1703, 1705, 1706, 1707, 1708, 1709, 1710, 1801, 1807, 1810, 1901, 1903, 1904, 1905, 1906, 1907, 1908, 1909, 1910, 2001, 2002, 2005, 2008, 2010, 2102, 2104, 2105, 2106, 2109, 2110, 2203, 2204, 2206, 2207, 2208, 2209, 2210, 2301, 2302, 2306, 2307, 2309, 2310, 2401, 2403, 2404, 2409, 2410, 2503, 2504, 2505, 2507, 2508, 2509, 2510, 2601, 2602, 2603, 2604, 2606, 2607, 2608, 2610, 2701, 2702, 2703, 2704, 2706, 2708, 2709, 2710, 2802, 2803, 2804, 2806, 2808, 2810, 3103, 3104, 3107, 3108, 3202, 3208, 3210, 3301, 3302, 3305, 0601, 1603, 1606, 3201.	Negativa	Negativa	65 (182)
Cocobacilos Gram Positivos	0110, 0408, 0704, 0709, 0801, 0810, 0904, 1006, 1007, 1009, 1010, 1106, 1107, 1110, 1301, 1302, 1304, 1305, 1306, 1307, 1402, 1405, 1408, 1502, 1510, 1610, 1704, 1802, 1803, 1805, 1806, 1808, 1809, 2003, 2202, 2205, 2308, 2406, 2506, 2605, 2408, 2501, 2502, 2609, 2801, 2809, 2901, 2902, 2904, 2905, 2907, 3001, 3002, 3005, 3007, 3008, 3010, 3106, 3109, 3110, 3203, 3207, 3303, 3304, 3307, 3308, 3309, 3310.	Negativa	Negativa	24 (68)
Cocos Gram Positivos	1804, 2705, 2910, 0301, 0302, 0407, 0507, 0510, 0903, 0907, 1504, 1507, 1508, 1509, 1607, 2007, 2009, 2101, 2103, 2405, 2903, 2906, 2908, 2909, 3006, 3009, 3105, 3205, 3206, 3306.	Negativa	Negativa	11 (30)

Las bacterias contenidas en los cultivos iniciadores utilizados en la fermentación de alimentos suelen ser Gram positivas ya que no es posible la aplicación de bacterias Gram negativas por su sensibilidad a los métodos comunes de preparación de los cultivos iniciadores (Ralph, 1998). En los alimentos a partir de los cuales se aislaron las cepas de BAL, no se utilizaron cultivos iniciadores, sin embargo, la fermentación de los mismos se lleva a cabo de manera natural por bacterias lácticas presentes en las materias primas, las cuales son Gram positivas.

Se consideraron como BAL aquellas cepas con resultado de catalasa y oxidasa negativas debido a que en la primera prueba no hubo producción de gas al adicionar  $H_2O_2$  y en la segunda no hubo viraje de color al agregar el reactivo clorhidrato de tetrametil p-fenil endiamina. De ésta manera, se identificaron presuntivamente a las BAL como cocos o bacilos Gram positivos, catalasa y oxidasa negativos (Sharpe et al., 1986).

### 6.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE BAL POR MEDIO DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Por ser limitado el recurso económico para este trabajo de investigación, el sistema miniaturizado API 50 CHL se aplicó a 280 de las 293 cepas de BAL aisladas e identificadas, pudiéndose realizar el estudio de fermentación de los 49 azúcares contenidos en la galería. Los resultados obtenidos constituyeron el perfil bioquímico y permitieron la identificación del microorganismo con la ayuda de un programa informático Apilab plus (BioMerieux) (BioMerieux, 2002). Los resultados de identificación se muestran en las tablas que se encuentran en anexo; es de notar que la identificación sólo llegó a nivel de especie y en algunos casos a nivel de subespecie, por lo que sería conveniente que en todos los casos la identificación fuera a nivel de subespecie.

En la figura 8 representa la distribución de cepas por género. Los géneros identificados fueron *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Carnobacterium*. Comparando estos resultados con lo descrito por Jay (1992) quien menciona que los géneros tradicionales de las BAL son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*,

*Pediococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterim*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Vagococcus*; es de notar que los últimos tres géneros no se identificaron bioquímicamente en los productos lácteos del presente trabajo, una razón posible en el caso de los quesos puede ser porque fueron elaborados artesanalmente, es decir, su fermentación de las BAL es espontánea y no por la adición de fermentos (Medina, 1990); otra razón puede deberse a que los géneros no identificados no son flora microbiana propia de los quesos y leche.

La velocidad de desarrollo de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Carnobacterium* depende especialmente de la temperatura de conservación y de la humedad de los quesos estudiados en este trabajo de investigación; ya que el agua es el elemento imprescindible para el desarrollo de estos, y como se trata de quesos artesanales es posible que durante el proceso de elaboración las operaciones no se condujeron para obtener una humedad en el producto siempre igual y constante en cada tipo, lo que permitió sólo el desarrollo de 5 géneros (Francis y Gaona, 2002).

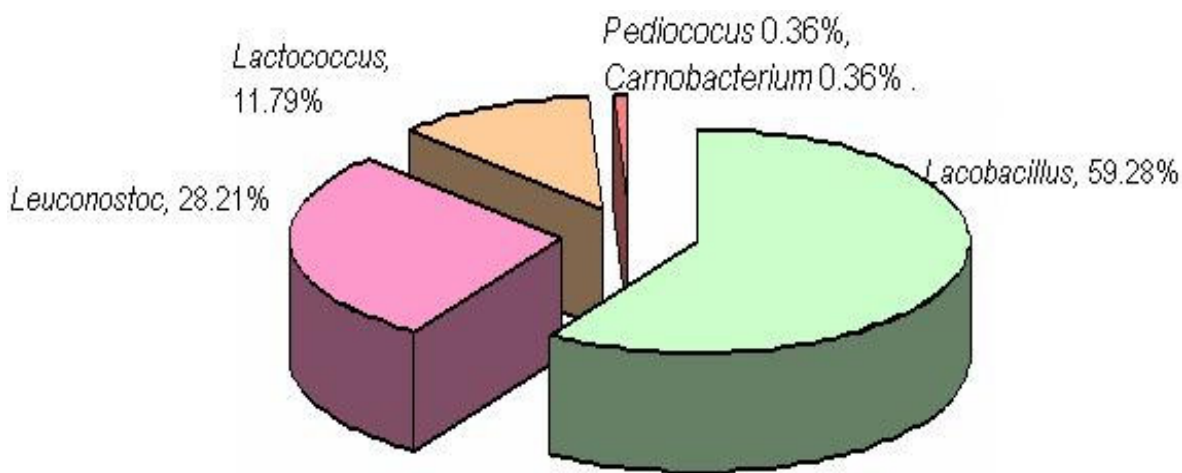


Figura 8. Distribución de cepas BAL en estudio por género.



Pardo et al., (1988) utilizaron el sistema API 50 CHL para la identificación de cepas de BAL aisladas a partir de vino, los resultados mostraron que el sistema no era apropiado para la identificación de la especie *Leuconostoc oenos*; sin embargo para identificar a la especie *Ln. mesenteroides subesp. mesenteroides* (28.21%) en quesos artesanales si es apropiado el sistema, de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación (figura 9).

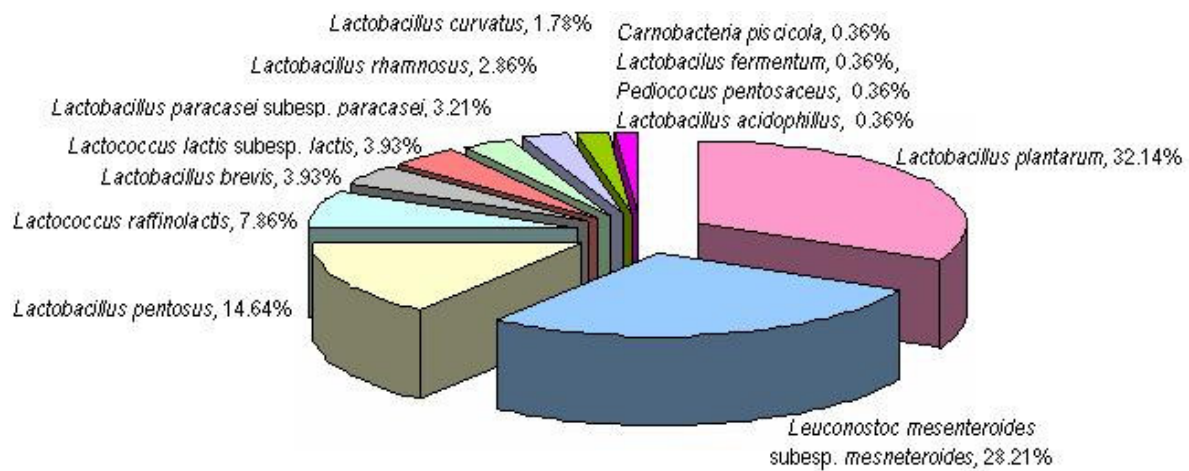


Figura 9. Distribución de cepas identificadas.  
N = 280

Torres-Llanez (2005) reportó la utilización del sistema BBL CRYSTAL para caracterizar la flora natural del queso fresco artesanal mexicano, reportando que *Lactobacillus* (32.35%) es el género que se identificó en mayor porcentaje con las especies *Lactobacillus casei* (20.59%), *Lb. jensenii* (5.88%) y *Lb. johnsonii* (5.88%). A diferencia de los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo por el sistema API 50 CHL, el mayor porcentaje corresponde a la especie *Lb. plantarum* (32.14%). Es de notar que los resultados difieren en cuanto a la especie pero no en cuanto al género (figura 10); posiblemente se debe a que son diferentes las condiciones de temperatura de conservación, de la humedad y del pH de los quesos que analizamos en éste trabajo de investigación (Francis y Gaona, 2002).

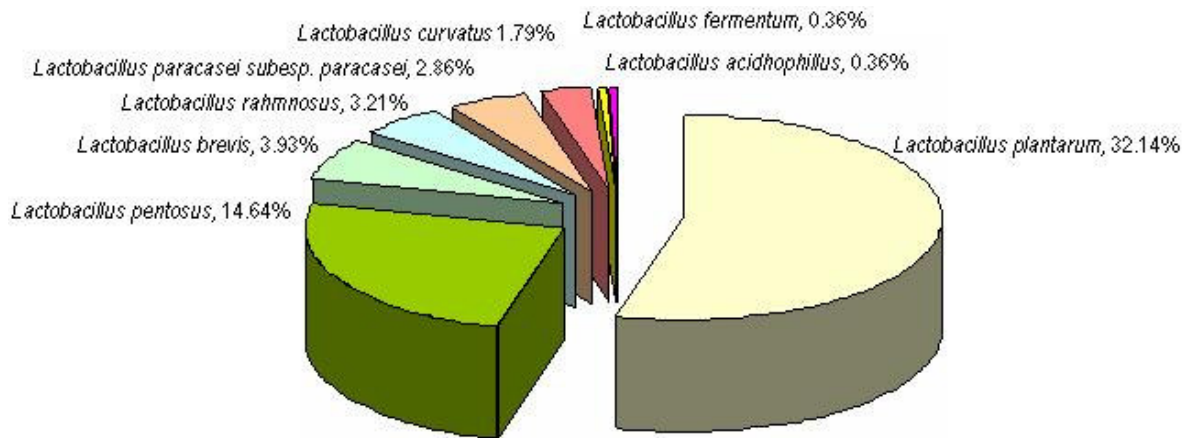


Figura 10. Porcentaje de cepas BAL correspondientes al género *Lactobacillus* identificadas bioquímicamente mediante el sistema API 50 CHL.

Para poder llegar a una identificación fina de las cepas de BAL es importante conocer el perfil bioquímico que presentaron cada una de las 280 cepas de BAL, en la tabla 3 se muestra el porcentaje de carbohidratos que fueron fermentados por cada una de las 13 especies diferentes.

El 100% de cepas de *Lb. acidophilus*, fermentaron los mismos carbohidratos que muestra el manual de Bergey's (Snealt et al., 1986). De acuerdo a estos carbohidratos fermentados se piensa que la especie *Lb. acidophilus* de el género *Lactobacillus* es homofermentativo obligatorio, por lo que sigue la vía Embden-Meyerhof-Parnas produciendo un 90-97% de ácido láctico al fermentar al 100% de cepas el carbohidrato lactosa (Leveau y Bouix, 2000).

Tabla 3. Perfil bioquímico para las cepas de BAL identificadas mediante el sistema API 50 CHL.

Género y especie	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
Cantidad de cepas	90	79	41	22	11	11	9
DARA	-	-	-	-	(8)	-	-
LARA	51 (9)	58 (11)	78 (10)	23 (5)	64 (18)	9 (9)	(11)
RIB	94 (3)	59 (20)	-	95	+	82 (18)	+
DXYL	40 (20)	59 (24)	90 (7)	82 (5)	55 (27)	55 (18)	(11)
GAL	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+
FRU	+	+	+	+	+	+	+
MNE	+	+	+	+	+	+	+
SBE	9 (2)	(4)	(10)	(9)	(9)	-	57
RHA	3 (1)	(3)	(2)	-	(9)	-	(11)
DUL	3	-	(2)	-9	-	-	(11)
INO	-	-	-	-	-	-	-
MAN	92 (5)	41 (10)	95 (5)	86 (5)	82	55 (9)	+
SOR	69 (3)	(3)	85 (12)	5 (9)	-	9 (9)	78 (11)
MDM	37 (9)	-	10 (12)	-	-	-	-
MDG	83 (4)	92 (8)	78 (12)	59 (23)	+	(9)	(11)
NAG	96 (4)	90 (10)	85 (15)	95 (5)	+	+	89 (11)
AMY	92 (4)	38 (23)	93 (7)	59 (14)	+	27 (9)	56 (22)
ARB	98 (2)	59 (19)	95 (5)	82 (9)	91	64 (18)	56 (44)
ESC	94 (1)	91 (1)	93	95 (5)	82	82	89
SAL	94 (6)	61 (22)	-	95 (5)	91 (9)	73 (27)	67 (22)
CEL	99	70 (3)	+	+	+	82 (9)	78 (11)
MAL	98 (2)	+	+	+	+	+	78 (22)
LAC	+	+	+	+	+	+	+
MEL	97 (3)	99 (1)	+	+	+	45 (9)	22 (11)
SAC	+	20	+	+	+	64 (9)	89 (11)
TRE	+	20	+	+	+	+	+
INU	-	-	-	(5)	-	9	22
MLZ	71 (3)	1 (6)	61 (12)	14 (18)	9	(9)	78
RAF	77 (13)	10 (3)	83 (15)	77 (14)	64 (9)	9 (18)	22
AMD	2 (46)	(39)	2 (54)	27 (59)	(55)	(45)	(22)
GLYG	1 (2)	(1)	-	-	-	-	-
GEN	86 (12)	49 (32)	73 (24)	50 (36)	73 (27)	45 (18)	44 (44)
TUR	96 (1)	90 (1)	93 (5)	95 (5)	+	18 (82)	78
LYX	-	-	-	5	-	-	(11)
TAG	60	10 (16)	34 (10)	32 (9)	91 (9)	18 (9)	78
LFUC	-6	(4)	(7)	(9)	(9)	-	(11)
DARL	83 (13)	(9)	2 (15)	(5)	-	-	-
GNT	(77)	(49)	(78)	(32)	(91)	(27)	78 (22)
2 CGNT	(7)	(22)	(10)	(14)	(18)	-	(11)
5 CGNT	-	(6)	-	(9)	-	-	-

- = No fermento

(+)= Indica el 100% de fermentación débil

El número significa % de fermentación de ese carbohidrato y el número entre paréntesis significa % de fermentación débil.

Tabla 3 (continua). Perfil bioquímico para las cepas de BAL identificadas mediante el sistema API 50 CHL.

Género y especie	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Camobacteria piscicola</i>
Cantidad de cepas	8	5	1	1	1	1
DARA	-	-	-	-	-	-
LARA	88	-	-	-	+	-
RIB	+	80 (20)	-	+	+	+
DXYL	(88)	40	+	+	+	(+)
GAL	75	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+
FRU	+	+	+	+	+	+
MNE	88 (13)	+	+	+	+	+
SBE	+	-	-	-	-	-
RHA	63 (25)	-	-	-	-	-
DUL	+	-	-	-	-	-
INO	+	-	-	-	-	-
MAN	+	-	-	-	-	+
SOR	+	40	-	-	-	(+)
MDM	13 (88)	20	-	-	-	-
MDG	+	80	-	-	-	+
NAG	25 (63)	80	+	(+)	(+)	+
AMY	+	-	-	-	+	+
ARB	+	40 (20)	-	(+)	+	+
ESC	(75)	80	+	-	+	
SAL	(88)	60 (20)	-	-	+	+
CEL	38 (63)	60 (40)	-	(+)	+	+
MAL	(75)	+	+	+	+	+
LAC	25 (63)	+	+	+	+	+
MEL	+	-	+	+	+	(+)
SAC	+	+	+	+	+	+
TRE	+	+	+	+	+	+
INU	13 (75)	-	-	+	-	-
MLZ	75	(20)	-	-	-	(+)
RAF	(88)	-	11	+	+	-
AMD	+	(20)	-	-	-	-
GLYG	-	-	-	-	-	-
GEN	+	-	-	(+)	+	+
TUR	+	+	-	(+)	(+)	+
LYX	+	-	-	-	-	-
TAG	+	+	-	-	-	-
LFUC	+	-	-	-	-	-
DARL	-	-	-	-	-	-
GNT	(25)	(40)	-	-	-	-
2 CGNT	-	-	-	-	-	-
5 CGNT	-	-	-	-	-	-

= No fermento

(+)= Indica el 100% de fermentación débil

El número significa % de fermentación de ese carbohidrato y el número entre paréntesis significa % de fermentación débil.

En la tabla 3 se muestra que *Lb. plantarum* fermentó a ciertos carbohidratos, que al compararlo con el manual de Bergey's (Sneath et al., 1986) se observa que los resultados difieren en el caso del carbohidrato gluconato ya que en el manual muestra que éste fermenta el carbohidrato gluconato y los resultados obtenidos por el sistema API 50 CHL da un porcentaje de 76.66% de cepas de *Lb. plantarum* de fermentación débil; con lo anterior podemos demostrar que depende del perfil bioquímico para poder agrupar a las cepas. De acuerdo a estos datos obtenidos se piensa que la especie del género *Lactobacillus* es heterofermentativa facultativa; ya que si se observa ésta especie utiliza pentosas (arabinosa, ribosa, xilosa) penetrando estos compuestos gracias a permeasas específicas y a continuación son convertidos en D-xilulosa-5-fosfato y finalmente en lactato y acetato. Las enzimas de la vía de las pentosas son inducidas por su sustrato específico.

Un estudio realizado por Sánchez et al., (2003) sobre la caracterización bioquímica de BAL por fermentación espontánea de "almagro" berenjenas; utilizaron los patrones de fermentación y otras características físicas y morfológicas para la caracterización; los resultados mostraron que de 149 cepas de BAL 148 pertenecieron al género *Lactobacillus*, de las cuales se identificó 6 especies de *Lactobacillus*: *Lb. plantarum* biotype 1 (54.4%), *Lb. brevis* biotype 2 (19.5%), *Lb. fermentum* (9.40%), *Lb. brevis* biotype 3 (5.4%), *Lb. pentosus* (4.7%) y 9 cepas pertenecieron al grupo de *Lb. casei* spp. *casei* (6%). Los resultados mostraron que la fermentación fue iniciada por *Lactobacillus brevis* biotype 2 y *Lb. fermentum* y que durante la fermentación *Lb. plantarum* siempre predominó; si se observa en el presente trabajo se obtuvieron 8 especies del género *Lactobacillus* (Tabla 3) de las cuales se puede pensar que *Lb. plantarum* predominó en el proceso de fermentación durante la elaboración de los quesos; ya que fue el género que se encontró con mayor abundancia en los quesos y en la leche. Por otro lado Kunene et al., (2000) realizaron la caracterización de BAL en alimentos fermentados por análisis de proteínas solubles, los resultados mostraron que de 180 cepas de BAL 58 pertenecieron al género *Lb. plantarum* y 47 a *Ln. mesenteroides* cepas que fueron dominantes durante la fermentación, al igual que este

trabajo de investigación se puede pensar que estos dos géneros predominaron durante la fermentación de los quesos y la leche.

En el caso de *Pc. pentosaceus* y *Lc. raffinolactis* son capaces de fermentar pentosas (arabinosa, ribosa y xilosa), esto es debido a que muchas cepas homolácticas de *Pediococcus* y *Lactococcus* pueden fermentar las pentosas: poseen en efecto una fosfocetolasa inducible por las pentosas implicadas y la fermentación de estos azúcares es entonces heteroláctica con producción de lactato y acetato en cantidad equimolar.

En la tabla 3 se muestra que la especie *Ln. mesenteroides subesp. mesenteroides* es capaz de fermentar pentosas, por lo que se puede determinar que es heteroláctica comparando con la referencia de Jay (1992) dice textualmente que todas las especies de *Leuconostoc* son heterolácticas.

Según Santos et al. (2005), un estudio que realizaron sobre caracterización bioquímica de bacterias lácticas en morcilla de Burgos España la especie *Ln. mesenteroides* fermenta galactosa, maltosa, melobiosa y trealosa a diferencia de nuestros resultados de identificación donde solo un 20% de las cepas fermentaron la trealosa. Esta diferencia puede deberse al producto de origen de las cepas.

Es importante mencionar que el género *Leuconostoc* se caracteriza por una fermentación gaseosa de los azúcares, con producción de CO<sub>2</sub> y acetoína por lo que esta especie que suele desarrollarse en productos envasados a vacío, puede ser responsable del deterioro de dichos alimentos.

Las diferentes especies de BAL identificadas fueron variables dependiendo de cada tipo de queso, lo cual, posiblemente se debió a que los quesos artesanales tenían distinta cantidad de agua retenida, la cual desempeña un papel importante; ya que es esencial para el desarrollo de estas especies de BAL las cuales determinan la velocidad de las

fermentaciones y de la maduración, el tiempo de conserva, la textura del queso y el rendimiento del proceso de elaboración y además estas BAL confieren diversas modificaciones y dan lugar a las distintas variedades de queso (Amiot et al., 1991).

A excepción de *Lc. raffinolactis* el resto de cepas fermentaron la lactosa, azúcar mayoritario en los quesos y productos lácteos de forma que ejerce cierta selección sobre la flora presente, favoreciéndose el desarrollo de aquellos microorganismos que pueden utilizar dicho azúcar.

Cabe mencionar que dentro de diferentes grupos y géneros bacterianos, el grupo de bacterias lácticas representa uno de los que requieren un mayor número de pruebas bioquímicas y fisiológicas para su identificación; debido a esta complejidad metabólica de las BAL, se ha sugerido el empleo de otros métodos como los moleculares para la identificación de las BAL.

Para la identificación rutinaria de las BAL la mayor parte de laboratorios emplean métodos fenotípicos clásicos, ya sea por la técnica tradicional o métodos miniaturizados rápidos como el sistema API 50 CHL, ya que es accesible económicamente y fácil de realizar, empleo de menor cantidad de material, reactivos y tiempo. Sin embargo, para alcanzar una correcta clasificación de las BAL es necesario conjugar diferentes métodos de clasificación e incluir nuevas técnicas moleculares. En relación a técnicas moleculares dirigidas a la identificación de BAL, el empleo de sondas ya sean específicas para hibridación *in situ* o universales (ribotipificación) ha demostrado ser una buena herramienta en la identificación de BAL (Nissen et al., 1994).

#### 6.4 DISTRIBUCIÓN DE CEPAS POR TIPO DE QUESO

Las BAL tienen numerosos “habitats”, aparte de los productos lácteos, se encuentran en abundancia en los productos vegetales: ensilados, granos jugos y mostos en fermentación (Alais, 1985); en el presente trabajo se muestran los resultados que se

identificaron bioquímicamente en productos lácteos: cabe mencionar que el tipo de género y especie varia en cuanto a productos lácteos y por consiguiente en productos vegetales ya que cambian las condiciones de nutrientes, pH, temperatura entre otras.

El crecimiento de las BAL en la leche y su actividad en los quesos tiene consecuencias beneficiosas para el alimento: la fermentación de la lactosa hasta ácido láctico acidifica el medio y juntamente con la proteólisis de las caseínas provoca la coagulación de la leche y la sinéresis de la cuajada. Algunas cepas de *Lc. lactis* o ciertos *Leuconostoc* son fuente de diacetilo que es un componente principal de aroma de la mantequilla y de otros productos lácteos (Leveau y Bouix, 2000); En el presente trabajo se estudiaron muestras de quesos frescos, o con poca maduración, pero que no habían sido adicionadas de cultivos iniciadores o starter, sino cuya flora láctica se desarrolló de forma natural.

A continuación, la figura 11 expresa el porcentaje de 280 cepas de BAL que se aislaron a partir de los diferentes tipos de alimentos lácteos. A partir de queso Oaxaca, queso panela y queso canasto, se aislaron el mayor número de cepas 125, 43 y 29 respectivamente, mientras que minoritariamente se aislaron cepas de BAL de las muestras: queso manchego que representa 16 cepas, queso doble crema 11 cepas al igual que queso blanco 10 cepas y leche 10 cepas finalmente requesón, queso molido, queso ranchero, queso botanero y queso cotija que representan 9, 8, 7, 7 y 5 cepas respectivamente.



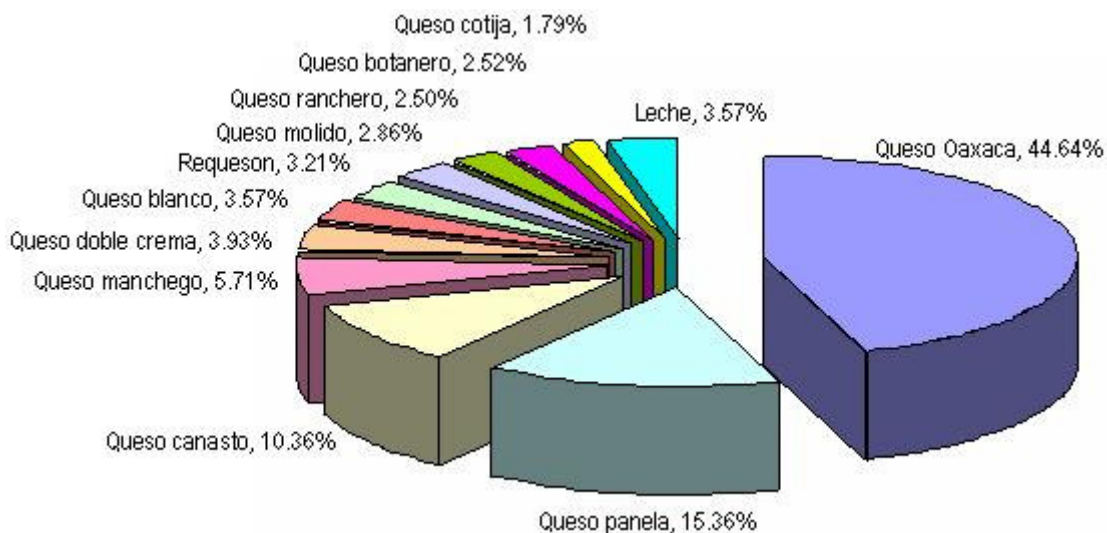


Figura 11. Porcentaje de cepas de BAL aisladas a partir de diferentes tipos de alimentos lácteos.

Con relación a las cepas aisladas por tipo de producto e identificadas bioquímicamente, los resultados se muestran en las figuras 12 a 23 y en las tablas 4 a 15.

De acuerdo a los resultados que se muestran en la tabla 4 y figura 12 a partir del queso Oaxaca se identificaron en mayor número de cepas las especies *Lb. plantarum* (29.60%) y *Ln. mesenteroides subesp. mesenteroides* (20.00%); posiblemente su desarrollo fue favorecido debido a las condiciones de conservación, además se trata de un queso fresco elaborado artesanalmente el cuál después de su elaboración debe ser consumido en estado fresco (Medina, 1990).

Por otro lado el queso Oaxaca es el único producto que se pudo identificar el género *Pediococcus*; era de esperarse que se encuentre en menor abundancia puesto que en ocasiones se encuentra en leche cruda y además lleva un proceso de elaboración diferente que el queso panela, manchego, entre otros. (Medina, 1990).

Tabla 4. Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso Oaxaca analizadas.

Producto	Origen	No. de cepas	Código de cepas	Género y especie	No. de cepas	Porcentaje
Queso Oaxaca	- Mercado de Tulancingo.	125	0205, 0206, 0208, 0602, 0606, 0608, 0609, 610, 1105, 1108, 1404, 1406, 1407, 1504, 1508, 1602, 1603, 1605, 1607, 1609, 1707, 1709, 1801, 1803, 1808, 2504, 2603, 2802, 2804, 2806, 2808, 3103, 3104, 3109, 3201, 3208, 3210.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	37	29.60
	- Mercado de Actopan.		0202, 0603, 0604, 0605, 1106, 1402, 1601, 1610, 1805, 2301, 2505, 2508, 2509, 2601, 2604, 2608, 2609, 2801, 2803, 3105, 3106, 3110, 3202, 3203, 3206, 3207.	<i>Leuconostoc mesenteroides subesp. mesenteroides</i>	25	20.00
	- Tienda de Tulancingo.		0203, 0209, 0210, 0607, 1103, 1107, 1110, 1405, 1408, 1501, 1509, 1604, 1606, 1608, 1809, 1810, 2605, 2610, 2809, 3107.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	21	16.80
	- Acatlán.		0207, 0601, 1109, 1409, 1701, 1704, 1710, 1807, 2306, 2307, 2310, 2501, 2503, 2506, 2507, 2606.	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	16	12.80
	- Jaltepec.		1102, 1510, 1708, 1802, 1806, 2302, 2810.	<i>Lactococcus lactis subesp. lactis</i>	7	5.60
	- Tienda de Actopan.		1104, 1503, 1506, 1507, 2309, 1703.	<i>Lactobacillus paracasei subesp. paracasei</i>	6	4.80
	- Tienda de Singuilucan.		0204, 1705, 2308, 2510, 2607, 3108.	<i>Lactobacillus brevis</i>	6	4.80
	- Mercado de Tezontepec.		1702, 1706, 2502, 2602, 3205.	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	5	4.00
	- Tienda de Tezontepec		1502.	<i>Carnobacterium piscicola</i>	1	0.80
			1804.	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	0.80

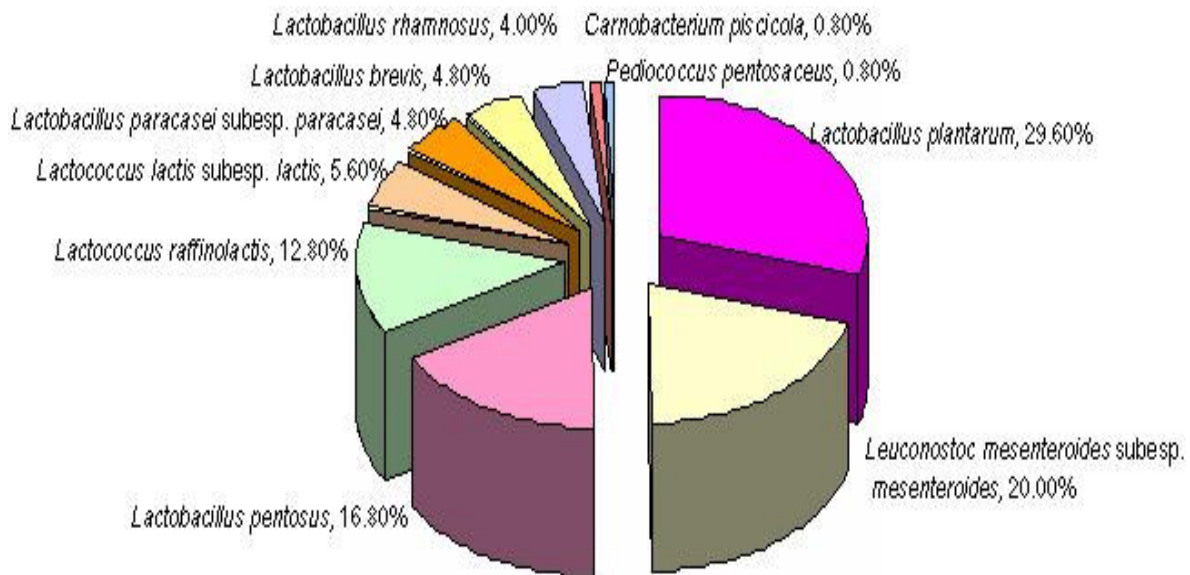


Figura 12. Distribución de cepas aisladas a partir de queso Oaxaca.

Las BAL más abundantes en el queso panela fueron las especies *Lb. plantarum* (34.87%) y *Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides* (32.56%) (tabla 5 y figura 13), la materia prima puede ser una razón que explica la presencia de estas especies; ya que la naturaleza de la leche puede provenir de distintas razas o especies provocando diferencia en su composición, lo que permite dar efecto a las propiedades microbiológicas del queso (Medina, 1990).

Por otro lado una de las especies que se identificó en menor abundancia fue *Lb. paracasei subsp. paracasei* (4.65%) (tabla 5 y figura 13) lo cual, puede deberse a que según lo descrito por Alais (1985) la bacteria láctica tiene una gran actividad enzimática ya que posee sistemas enzimáticos tales como la lipasa, por lo que se puede encontrar de manera natural en la leche cruda. Sin embargo otro microorganismo identificado en menor porcentaje fue *Lb. brevis* (2.33%) que puede provocar hinchamiento en los quesos (Alfaval, 1990), éste resultado posiblemente se deba a que en algunos quesos tales como el queso panela es deseable la hinchazón pero no en el caso del queso Oaxaca.

Tabla 5. Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso panela analizadas.

Producto	Origen	No. de cepas	Código de cepas	Género y especie	No. de cepas	Porcentaje
Queso Panela	- Mercado de Tulancingo. - San Miguel Regala. - Huejutla - Tienda de Actopan. - Mercado de Singuilucan.	43	0101, 0105, 0109, 0110, 0702, 0703, 0704, 2408, 2410, 2702, 2703, 2704, 2708, 2710, 2903.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	15	34.87
			0104, 2405, 2701, 2705, 2706, 2709, 2901, 2902, 2904, 2905, 2906, 2907, 2908, 2910.	<i>Leuconostoc mesenteroides subesp. mesenteroides</i>	14	32.56
			0106, 0108, 0701, 2406.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	4	9.30
			0102, 0107, 2409.	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	3	6.97
			0103, 2401.	<i>Lactobacillus paracasei subesp. paracasei</i>	2	4.65
			0707	<i>Lactobacillus brevis</i>	1	2.33
			0709	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1	2.33
			2403	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	2.33
			2404	<i>Lactobacillus curvatus</i>	1	2.33
			2409	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	2.33

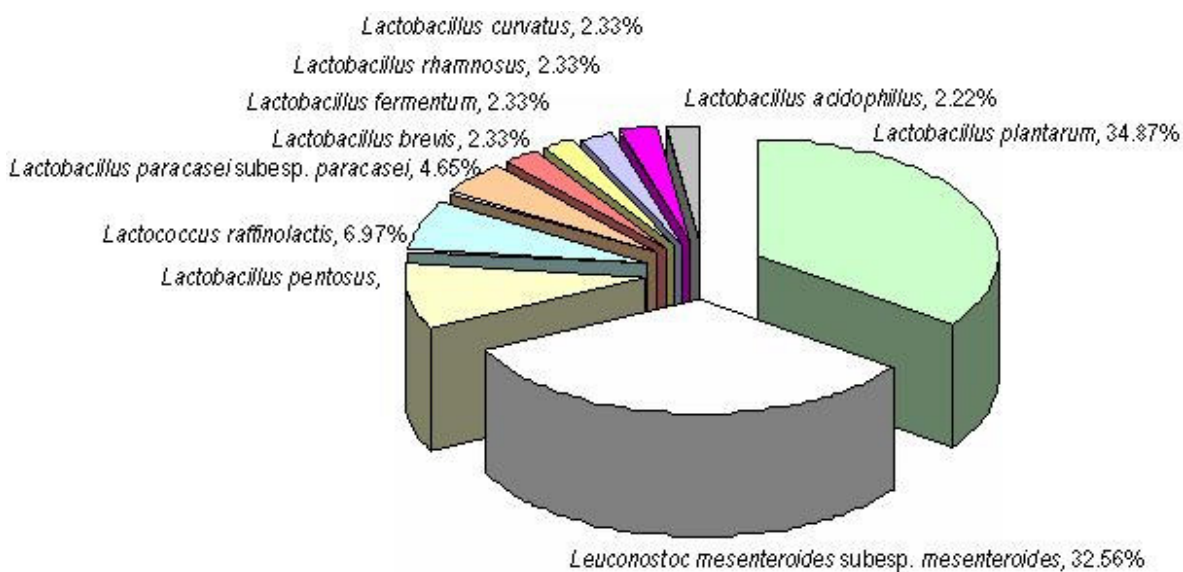


Figura 13. Distribución de cepas aisladas a partir de queso panela

En el queso canasto la especie que se identificó con mayor abundancia fue *Lb. plantarum* (40%). De acuerdo a Alais (1985) esta especie se encuentra en la leche cruda y con menor frecuencia en los quesos, lo que explica que posiblemente la leche cruda con la que se elaboro el queso, no fue llevada a un tratamiento térmico de pasteurización provocando así que ésta especie predomine en el producto (tabla 6 y figura 14).

Tabla 6. Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso canasto analizadas.

Producto	Origen	No. de cepas	Código de cepas	Género y especie	No. de cepas	Porcentaje
Queso Canasto	- Mercado de Pachuca. - Acatlán. - Ciudad de México. - Central de abastos de Pachuca.	29	0302, 1305, 1307, 1308, 1304, 1310, 1904, 3001, 3002, 3006, 3008, 3010.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	12	41.38
			1301, 1302, 1306, 1901, 1903, 1905, 1906, 1907, 1908, 1909, 1910.	<i>Leuconostoc mesenteroides subesp. mesenteroides</i>	11	37.93
			0301, 3007, 3009.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	3	10.34
			1303	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1	3.45
			1309	<i>Lactobacillus paracasei subesp. paracasei</i>	1	3.45
			3005	<i>Lactobacillus brevis</i>	1	3.45

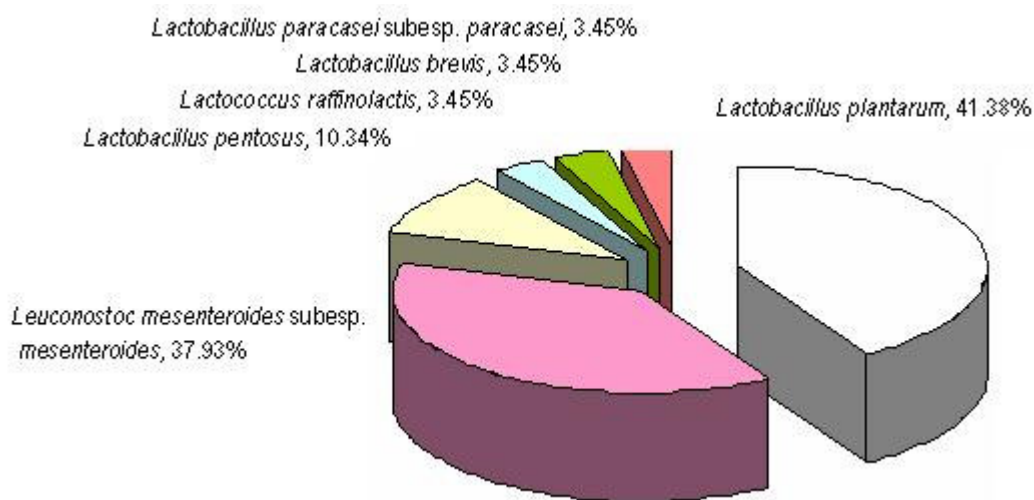


Figura 14. Distribución de cepas aisladas a partir de queso canasto

*Ln. meseenteroides subesp. mesenteroides* (50.00%) fue la especie que predominó en el queso manchego; estos resultados posiblemente se obtuvieron debido a que es un queso maduro y que según Litopoulou-Tzanetaki et al., (1993) los leuconostocs pueden jugar un papel importante en la maduración de estos quesos como consecuencia de sus actividades peptidásicas y lipolíticas intensificando el desarrollo del aroma y sabor. Otra razón puede ser porque el empaque cerrado favoreció el desarrollo de esta especie, ya que es productora de CO<sub>2</sub> (tabla 7 y figura 15).

Tabla 7. Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso manchego analizadas.

Producto	Origen	No. de cepas	Código de cepas	Género y especie	No. de cepas	Porcentaje
Queso Manchego	- Pachuca. - Jaltepec.	16	1004, 1005, 1006, 1009, 2101, 2103, 2104, 2110.	<i>Leuconostoc mesenteroides subesp. mesenteroides</i>	8	50.00
			1007, 1008, 1010, 2109.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	4	25.00
			1001	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	6.25
			2105	<i>Lactococcus lactis subesp. lactis</i>	1	6.25
			2106	<i>Lactobacillus curvatus</i>	1	6.25
			2102	<i>Lactobacillus brevis</i>	1	6.25

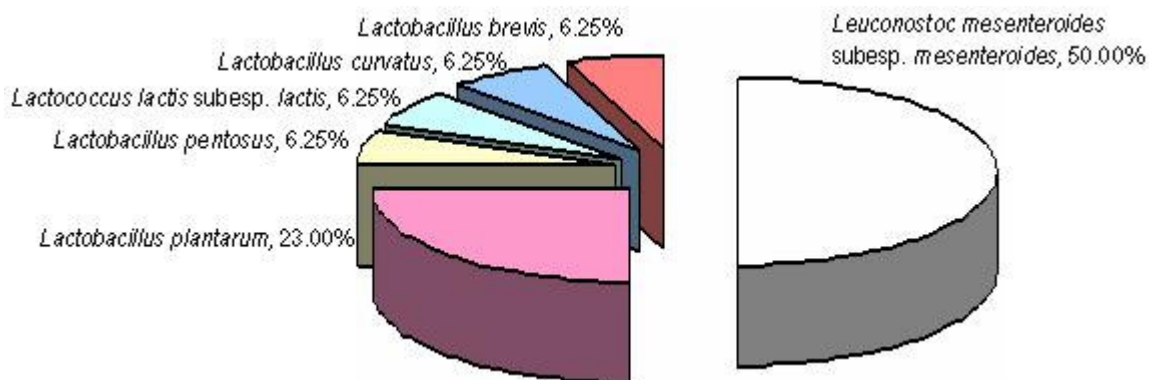


Figura 15. Distribución de cepas aisladas a partir de queso manchego.

La especie *Lb. plantarum* (45.45%) fue la que se identificó con mayor abundancia en el queso doble crema; este producto fue elaborado artesanalmente por lo que seguramente no tuvo un tratamiento térmico adecuado de pasteurización provocando que *Lb. plantarum* sobreviviera en mayor abundancia; también se trata de un queso fresco que no tiene un periodo de maduración notorio y contiene un alto contenido de humedad lo que favoreció posiblemente el crecimiento de esta especie (Alais, 1985) (tabla 8 y figura 16).

Tabla 8. Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso doble crema analizadas.

Producto	Origen	No. de cepas	Código de cepas	Género y especie	No. de cepas	Porcentaje
Queso Doble crema	- Mercado de Pachuca	11	0402, 0408, 0409, 0410, 0412.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	5	45.45
			0406, 0411.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	2	18.19
			0405.	<i>Lactobacillus mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	1	9.09
			0407.	<i>Lactobacillus curvatus</i>	1	9.09
			0401.	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1	9.09
			0403.	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1	9.09

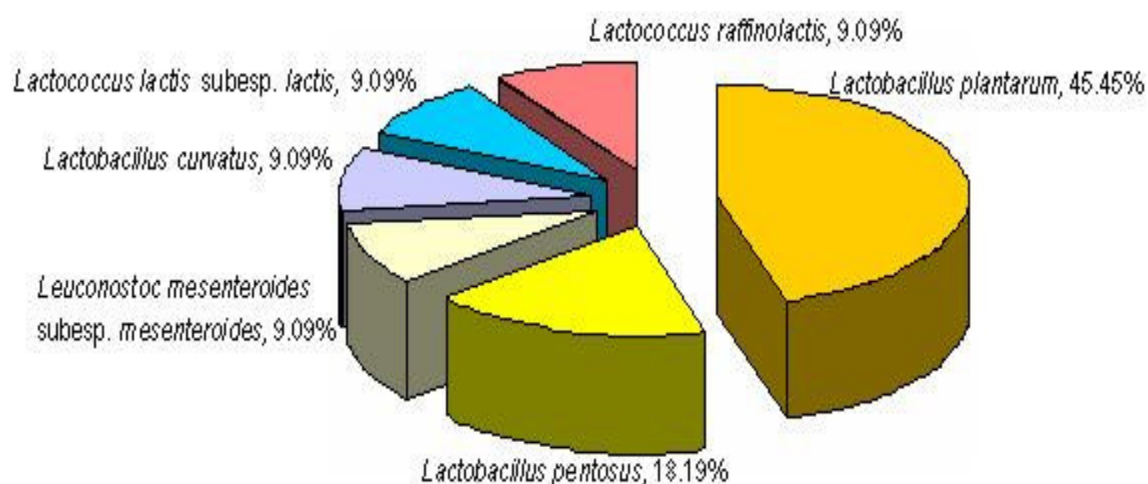


Figura 16. Distribución de cepas aisladas a partir de queso doble crema.

En la muestra de queso blanco se identificó bioquímicamente las especies de *Ln. mesenteroides subesp. mesenteroides* (60%), *Lb. plantarum* (20%) y *Lb. pentosus* (20%); estos resultados se pudieron obtener debido a que se trata de un queso fresco que contiene un corto periodo de maduración lo que permite el crecimiento en mayor porcentaje de estas BAL. Además para su elaboración parte de leche cruda en donde se encuentran estas especies de BAL de manera natural, lo cual favorece que estas BAL se encuentren activas durante todo el proceso de elaboración del producto (tabla 9 y figura 17).

Tabla 9. Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso blanco analizadas.

Producto	Origen	No. de cepas	Código de cepas	Género y especie	No. de cepas	Porcentaje
Queso Blanco	- Central de abastos de Pachuca	10	3308, 3306, 3305, 3304, 3303, 3301.	<i>Leuconostoc mesenteroides subesp. mesenteroides</i>	6	60
			3302, 3309.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	20
			3307, 3310.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	2	20

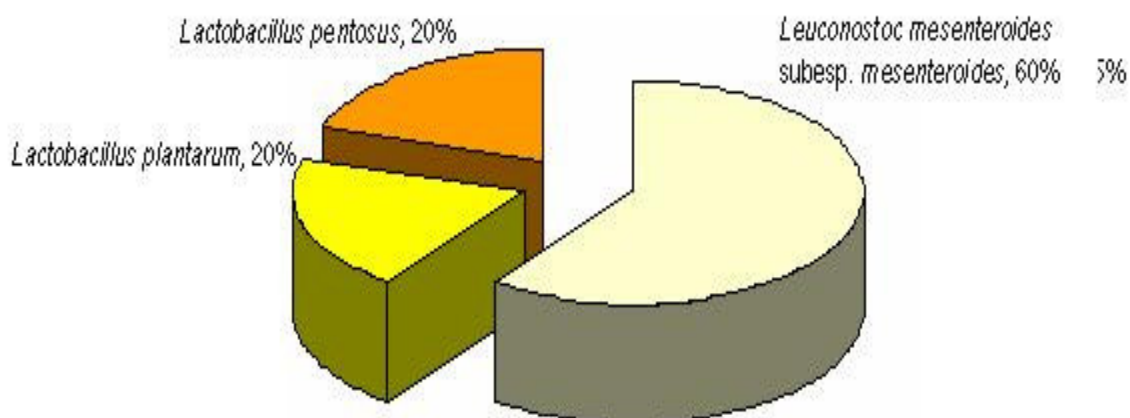


Figura 17. Distribución de cepas aisladas a partir de queso blanco.



A partir de una muestra de requesón, se identificaron 9 cepas de BAL; es importante analizar que *Ln. mesenteroides* subesp. *mesenteroides* (78%) se identificó en mayor abundancia, era de esperarse este resultado debido a que se trata de un queso añejado y blando que posiblemente éstas características *Ln. mesenteroides* subesp. *mesenteroides* se las confiere; ya que esta especie favorece la maduración de los quesos (Medina, 1990) (Tabla 10 y figura 18).

Tabla 10. Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de requesón analizadas.

Producto	Origen	No. de cepas	Código de cepas	Género y especie	No. de cepas	Porcentaje
Requeson	- Mercado de Tulancingo.	9	2202, 2203, 2204, 2205, 2206, 2207, 2208.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>	7	77.78
			2209.	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i>	1	11.11
			2210.	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1	11.11

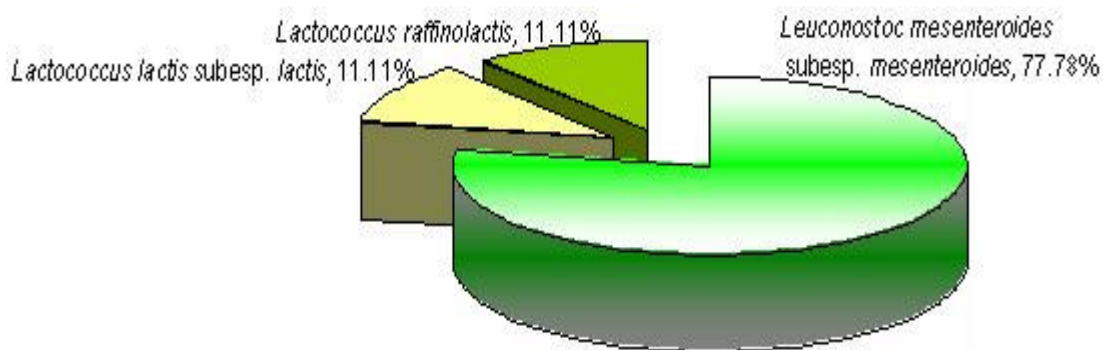


Figura 18. Distribución de cepas aisladas a partir de requesón.

El queso molido se obtuvo de una muestra de diferentes tipos de queso de los cuales no se conoce su nombre; las únicas especies que encontraron presentes en mayor abundancia son *Ln. mesenteroides subeps. mesenteroides* (62.50%) y en menor abundancia *Lb. curvatus* (25.00%) y *Lb. brevis* (12.50%) (tabla 11 y figura 19).

Tabla 11. Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso molido analizadas.

Producto	Origen	No. de cepas	Código de cepas	Género y especie	No. de cepas	Porcentaje
Queso Molido	- Central de Abastos de Pachuca.	8	2002, 2007, 2008, 2010, 2003.	<i>Leuconostoc mesenteroides subesp. mesenteroides</i>	5	62.50
			2001, 2005.	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2	25.00
			2009.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	12.50

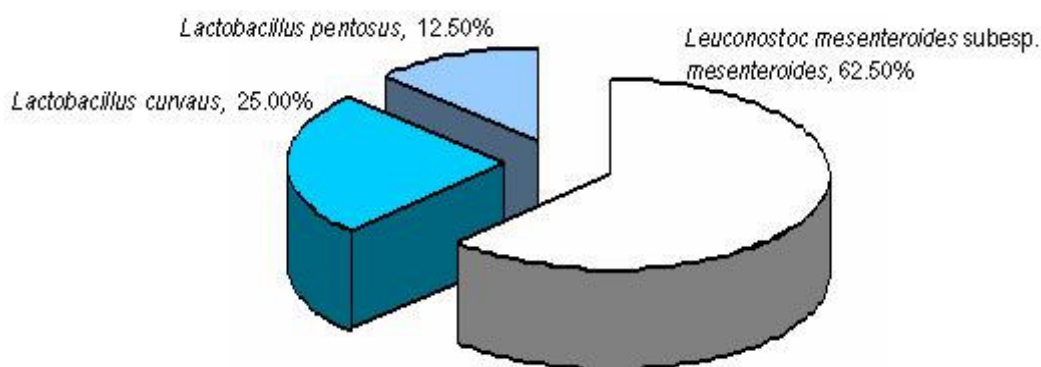


Figura 19. Distribución de cepas aisladas a partir de queso molido

De la muestra de queso ranchero se identificó en mayor cantidad la especie *Lb. pentosus* (57.14%); este resultado se debe a que posiblemente como se trata de un queso fresco en donde la cuajada se obtiene añadiendo limón, vinagre, etc. directamente a pequeños volúmenes de leche cruda por tal motivo disminuye el pH a cierto valor (Veisseyre, 1990) lo que favorece el desarrollo microbiano de esta especie.

Por otro lado se identificó en menor cantidad *Lc. lactis subesp. lactis* (14.29%), son BAL que a lo mejor pudieron favorecer el agrietamiento del queso para que su estructura se pueda abrir y sea permeable (Alais, 1985; Medina, 1990) (tabla 12 y figura 20).

Los condimentos del chile y epazote en el queso ranchero pudieron propiciar la presencia de las especies antes mencionadas, ya que estos condimentos posiblemente puedan ejercer cierta acción antimicrobiana que favorezca el desarrollo de unas especies frente a otras.

Tabla 12. Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso ranchero analizadas.

Producto	Origen	No. de cepas	Código de cepas	Género y especie	No. de cepas	Porcentaje
Queso Ranchero	- Pachuca	7	0803, 0804, 0805, 0810.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	4	57.14
			0801, 0806.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	28.57
			0808	<i>Lactococcus lactis subesp. lactis</i>	1	14.29

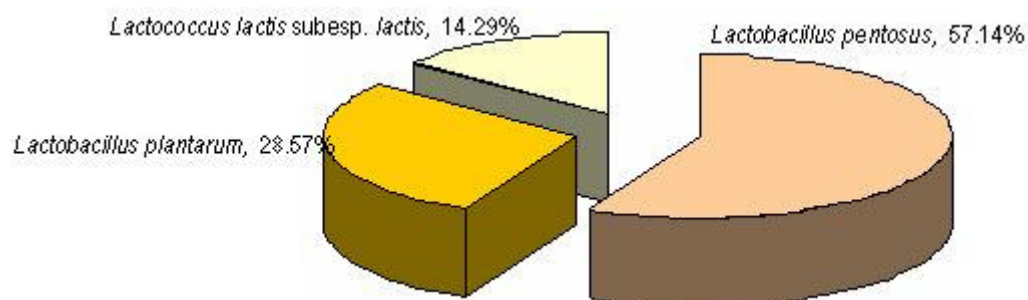


Figura 20. Distribución de cepas aisladas a partir de queso ranchero.

Se identificaron bioquímicamente 7 cepas de las cuales 3 cepas fueron *Lb. plantarum* (42.85%) por lo que es de notar que éste género es el que predomina en el queso botanero; puede ser debido a que *Lb. plantarum* se encuentra en la leche cruda y como a lo

mejor no fue sometida a un tratamiento térmico de pasteurización para la elaboración del queso, esta especie puede seguir activa durante el proceso. Todas estas condiciones posiblemente permiten también la presencia de las cepas de BAL identificadas en menor porcentaje tales como *Ln. mesenteroides subesp. mesenteroides* (14.29%), *Lb. pentosus* (14.29%), *Lb. brevis* (14.29%) y *Lb. rhamnosus* (14.29%) (tabla 13 y figura 21).

Tabla 13. Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso botanero analizadas.

Producto	Origen	No. de cepas	Código de cepas	Género y especie	No. de cepas	Porcentaje
Queso Botanero	- Pachuca	7	0903, 0905, 0910.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	42.85
			0909.	<i>Lactobacillus mesenteroides subesp. mesenteroides</i>	1	14.29
			0904.	<i>Lactobacillus brevis</i>	1	14.29
			0907.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	14.29
			0906.	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	14.29

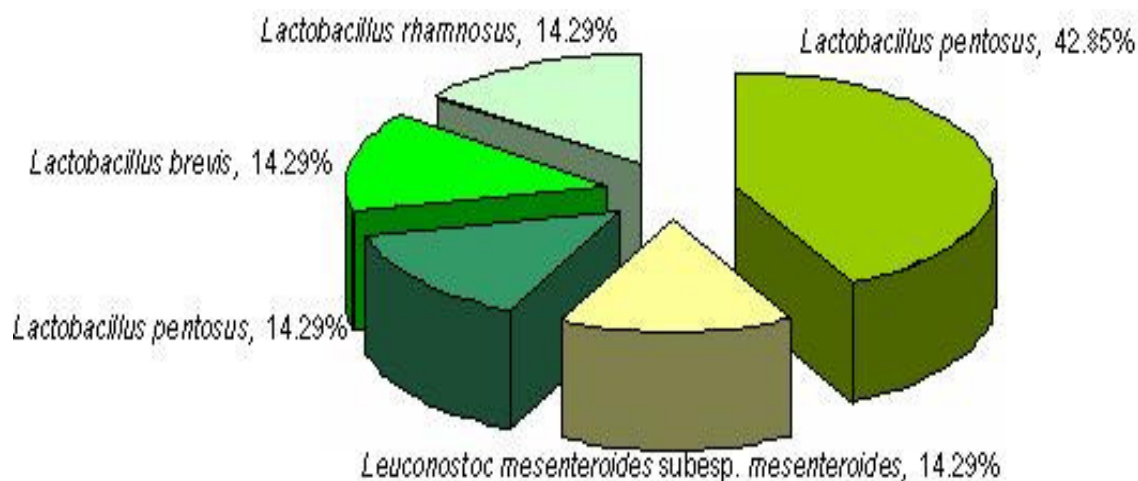


Figura 21. Distribución de cepas aisladas a partir de queso botanero.

Con respecto al queso cotija de 5 muestras, se identificaron bioquímicamente las especies *Lb. plantarum* (40%), *Ln. mesenteroides subesp. mesenteroides* (20%), *Lb. brevis* (20%), y *Lb. rhamnosus* (20%) (tabla 14 y figura 22); era de esperarse estos resultados ya que se trata de un queso prensado y afinado, elaborado con leche cruda en donde se encuentran posiblemente estas especies y que pueden seguir activas durante el proceso de elaboración del queso; otra de las razones son las condiciones de conservación del producto ya que en algunas ocasiones lo mantienen a temperatura ambiente para la venta o lo conservan en un refrigerador electrodoméstico, la temperatura en la que se conserve un queso puede a lo mejor influir en el pH y por lo tanto las especies de BAL son diferentes; ya que ellas dependen para su desarrollo del medio ácido en el que se encuentren (Alais, 1985).

Tabla 14. Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de queso cotija analizadas.

Producto	Origen	No. de cepas	Código de cepas	Género y especie	No. de cepas	Porcentaje
Queso Cotija	- Tehuacan Puebla	5	1206.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	40
			1207.	<i>Lactobacillus mesenteroides subesp. mesenteroides</i>	1	20
			1209.	<i>Lactobacillus brevis</i>	1	20
			1202.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	20
			1205.	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	20

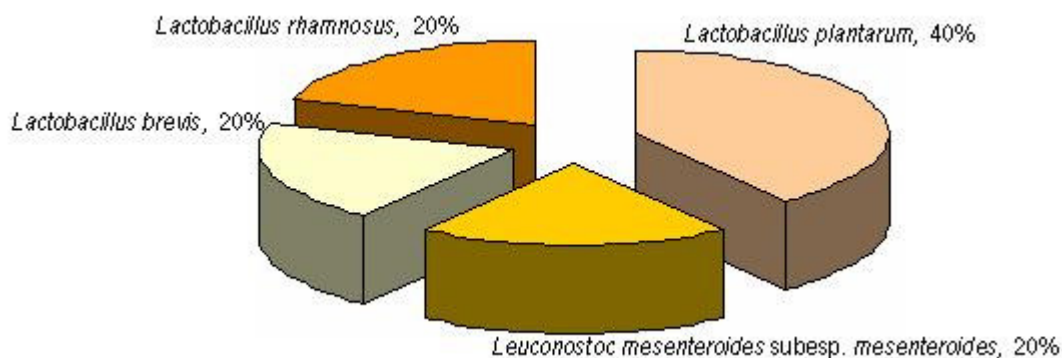


Figura 22. Distribución de cepas aisladas a partir de queso cotija.

*Ln. mesenteroides* subesp. *mesenteroides* ha sido frecuentemente aislada en leche cruda (Menéndez et al., 1998), a diferencia de que en nuestro trabajo no se aisló, muestra en la cual solo se identificaron especies tales como *Lb. plantarum* (80%) y *Lb. pentosus* (20%) (tabla 16 y figura 23), éste resultado posiblemente es debido a que toda clase de microorganismos puede proliferar en la leche causando alteraciones en el sabor y color, esto depende de la raza de los vacunos, la hora del ordeño y la época del año ya que el forraje seco propicia una leche mas rica en grasas, por tal motivo depende de estas condiciones para que se desarrollen ciertas especies de BAL en la leche cruda (Veisseyre, 1990).

Tabla 15. Origen de productos, códigos de cepas y distribución de especies de de leche analizadas.

Producto	Origen	No. de cepas	Código de cepas	Género y especie	No. de cepas	Porcentaje
Leche	- Mercado de Atotonilco.	10	0501, 0502, 0503, 0504.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	8	80
			0505, 0507, 0508, 0510.			
			0506, 0509.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	2	20

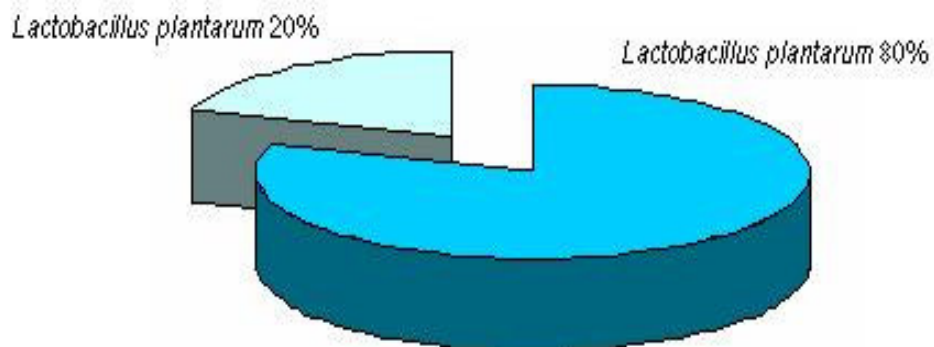


Figura 23. Distribución de cepas aisladas a partir de leche.

En general el género más abundante que se identificó en los productos lácteos fue *Lactobacillus*; Alais (1985) reporta que los lactobacilos dominan en diversos tipos de quesos especialmente los que se fabrican a temperaturas relativamente altas (superiores a 40°C), tras un cierto tiempo; las muestras de quesos que se presentan en esta investigación fueron elaborados artesanalmente, por lo que seguramente no hubo control de temperatura y por eso *Lactobacillus* fue el género mas abundante. Sin embargo según Amiot et al. (1991) todos los quesos contienen lactobacilos siendo los más frecuentes *Lb. casei* y *Lb. plantarum* y también *Lb. Fermentum*. Es de notar que en ésta investigación la especie *Lb. plantarum* se identificó en mayor abundancia en quesos artesanales pero no para el caso de *Lb. casei* y *Lb. fermentum* que se encontraron y menor abundancia, una explicación puede ser porque además de su actividad acidificante, los lactobacilos son proteolíticos y desempeñan un importante papel en la maduración de muchos quesos por lo que las especies varían en cuanto a tipos de quesos blandos y duros.

Estudios realizados por Tobia et al. (2003) sobre el aislamiento de cepas de BAL en ensilados de soya, *Lb. brevis* fue la especie más abundante, la cual es común en este tipo de productos, no así en quesos. El estudio que realizaron Menéndez et al. (1998) con respecto al género *Leuconostoc* indicó la conveniencia para la elaboración de quesos blancos de leche de cabra con el empleo de cultivos iniciadores mesófilos que incluyan cepas *Ln. mesenteroides* subesp. *mesenteroides* en lugar de *Lactococcus* y *Lactobacillus* ya que según estos autores el género *Leuconostoc* puede jugar un papel muy importante en la maduración de estos quesos intensificando el desarrollo del sabor y aroma. En general la presencia del género *Leuconostoc* es asociada al deterioro de alimentos, especialmente los envasados a vacío que da lugar al hinchamiento de los empaques por ejemplo la alteración gaseosa de los quesos es debido a la producción de polisacáridos viscosos por *Ln. mesenteroides* causando pérdidas del producto (Tallgren et al., 1999), sin embargo también puede participar en el desarrollo de características aromáticas por lo que es conveniente tener conocimiento de en que momento se debe utilizar como cultivo iniciador.

Los quesos frescos artesanales tienen un alto contenido de humedad que los expone al que el ataque de microorganismos sea elevado (Alais, 1985), en el caso de las BAL presentes en los quesos son favorables ya que como se mencionó anteriormente ocupan la lactosa para convertirla en ácido láctico lo que provoca un pH ácido facilitando así la sinérisis de la cuajada. El caso de las BAL heterofermentativas convierten la lactosa a compuestos como el diacetilo que confieren el sabor y el aroma en los productos (Jay, 1992; Alais, 1985); un caso particular del género *Leuconostoc* la producción de dextrano, y de CO<sub>2</sub> en algunos quesos si es favorable ya que los agrieta y forma ojos redondos pero para algunos otros productos es indeseable su presencia (Alais, 1985); según Francis y Gaona (2002) esto se debe a que generalmente en todos los quesos se produce gas, anhídrido carbónico, si este gas se forma lentamente se va difundiendo por la masa y algo sale al exterior, pero si el gas se forma con más intensidad entonces se forman burbujas que quedan atrapadas en el interior del queso formando ojos.

Los géneros que se identificaron tales como *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, algunos autores describen que han sido poco utilizados como probióticos; en particular la cepa que se identificó bioquímicamente como *Pediococcus* (0.36%) ha sido un género utilizado como probiótico aunque su aplicación principal ha sido como iniciador para la obtención de vegetales fermentados. En casi todos los estudios de probióticos hacen referencia a *Lactobacillus* (género identificado con mayor abundancia en este trabajo) obtenidos principalmente de la flora intestinal o de leches fermentadas; sin embargo con este estudio se demostró que estos microorganismos se pueden aislar de quesos artesanales y leche cruda. Esto representa un potencial para su aplicación en alimentos y así mejorar la salud de la población con cepas microbianas nativas.



En el presente trabajo fue posible la identificación de cepas de BAL aisladas de productos lácteos, mediante pruebas bioquímicas utilizando el sistema API 50 CHL; en algunos se logró la identificación a nivel de subespecie; sin embargo las técnicas basadas en pruebas bioquímicas no siempre dan una identificación confiable; ya que en el caso de BAL pueden darse nuevas especies no contempladas en la base de datos o cepas atípicas que lleven a errores en la identificación. Es por ello que resulta conveniente aplicar otras técnicas como las basadas en pruebas genotípicas tales como ribotipificación, RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) o electroforesis de campos pulsantes (PFGE), secuenciación de los genes-rRNA, entre otras, para llegar a una identificación más precisa; sin embargo estos métodos requieren de elevadas inversiones y personal altamente cualificado; por tal motivo en la actualidad la utilización de este sistema de pruebas fermentativas son altamente utilizadas con un grado aceptable y para una primera aproximación de la agrupación de cepas.

## 7. CONCLUSIONES

Se logró la identificación de cepas de BAL, mediante pruebas bioquímicas por el sistema API 50 CH.

Se identificó 280 cepas de BAL que corresponden a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Pediococcus* y *Lactococcus*.

Se identificó con mayor abundancia la especie *Lactobacillus plantarum* en los quesos frescos artesanales y en la leche.

El contar con un banco de cepas BAL debidamente caracterizado ha permitido el desarrollo actual de esta línea de investigación; y servirá de base para la aplicación industrial de las cepas, principalmente que de las cepas bacteriocinogénicas que puedan utilizarse como cultivos iniciadores.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Accolas J.P., D. Hemme, M.J. Desvazeaud, L. Vassal, C. Bouillagne y M. Meaux 1980. Les levains lactiques Thermopliles: proprietes et comportement en technologie laitiere. *Le Lait*, 60:487-524.
2. Alais, Ch. 1980. "Ciencia de la leche" Cía. Editorial Continental, S.A., 1ª edición, México. pp 286-300.
3. Alais, Ch. 1985. Ciencia de la leche. Ed. Reverte España.
4. Alfa-laval. 1990. Manual de industrias lácteas. A. Madrid Vicentes. Ediciones, España.
5. Amiot J., Dumais R. y Morin R. 1991. Ciencia y Tecnología de la leche. Principios y aplicaciones. Ed. Acribia.
6. Bacus J.N. y W.L. Brown. 1985. The *lactobacilli*: meat products. In: Bacterial Starter Cututes for Foods. Gilliland S.E. ed. 5:58-72.
7. BioMerieux. 2002. Ficha técnica de referencia para utilizar el método API 50 CHL. pp 1-2.
8. Björkroth, J., Ridell, J. y H. Korkeala. 1996. Characterization of *Lactobacillus sake* strains associating with production of ropy slime by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and pulse-field gel electrophoresis (PFGE) patterns. *Int. J. Food Microbiol.* 31: 59-68.
9. Botazzi V. y M. Vescao. 1969. Carbonyl compounds produced by yogurt bacteria. *Neth. Milk diary J.* 23:71-78.
10. Clavel M. M. 2006. Congelación y liofilización de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el Estado de Hidalgo. Tesis de licenciatura. UAEH.
11. Condon S. 1983. Aerobic metabolismo of lactic acid bacteria. *Ir. J. Food Sci. Technol.* 7:15-25.
12. Condon S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxigen. *FEMS Microbiol. Rev.* 46:269-280.

13. Cox, N.A., A. J. Mercuri y F. Mc Han. (1976). "Miniaturized Multitest Systems and Modifications to expand their use". In 2<sup>nd</sup> International Symposium on Rapid Methods and Automation in Microbiology. Cambridge, England. 33:25-28
14. Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43:164-167.
15. Davies F.L. y M.J. Gasson 1984. Bacteriophages of dairy lactic-acid bacteria. In: *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, ed. Elsevier Applied Science Publ., London. pp 127-151.
16. Esquivel, I.I., R. Guerrero, J. E. Mendoza y A. Navarrete. 1987. "Introducción a la tecnología de alimentos". 6<sup>a</sup> ed. E.N.C.B. del I.P.N., México, D.F. pp 489-495.
17. Fernández E.E. y Hernández M.C. 1985. Aplicación del medio APN en el recuento de bacterias lácticas en quesos frescos no pasteurizados y requesones. 26:47-51.
18. Fernández, E.E. 1981. "Microbiología sanitaria-agua y alimentos". Vol. 1, Ed. Universidad de Guadalajara (EDUG). pp 415-468.
19. Fleming H.P. McFeeters R.F. y M.A Daeschel. 1985. The lactobacilli, pediococci and leuconostocs; vegetables products. In: *Bacterial Starter Cultures for Foods*. Gilliland S.E. Ed. Ch. (8): 98-118. CRC Press, Inc, Boca de Raton, Florida.
20. Francis K. y Gaona R. 2002. *Introducción a la lactología*. 2<sup>a</sup> edición. Editorial Limusa. México.
21. Gibbs P. A. 1987. Novel uses for lactic acid fermentation in food preservation. *J. Appl. Microbiol.* 122:295-303
22. Gilliland S.E. 1985. *Bacterial Starter Cultures for Foods*, CRC Press, Boca Raton Florida.
23. Havenar, R. B. y J.H.J. Huis In't Veld. 1992. Probiotics: A general view. *The lactic acid bacteria volume 1: The lactic acid bacteria in health and disease*. Chapman and Hall. New York.
24. Hickey, M.W., A.J. Hillier y G.R. Jago. 1986. Transport and metabolism of lactose, glucose and galactose in homofermentative lactobacilli. *Appl. Environ Microbiol.* 51:825-831.

25. Hoover, G.D. y R.L. Steenson. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic Press. E.U.A.
26. Hutkins, R., H. A. Morris y L. Mckay. 1985a. Galactokinase activity in *Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ Microbiol. 50:777-780.
27. Hutkins, R., H. A. Morris y L. Mckay. 1985b. Galactose transport in *Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ Microbiol. 50:772-776.
28. Hutkins, R., H. A. Morris y L. Mckay. 1987. Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: A review, J. Food Prot. 50:876-884.
29. Jay, M.J. 1992. Microbiología Moderna de los Alimentos. 3ª edición. Ed. Acribia. España.
30. Jayne, W.D.J. 1976. The application of miniaturized methods for the characterization of various organisms isolated from the animal gut. J. Appl. Bacteriol. 40:189-200.
31. Kandler O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. pp 49:209-224.
32. Kunene N. F., I. Geornaras, Von H. A. y J.W. Hastings. 2000. Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented weaning food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. Appl Environ Microbiol. 3:1084-92.
33. Lee S.Y., Vedamuthu E.R. Washam C.J. y G.W.Reinbold. 1976. An agar medium for the differential enumeration of yogurt starter bacteria. J. Milk Food Technol. 37:272-276.
34. Leveau J.-Y. y M Bouix. 2000. Microbiología Industrial. Los microorganismos de interés industrial. Editorial Acribia.
35. Litopolou-Tzanetaki E., Tzanetakis,N. y Xafopoulou-Mastrojiannaki A. 1993. Effect of the type of lactic starter on microbiological, chemical and sensory characteristics of feta cheese. Food Microbiol. 10:31-41.
36. Macfarland. J. 1990. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana.

37. Marshall V.M.E. y Cole W.M., 1984. Threonine aldose and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavor production in fermented milks. J. Dairy Res. 50:375-379.
38. Medina M. 1990. Principios básicos para la fabricación de quesos. Hojas divulgadora del Ministerio de agricultura, pesca y alimentación, Rivadeneyra S.A. Madrid.
39. Menéndez S., Rodríguez O. y Hermida M. 1998. Leuconostocs en quesería. Análisis de alimentos. Universidad de Santiago de Compostela y Laboratorio de Mouriscade.
40. Morales R. A. 1989. Caracterización de bacterias lácticas aisladas a partir de cultivos iniciadores comerciales y su conservación. Tesis profesional. E.N.C.B. del I.P.N.
41. Nelson L., Michael M. y Cox. 2000. "Lehninger Principios de Bioquímica". Editorial Omega, S.A.; Barcelona, España; I.S.B.N. 84-282-1208-2.
42. Nissen, H., A. Holck y R.H. Dinty. 1994. Identification of *Carnobacterium* spp. and *Leuconostoc* spp. In meta by genus-specific 16S rRNA probe. Lett. Appl. Microbiol. 19:165-168.
43. Pardo I., M. J. García , M. Zúñiga, y F. Uruburu. 1988. Evaluation of the API 50 CHL System for Identification of *Leuconostoc oenos*. American Society for Enology and Viticulture. 4:347-350.
44. Pereda, A.A., A.L.S. Vega, y de la Garza M. L. 1990. Identificación de bacterias lácticas de interés industrial mediante micrométodos. Rev. Lat-amer. Microbiol. 32:24-29
45. Pérez, G.P. y E. Pérez. 1984. (ed). Bioquímica y microbiología de la leche. Limusa, México.
46. Ralph E. 1998. Tecnología de los productos lácteos. Editorial Acribia.
47. Reiter B. 1985. The biological significance of the non-immunoglobulin protective proteins in milk: lysozyme, lactoferrin, lactoperoxidase. In: Developments of Dairy Chemistry, Fox P.F., ed. Elsevier Appl. Publ. London. 3:281-336.
48. Reuter G. 1985. Elective and selective media for lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology. 2:55-68.

49. Sánchez I., Palop L. y Ballesteros C. 2003. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplants. *Int J Food Microbiol.* 59:9-17.
50. Santos E.M., I. Jaime, J. Rovira, U. Lyhs, H. Korkeala, y J. Bjorkroth. 2005. Characterization and identification of lactic acid bacteria in "morcilla de Burgos". *Int. J Food Microbiol.* 3:285-96.
51. Satokari, R., T. Mattila-Sandholm y M.L. Suihko,. 2000. Identification of pediococci by ribotyping. *J. Appl. Microbiol.* 88:260-265.
52. Schmitt P., C. Couvreur, J.F. Cavin, H. Prevost y C. Davies. 1988. Citrate utilization by free and immobilized *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:430-436.
53. Sharpe, M.E., T.F. Gyer y D.G. Smit. 1986. Identification of lactic Acid Bacteria. In identification methods for microbiologist. Ed. Gibbs. B.M. y Skinner T.A. Acad. Press Inc. London Ltd. pp 65-67.
54. Sneath, P.H.A., Hair, N.S., Sharpe M.E. y Holtz, J.G. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Williams & Wilkins Press.
55. Stamer J. R. 1979. The Lactic acid bacteria: Microbes of Diversity. *Food technology*. pp 60-64.
56. Stryer L. 1994. "Bioquímica". 4ª Edición. Tomo I. Editorial REVERTÉ, S.A. Barcelona España; I.D.B.N. 84-291-7451-6.
57. Stryer, L. 1988. *Bioquímica*. Tercera edición. Tomo 2. pp 807-809.
58. Suhigara T.F. 1985. The Lactobacilli and streptococci: bakery products. In: *Bacterial Starter Cultures for Foods*. Gilliland S.E. Ed. 9:120-125.
59. Tallgren, A. H., U. Airaksinen, R. von Weissenberg, H. Ojamo, J. Kuusisto, y M. Leisola. 1999. Exopolysaccharide-Producing bacteria from beets. *Appl. Rodee. Microbiología* . 65, No. 2:862-64.
60. Tobia C., Uribe L., Villalobos E., Soto H. y Ferris I. 2003. Aislamiento, selección y caracterización de bacterias ácido lácticas en ensilajes de soya. *Agronomía Costarricense*. 2:21-27.

61. Torres-Llanez M.J. 2005. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control*. 64:552-557
62. Veisseyre, R. 1990. *Lactología Técnica*. 3ª edición. Editorial Acribia. España.
63. Wood B.J.B. y W.H. Holzapel. 1995. *The genera of lactic acid bacteria. The lactic acid bacteria*. Volumen 2. 5ª edición.



## 9. ANEXO

### 5.1.4. MEDIOS DE CULTIVO

#### 5.1.4.1. Agar de Man Rogosa y Sharpe (MRS)

Ingredientes	Cantidad (g/l)
Peptona de caseína	10
Extracto de carne	8
Extracto de levadura	4
D (+) – glucosa	20
Fosfato dipotásico	2
Tween 80	1
Citrato diamónico	2
Acetato sódico	5
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.04
Agar-agar	14

El medio de cultivo utilizado fue marca Merck y se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (66.24 g/l), posteriormente fue esterilizado a 15 libras de presión durante 20 min.

#### 5.1.4.2. Caldo de Man Rogosa y Sharpe (MRS)

Ingredientes	Cantidad (g/l)
Peptona de caseína	10
Extracto de carne	8

Extracto de levadura	4
D (+) – glucosa	20
Fosfato dipotásico	2
Tween 80	1
Citrato diamónico	2
Acetato sódico	5
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.04

El medio de cultivo utilizado fue marca Merck y se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (52.24 g/l), posteriormente fue esterilizado a 15 libras de presión durante 20 min.

#### 5.1.4.3. Agar Soya Trypticasa

Ingredientes	Cantidad (g/l)
Peptona de caseína	15
Peptona de soya	5
Cloruro de sodio	5
Agar	15

El medio de cultivo utilizado fue de marca Bioxon y se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (40 g/l), posteriormente se esterilizó a 15 libras de presión durante 20 minutos.

#### 5.1.4.4. Medio API 50 CHL

Ingredientes	Cantidad (g/l)
--------------	----------------

Polipeptona	10
Extracto de levadura	5
Tween 80	1
Fosfato dipotásico	2
Acetato sódico	5
Citrato diamónico	2
Sulfato de magnesio	0.20
Sulfato de manganeso	0.05
Púrpura de bromocresol	0.17

El medio de cultivo utilizado fue preparado de acuerdo a las especificaciones del sistema API 50 CHL (25.42 g/l) a un pH de 6.7-7.1, posteriormente fue esterilizado a 15 libras de presión durante 20 min.

Número de cepa	Código de cepa	Género y especie
1	0101	<i>Lactobacillus plantarum</i>
2	0102	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
3	0103	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>
4	0104	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
5	0105	<i>Lactobacillus plantarum</i>
6	0106	<i>Lactobacillus pentosus</i>
7	0107	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
8	0108	<i>Lactobacillus pentosus</i>
9	0109	<i>Lactobacillus plantarum</i>
10	0110	<i>Lactobacillus plantarum</i>
11	0202	<i>Lactobacillus pentosus</i>
12	0203	<i>Lactobacillus pentosus</i>
13	0204	<i>Lactobacillus brevis</i>
14	0205	<i>Lactobacillus plantarum</i>
15	0206	<i>Lactobacillus plantarum</i>
16	0207	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
17	0208	<i>Lactobacillus plantarum</i>
18	0209	<i>Lactobacillus pentosus</i>
19	0210	<i>Lactobacillus pentosus</i>
20	0301	<i>Lactobacillus pentosus</i>
21	0302	<i>Lactobacillus plantarum</i>
22	0401	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i>
23	0402	<i>Lactobacillus plantarum</i>
24	0403	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
25	0405	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
26	0406	<i>Lactobacillus pentosus</i>
27	0407	<i>Lactobacillus curvatus</i>
28	0408	<i>Lactobacillus plantarum</i>
29	0409	<i>Lactobacillus plantarum</i>
30	0410	<i>Lactobacillus plantarum</i>
31	0411	<i>Lactobacillus pentosus</i>
32	0412	<i>Lactobacillus plantarum</i>
33	0501	<i>Lactobacillus plantarum</i>
34	0502	<i>Lactobacillus plantarum</i>
35	0503	<i>Lactobacillus plantarum</i>
36	0504	<i>Lactobacillus plantarum</i>
37	0505	<i>Lactobacillus plantarum</i>
38	0506	<i>Lactobacillus pentosus</i>
39	0507	<i>Lactobacillus plantarum</i>
40	0508	<i>Lactobacillus plantarum</i>
41	0509	<i>Lactobacillus pentosus</i>
42	0510	<i>Lactobacillus plantarum</i>
43	0601	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
44	0602	<i>Lactobacillus plantarum</i>
45	0603	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
46	0604	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
47	0605	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
48	0606	<i>Lactobacillus plantarum</i>
49	0607	<i>Lactobacillus pentosus</i>
50	0608	<i>Lactobacillus plantarum</i>
51	0609	<i>Lactobacillus plantarum</i>
52	0610	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Tabla 16 (continua). Relación de cepas de BAL identificadas mediante morfología microscópica y pruebas bioquímicas por el sistema API 50 CHL.

Número de cepa	Código de cepa	Género y especie
53	0701	<i>Lactobacillus pentosus</i>
54	0702	<i>Lactobacillus plantarum</i>
55	0703	<i>Lactobacillus plantarum</i>
56	0704	<i>Lactobacillus plantarum</i>
57	0707	<i>Lactobacillus brevis</i>
58	0709	<i>Lactobacillus fermentum</i>
59	0801	<i>Lactobacillus plantarum</i>
60	0803	<i>Lactobacillus pentosus</i>
61	0804	<i>Lactobacillus pentosus</i>
62	0805	<i>Lactobacillus pentosus</i>
63	0806	<i>Lactobacillus plantarum</i>
64	0808	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i>
65	0810	<i>Lactobacillus pentosus</i>
66	0903	<i>Lactobacillus plantarum</i>
67	0904	<i>Lactobacillus brevis</i>
68	0905	<i>Lactobacillus plantarum</i>
69	0906	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
70	0907	<i>Lactobacillus pentosus</i>
71	0909	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
72	0910	<i>Lactobacillus plantarum</i>
73	1001	<i>Lactobacillus pentosus</i>
74	1004	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
75	1005	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
76	1006	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
77	1007	<i>Lactobacillus plantarum</i>
78	1008	<i>Lactobacillus plantarum</i>
79	1009	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
80	1010	<i>Lactobacillus plantarum</i>
81	1102	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i>
82	1103	<i>Lactobacillus pentosus</i>
83	1104	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>
84	1105	<i>Lactobacillus plantarum</i>
85	1106	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
86	1107	<i>Lactobacillus pentosus</i>
87	1108	<i>Lactobacillus plantarum</i>
88	1109	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
89	1110	<i>Lactobacillus pentosus</i>
90	1202	<i>Lactobacillus brevis</i>
91	1205	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
92	1206	<i>Lactobacillus plantarum</i>
93	1207	<i>Lactobacillus plantarum</i>
94	1209	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
95	1301	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
96	1302	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
97	1303	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
98	1304	<i>Lactobacillus plantarum</i>
99	1305	<i>Lactobacillus plantarum</i>
100	1306	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
101	1307	<i>Lactobacillus plantarum</i>
102	1308	<i>Lactobacillus plantarum</i>
103	1309	<i>Lactobacillus brevis</i>
104	1310	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Tabla 16 (continua). Relación de cepas de BAL identificadas mediante morfología microscópica y pruebas bioquímicas por el sistema API 50 CHL.

Número de cepa	Código de cepa	Género y especie
105	1402	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
106	1404	<i>Lactobacillus plantarum</i>
107	1405	<i>Lactobacillus pentosus</i>
108	1406	<i>Lactobacillus plantarum</i>
109	1407	<i>Lactobacillus plantarum</i>
110	1408	<i>Lactobacillus pentosus</i>
111	1409	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
112	1501	<i>Lactobacillus pentosus</i>
113	1502	<i>Carnobacterium piscicola</i>
114	1503	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>
115	1504	<i>Lactobacillus plantarum</i>
116	1506	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>
117	1507	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>
118	1508	<i>Lactobacillus plantarum</i>
119	1509	<i>Lactobacillus pentosus</i>
120	1510	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i>
121	1601	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
122	1602	<i>Lactobacillus plantarum</i>
123	1603	<i>Lactobacillus plantarum</i>
124	1604	<i>Lactobacillus pentosus</i>
125	1605	<i>Lactobacillus plantarum</i>
126	1606	<i>Lactobacillus pentosus</i>
127	1607	<i>Lactobacillus plantarum</i>
128	1608	<i>Lactobacillus pentosus</i>
129	1609	<i>Lactobacillus plantarum</i>
130	1610	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
131	1701	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
132	1702	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
133	1703	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>
134	1704	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
135	1705	<i>Lactobacillus brevis</i>
136	1706	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
137	1707	<i>Lactobacillus plantarum</i>
138	1708	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i>
139	1709	<i>Lactobacillus plantarum</i>
140	1710	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
141	1801	<i>Lactobacillus plantarum</i>
142	1802	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i>
143	1803	<i>Lactobacillus plantarum</i>
144	1804	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
145	1805	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
146	1806	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i>
147	1807	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
148	1808	<i>Lactobacillus plantarum</i>
149	1809	<i>Lactobacillus pentosus</i>
150	1810	<i>Lactobacillus pentosus</i>
151	1901	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
152	1903	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
153	1904	<i>Lactobacillus plantarum</i>
154	1905	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
155	1906	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
156	1907	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>

Tabla 16 (continua). Relación de cepas de BAL identificadas mediante morfología microscópica y pruebas bioquímicas por el sistema API 50 CHL.

Número de cepa	Código de cepa	Género y especie
157	1908	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
158	1909	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
159	1910	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
160	2001	<i>Lactobacillus curvatus</i>
161	2002	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
162	2003	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
163	2005	<i>Lactobacillus curvatus</i>
164	2007	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
165	2008	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
166	2009	<i>Lactobacillus pentosus</i>
167	2010	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
168	2101	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
169	2102	<i>Lactobacillus brevis</i>
170	2103	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
171	2104	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
172	2105	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i>
173	2106	<i>Lactobacillus curvatus</i>
174	2109	<i>Lactobacillus plantarum</i>
175	2110	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
176	2202	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
177	2203	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
178	2204	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
179	2205	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
180	2206	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
181	2207	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
182	2208	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
183	2209	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i>
184	2210	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
185	2301	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
186	2302	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i>
187	2306	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
188	2307	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
189	2308	<i>Lactobacillus brevis</i>
190	2309	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>
191	2310	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
192	2401	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>
193	2403	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
194	2404	<i>Lactobacillus curvatus</i>
195	2405	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
196	2406	<i>Lactobacillus pentosus</i>
197	2408	<i>Lactobacillus plantarum</i>
198	2409	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
199	2410	<i>Lactobacillus plantarum</i>
200	2501	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
201	2502	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
202	2503	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
203	2504	<i>Lactobacillus plantarum</i>
204	2505	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
205	2506	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
206	2507	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
207	2508	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
208	2509	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>

Tabla 16 (continua). Relación de cepas de BAL identificadas mediante morfología microscópica y pruebas bioquímicas por el sistema API 50 CHL.

Número de cepa	Código de cepa	Género y especie
209	2510	<i>Lactobacillus brevis</i>
210	2601	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
211	2602	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
212	2603	<i>Lactobacillus plantarum</i>
213	2604	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
214	2605	<i>Lactobacillus pentosus</i>
215	2606	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
216	2607	<i>Lactobacillus brevis</i>
217	2608	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
218	2609	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
219	2610	<i>Lactobacillus pentosus</i>
220	2701	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
221	2702	<i>Lactobacillus plantarum</i>
222	2703	<i>Lactobacillus plantarum</i>
223	2704	<i>Lactobacillus plantarum</i>
224	2705	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
225	2706	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
226	2708	<i>Lactobacillus plantarum</i>
227	2709	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
228	2710	<i>Lactobacillus plantarum</i>
229	2801	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
230	2802	<i>Lactobacillus plantarum</i>
231	2803	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
232	2804	<i>Lactobacillus plantarum</i>
233	2806	<i>Lactobacillus plantarum</i>
234	2808	<i>Lactobacillus plantarum</i>
235	2809	<i>Lactobacillus pentosus</i>
236	2810	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i>
237	2901	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
238	2902	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
239	2903	<i>Lactobacillus plantarum</i>
240	2904	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
241	2905	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
242	2906	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
243	2907	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
244	2908	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
245	2909	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
246	2910	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
247	3001	<i>Lactobacillus plantarum</i>
248	3002	<i>Lactobacillus plantarum</i>
249	3005	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>
250	3006	<i>Lactobacillus plantarum</i>
251	3007	<i>Lactobacillus pentosus</i>
252	3008	<i>Lactobacillus plantarum</i>
253	3009	<i>Lactobacillus pentosus</i>
254	3010	<i>Lactobacillus plantarum</i>
255	3103	<i>Lactobacillus plantarum</i>
256	3104	<i>Lactobacillus plantarum</i>
257	3105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
258	3106	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
259	3107	<i>Lactobacillus pentosus</i>
260	3108	<i>Lactobacillus brevis</i>

Tabla 16 (continua). Relación de cepas de BAL identificadas mediante morfología microscópica y pruebas bioquímicas por el sistema API 50 CHL.



Número de cepa	Código de cepa	Género y especie
261	3109	<i>Lactobacillus plantarum</i>
262	3110	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
263	3201	<i>Lactobacillus plantarum</i>
264	3202	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
265	3203	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
266	3205	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
267	3206	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
268	3207	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
269	3208	<i>Lactobacillus plantarum</i>
270	3210	<i>Lactobacillus plantarum</i>
271	3301	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
272	3302	<i>Lactobacillus plantarum</i>
273	3303	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
274	3304	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
275	3305	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
276	3306	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
277	3307	<i>Lactobacillus pentosus</i>
278	3308	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>
279	3309	<i>Lactobacillus plantarum</i>
280	3310	<i>Lactobacillus pentosus</i>

Tabla 16 (continua). Relación de cepas de BAL identificadas mediante morfología microscópica y pruebas bioquímicas por el sistema API 50 CHL.