



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO**

**IDENTIFICACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO
PRESENTE EN UNA BEBIDA TIPO BÚLGARO**

PRESENTA

HIGINIO ANDRADE ESCOBAR

ASESORES:

Doctor en Ciencias de los alimentos. JOSÉ OCTAVIO RODILES LÓPEZ

Doctor en Ciencias Biotecnológicas. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES



MORELIA, MICHOACÁN. Febrero 2014.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizaje, experiencias y sobre todo felicidad.

Le doy gracias a mis padres Gabriel Andrade y Ana María Escobar, por apoyarme en todo momento, y haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación a lo largo de mi vida. Sobre todo por el excelente ejemplo de vida a seguir.

A mis hermanos por apoyarme en aquellos momentos de necesidad por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar.

A la señora Esperanza Avilés Gonzales, por motivarme en los momentos de desesperación y sobre todo por hacer de su familia una familia para mí.

A mis profesores D.C. José Octavio Rodiles López, D.C. Héctor Eduardo Martínez Flores, D.C. Consuelo Bautista y La Q.F.B Karla Gabriela Dominguez, a mis amigos y familiares por la confianza, el apoyo y toda la dedicación de tiempo.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
1. TAXONOMÍA	1
1.1. Pruebas taxonómicas	3
1.2. Morfología	3
1.2.1. Morfología microscópica	3
1.2.2. Morfología macroscópica	5
1.3. Identificación bioquímica	7
1.4. Identificación genética.....	7
2. PROCARIONTES	7
2.1. Arqueas	7
2.2. Bacterias	9
2.2.1. Clasificación morfológica	10
2.2.2. Clasificación nutricional	10
A. Bacterias autótrofas.....	10
B. Bacterias heterótrofas.....	10
C. Respiración	10
D. Temperatura	11
2.2.3. Género bacillus	12
3. EUCHARIONTES	12
3.1. Hongos.....	12
3.1.1. Levaduras	13
4. CONSORCIO MICROBIANO	14
5. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN CELULAR	14
6. PROBIÓTICO	15
7. PREBIÓTICO	17
7.1. Efectos simbióticos.....	17
7.2. Productos lácteos fermentados	17
7.2.1. Yogurt	17
A. Origen del yogurt.....	18
B. Propiedades nutritivas.....	18
C. Beneficios del yogurt.....	19
7.2.2. Leches fermentadas.....	20
7.2.3. Jocoque	20
7.2.4. Leche acidófila.....	20

7.2.5. Leche búlgara.....	20
7.2.6. Kéfir	21
7.2.7. Búlgaros	21
II. JUSTIFICACIÓN	23
III. HIPÓTESIS	23
IV. OBJETIVOS.....	24
1. OBJETIVO GENERAL	24
2. OBJETIVOS PARTICULARES	24
V. MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. MATERIALES.....	25
1.1. Material biológico.....	25
1.2. Medios de cultivo	25
1.3. Azúcares	26
1.4. Cristalería.....	26
1.5. Equipos	27
1.6. Insumos y reactivos	27
2. METODOLOGÍA	28
2.1. Análisis microscópicos	28
2.2. Aislamiento de los microorganismos.....	29
2.3. Pruebas de identificación bioquímica.....	29
2.4. Pruebas de identificación genotípicas.....	30
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
1. Identificación microscópica	36
2. Identificación bioquímica.....	37
2.1. Bacterias.....	38
2.2. Levadura	39
3. Identificación genotípica	40
VII. CONCLUSIONES.....	43
VIII. BIBLIOGRAFÍA	44
IX. ANEXOS.....	47
1. Métodos	47
1.1. Pruebas microscópicas.....	47
1.1.1. Tinción de gram	47
1.1.2. Tinción lactofenol	47
1.1.3. Tinción azul de metileno.....	47

1.2. Pruebas bioquímicas	48
1.2.1. Prueba de la catalasa	48
1.2.2. Prueba de la oxidasa.....	48
1.2.3. Prueba de Voges–Proskauer	49
1.2.4. Agar rojo de fenol + azúcar fermentable	49
1.2.5. Agar almidón	50
1.2.6. Agar arginina	50
1.2.7. Agar nitrato	50
1.2.8. Gelatina bacteriológica	51
1.2.9. Agar leche	51
1.2.10. Reactivo de kovac.....	52
1.2.11. Reactivo de cloruro férrico	52
1.2.12. Reactivo de rojo de metilo.....	52
1.2.13. Peróxido de hidrogeno al 3%.....	53
1.3. Pruebas bioquímicas de Bacillus	53
1.4. Identificación bioquímica para levaduras.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología Microscópica de Bacterias	4
Figura 2. Formas, superficies y bordes de colonias bacterianas.....	6
Figura 3. Diagrama General de Trabajo	28
Figura 4. Diagramas de flujos para la extracción del material genético.....	31
Figura 5. Electroforesis de DNA Cromosómico Total, la cual indica la presencia del DNA.	32
Figura 6. Extracción de RNA Ribosómico.....	33
Figura 7. Amplificación por PCR para Obtener RNA Ribosómico Amplificado.....	34
Figura 8. Purificación de la Muestra de RNA Ribosómico para la Secuenciación.....	35
Figura 9. Tinción Azul de Lactofenol. 40x.	36
Figura 10. Tinción de Gram. 40x	37
Figura 11. Tinción de Azul de Metileno 100x. Pruebas macroscópicas.	37
Figura 12. ADN Cromosómico total en gel de agarosa al 2%.	40
Figura 13. RNAr 16 S amplificado y Purificado en gel de agarosa al 1%.	41
Figura 14. ITS amplificado y purificado en gel de agarosa al 2%.	41
Figura 15. RNAr 18 S amplificado y purificado en gel de agarosa al 12 %.	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tinción de Gram.....	5
Tabla 2. Valor Nutritivo Yogurt. Valores en Por ciento.	19
Tabla 3. Pruebas Bioquímicas Utilizadas.....	29
Tabla 4. Resultado de las Pruebas Bioquímicas en Bacterias	38
Tabla 5. Resultado de las Pruebas Bioquímicas en la Levadura	39
Tabla 6. Identificación Bioquímica del Genero Bacillus.	53
Tabla 7. Identificación Bioquímica del Genero <i>Bacillus</i> (Continuación)	53
Tabla 8. Identificación Bioquímica del Genero <i>Bacillus</i> . (Continuación)	54
Tabla 9. Identificación Bioquímica de Levaduras.....	54

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con la finalidad de identificar un consorcio de microorganismos presentes en una bebida láctea fermentada tipo Búlgaro, que se consume desde hace mucho tiempo en la localidad de La Calera del Estado de Michoacán en la República Mexicana, pasando de generación en generación, y a la cual los habitantes de dicha comunidad le atribuyen propiedades curativas.

El estudio de estos microorganismos se realizó mediante pruebas fenotípicas como la observación macro y microscópica de la muestra; así mismo se utilizaron diferentes tipos de tinciones y pruebas bioquímicas, y también pruebas genotípicas como la secuenciación del Ácido Ribonucleico Ribosomal 16S (RNAr 16S).

La información de esta investigación es muy importante, ya que conocer más acerca de esta bebida, sus microorganismos y sus beneficios, nos permitirá su divulgación y estudio como potencial prebiótico y probiótico, y así como posible uso de alimento funcional.

Palabras clave: Identificación, microorganismos, Búlgaros, alimento funcional.

Abstract

The following job has been done with final objective of identify a consortium of microorganisms present in a lacteal beverage fermented kind Bulgarian, it's consumed since a long time ago in La Calera of the State of Michoacán of Mexican Republic; has passed generation after generation; population of this community has attributed healing properties.

Studying of this microorganisms was performed by phenotypic tests like macro and microscopic observation of the sample; likewise different kinds of stain and proofs biochemical, also genotypic tests like sequence of Ribonucleic Acid 16S (RNA r 16S).

Information for this research is really relevant; knowing about beverage, their microorganisms and benefits; will allow us study and giving out as prebiotic and probiotic potential; so as possible use of functional meal.

Keywords: Identify, microorganisms, Bulgarian, functional meal.





I. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad se han consumido de manera tradicional los productos lácteos fermentados, derivados de la leche de diferentes especies de mamíferos, como es el caso del yogurt o las leches fermentadas, ya sea por sus extraordinarias propiedades nutricionales, o por su función como alimento funcional. Estos alimentos se han pasado de generación en generación, sin llevar algún tipo de fundamento o investigación científica, como es el caso de los búlgaros de leche que es un tipo de leche fermentada, parecidos al yogurt natural, que es consumida en toda la república Mexicana haciendo énfasis en una pequeña comunidad del estado de Michoacán llamada La Carlera, donde la gente consume este producto de manera tradicional y atribuyéndole propiedades curativas.

Esta investigación tiene el fin de identificar qué tipo de microorganismos se encuentran presentes en este tipo de bebida fermentada tipo búlgaro, su tipificación incluso hasta nivel de subespecie, y de esa manera, poder saber a ciencia cierta qué es lo que están consumiendo las personas desde hace mucho tiempo atrás.

1. TAXONOMÍA

Hoy en día, la célula en biología se define como “la unidad viva más pequeña con capacidad de crecimiento autónomo y reproducción, y con la habilidad para utilizar sustancias químicas como alimento” (Madigan *et al.*, 2005). Todas las células presentan ciertas moléculas químicas en común, tales como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos, vitaminas y minerales. Así mismo, todas las células se caracterizan por poseer una membrana celular y dentro de la misma el citoplasma, sustancia de carácter acuoso.

Todos los seres vivos se clasifican en función a una serie de propiedades comunes. La ciencia que estudia la clasificación de los seres vivos se le llama "Taxonomía"; la cual viene del griego *τάξις*, *taxis*, que significa "ordenamiento", y *νομος*, *nomos*, que significa "norma" o "regla"). (Bekkali *et al* 2007).

La taxonomía ordena a los organismos en un sistema de clasificación compuesto por una jerarquía de taxones anidados. Un taxón (ordenamiento) es un grupo de organismos emparentados, que en una clasificación dada han sido agrupados, asignándole al grupo un nombre en latín, una descripción, y un «tipo», de forma que el taxón de una especie es un espécimen o ejemplar concreto. Cada descripción formal de un taxón es asociada al nombre del autor o autores que la realizan, los cuales se hacen figurar detrás del nombre. En latín el plural de taxón es *taxa*, y es como suele usarse en inglés, pero en español el plural adecuado es «taxones». La ciencia que define a los taxones se llama taxonomía. La Taxonomía Biológica es una sub-disciplina de la Biología



Sistemática, y consiste en el estudio de la clasificación de las especies con arreglo a su historia evolutiva, llamada filogenia. (Jeffares & Penkett, 2008).

Actualmente, la Taxonomía actúa después de haberse resuelto el árbol filogenético de los organismos estudiados, esto es, una vez que están resueltos los clados. Así mismo, se le llama clado a cada una de las ramas del árbol filogenético propuesto para agrupar a los seres vivos. Por consiguiente, un clado se interpreta como un conjunto de especies emparentadas (con un antepasado común) o ramas evolutivas, en función de las relaciones de parentesco entre ellos.

En la actualidad existe el consenso en la comunidad científica de que la clasificación debe ser enteramente consistente con lo que se sabe de la filogenia de los taxones, ya que sólo entonces dará el servicio que se espera de ella al resto de las ramas de la Biología (Soltis & Soltis, 2003).

La taxonomía es la disciplina biológica referida a la teoría y práctica de la clasificación de los organismos. La sistemática es el estudio científico de las clases y diversidad de los organismos y de todas las relaciones entre ellos. Actualmente ambas palabras se utilizan con el mismo sentido, y el objetivo inicial era el de identificar, describir y delimitar especies.

La taxonomía se divide en 2 ramas:

- Micro-taxonomía. Esta tiene el objetivo de identificar, describir y delimitar especies.
- Macro-taxonomía. Esta tiene como objetivo construir clasificaciones de los taxones, y requiere de la micro-taxonomía.

La primera clasificación de los seres vivos se basa en la presencia o ausencia de la membrana celular. Los seres se dividen en celulares y acelulares. Los únicos seres acelulares son los virus y se caracterizan por la ausencia de una membrana celular. (Luque & Herraéz, 2000).

Así mismo, los seres celulares se clasifican en procariontes y eucariontes. Los primeros carecen de un núcleo celular e incluye a las bacterias y las arqueas. Por otro lado, los organismos eucariontes tienen un núcleo celular e incluyen a plantas, animales, hongos y protistas, éstos últimos formados por algas y protozoarios.

En los organismos eucariontes el DNA se halla dentro del núcleo celular.

La palabra procariota viene del griego ‘pro’ = previo a, y ‘karyon = núcleo, y significa previo al núcleo. Los miembros del mundo procariota constituyen un grupo heterogéneo de organismos unicelulares, incluyendo a las eubacterias (donde se encuentran las bacterias) y las archaeas (archaea bacteria). Una típica célula procariota está constituida por las siguientes estructuras principales: membrana citoplasmática, citoplasma, pared celular, ribosomas, y un conjunto de DNA llamado nucleótido. Las células procariotas son generalmente mucho más pequeñas y más simples que las Eucariotas (Alberts *et al*, 2010).



Alberts y colaboradores, 2010, definen el término eucariota en referencia a un núcleo verdadero del griego: 'eu' = buen, y 'karyon = núcleo. Este grupo de organismos se caracteriza por poseer un núcleo celular cubierto por una membrana; además de membrana celular, citoplasma, DNA, y una serie de organelos como mitocondrias, cloroplastos, retículo endoplasmático, y aparato de Golgi. El DNA en eucariontes se encuentra dentro del núcleo celular, mientras que en procariontes se halla disperso en el citoplasma y se le llama nucleóide.

1.1. PRUEBAS TAXONÓMICAS

Los seres vivos pueden clasificarse taxonómicamente según diferentes pruebas, tales como morfológicas, bioquímicas y genéticas.

Los microorganismos procariontes se caracterizan por la ausencia de un núcleo celular, y donde su DNA se halla disperso en el citoplasma. Este grupo de organismos incluyen a las bacterias y a las arqueas. Existen diferentes maneras de clasificar a los microorganismos procariontes, tales como su morfología, sus propiedades bioquímicas, y sus propiedades genéticas. (Ferat, 1995).

1.2. MORFOLOGÍA

El estudio de la morfología puede ser tipo microscópica o tipo macroscópica. El estudio microscópico involucra el uso del microscopio, mientras que los estudios macroscópicos se basan en el uso de medios de cultivo en cajas Petri.

1.2.1. MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en tres tipos: cocos, bacilos, y espirilos. Los cocos son de forma esférica u ovalada; los bacilos de forma cilíndrica tipo bastones, rectos o curvos; y los espirilos en forma de espiral.

En la figura 1 se muestra un resumen de la morfología microscópica de bacterias; donde 1. Cocos; 2. Diplococo; 3. Cocos en cadenas; 4. Cocos en racimos; 5. Cocos en tétradas; 6. Cocobacilos; 7. Bacilos; 8. Bacilos bordes redondeados; 9. Bacilos bordes rectos; 10. Bacilos fusiformes; 11. Vibrios 12. Bacilos curvos; 13-15. Diferentes Espiroquetas.

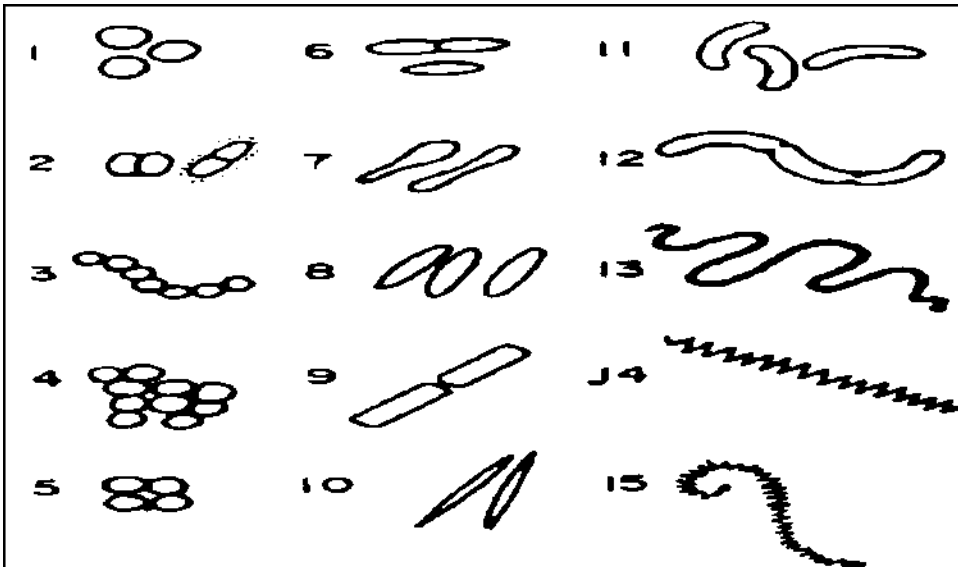


Figura 1. Morfología Microscópica de Bacterias

Las bacterias pueden mantenerse unidas unas con otras después de la división celular, pero conservando siempre la independencia celular. La morfología bacteriana debe ser observada con un microscopio óptico o con el microscopio electrónico, dado el tamaño pequeño de estos microorganismos. (Chicharrón, 2006).

Las bacterias pueden observarse en el microscopio sin tinción, llamado examen en fresco, si se les coloca en glicerol o en soluciones no acuosas que aumenten el índice de refracción; o con una tinción usando distintas coloraciones que mejoran su visualización, ya que éstas son células incoloras. Dichas tinciones se basan en la afinidad que presentan los colorantes por las estructuras bacterianas. Los colorantes catiónicos, por ejemplo, son atraídos por los componentes de carga negativa como los ácidos nucleicos y los polisacáridos. Ejemplo de este tipo son el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina.

Las coloraciones que se usan para teñir los preparados de bacterias se pueden dividir en simples, diferenciales y especiales. Las primeras, por ejemplo el azul de metileno, nos permiten observar la existencia de bacterias, su morfología, su agrupación, la presencia de esporas y la existencia de otros tipos celulares. Las diferenciales, por ejemplo la coloración de Gram y la de Ziehl-Nielsen, además de lo anterior, permiten la diferenciación de las bacterias porque usan diferentes colorantes que se comportan distinto según el microorganismo en cuestión. Las tinciones especiales se usan para objetivar distintas estructuras morfológicas como la membrana celular, la cápsula, el núcleo, los flagelos, las esporas, etc. (Copertino & Hallick, 1993).

Antes de la coloración hay que realizar la preparación y la fijación del frotis.



La preparación del frotis consiste en extender homogéneamente la muestra (por ejemplo un cultivo bacteriano), o una suspensión de la misma sobre una lámina. Una vez preparado el frotis debe secarse y fijarse, por ejemplo con el uso de calor. La fijación del frotis se pretende obtener la muerte de los microorganismos, la adhesión a la lámina y la conservación de su morfología. Después de preparar y fijar el frotis se puede usar cualquier tipo de coloración (Schaechter *et al*, 1993).

La coloración de Gram es la más usada en bacteriología. Ésta debe su nombre a quién la describió en 1884; el danés Christian Gram. Ésta es una tinción diferencial, dado que las bacterias pueden clasificarse según su respuesta al colorante en Gram-Positivas o Gram-Negativas. Las primeras se tiñen de color azul violeta y las segundas adquieren un color rosado o rojo. La diferente reacción de las bacterias a la coloración de Gram se relaciona con diferencias fundamentales de la envoltura celular de estas dos clases de células.

En la tabla 1 se muestran los colorantes usados, su tiempo de aplicación y la diferente coloración que adoptan las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en cada paso de la coloración de Gram. El cristal violeta es el colorante primario, el Lugol el mordiente, la solución alcohol-acetona el decolorante y la safranina el colorante secundario o de contraste.

Tabla 1. Tinción de Gram

Solución	Tiempo de Aplicación	Bacterias Gram Positivas	Bacterias Gram Negativas
Cristal Violeta	30 s	Violeta	Violeta
Lugol	1min	Violeta	Violeta
Alcohol-Acetona	10-15 min	Violeta	Incolora
Safranina	1min	Violeta	Rosada

1.2.2. MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA

La mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente y son visibles como colonias cuando se les siembra en medios de cultivo sólidos adecuados. Éstas requieren una incubación de aproximadamente 24 horas en una atmósfera que favorezca su desarrollo, y a una temperatura óptima.

Una colonia está constituida por los descendientes de una o unas pocas células. Las características de la colonia también dependen de la movilidad de la bacteria. El tamaño puede variar desde 0.5 mm (*Haemophilus* sp. o *N. gonorrhoeae*), a más grandes como las Enterobacterias.

La forma de la colonia en el medio de cultivo puede ser circular (*Staphylococcus*), o irregular o filamentosa (*Bacillus*). Así mismo, los bordes pueden ser ondulados (*Bacillus anthracis*), en forma de sierra o dentados (*Yersinia pestis*) o lisos (*Proteus vulgaris* y *Escherichia coli*).



Por otro lado, la superficie de la colonia también es orientadora y puede ser: plana, convexa, mamelonada, y/o umbilicada.

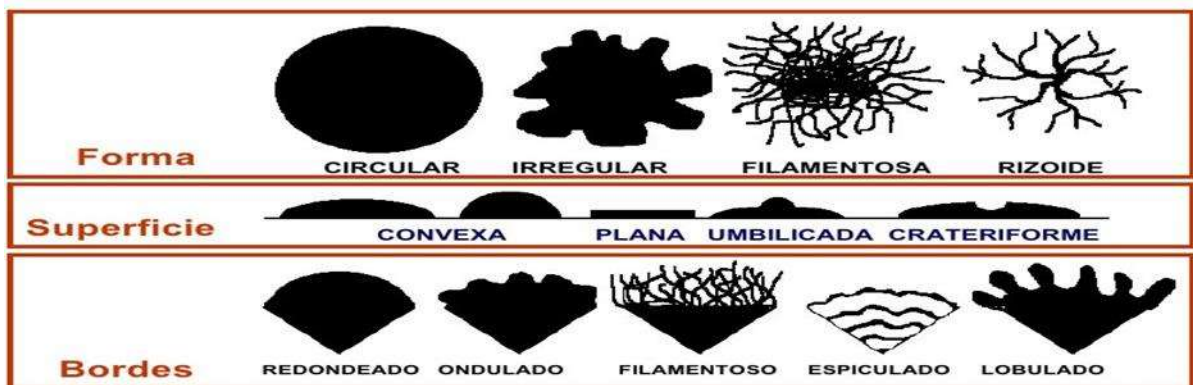


Figura 2. Formas, superficies y bordes de colonias bacterianas.

En relación al pigmento que adquieren puede ser muy variado, y por ejemplo puede ser verde (*P. aeruginosa*), amarillo (*S. aureus*), y grisáceo (*N. meningitidis*).

También es diferente el comportamiento frente a la luz, y puede ser brillante (*Streptococcus*) u opaca (*Staphylococcus*). Así mismo, pueden presentar olores particulares como el frutal de *P. aeruginosa* y el putrefacto de los microorganismos anaerobios.

Por último, hay que destacar la consistencia de la colonia, la cual puede ser mucoide (M), lisa (S) o rugosa (R). Las colonias M tienen aspecto acuoso, brillante, propio de las bacterias capsuladas o que forman cubiertas polisacáridas como *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, y *Haemophilus influenzae*. Los polímeros capsulares pueden ser específicos de grupo y son generalmente antigénicos. Entre las bacterias patógenas, las formas capsuladas suelen ser más virulentas.

Por otra parte, las colonias S son de aspecto homogéneo, de textura uniforme y son características de microorganismos de tipo salvaje recientemente aislados de su hábitat natural como las Enterobacterias.

Las colonias R son de aspecto granulado, y en general son cepas mutantes que carecen de ciertos polisacáridos de superficie. Las formas R de Enterobacterias, por ejemplo, generalmente no son virulentas, en oposición a la mayor resistencia de las bacterias procedentes de colonias S de tipo salvaje.

Un cuarto tipo de colonia es la L y se asocia a la ausencia de la pared celular como resultado de la exposición a antibióticos; y en general estas formas vuelven a sintetizarla pared celular una vez que el fármaco se extrae del medio (Prescott *et al*, 1999.)



1.3. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Los ensayos bioquímicos, tradicionalmente utilizados, generalmente determinan la actividad de una vía metabólica (conjunto de reacciones químicas) a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no. (Donaldson, 2004).

Las pruebas o ensayos bioquímicos son pruebas simples que se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica bioquímica, ya sea como la presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o una determinada vía metabólica; así como el crecimiento a una determinada temperatura, el crecimiento en presencia de inhibidores, etc. Las pruebas bioquímicas no significan de ninguna manera un estudio profundo del metabolismo bacteriano. (Gimeco, 2004).

1.4. IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

La identificación genética se basa principalmente en la secuenciación del DNA cromosómico de los seres vivos. Se usan equipos de laboratorio para secuenciar dicho DNA.

La genealogía molecular es el campo de la biología que estudia la estructura y la función de los genes a nivel molecular. La genética molecular emplea los métodos de la genética y la biología molecular. Se denomina de esta forma para diferenciarla de otras ramas de la genética como la ecología genética y la genética de poblaciones. Un área importante dentro de la genética molecular es el uso de la información molecular para determinar los patrones de descendencia y por tanto, la correcta clasificación científica de los organismos, lo que se denomina sistemática molecular, mientras que al establecimiento de relaciones de parentesco se llama filogenia molecular. (Ferat, 1995).

2. PROCARIONTES

Se llama procariontes a las células sin núcleo celular diferenciado, y cuyo material genético se encuentra disperso en el citoplasma, y reunido en una zona denominada nucleóide. Casi sin excepción los organismos basados en células procariontes son unicelulares, es decir, formados por una sola célula (Tortora, 2007).

El grupo de los procariontes incluye a las arqueas y a las bacterias.

2.1. ARQUEAS

Las arqueas o arqueobacterias son un grupo de microorganismos unicelulares pertenecientes al dominio *Archaea*. Las arqueas, como las bacterias, son procariontes que carecen de núcleo celular o cualquier otro orgánulo dentro de sus células. Sin embargo, cabe señalar que hay diferencias



a nivel molecular entre arqueas y bacterias y que las arqueas están filogenéticamente más próximas a los eucariontes que a las bacterias.

Las arqueas se reproducen asexualmente y se dividen por fisión binaria; además de fragmentación o gemación, a diferencia de las bacterias.

Las arqueas y las bacterias no tienen membranas internas que delimiten organelos, y como todos los organismos celulares presentan ribosomas, pero a diferencia de los encontrados en las bacterias que son sensibles a ciertos agentes químicos inhibidores, los de las arqueas no lo son, lo que puede sugerir una relación cercana entre *Arquea* y *Eukarya*.

La membrana celular tiene una estructura física similar a la de las demás células, pero su composición química es única. No poseen péptido glucano como en las bacterias, y debido a estas diferencias, las arqueas exhiben una alta resistencia contra los antibióticos y los agentes líticos (Gevers *et al*, 2006).

Las arqueas poseen fosfolípidos basados en glicerol en su membrana celular, pero con 3 características que los hacen inusuales:

- ***Estereoquímica del Glicerol.*** Los lípidos de las arqueas son únicos porque la estereoquímica del glicerol es opuesta a la encontrada en bacterias y eucariontes. Esto evidencia fuertemente un camino bio-sintético independiente.
- ***Enlaces Éter.*** Las bacterias y eucariontes tienen membranas compuestas principalmente por glicerol y unidos a los ácidos grasos mediante enlaces éster, mientras que en las arqueas la unión es por enlaces éter. Aun cuando alguna bacteria tiene lípidos ligados por éter, la estereoquímica del glicerol sigue siendo de tipo bacteriano. Estas diferencias pueden ser debidas por una adaptación de las arqueas a los ambientes hipertermófilos.
- ***Cadenas Isoprenoides.*** Las cadenas laterales de las membranas celulares también tiene una composición distintiva en *Arquea*, pues son cadenas isoprenoides compuestas de 20 o incluso 40 átomos de carbono, mientras que en *Bacteria* y *Eukarya* están compuestas por ácidos grasos y usualmente de 16 a 18 átomos de carbono (Gevers *et al*. 2006).

Las arqueas se diferencian de las bacterias no solo en la composición de su membrana celular, sino también en aspectos genéticos. Así, la transcripción y traducción, los dos procesos centrales de la biología molecular, no presentan las características bacterianas típicas sino que son más similares en muchos aspectos a los encontrados en *Eukarya*. Por ejemplo, la traducción usa factores de iniciación y de alargamiento del tipo eucarionte y la transcripción implica proteínas de unión TATA y TFIIB como en los eucariontes. (Gilbert, 2006).



Muchos genes ARNr y ARNt de las arquea albergan intrones. Los intrones son fragmentos de ADN que no son capaces de expresarse bajo la forma de una proteína (Onyenwoke *et al*, 2004); es decir, un intrón es un fragmento de ADN que está presente en un gen pero que no codifica ningún fragmento de la proteína; y los intrones son eliminados en el proceso de maduración del ARN.

Los genes están constituidos por fragmentos de dos clases: Intrones y Exones. Los exones son los fragmentos del gen que codifican aminoácidos de la proteína mientras que los intrones son fragmentos del gen que se encuentran separando los distintos exones y no codifican aminoácidos. En un primer momento de la transcripción la información genética pasa del ADN al ARN y se produce un ARN inmaduro que contiene una copia exacta del gen, con exones e intrones. En el proceso de maduración del ARN que ocurre en el núcleo elimina los intrones y se pegan los exones para formar un ARN maduro que ya puede salir del núcleo hacia el citoplasma.

Aunque puede parecer que los intrones no sirven para nada, ya que son desechados en este proceso, esto no es cierto, ya que en muchas ocasiones contienen importantes señales reguladoras del gen. Por otra parte, su existencia permite que los genes sean modulares y se puedan combinar los exones de diversas maneras produciendo proteínas diferentes con un mismo gen. Por último, esta modularidad ha sido un factor muy importante en la evolución de los genes (Bruce, 2008).

Aunque no son únicas, las paredes celulares de las arquea son también inusuales. Las arqueas no tienen paredes de péptidoglucano como en las bacterias, aunque un grupo de arqueas metanogénicas contiene un pseudo-péptidoglucano, pero que se diferencia en la composición y en los enlaces; y tampoco tienen paredes de celulosa como las plantas, o de quitina como los hongos y animales (Tortora, 2007).

Las paredes celulares de las arqueas se componen de polisacáridos, glicoproteínas y/o proteínas. El tipo más común de pared es la capa superficial para-cristalina (capa S) que está formada por proteínas o glicoproteínas, y generalmente de simetría hexagonal. Las capas S son comunes en las bacterias donde constituyen el único componente de la pared celular en algunos organismos (*Planctomyces*) o la capa externa de muchos otros organismos con péptido glucano. La Arquea *Thermoplasma* carece de pared celular (Tortora, 2007).

Las arquea también tienen flagelos que son notablemente diferentes en composición y desarrollo de los superficialmente flagelos de las bacterias (Tortora, 2007).

2.2. BACTERIAS

Estos son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (0.5-5.0 μ m), y que presentan diversas formas morfológicas, e incluyendo esferas, barras y



hélices. Las bacterias son procariotas, y por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas no tienen núcleo celular ni organelos internos.

Existen diferentes formas de clasificar a las bacterias: Morfología, Fisiología, Genéticas, etc.

2.2.1. CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Acorde a su morfología las bacterias se clasifican del modo siguiente:

- **Cocos.** Estas son bacterias esféricas que pueden presentarse de forma aislada y llamadas cocos, en parejas llamadas diplococos, o en cadenas y denominadas estreptococos, y si se encuentran dispuestos en racimos se les llama estafilococos.
- **Bacilos.** Estas son bacterias alargadas, rectas o curvas.
- **Espirilos.** Estas son bacterias curvadas o retorcidas helicoidalmente, y con un enrollamiento incompleto como en los vibriones, o completo como en las espiroquetas.
- **Bacterias Tabicadas.** Estas son relativamente grandes y formadas por filamentos tabicados y que reciben el nombre genérico de *Leptothrix*. (Leanoir *et al.* 2007).

2.2.2. CLASIFICACIÓN NUTRICIONAL

Las bacterias en base a la manera en que se nutren se clasifican en autótrofas y heterótrofas.

A. BACTERIAS AUTÓTROFAS

Estas son capaces de sintetizar sus sustancias orgánicas a partir de minerales y una fuente de energía externa; las hay fotosintéticas, es decir, que utilizan la energía de las radiaciones luminosas gracias a ciertos pigmentos que poseen; y las quimio sintéticas, que obtienen la energía a partir de reacciones químicas de oxidación, como son las bacterias nitrificantes del suelo que utilizan nitratos y las sulfo-bacterias de las aguas sulfurosas que utilizan ácido sulfhídrico, y otros compuestos del azufre oxidable como sulfitos y tiosulfatos.

B. BACTERIAS HETERÓTROFAS

Estas utilizan compuestos orgánicos elaborados por otros seres vivos. Estas pueden ser parásitas que son productoras de enfermedades en el hombre y en otros animales; también pueden ser saprófitas, las cuales viven a partir de materia orgánica muerta; y por último, las bacterias simbióticas, que viven en un plan de ayuda mutua con organismos vegetales o animales (Albertset *al.*, 2007).

C. RESPIRACIÓN

Las bacterias también se clasifican en función a la manera que respiran, ya sea usando oxígeno, o usando otras sustancias.



- **Bacterias Aerobias.** Utilizan oxígeno para realizar la respiración.
- **Bacterias Anaerobias.** Para respirar sustituyen el oxígeno por otras sustancias.

Existen bacterias aerobias estrictas, las cuales mueren en ausencia de oxígeno; así mismo existen anaerobias estrictas que mueren en presencia de oxígeno; y también existen un grupo de bacterias que pueden vivir en presencia o en ausencia de oxígeno, llamadas aerobias facultativas.

D. TEMPERATURA

Según la temperatura óptima de crecimiento las bacterias se clasifican en termófilas, mesófilas y psicrófilas.

TERMÓFILAS.

Se desarrollan entre 25 y 80°C, y con una óptima entre 50 y 60°C. Las bacterias termófilas son aquellas que se desarrollan a temperaturas superiores a 45°C, pudiendo superar incluso los 100°C, hipertermófilos, siempre y cuando exista agua en estado líquido, lo que se consigue si la presión es elevada como ocurre en las profundidades oceánicas.

Actualmente se están descubriendo muchas especies nuevas de bacterias termófilas en chimeneas hidrotermales de las profundidades marinas, como es el caso de *Rhodothermus obamensis* en la Bahía Tachibana (Japón) con un crecimiento óptimo a 80°C.

MESÓFILAS.

Estas se desarrollan entre 10 y 45°C, y con una óptima entre 20 y 40°C.

PSICRÓFILAS.

Estas se desarrollan entre -5 y 30°C, y con una óptima entre 10 y 20°C. Psicrófilos (palabra compuesta de las griegas *ψυχρος* =frío, y *φιλία*=afecto, amor; es decir "amantes del frío"), son organismos capaces de vivir a temperaturas por debajo de los 5 °C. Sus temperaturas mínimas de desarrollo van de -5 a +5 °C, y sus temperaturas de desarrollo máximas están entre 15 y 20 °C.

Hay dos tipos de psicrófilos:

- **Psicrófilos Obligados.** Su temperatura óptima está en torno a los 15-18 °C, aunque viven perfectamente a cero grados e incluso a temperaturas más bajas; un ejemplo es *Flavobacterium*. Hay algunos cuya temperatura óptima todavía es más baja, los llamamos psicrófilos extremos, un ejemplo es *Polaromonas vacuolata*, que vive en las aguas de la Antártida; y su temperatura óptima es de 4°C y la máxima que resiste es de 14°C y no sobreviven por encima de esta temperatura.



- **Psicrófilos Facultativos.** Como su nombre indica tienen la facultad de resistir el frío, pero su temperatura óptima es más alta, en torno a los 20-30°C. Estos organismos son los culpables de que los alimentos se estropeen en los frigoríficos. (Brock, 2008).

2.2.3. GÉNERO BACILLUS

Las bacterias del género *Bacillus* son bacilos de gran tamaño (4-10 µm), Gram positivos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos, y encapsulados. Una característica importante es que éstas forman esporas extraordinariamente resistentes a condiciones desfavorables.

Las especies del género *Bacillus* se clasifican en los siguientes subgrupos: *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis* (*Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis*), *Bacillus brevis* y *Bacillus anthracis* (Koneman *et al.*, 1999).

Estos microorganismos suelen desarrollarse bien en gelosa sangre, donde producen colonias grandes, extendidas, blanco-grisáceas y con bordes irregulares. Las especies de dicho género tienen amplia distribución, ya que habitan suelo, agua y polvo ambiental. Los miembros termófilos y psicrófilos del género pueden desarrollarse a temperaturas elevadas como 75°C, o bajas, como los -5°C.

Aunque la mayoría de las especies de *Bacillus* son inocuas, algunas son patógenas para las personas y animales. *Bacillus cereus* causa una intoxicación alimentaria similar a la estafilocócica. Algunas cepas producen una toxina termoestable en los alimentos que se asocia con la germinación de esporas y que genera un cuadro de vómitos en un plazo de 1 a 5 horas tras la ingestión (Koneman *et al.*, 1999).

3. EUCARIONTES

Este dominio incluye a los organismos celulares con núcleo verdadero. Estos organismos constan de una o más células eucariotas, abarcando desde organismos unicelulares hasta verdaderos pluricelulares, donde las células se especializan para diferentes tareas y que, en general, no pueden sobrevivir de forma aislada (Tortora, 2007).

Pertenecen al dominio *Eukarya* los animales, las plantas, los hongos, así como varios grupos denominados colectivamente como protistas que incluyen a las algas y a los protozoarios (Tortora, 2007).

3.1. HONGOS

Los hongos son un reino de seres vivos unicelulares o pluricelulares que no forman tejidos y cuyas células se agrupan formando un cuerpo filamentosos ramificado. Al conjunto de filamentos



de un hongo se le llama micelio, y cada filamento se denomina hifa. Las células de los hongos tienen una pared celular de quitina, que cumple un papel equivalente a la celulosa de las plantas (Micol, 2008).

Los hongos tienen alimentación heterótrofa, puesto que no pueden realizar fotosíntesis porque no tienen clorofila. Tienen digestión externa, es decir, vierten al exterior enzimas digestivas que actúan sobre los alimentos dividiéndolos en moléculas sencillas. Los hongos absorben los alimentos después de digerirlos.

Micol, 2008, menciona que los hongos pueden ser saprófitos, parásitos y simbioses. Los hongos saprófitos, como el champiñón o la trufa, se alimentan de sustancias en descomposición. Los hongos parásitos se alimentan de los líquidos internos de otros seres vivos; y los hongos simbioses se asocian con otros organismos y se benefician mutuamente.

Los hongos viven en lugares húmedos, con abundante materia orgánica en descomposición y ocultos a la luz del sol. También pueden habitar en medios acuáticos o vivir en el interior de ciertos seres vivos parasitándolos. (Potter N. 1998).

La reproducción de los hongos puede ser asexual (por esporas) o sexual. Las hifas haploides pueden dar lugar por mitosis, es decir, asexualmente, a unas esporas llamadas conidios o conidiosporas. Las hifas diploides resultantes de la unión de dos hifas haploides pueden dar lugar, por reproducción sexual, a esporas en unas estructuras tipo asca o tipo basidio. Hay dos clases de hifas: hifas cenocíticas, sin tabiques de separación entre células, e hifas tabicadas. (Schachter *et al.* 2006).

3.1.1. LEVADURAS

Se denomina levadura a cualquiera de los diversos hongos microscópicos unicelulares y que son importantes por su capacidad para realizar la descomposición mediante fermentación de diversos cuerpos orgánicos, principalmente azúcares o hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias (Graham *et al.*, 2006).

Desde una perspectiva microbiológica se ha denominado levadura a todos los hongos con predominio de una fase unicelular en su ciclo de vida, incluyendo a los hongos basidiomicetes. A veces suelen estar unidos entre sí formando cadenas; y producen enzimas capaces de descomponer diversos sustratos, principalmente azúcares.

Una de las levaduras más conocidas es la especie *Saccharomyces cerevisiae*, y ésta tiene la facultad de crecer en forma anaerobia y realizando una fermentación alcohólica. Por esta razón se emplea en muchos procesos de fermentación industrial, por ejemplo en la producción de cerveza, vino, hidromiel, pan, producción de antibióticos, etc. (Graham *et al.*, 2006).



Las levaduras se reproducen asexualmente por gemación o brotación y sexualmente mediante ascosporas o basidiosporas. Durante la reproducción asexual, una nueva yema surge de la levadura madre cuando se dan las condiciones adecuadas, tras lo cual la yema se separa de la madre al alcanzar un tamaño adulto. En condiciones de escasez de nutrientes las levaduras que son capaces de reproducirse sexualmente formarán ascosporas (Deak y Beuchat, 1996).

La mayoría de las levaduras son mesófilas, y con una temperatura máxima de crecimiento entre 24 y 48°C. No hay levaduras que puedan crecer a 50°C y solamente unas pocas pueden desarrollarse cerca de 0°C.

La mayoría de las levaduras que causan deterioro de alimentos crece a una actividad de agua entre 0.90 y 0.95. En general las levaduras toleran mejor altas concentraciones de azúcar que de sal. Por otra parte, toleran mejor la glucosa que la sacarosa. La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero prefieren un medio ligeramente ácido con un pH entre 4.5 y 6.5. La utilización de nitratos está confinada a ciertas especies de levaduras, mientras que las fuentes comunes de nitrógeno son amonio, urea y aminoácidos.

Las levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se hallan sobre hojas, flores, frutos, piel, cuero, plumas y tracto digestivo de animales herbívoros y omnívoros. Algunas están asociadas con insectos, pero el suelo es el mayor reservorio. También forman parte de la microbiota de productos lácteos y cárnicos. Las levaduras de las pasturas y suelo de corrales pueden ser transportados a los mataderos y de allí a las carcasas. Suelen hallarse en carcasas de cordero y cerdo (Deak y Beuchat, 1996).

4. CONSORCIO MICROBIANO

Un consorcio microbiano es un grupo de diferentes especies de microorganismos que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo donde todos se benefician de las actividades de los demás. (Calderón y Herrera, 1989).

En un consorcio se pueden encontrar una serie de microorganismos con diferentes habilidades metabólicas, incluyendo actividad proteolítica (degradación de proteínas), sacarolítica (degradación de diversos tipos de azúcares), lipolítica (digestión de lípidos) y celulítica (degradación de celulosa o material vegetal) (Calderón y Herrera 1989).

5. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN CELULAR

Las pruebas de identificación celular a nivel microbiano básicamente son 3:

- Identificación Morfológica (Macro y Microscópica).



- Identificación Bioquímica.
- Identificación Molecular.

En las pruebas de morfología microscópica se hacen estudios de observación colonial del crecimiento directo y posterior observación con un microscopio mediante la utilización de tinciones simples o diferenciales, en las que se observa la agrupación celular y la afinidad a dicho colorante; así como la presencia o ausencia de ciertas estructuras celulares como núcleos, flagelos, cápsula, fimbrias, etc.

En las pruebas macroscópicas se usan medios de cultivo en cajas Petri y se observa su morfología colonial.

Estas técnicas, bajo ciertas limitaciones, permiten detectar el tipo de microorganismo y la cantidad del mismo a bajos costos.

Las pruebas de identificación bioquímica se basan en reacciones metabólicas, ya sean catabólicas o anabólicas, que son específicas para un determinado microorganismo o un grupo de los mismos. Estas pruebas permiten determinar la identidad de un microorganismo hasta su género y especie. Las pruebas bioquímicas incluyen el uso de medios de cultivo en cajas Petri y/o reactivos químicos que generan una serie de colores bajo una reacción química específica.

Por otra parte, la mayoría de las pruebas de identificación molecular se basan en la secuenciación del DNA. Se utiliza normalmente la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymer Chain Reaction*). Esta es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular. Posteriormente la secuencia es analizada con sistemas de cómputo y se logra la identificación de un microorganismo hasta género y especie e incluso sub especie (Bartlett y Stirling, 2003).

6. PROBIÓTICO

De acuerdo con la definición Alemana de Cimperman L. Casen Fleet laboratorios.: “Los Probióticos son microorganismos viables que en cantidades suficientes enriquecen la actividad de efectos positivos en la salud”.

Numerosos microorganismos probióticos son usados particularmente en leches fermentadas y sus derivados y han sido estudiados desde 1917 (Yang *et al*, 2005).

Según Joumanay colaboradores, 2004, algunos de los efectos positivos son:

- ✓ Evitan diarreas complicadas por la intolerancia a la lactosa.
- ✓ Reducción de la concentración de enzimas promotoras de cáncer.



- ✓ Reducción del metabolismo tóxico asociado con la putrefacción intestinal.
- ✓ Regulación y elevación de la salud del tracto gastrointestinal.
- ✓ Efectos beneficiosos contra microorganismos patógenos.
- ✓ Evita enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal, así como infecciones por bacterias como *Helicobacter pylori*.
- ✓ Normalización del paso de las deposiciones de sujetos con estreñimiento o colon irritable.
- ✓ Prevención de alergias en infantes.
- ✓ Prevención de infecciones del tracto respiratorio y otras enfermedades infecciosas así como tratamiento de infecciones urogenitales, y prevención de efectos de hiper colesterol.
- ✓ Mejorar la flora y prevención de caries.
- ✓ Terapia de isquemia de corazón.
- ✓ Disminución de enfermedades autoinmunes.
- ✓ Previene o reduce la duración de complicaciones por rotavirus
- ✓ Evita complicaciones asociadas por antibióticos.

Los probióticos también se han relacionado con el cáncer de colon, CRC; y cabe mencionar que actualmente es la mayor causa de muerte en el mundo de occidente. Aproximadamente el 70% del CRC es asociado con factores ambientales, y principalmente por la dieta. Esto es interesante por el rol que juegan las leches fermentadas como protección gástrica ya que contiene cultivos probióticos que funcionan en contra del CRC.

Los estudios relacionados en humanos indican que el consumo de las leches fermentadas con cultivos probióticos puede reducir el riesgo de contraer cáncer colon rectal. Estudios han mostrado marcadores de alto y bajo riesgo de cáncer después de la ingesta de leches fermentadas con cultivos probióticos. Por otro lado, estudios en animales han mostrado una reducción en los inductores químicos en la formación de tumores de cáncer colon rectal al administrar probióticos. En estudios *in vitro* también hay evidencia de la protección de los probióticos y permite un mejor entendimiento para comprender la actividad y mecanismo de los efectos anticancerígenos. (Roberfroid, 2000)

Los probióticos no solo se han suministrado a humanos, sino también a otros animales. En un estudio realizado por el Colegio de Ciencias Veterinarias en China, y Universidad de Agricultura en Beijing realizado en el 2007, mostraron la reducción de enfermedades propias de las aves domésticas. En un estudio realizado en dos grupos de pollos, donde se observó el aumento de las proteínas IgG, IgM, IgA, propios del sistema inmunológico. El resultado sugiere que los probióticos alargan la inmunidad de la mucosa intestinal, y por lo tanto la vida de los pollos es mayor (Yurong *et al*, 2005).



7. PREBIÓTICO

Un prebiótico es el sustrato trófico de un probiótico.

Los prebióticos son sustancias no digeribles por el hombre que forman parte de los alimentos, y que benefician al huésped estimulando de forma selectiva el crecimiento y/o actividad de un número limitado de bacterias intestinales.

Todavía hay poca experiencia en su empleo; pero la investigación de los mismos ha aumentado considerablemente en años recientes. Uno de los más estudiados es la inulina.

Las principales acciones de los prebióticos ocurren a nivel gastrointestinal. Éstos llegan al intestino grueso y son fermentados por las bacterias del colón, lo que condiciona la selección de la flora tipo bifidobacterias (Collins y Gibson, 1999).

Un prebiótico son ingredientes seleccionados para llevar a cabo una fermentación y realizar cambios específicos, en la composición y/o actividad en la microflora intestinal, y que le confiere beneficios para una buena salud. Las dietas con ingesta elevada de fibra establecen un impacto positivo en el micro flora intestinal.

7.1. EFECTOS SIMBIÓTICOS

La asociación de un probiótico con un prebiótico se denomina “efecto simbiótico”.

Un ejemplo son los preparados lácteos ricos en fibra fermentados por bifidobacterias. Se supone que dicha asociación proporciona efectos sinérgicos. Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios relevantes con simbióticos, por lo que los aparentes beneficios son por el momento especulativos (Rodríguez *et al*, 2003).

7.2. PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS

Existe una gran variedad de productos lácteos que son elaborados mediante la fermentación de la misma por diferentes tipos de microorganismos.

7.2.1. YOGURT

Su sabor inconfundible y sus beneficiosas bacterias, excelentes para el sistema inmunológico, han sido fundamentales en la alimentación del ser humano durante siglos. Tanto es así, que muchos expertos creen que el yogurt fue conocido mucho antes que la agricultura. Además, no sólo es exquisito como postre, solo o con azúcar, mermelada, miel o frutas, sino que además es un ingrediente imprescindible de numerosas salsas para pastas, ensaladas y carnes.



A. ORIGEN DEL YOGURT

El nombre del yogur tiene su origen en una palabra búlgara: 'jaurt'; y es precisamente de la zona de los Balcanes y de Asia Menor de donde procede este manjar lácteo. Las tribus nómadas pronto se dieron cuenta de que la leche se convertía en una masa semi sólida al transportarla en sacos de piel de cabra, porque el calor y el contacto de la leche con la piel de cabra fomentaban su fermentación mediante la acción de bacterias ácidas.

La facilidad de transporte, conservación y propiedades nutritivas convirtieron al yogur en un alimento esencial para estos pueblos. Algunos historiadores creen que GengisKhan obligaba a sus tropas a tomar este producto para fortalecerse y tener una salud envidiable. (Schardt, 2006).

El yogur se conocería en distintas partes del mundo y pronto se incorporó a la cocina de numerosas civilizaciones. Los griegos lo utilizaban para curar problemas de estómago e intestinales. Por su parte, en La India, era conocido como 'dahi', alimento que se atribuía a los dioses.

B. PROPIEDADES NUTRITIVAS

A raíz de los descubrimientos de Metchnikoff, microbiólogo ucraniano, y premio Nobel en 1908, el yogur se convirtió en un alimento popular durante el siglo XX. La longevidad de los pueblos balcánicos llamó la atención de muchos investigadores, entre ellos, Metchnikoff, que gracias a sus estudios demostró cuáles eran los efectos de las bacterias del yogur sobre la flora intestinal.

Los organismos vivos de este alimento transforman la lactosa en ácido láctico, un componente que impide el desarrollo de bacterias dañinas en el intestino y que son derivadas de la descomposición de los alimentos. Este investigador también halló interesantes propiedades nutritivas derivadas de su gran cantidad de vitaminas del grupo B.

La acción sobre el sistema digestivo convierte al yogur en una auténtica defensa natural contra todo tipo de infecciones y enfermedades. Además, reduce el colesterol y permite absorber las grasas mucho más fácilmente, además de equilibrar el intestino, controlando los posibles casos de diarrea y estreñimiento. También minimiza los efectos negativos de los antibióticos y protege el estómago de la erosión que producen ciertos medicamentos.

Hoy existen muchas variedades de yogur. La cuidadosa elaboración mediante tanques de leche pasteurizada y homogeneizada permite darle a la leche las condiciones necesarias para generar las bacterias que hacen de este producto un alimento único. Los ingredientes y el modo de elaboración determinan los tipos de yogurt: líquidos, cremosos, desnatados, con frutas, etcétera.

En la siguiente tabla se muestra el valor nutricional del yogurt.



Tabla 2. Valor Nutritivo Yogurt. Valores en Porcentaje.

	Yogurt Entero	Yogurt Descremado
Energía (kcal)	61	
Agua	87.90	85.23
Carbohidratos	4.66	7.68
Fibra	0.00	0.00
Lípidos	3.25	0.18
Proteínas	3.47	5.73
Cenizas	0.72	1.18
Total	100	100

C. BENEFICIOS DEL YOGURT

Una de las mayores cualidades del yogur es su importante cantidad de calcio. Los yogures se convierten así en un aliado imprescindible para fortalecer los huesos y los dientes. Sus proteínas, grasas e hidratos de carbono con predominio de la lactosa suministran energía suficiente al cuerpo como para afrontar la ardua jornada laboral o académica.

Lo bueno del yogur es que, además, no engorda. Las variedades desnatadas se recomiendan en todas las dietas de adelgazamiento, ya que suministran energía y nutrientes básicos, pero a su vez aportan muy pocas calorías. Las vitaminas del tipo A y B, el ácido fólico, y el contenido en fósforo, potasio, magnesio, cinc y yodo completan el contenido nutricional de este producto imprescindible en la dieta.

Dos bacterias lácticas hacen el resto: *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que permanecen vivos tras la fermentación y que ofrecen al yogur su acidez y aroma inconfundibles, además de proteger y regular la flora intestinal.

Existe cierta confusión en el mercado acerca de los beneficios para la salud de las bacterias lácticas contenidas en los diversos tipos de yogures. En realidad, sólo es yogur aquella leche coagulada que se obtiene por la fermentación láctica ácida, debida al *Lactobacillus bulgaricus* y al *Streptococcus thermophilus*. Los yogures tienen un mínimo de 100 millones de microorganismos vivos por gramo de yogur.

Para producir yogur se recurre a la fermentación de la leche tipo ácida. A la leche pasteurizada se le añaden cultivos previamente seleccionados de *Lactobacillus* y *Streptococcus* y se deja fermentar durante un periodo prolongado, entre 6 y 23 horas, y una vez alcanzadas ciertas condiciones óptimas, el resultado se deja reposar en envases estériles.



Un yogur diario es más que suficiente para garantizar los beneficios que este producto aporta a nuestro organismo. El cuerpo necesita de 2 a 4 raciones de lácteos por día, de los cuales 125 gramos serían de yogur y 60 gramos de queso fresco.

7.2.2. LECHE FERMENTADAS

Los productos fermentados de la leche, denominados también lácteos fermentados, son productos lácteos procedentes de los cultivos lácticos debido a la acción de las bacterias del ácido láctico, *Lactobacilos*, tales como los *Lactobacillus*, *Lactococcus*, y *Leuconostoc*.

El proceso de fermentación incrementa la vida útil y del producto y mejora la digestibilidad del mismo frente a la leche. Existen evidencias que demuestran la existencia de productos fermentados de la leche ya desde hace 10,000 años (Cameron, 2002).

7.2.3. JOCOQUE

El Jocoque es un producto lácteo fermentado de gran tradición en México.

Su elaboración puede remontarse hasta la época colonial. Sin embargo, se halla mal caracterizado y escasamente estudiado. Éste se elabora con la participación de cepas o especies capaces de formar gomas (filantes); y sus características esenciales son: sabor ácido y aroma a mantequilla por la presencia de diacetilo, y su textura es viscosa por la presencia de la goma de las cepas filantes. Se elabora normalmente a partir de leche de vaca pasteurizada fermentada con *Lactococcus lacticus cremoris* y *Leuconostoc mesenteroides cremoris* (García et al., 2005).

7.2.4. LECHE ACIDÓFILA

La leche acidófila se obtiene por fermentación de la leche estéril, entera o descremada, con *Lactobacillus acidophilus*; éste es un producto cuyo consumo se debe principalmente a las razones terapéuticas atribuidas a estas bacterias. En términos de saber, se trata de un producto ácido sin aroma característico, ya que este microorganismo no produce metabolitos en forma importante, además del ácido láctico (Garibay et al, 2005).

7.2.5. LECHE BÚLGARA

Originada y muy consumida en Bulgaria. Se elabora por fermentación de la leche de vaca, borrega o cabra con *L. delbrueckii bulgaricus* de 40°C a 42°C; y de cuya formación resulta un producto muy ácido (4.5-4.7% de ácido láctico); y con un aroma muy similar al del yogur por la producción del acetaldehído. El jocoque búlgaro es una leche fermentada por acción de *L. delbrueckii ss. bulgaricus* y cultivos mesófilos del jocoque. (Garibay et al, 2005).



7.2.6. KÉFIR

Estas son bebidas a base de leche sometidas tanto a fermentación láctica como a la alcohólica, lo cual las convierte en productos muy particulares. Una de sus características es la presencia de bióxido de carbono producido por levaduras y generando una bebida gaseosa y espumosa.

Este producto es originario de Rusia y no se tiene un año específico de su creación, ya que se realiza de forma tradicional. El inóculo utilizado en la elaboración del kéfir es muy singular, se trata de una simbiosis de microorganismos atrapados en una matriz de polisacáridos, lo cual forma una masa del tamaño de un grano de arroz o más grande que recibe el nombre de “granos de kéfir”.

Así, el inóculo se encuentra literalmente inmovilizado en un soporte producido por el mismo y permite su reutilización retirándolo por filtración de la leche fermentada para volver a usarlo en el siguiente lote. La matriz está formada por un polisacárido de glucosa y galactosa que recibe el nombre de kefirano: 24% está constituido por carbohidratos y 13% por proteínas (Garibay, *et al* 2005).

El kéfir está prácticamente formado por la presencia de *Lactobacillus kéfir* y la levadura *Candida kéfir*; aunquetambién se han reportado la presencia de *Leuconostoc mesenteroides* ss. *cremoris*, *Lactobacillus brevis*, *L. casei* ss., *L. acidophilus* y con poca frecuencia *Lactococcus lactis*. Además de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se menciona que solo entre el 5 y el 10% de la población de los granos del kéfir son levaduras. El origen de estos granos se desconoce; han sido infructuosos los intentos para producirlos artificialmente.

En México se elabora un producto similar al kéfir de forma casera en muchos hogares y se conoce con el nombre de “búlgaros”, los granos se propagan de una familia a otra y forma parte de una tradición cultural (Garibay *et al*, 1993).

7.2.7. BÚLGAROS

Los búlgaros son una estructura polisacárida donde conviven en simbiosis diversos microorganismos y que adopta la forma de una masa gelatinosa, irregular, color blanca o ligeramente amarillenta, de consistencia elástica y aspecto similar a las flores de coliflor.

Su tamaño varía entre pocos milímetros y algunos centímetros de diámetro. Conocidos artesanalmente por atribuírsele propiedades curativas, este tipo de alimento se ha consumido desde hace muchos años atrás. En el Cáucaso, donde se ha consumido corrientemente durante miles de años (ya lo utilizaban los antiguos Sumerios), la gente mantenía una gran longevidad y una buena salud (Garibay *et al*, 1993).



Tradicionalmente se generaban como consecuencia de cuajar leche fresca en cántaros de madera. Este proceso, al igual que el cuajado con rumen de ternero y la posterior elaboración de quesos, era necesario para conservar los excedentes lácteos ante la ausencia de refrigeradores. Luego de cuajar leche durante varios días en el mismo recipiente, se formaban en sus paredes estos gránulos de consistencia gelatinosa. Sumergiéndolos en leche recién ordeñada, los habitantes del Cáucaso comenzaron a obtener una bebida de sabor agradable con benéficos efectos y mejor conservación que la leche fresca. Podríamos definirla como una leche fermentada carbonatada ácida cuyo sabor se debe a la presencia del ácido láctico de acuerdo a FermentedMilkProducts Canadian DairyCommissionde2009.

También se puede obtener de forma tradicional y se adquiere por toda la república mexicana siendo más consumido en las pequeñas comunidades donde las personas cuentan con pocos recursos económicos.

Las personas los han tomado por años sin saber a ciencia cierta que son, solo siguen la tradición de inocularlos en leche entera de vaca y dejarlos reposar por un día. En otros lugares del mundo se usan leches de diferentes especies como la de búfala, yegua, cabra u otro tipo de mamífero; al siguiente día se cuelan y se lavan con agua limpia y se guardan en un recipiente de vidrio teniendo cuidado de no estar en contacto con recipientes de metal puesto que los algunos metales funcionan como bactericidas.

El fermentado resultante es una forma de yogurt natural con sabor cítrico-acido.

Se le atribuyen propiedades curativas y también se habla de que mejora malestares estomacales, úlceras gástricas, así como ayudar a las personas a bajar de peso, y mantenerlo mejorando de esa manera su salud.

También se ha hablado mucho sobre la longevidad que proporciona tomar este fermentado láctico puesto que hay personas que afirman que las bacterias lácticas que contienen este producto mejoran la síntesis de vitamina B y K en el intestino, además, mejora la capacidad de asimilación de los alimentos, regula el tránsito intestinal, fortalece las defensas frente a infecciones tanto víricas como bacterianas, reduce los niveles de colesterol y el riesgo de padecer cáncer de colon, como laxante, en concentraciones mayores como astringente, mejora los nervios, cura la falta de sueño y se mejora el apetito, y disminuyendo las depresiones. Así mismo, mejora el malestar del intestino, problemas de anemia, eczemas, esclerosis del corazón, regula la presión arterial y regula el peso, trastornos de la vesícula biliar, dolores de riñones, infecciones, hepatitis y congestión; y reduce la intolerancia a la lactosa. (Burón y García, 1990).



II. JUSTIFICACIÓN

En la comunidad de La Calera en el estado de Michoacán, México, se consume un tipo de bebida fermentada láctea tipo búlgaro y que se le atribuyen propiedades curativas, pero no se conoce la composición microbiológica de la misma. El conocimiento de la flora microbiana presente en este sub producto lácteo fermentado nos permitirá conocer si tienen algún tipo de función prebiótica dentro del organismo.

III. HIPÓTESIS

La leche fermentada tipo búlgaro es un producto lácteo fermentado constituido por un consorcio de microorganismos que coexisten en simbiosis, formando un tipo de polisacárido blanco, similar a las flores de coliflor, que tienen la propiedad de fermentar la leche.



IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Identificar taxonómicamente un consorcio microbiano presente en una bebida fermentada tipo búlgaro consumida en el estado de Michoacán, México, mediante una serie de pruebas microscópicas, bioquímicas y genéticas.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Corroborar mediante una serie de pruebas microscópicas la presencia de un consorcio microbiano en una bebida fermentada tipo búlgaro.
- Utilizar pruebas bioquímicas para identificar los microorganismos presentes en el consorcio microbiano hasta género y especie.
- Aplicar pruebas genotípicas mediante técnicas de Biología Molecular para la confirmación de los resultados obtenidos de las pruebas fenotípicas y bioquímicas y poder lograr la taxonomía completa a nivel de género, especie y subespecie.



V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Muestra de leche tipo Búlgaro proporcionada por una persona de la comunidad de La Calera, Municipio de José Sixto Verduco, Michoacán, México.

1.2. MEDIOS DE CULTIVO

A continuación se presenta una lista de los medios de cultivo usados.

Agar – Agar marca Dibico®
Agar Bilis-Esculina marca BD®
Agar Citrato marca Bioxon®
Agar de Dextrosa peptona y extracto de levadura Difco®
Agar de Eosina Azul de Metileno marca BD®
Agar de Papa y Dextrosa Bioxon®
Agar de Soya y Trypticaseína marca Bioxon®
Agar Dextrosa SabouraudBioxon®
Agar Fenilalanina marca Bioxon®
Agar Hierro Lisina marca Merck®
Agar hierro Triple Azúcar marca Merck®
Agar Indol Nitrito marca Bioxon®
Agar Leche
Agar Mac Conkey marca Bioxon®
Agar MIO®
Agarosa marca Sigma®
Almidón soluble marca
Aminoácido Arginina marca Omnicem®
Base de Agar Sangre marca Bioxon®
Base de Caldo Rojo de Fenol Bioxon®
Caldo Infusión Cerebro y Corazón marca Bioxon®
Caldo Malonato marca Bioxon®
Caldo Müller-Hinton marca Difco®
Caldo Nutritivo marca Bioxon®
Caldo Rojo de Fenol marca BD®
Caldo Rojo de metilo / Vogues-Proskauer marca Merck®



Caldo Soya Trypticaseína marca Bioxon®
Caldo urea marca Bioxon®
Caseína marca Sigma®
Gelatina nutritiva marca Bioxon®

1.3. AZÚCARES

A continuación se presenta la lista de azúcares usados para las pruebas bioquímicas. Estos corresponden a las marcas Sigma y BD.

Arabinosa	Melibiosa
Dulcitol	Myo-Inositol
Fructosa	Rafinosa
Galactosa	Ramnosa
Glicerol	Ribosa
Glucosa	Sacarosa
Inositol	Salicina
Lactosa	Sorbitol
Levulosa	Trehalosa
Maltosa	Xilosa
Manosa	

1.4. CRISTALERÍA

A continuación se lista el tipo de cristalería usado en toda la experimentación.

Matraces Erlen-Meyer de 125, 250, 500, 1000 y 2000 mL. Marca Kimax®
Mortero marca Pyrex®
Perlas de vidrio
Pipeta Pasteur de vidrio
Pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10mL. Marca Pyrex®
Placas de Petri de vidrio de 90x200 marca Kimax®
Portaobjetos y cubreobjetos
Probetas graduadas de 100, 500 y 800 mL. Marca Pyrex®
Tubos de ensaye de 13x100 y 16x100 con tapón de rosca marca Kimax®
Tubos de ensaye de 13x75 con tapón de caucho



1.5. EQUIPOS

Autoclave de calor húmedo marca Presto Steel® modelo 21L
Cámara de electroforesis Biorad® modelo 38x50
Cámara de luz ultravioleta miniBISproDN
Cámara Fotográfica marca Panasonic modelo Lumix®
Campana de seguridad biológica CEV® modelo CSB120
Centrífuga marca Sol-Bat® modelo J-600
Espectrofotómetro de absorción atómica
Estufa de gas marca SAN-SON
Incubadora marca Felisa® modelo FE-131
Lámpara de luz ultravioleta marca Minerallight® modelo UVGL-25
Marcador de tiempo marca Control Company®
Mechero tipo Fisher
Micropipetas marca Biohit® de 10 a 100 µL
Microscopio óptico marca Carl Zeiss® modelo Stanford 25
Refrigerador General Electric® modelo turbo plus coolingsystem
Termo baño marca CIVEQ® modelo HH-1
TermocicladorTechgene® modelo FTGENE5D

1.6. INSUMOS Y REACTIVOS

Agua de grado PCR
Agua destilada
Algodón
Aplicador de madera
Discos de Oxidasa marca BBL®
Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico
Hisopos estériles
Kit.Purificargeles de agarosacon muestras amplificadas de RNA Quick Extractionkit®
MgCl
NaCl
Parafilm®
SO ₃
Taq Polimerasa
Tris-EDTA
Tubos Eppendorf
Tubos para PCREppendorf



2. METODOLOGÍA

Para la realización de este estudio se utilizaron diversas metodologías las cuales se describen a continuación en el diagrama general de trabajo.

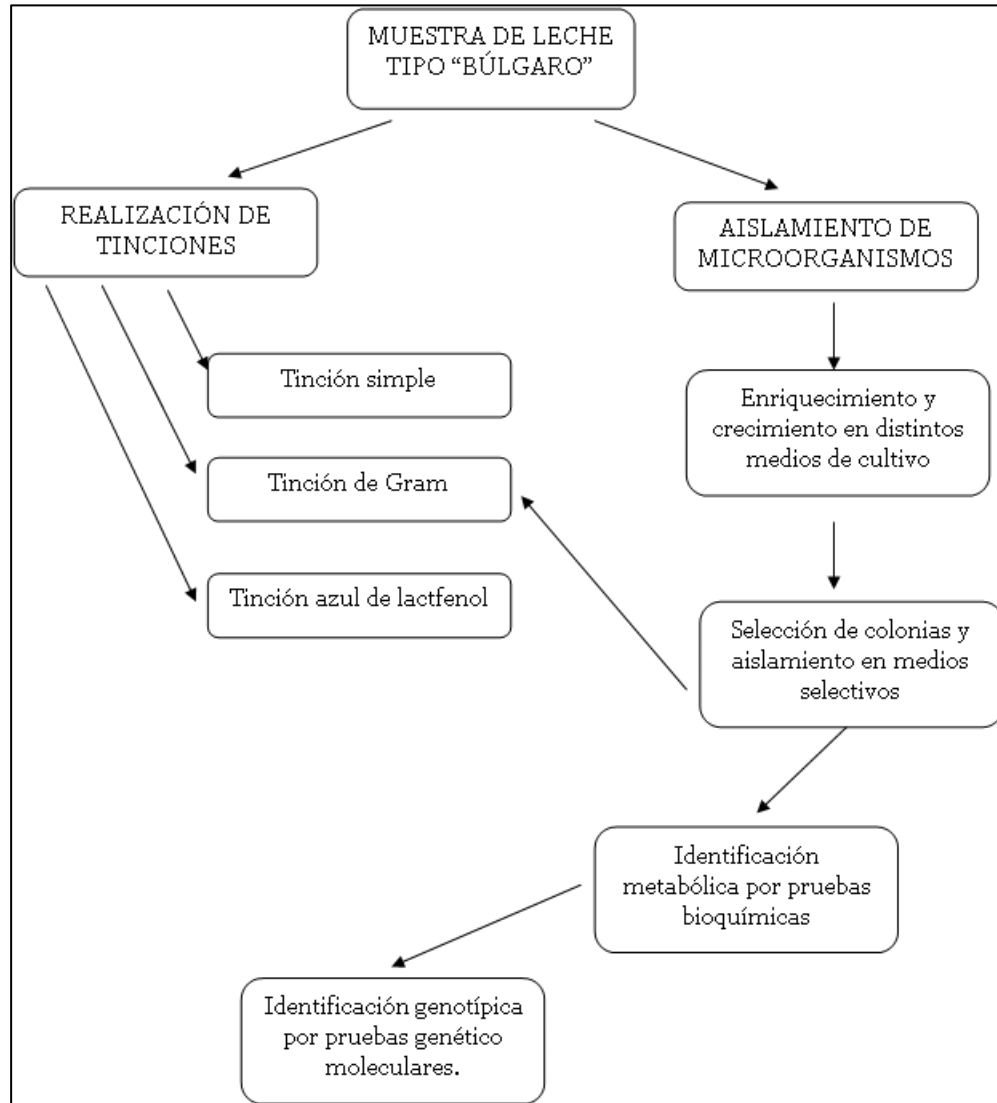


Figura 3. Diagrama General de Trabajo

2.1. ANÁLISIS MICROSCÓPICOS

Primeramente se realizó un estudio microscópico directo de la muestra de leche tipo búlgaro a la que denominaremos simplemente “búlgaros”; los cuales previamente se lavaron con agua destilada y se filtraron con gasa estéril. La biomasa obtenida de la filtración fue depositada en un recipiente estéril y se procedió a cortar los grumos de biomasa con ayuda de una hoja de bisturí y un asa bacteriológica.



Se tomó una muestra de la biomasa con un asa microbiológica y se realizaron 3 frotos sobre un portaobjetos de vidrio, y los cuales se tiñeron con las técnicas de tinción de Gram, Azul de Lactofenol y Azul de Metileno (descritos en el anexo). Las muestras se observaron en un microscopio óptico con los lentes de aumento 40x y 100x; y obteniendo distintas imágenes del consorcio presente en la muestra problema.

2.2. AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

Primeramente se tomó un inóculo directo de la muestra con ayuda de un asa bacteriológica y se inóculó en un caldo Soya y Tripticaseína y el cual se incubó a 37°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se tomó un inóculo de dicho caldo y se inóculó en placas de Gelosa Sangre Humana, Gelosa de Papa-Dextrosa, y Gelosa de Infusión Cerebro Corazón de Ternera; y las cuales se incubaron nuevamente a 37°C durante 24 horas.

Posterior a la incubación, se observó el crecimiento en las placas de 4 morfologías diferentes y se tomaron muestras de las mismas; y se denominaron ejemplares: A, B, C y D.

2.3. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Después del aislamiento de los microorganismos se realizó la identificación bioquímica utilizando distintos sustratos para observar el metabolismo de los microorganismos aislados. Este procedimiento se realizó preparando una batería de pruebas para cada una de las cepas aisladas.

El procedimiento común para la realización de estas pruebas fue usar diferentes medios de cultivos sólidos y en tubo. Sin embargo, también se utilizaron medios semisólidos, líquidos y algunos reactivos específicos. En la tabla 3 se muestran todos los medios utilizados.

Tabla 3. Pruebas Bioquímicas Utilizadas

TSI	Glucosa	Fructosa
LIS	Glicerol	Manosa
Citrato	Salicina	Sacarosa
Fenilalaninadesaminasa	Lactosa	Dulcitol
Movilidad	Xilosa	Galactosa
Indol	Manitol	Inositol
Ornitina	Myoinositol	Levulosa
Rojo de metilo	Maltosa	Arabinosa
Ramnosa	Catalasa	Hidrólisis de gelatina
Sorbitol	Trehalosa	Gram
Ribosa	Melibiosa	Hemólisis en Sangre de Carnero
Rafinosa	Hidrólisis de Almidón	Oxidasa
Arginina	Hidrólisis de Caseína	Voges-Proskauer
Nitratos	Leche Tornasolada	Bilis-esculina



2.4. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICAS

Estas pruebas se realizaron en el Colegio de Posgraduados Campus Tabasco, en Villahermosa, Tabasco, México, y asesorado por la Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muños Profesor Investigador asociado.

La identificación genotípica se efectuó primeramente reactivando las cepas de los microorganismos aislados e identificados previamente por medio de las pruebas fenotípicas (microscópicas y bioquímicas). Estas cepas se reactivaron incubando en los medios de cultivo correspondientes y a las temperaturas adecuadas. Una vez reactivadas las cepas se llevaron a fase exponencial con el objetivo de conseguir un gran número de microorganismos, y una vez hecho esto, se escogieron las colonias aisladas para obtener un cultivo puro y se utilizó agar papa-dextrosa para las levaduras y se incubó a temperatura ambiente por 48 h; y agar cerebro-corazón para las bacterias y estas se incubaron a 28°C por 72 h.

A continuación se procedió a extraer el RNA cromosómico total de las células por medio de una lisis mecánica usando micro perlas de vidrio y posteriormente centrifugando a 15,000 rpm, y usando solventes orgánicos.

Para observar el RNA cromosómico se preparó una placa de gel de agarosa al 2% y al 1% de bromuro de etidio y se sometió a electroforesis por 60 min a 180 volts. Se tomó una foto en una cámara de luz ultravioleta y se leyó en un programa de computadora llamado Gel Capture, y donde se pudieron observar las bandas de RNA al ser expuestos a la luz ultravioleta por el bromuro de etidio.

Una vez corroborado la presencia del RNA cromosómico total, se hicieron diluciones de trabajo para evitar una cantidad excesiva de RNA y que éstas pudieran intervenir con la lectura de las muestras. El siguiente paso fue mezclar los reactivos para someter las muestras a un Termociclador, y observar la presencia de RNA ribosómico, que es donde se encuentran la evidencia genética para identificar los microorganismos. Los reactivos utilizados fueron reactivos 10X, TAQ Polimerasa, 4 dinucleótidos trifosfatados, MgCl, RNA, agua para PCR, y oligonucleótidos específicos que tienen como función ser un iniciador en reacciones de amplificación y estos son específicos para cada especie de microorganismos.

Una vez hecho esto se depositaron en un Termociclador, que actúa según el principio de la reacción en cadena de la polimerasa, donde a diferentes grados de temperatura se amplifica el gen específico a estudiar. Después de esto se depositan en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio al 10% y se someten a electroforesis por 60 min a 80 volts, y después de la electroforesis se toma una foto en una cámara de luz ultravioleta, y se lee en un programa de computadora llama-



do Gel Captura. Si es necesario el gel se introduce en una solución de bromuro de etidio al 10% para que las muestras resalten aún más al exponer a la luz UV.

Una vez que se leyó la foto, se procede a purificar. Esto se logra usando kits comerciales. Primeramente, se expone nuevamente la placa de gel de agarosa a luz ultravioleta y se hacen cortes donde se encuentra amplificado el RNAr; esto se puede notar porque fluoresce y resalta más que cualquier otra parte del gel. Posteriormente los trozos cortados se meten a tubos propios del kit de purificación; se calientan a 50°C hasta que se funde el gel, se centrifuga y se purifican con solventes propios del kit de purificación, y una vez terminada la purificación se procede a secuenciar dichos genes mediante programas bioinformáticos: DNAMAN, CROMASLITE, GENEDOC, y se comparan con análisis de secuencias que se encuentran en bancos de datos en la internet.

En las figuras 4-8 se muestran diagramas de flujos para la extracción del material genético que se usa para identificar a los microorganismos.

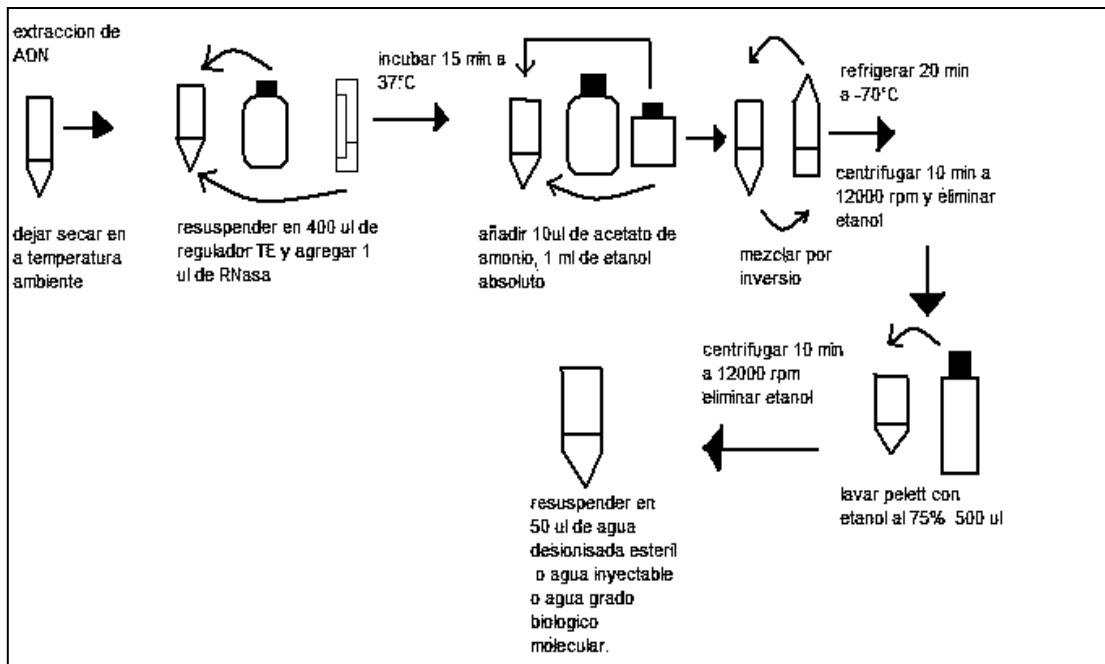


Figura 4. Diagramas de flujos para la extracción del material genético.

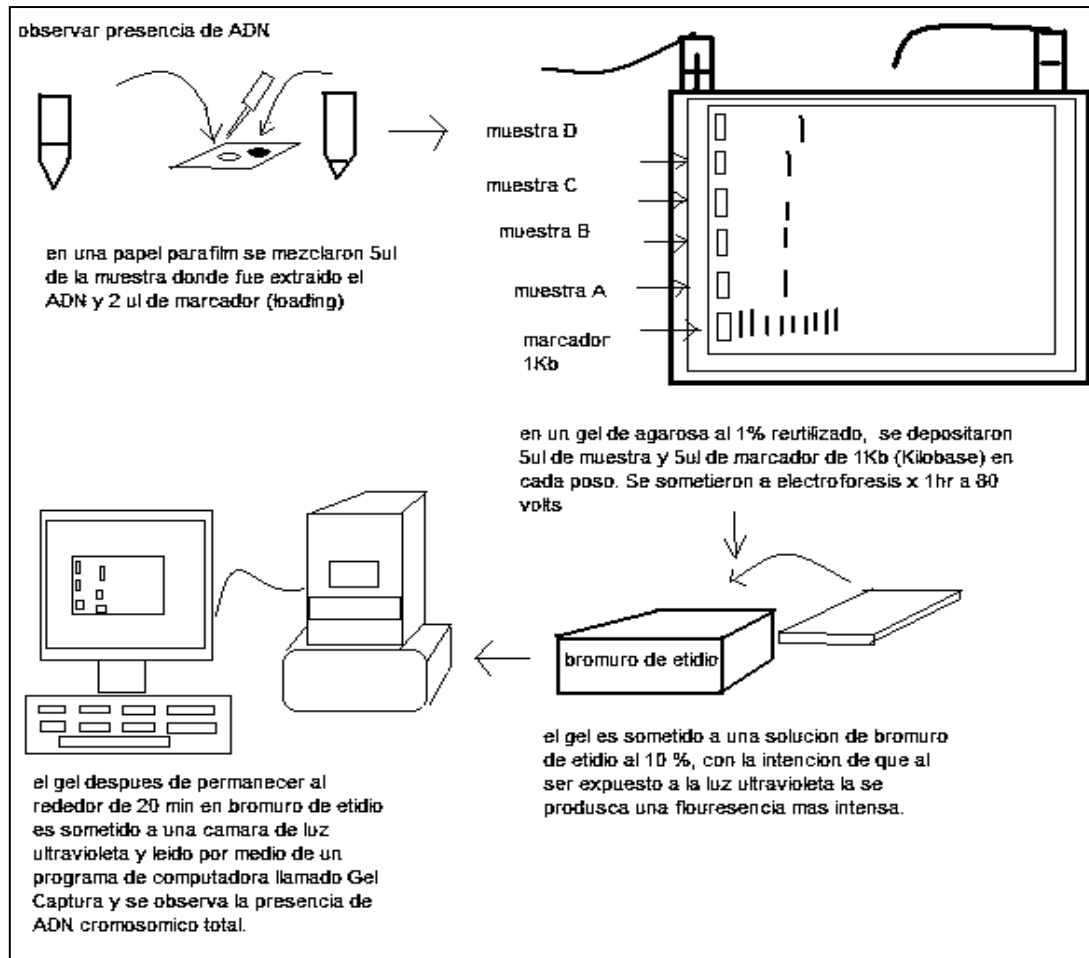


Figura 5. Electroforesis de DNA Cromosómico Total, la cual indica la presencia del DNA.

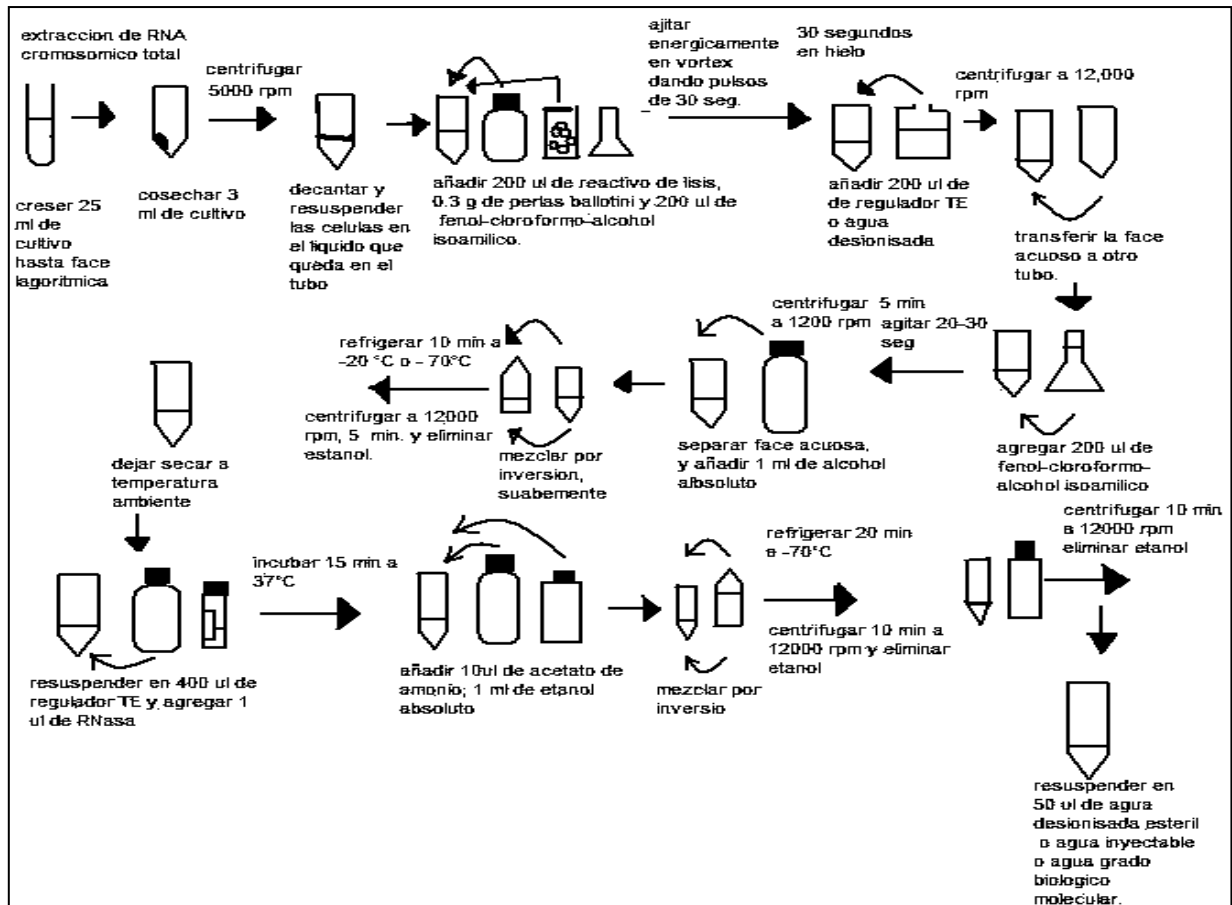


Figura 6. Extracción de RNA Ribosómico.

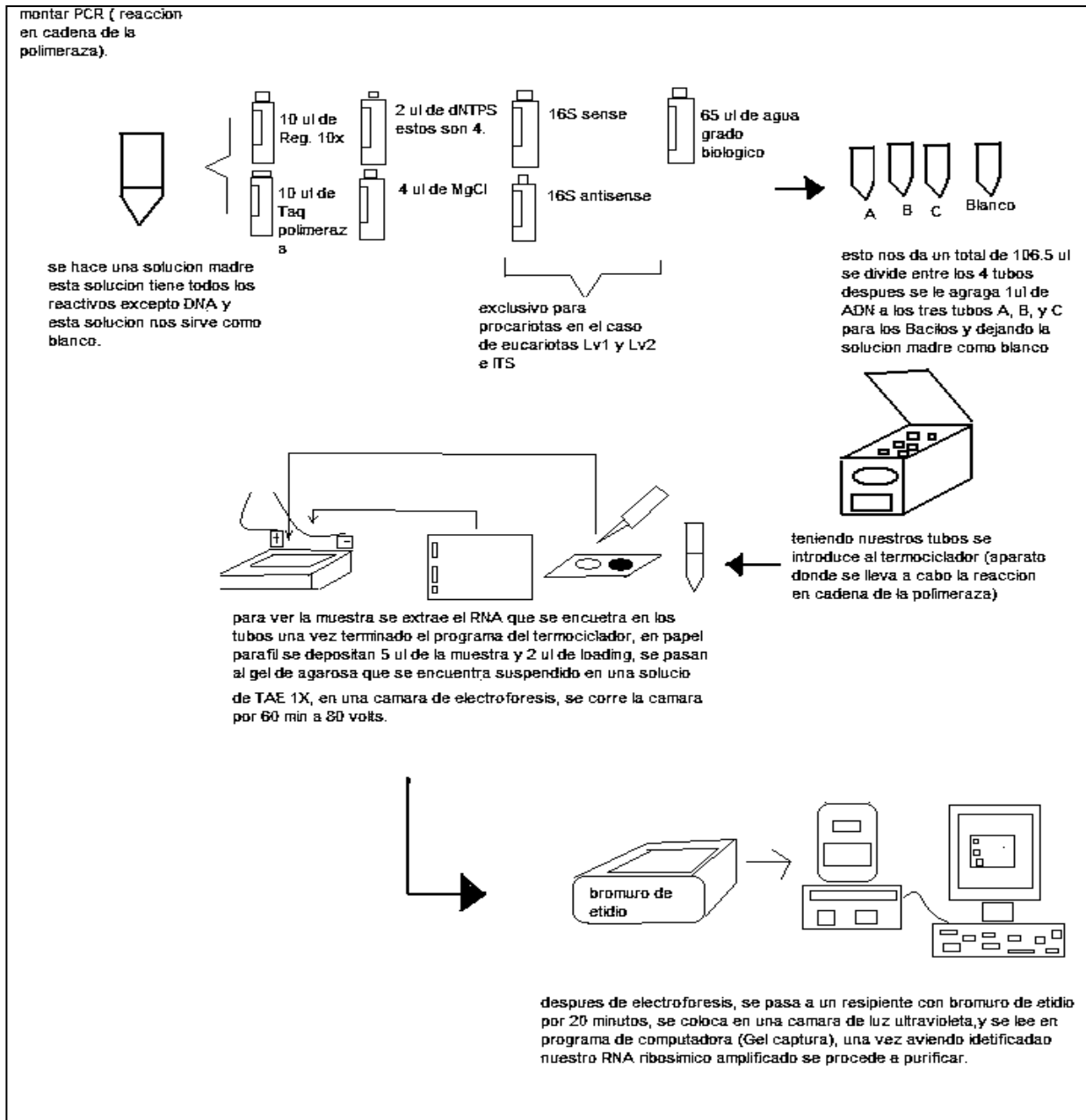


Figura 7. Amplificación por PCR para Obtener RNA Ribosómico Amplificado.

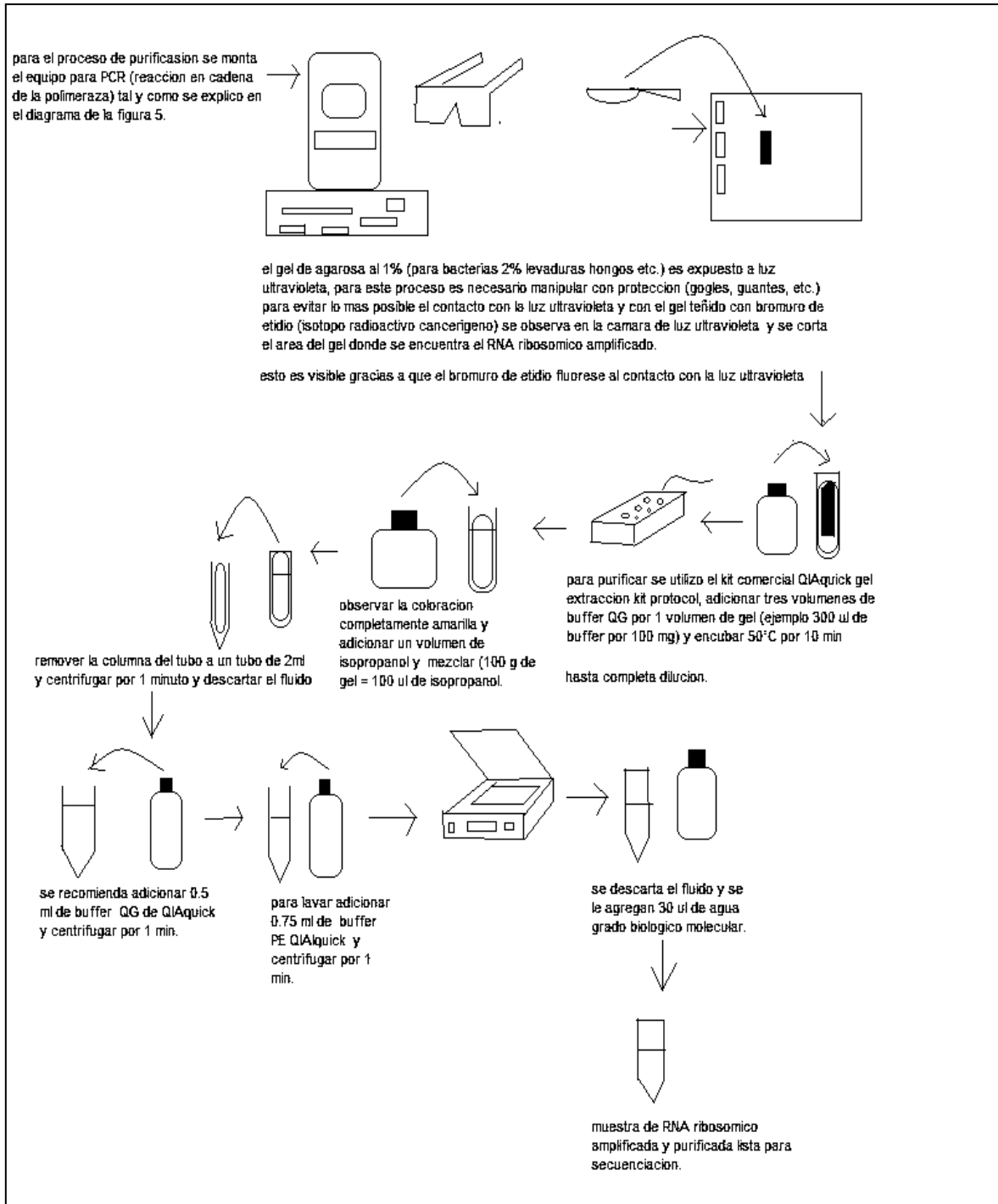


Figura 8. Purificación de la Muestra de RNA Ribosómico para la Secuenciación.



VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El principal objetivo de este trabajo consistió en la identificación microbiana de un consorcio de microorganismos presentes en una leche tipo búlgaro que se consume en una población del estado de Michoacán, México, conocida como La Calera.

1. IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA

Se usaron pruebas microscópicas, bioquímicas y genéticas para dicha identificación.

Para la observación microscópica se realizaron tres tinciones: Gram, Azul de Lactofenol y Azul de Metileno, y en las cuales se observó en repetidas ocasiones la simbiosis entre las distintas cepas aisladas de la muestra de leche de tipo búlgaro.

En la figura 9 podemos observar la tinción con azul de Lactofenol en la cual se demuestra la presencia de una red proteica en la cual a las orillas se observan bacilos formadores de cadenas. En la figura 10 podemos observar la presencia de levaduras con formas gemantes y algunos cúmulos de pequeños bacilos formadores de cadenas y con producción de esporas. En la figura 11 podemos observar la tinción simple con azul de metileno y en la cual se observa la presencia de levaduras con pseudo-micelios y con cúmulos de bacilos.

Las pruebas microscópicas nos permitieron identificar cuatro tipos de microorganismos: una levadura, y tres bacterias Gram (+).



Figura 9. Tinción Azul de Lactofenol. 40x.

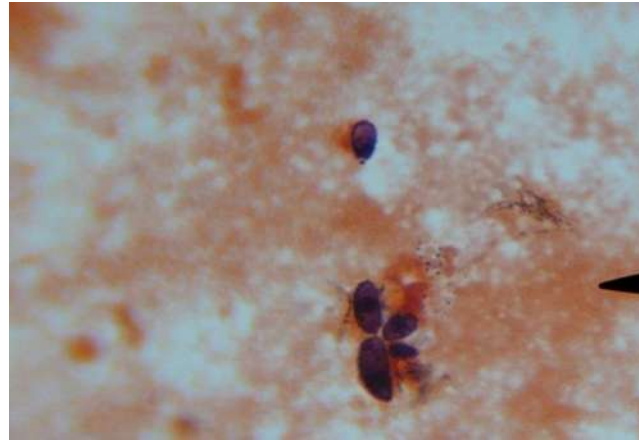


Figura 10. Tinción de Gram. 40x

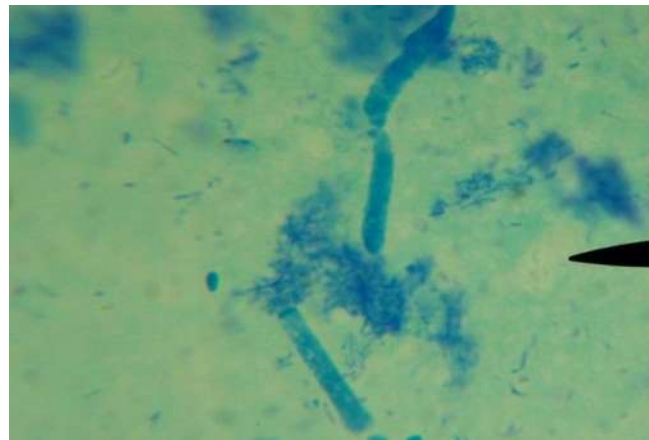


Figura 11. Tinción de Azul de Metileno 100x. Pruebas macroscópicas.

Las pruebas de morfología tipo macroscópicas involucran el uso de medios de cultivo y cajas Petri. En estas pruebas se observaron la forma de coliflor blanco gomoso del polímero producido por la levadura donde se encuentran en simbiosis las bacterias y la levadura.

2. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Posterior a la identificación microscópica, se procedió a realizar las pruebas bioquímicas.

Los microorganismos fueron inoculados en gelosas nutritivas con el objetivo de observar sus colonias y a partir de ahí, inocularlos en medios de cultivo selectivos para la identificación bioquímica y utilizando azúcares y diferentes sustratos.

Comparando los resultados de las pruebas bioquímicas con los datos descritos en el libro “Diagnostico Microbiológico” de Elmer W. Koneman, 2007, se identificaron 3 bacterias del géne-



ro *Bacillus* indicadas como A, B, C; y una levadura del género *Saccharomyces cerevisiae*, indicada como D.

2.1. BACTERIAS

En la tabla 4 se muestra un resumen de las pruebas bioquímicas para cada una de las tres bacterias aisladas del cultivo original.

Tabla 4. Resultado de las Pruebas Bioquímicas en Bacterias

SUSTRATO	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C
TSI	+	+	+
LIS	-	-	-
Citrato	-	-	-
Fenilalanina Desaminasa	-	-	-
Movilidad	-	-	-
Indol	-	-	-
Ornitina	-	-	-
Rojo de Metilo	-	-	-
Glucosa	+	+	+
Glicerol	(+) 50	(+) 50	(+) 50
Salicina	+	+	+
Lactosa	-	-	-
Xilosa	-	-	-
Manitol	+	+	+
Myoinositol	-	-	-
Maltosa	-	-	-
Fructosa	+	+	+
Manosa	-	-	-
Sacarosa	+	+	+
Dulcitol	-	-	-
Galactosa	-	-	-
Inositol	-	-	-
Levulosa	+	+	+
Arabinosa	-	-	-
Ramnosa	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Ribosa	+	+	+
Rafinosa	-	-	-
Arginina	-	-	-
Nitratos	-	-	-
Bilis-Esculina	-	-	-
Oxidasa	-	-	-
Catalasa	+	+	+
Trehalosa	-	-	-
Melibiosa	-	-	-
Hidrólisis de Almidón	+	+	+
Hidrólisis de Caseína	+	+	+
Leche Tornasolada	-	-	-



Voges-Proskauer	+	+	+
Hemólisis Sangre Carnero	(+) BETA	(+) BETA	(+) BETA
Hidrólisis de Gelatina	-	-	-
Gram	+	+	+

En base a la tabla anterior, el resultado final nos indica que las tres bacterias pertenecen al género *Bacillus*, pero no se pudo obtener la especie de las mismas utilizando este tipo de pruebas.

Los estudios taxonómicos moleculares del género *Bacillus* han demostrado su heterogeneidad; y no pueden ser considerados como una asociación de organismos, ya que la composición de bases de DNA de las especies varía desde un 30% a un 70% de GC. Lo que indica una considerable variación genética. Muchos bacilos producen enzimas hidrolíticas extracelulares que degradan polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos. Lo que permite a estos organismos usar dichos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones. (Moss, 1997).

El género *Bacillus* tiene gran importancia tanto industrial como alimenticia. Muchos bacilos producen antibióticos, entre los cuales se hallan la Bacitracina, la Polimixina, la Tirocidina, la Gramicina, y la Circulina. También en la industria alimenticia se usan para enriquecer los alimentos y desarrollar con ello alimentos funcionales, ya que estos microorganismos tienen función de probióticos; y de esta forma favorece el buen funcionamiento del intestino tanto en humanos como en animales. (Bourgeois *et al*, 1994).

2.2. LEVADURA

En la tabla 5 se muestra las pruebas bioquímicas para la levadura.

Tabla 5. Resultado de las Pruebas Bioquímicas en la Levadura

AZÚCARES FERMENTABLES	
Glucosa/Malta	+
Lactosa	-
Glucosa	+
Rafinosa	-
Sacarosa	-
Manitol	-
Fructosa	+
Galactosa	+
Inositol	-
Maltosa	-
Xilosa	-
Trehalosa	-
Melibiosa	-



En base a la tabla anterior, el resultado indica que la levadura corresponde a una *Saccharomyces cerevisiae*. Una de las pruebas concluyentes es la prueba de la melibiosa, la que dio negativa y es una característica de *Saccharomyces cerevisiae*, así como la morfología específica de esta levadura.

Las levaduras son hongos unicelulares y normalmente son células ovales o cilíndricas. Las células de las levaduras son mucho más grandes que las de las bacterias, y las levaduras normalmente prosperan en hábitad con abundante azúcar.

Las levaduras más importantes desde el punto de vista comercial son las cepas cerveceras y panaderas de las especies de *Saccharomyces cerevisiae*.

3. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

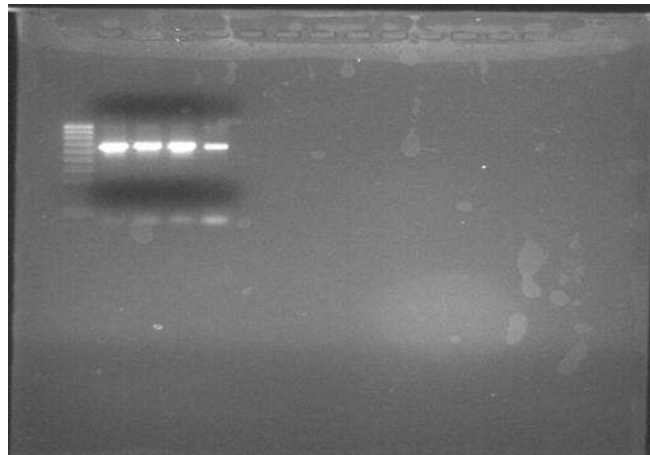


Figura 12. ADN Cromosómico total en gel de agarosa al 2%.

En la figura anterior se aprecia con bandas fluorescentes la presencia de ADN cromosómico total, lo cual se hizo para comprobar la existencia como tal del ADN en las células lisadas de los microorganismo, en el primer carril de izquierda a derecha se encuentra el marcador de 100 Kb este nos da un marco de referencia, en los siguientes carriles de izquierda a derecha, se indica la presencia de AND de los 4 microorganismos señalados como A, B, C (bacterias) y D (levadura).

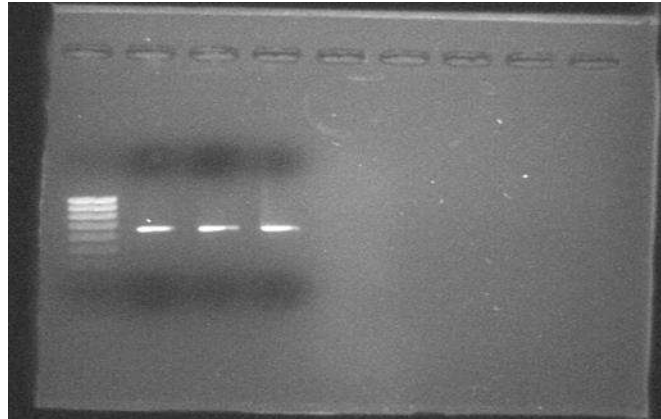


Figura 13. RNAr 16 S amplificado y Purificado en gel de agarosa al 1%.

En la figura 13 se aprecia la presencia de ARN ribosómico amplificado y purificado listo para ser secuenciado y alineado de las 3 bacterias; de izquierda a derecha en el primer carril se puede ver un marcador de 100 Kb. Esto nos indica que el RNA ribosómico de las bacterias que se amplificó tienen alrededor de 800 pares de bases.

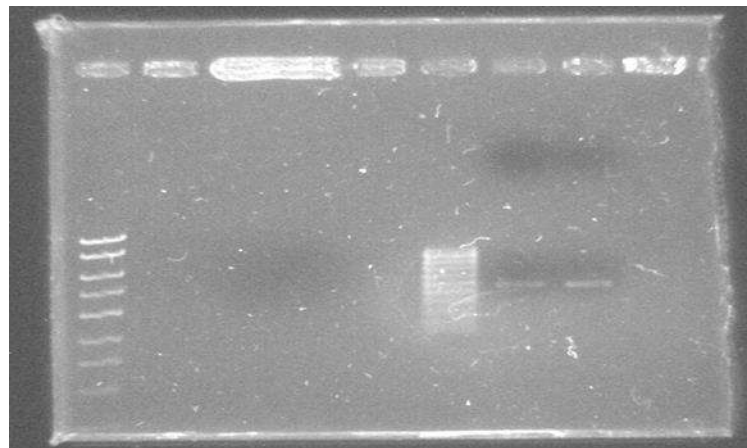


Figura 14. ITS amplificado y purificado en gel de agarosa al 2%.

En la figura 14 se puede ver la presencia de ARN ribosómico amplificado y purificado de la muestra D (levadura) para ITS (espaciador transcrito interno). Se aprecia la presencia de ARN ribosómico 18 S amplificado y purificado de la muestra D (levadura) de izquierda a derecha en el primer carril el marcados de 1000 Kb que nos indica que el RNA ribosómico de la levadura amplificada tiene alrededor de 1500 pares de bases

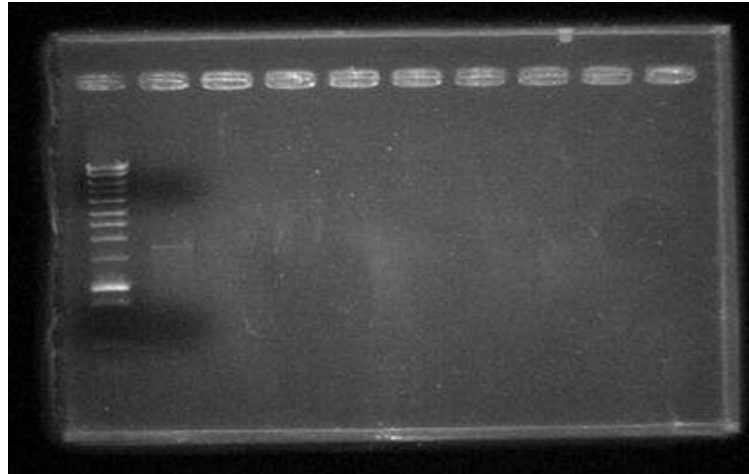


Figura 15. RNA r 18 S amplificado y purificado en gel de agarosa al 12 %.

.Se utilizaron dos marcadores de diferentes Kilo bases (Kb 100, Kb 1000) ya que como se sabe las células de las bacterias son más pequeñas que las de las levaduras.

Por cuestiones técnicas no se pudo realizar la secuenciación e identificación de los microorganismos por los sistemas computacionales. Queda pendiente este análisis.



VII. CONCLUSIONES

Identificación morfológica.- Podemos concluir gracias a la observación de la muestra en el microscopio y el conocimiento de la morfología de los microorganismos la existencia de una simbiosis entre bacterias lácticas y un tipo de levadura.

Identificación bioquímica.- Después de haber aislado los microorganismos existentes en la muestra del búlgaro se identificaron 3 tipos de bacterias marcadas como A, B y C. Acorde a la presencia de ciertas enzimas y metabolitos secundarios nos dio como resultado que las tres bacterias pertenecen al género *Bacillus*. Así mismo, se detectó la presencia de una levadura del genero *Saccharomyces cerevisiae*, y marcada como muestra D.

Identificación Genotípica.- Esta identificación consta de 3 partes: amplificación, secuenciación y alineación. Esta parte de la investigación quedó inconclusa pues se esperan los resultados de la secuenciación y alineación. Se lograron amplificar los RNA r 16s de los 4 microorganismos, moléculas donde se encuentra la información genética. Los resultados de estas pruebas nos darán la especie e incluso la subespecie de estos microorganismos.



VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Bekkali N., Bongers M., Van den Berg M., Olivia L. & Benninga M. 2007. El papel de una mezcla de probióticos en el tratamiento del estreñimiento infantil: un estudio piloto. *Diario de Nutrición*. 6:17.
- Bengmark S. & Gil A. 2006. Control bioecológico y nutricional de la enfermedad: prebióticos, probióticos y simbióticos. *Nutr. Hosp.* Vol. 21:2. 73-86.
- Bengmark S. & Ortiz de Urbina. 2005. Simbióticos: una nueva estrategia en el tratamiento de pacientes críticos. *Nutr. Hosp.* Vol. 20:2, 147-156.
- Bruce A. 2007. *Molecular Biology of the Cell*. 5ª Edición. Editorial Omega.
- Bruce Albert. 2004. *Biología molecular de la célula*. 4ta Edición, Barcelona, editorial Omega
- Burón I. & García R. Teresa. 1990. *Nuevos Productos Alimentarios. Diseño, Desarrollo, Lanzamiento y Mantenimiento en el Mercado*. Editorial AMV. Pág. 51.
- Carl Pallais, Nelly Pitteloud, Stephanie Seminar, NCBI, Isolated Gonadotropin-releasing Hormone (GnRH) Deficiency Overview, 2010.
- Castillo-Davis CI, Mekhedov SL, Hartl DL, Koonin EV, Kondrashov FA (August 2002). "Selection for short introns in highly expressed genes". *Nature Genetics*. 31 (4): 415-8.
- Chicharro L. 2006. Probióticos y prebióticos y simbióticos y helmintos gastrointestinales en las Enfermedades. *El Farmacéutico Hospitales*. 181: 6-13.
- Copertino DW, Hallick RB (1993). "Group II and group III introns of twin introns: potential relationships with nuclear pre-mRNA introns". *Trends Biochem. Sci*
- Déak, Larry R. Beuchat, D.W. Brooks, *Handbook of Food Spoilage Yeasts* (Hardback)
- Desroiser N. 1993. *Conservación de Alimentos*. Editorial Continental. 20ª Edición. Capítulo 7. 287-294.
- Desroiser N. 2001. *Elementos de Tecnología de Alimentos*. Editorial Continental. 1ª Edición. 419-420.
- Donaldson M. 2004. *Nutrición y Cáncer: Una revisión de la evidencia de una dieta anti-cáncer*. *Nutrition Journal*. pp. 3-19
- F. Michel, J. Feral, *Annual Reviews, Structure and Activities of Group II Introns*, 1995, Pags. 435-46.
- Gimeno C. 2004. *Alimentos prebióticos y probióticos*. *OFFARM*. Vol. 23.
- Greer CL, Peebles CL, Gegenheimer P, Abelson J (February 1983). "Mechanism of action of a yeast RNA ligase in tRNA splicing". *Cell* 537-46.



- Greer CL, Peebles CL, Gegenheimer P, Abelson J (February 1983). "Mechanism of action of a yeast RNA ligase in tRNA splicing". *Cell***32** (2): 537–46.
- Jeffares DC, Penkett CJ, Bähler J (August 2008). "Rapidly regulated genes are intron poor". *Trends in Genetics*.**24** (8): 375–8.
- JoklikWK, Willett HP, Amos DB, Wilgert CM. Editores, Zinsser. Microbiología. 1994. 20ª ed. BsAs. Panamericana.
- Koneman E., Allen S., Janda W., Schreckenber P. & Winn W. 2004. Bacilos aerobios Gram positivos. Diagnostico Microbiológico, Editorial Médica Panamericana. 5º edición. 631-635.
- Lenoir-Wijnkoop I., Sanders M., Cabana M., Esber C., Corthier G., Nada R., Sherman F., Timmerman H., Van Loo V., & Wolvers D. 2007. Influencia de probióticos y prebióticos más allá del tracto intestinal. *NutritionReviews*. 65:11. 469-89.
- Luque J. & Herráez A. 2000. Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, Técnicas y aplicaciones en la Salud. 1º edición. Editorial Harcourt. 65-69, 117-135.
- Madigan M., Martinko J., & Parker J. 2010. Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall. 8º edición. 606-627.
- Michel F, Ferat JL (1995). "Structure and activities of group II introns". *Annu. Rev. Biochem.* 435–61
- Organogenesis, Murine Homeobox Gene Control of Embryonic Patterning, Scindirect, Advances in Developmental Biology and Biochemistry, 2003, Pags. 1-250
- Potter N. 1998. La Ciencia de los Alimentos. Editorial Edutex. 2º edición. Capítulo 13. 379-431.
- Prescott, Harley, Klein. Microbiología. Mc Graw-Hill Interamericana de España. 4ª ed. 1999.
- Rodríguez S., Belén M, Mejías M., & Molina B. 2003. Alimentos funcionales y nutrición óptima: ¿Cerca o lejos? *Rev. Esp. Salud Publica*, Vol.77:3. 317-331
- Rodríguez-Trelles F, Tarrío R, Ayala FJ (2006). "Origins and evolution of spliceosomal introns". *Annu. Rev. Genet***40**: 47–76
- Roy SW, Gilbert W (March 2006). "The evolution of spliceosomal introns: patterns, puzzles and progress". *Nature Reviews Genetics***7** (3): 211–21.
- Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI, Guerra H. Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas.
- Schardt D. 2006. Las bacterias útiles. *Nutrition Action Health Letter*. Vol.10: 7-9.
- Singh R. & Heldman D. 1993. Introduction to Food Engineering. 2º Edition. 246.
- SOLTIS, D. & SOLTIS. 2004. *The origin and diversification of angiosperms*. *Am. J. of Botany* 91: 1614-1626



Stryer, Lubert; Berg, Jeremy Mark; Tymoczko, John L. (2007). *Biochemistry*. San Francisco. Editorial W.H. Freeman

Tortora, G.J. Derrickson, B. Principios de anatomía y fisiología. 11^a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2006.

Voet D., Voet J., & Pratt Ch. 2008. Fundamentos de Bioquímica. Editorial Panamericana, 2^o Edición. Capítulos 24-27.

William J. Israelsen, Matthew G. Vander Heiden, Cell, ATP Consumption Promotes Cancer Metabolism, 2010, Pags. 669-671.

Yen-Hsiang Wang, Kathy Y. wei, Christina D. Smolke, Annual Reviews, Synthetic Biology, 2012, Pags. 69-102.



IX. ANEXOS

1. MÉTODOS

1.1. PRUEBAS MICROSCÓPICAS

1.1.1. TINCIÓN DE GRAM

Reactivos:

- Solución A: 2 g de cristal violeta o violeta de metilo; 20 mL de etanol al 95%
- Solución B: 1 g de yodo; 2 g de yoduro de potasio; 300 mL de agua destilada.
- Solución C: 100 mL alcohol al 95%; 50 mL de acetona.
- Solución D: 2.5 g de safranina; 100 mL de etanol al 95%

Procedimiento de la tinción:

Previo a la preparación de los colorantes se debe realizar un frotis del microorganismo que se desea teñir, el cual se fija al aire y pasa por el mechero un par de veces. Una vez que se secó el frotis se agrega cristal violeta, violeta de genciana o violeta de metilo hasta cubrir el frotis durante un minuto, se lava brevemente con agua y se agrega el Iodo-Lugol durante un minuto y se lava a chorro de agua, después de esto se decolora con el alcohol-cetona hasta que se libera el colorante y se lava con agua, finalmente se le agrega la safranina o la fucsina básica durante un minuto y se lava con agua a chorro, se seca y se examina al microscopio.

Las bacterias Gram positivas se tornan de color violeta contrario y las bacterias Gram negativas se tiñen de rosa o rojo.

1.1.2. TINCIÓN LACTOFENOL

Se realizan las preparaciones a partir de cultivos. El fenol destruye la flora acompañante y organismos; el ácido láctico conserva las estructuras fúngicas y el azul algodón tiñe la quitina de las paredes fúngicas.

Procedimiento de la tinción:

Añadimos una gota de la muestra o una porción del hongo en un portaobjetos. Sobre ella colocamos una gota de azul algodón y ponemos el cubre. Observamos al microscopio.

1.1.3. TINCIÓN AZUL DE METILENO

Azul de metileno (Tinción positiva). Permite teñir el interior celular.



Tiñe microorganismos procariontes (vivos o muertos). Los eucariontes sólo se tiñen si están muertos. Algunas estructuras, como los corpúsculos meta cromáticos, se tiñen más intensamente con este colorante que el resto de la célula.

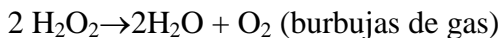
Procedimiento

Extensión: poner una gota de agua en el portaobjetos y extender en ella la muestra. Fijación: pasar el portaobjetos varias veces por encima de la llama del mechero de alcohol, sin permitir que llegue a hervir, hasta que se seque. Añadir Azul de metileno y esperar 2 minutos. Lavar con agua. Secar. Observar primero con el objetivo 40x; luego se añade aceite de inmersión y se observa con el objetivo 100x.

1.2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

1.2.1. PRUEBA DE LA CATALASA

La catalasa actúa según la siguiente reacción:



Procedimiento

Usando un aplicador de madera, transferir parte del centro de una colonia a la superficie de un portaobjetos de vidrio. Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 4% y observar la formación de burbujas que nos indica una prueba positiva.

1.2.2. PRUEBA DE LA OXIDASA

Reactivo:

- Discos comerciales para Oxidasa TAXO® marca BD BBL® para diagnóstico in vitro.

Procedimiento:

Se transfiere una pequeña cantidad del cultivo a un disco de papel filtro impregnado con el reactivo de Oxidasa con un aplicador de madera. La formación de un color púrpura dentro de los diez segundos posteriores indica que el ensayo es positivo. No se recomienda utilizar asas microbiológicas, ya que contienen alambre de cromo que generalmente dará reacciones falsas positivas.



1.2.3. PRUEBA DE VOGES–PROSKAUER

Para este ensayo se utiliza el medio de cultivo caldo RM/VP. El producto activo del medio es formado por el metabolismo bacteriano y es el acetil-metil-carbinol, y producto de la vía del butil-glicol.

Reactivos

- Solución A: 5 g de α -Naftol; 100 mL de alcohol absoluto.
- Solución B: 40 g de hidróxido de potasio; 100 mL de agua destilada.

Procedimiento:

Inocular el microorganismo a un tubo con caldo RM/VP e incubar 24 horas a 37°C. Finalizada la incubación, transferir 1 mL del caldo a un tubo de ensaye limpio. Agregar 0.6 ml de α -Naftol al 5%, seguidos de 0.2 mL de KOH al 40%. Es esencial seguir este orden. Agitar suavemente el tubo para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejar reposar el tubo durante 10 ó 15 minutos. Rojo de metilo, positivo color rojo, negativo color amarillo, Vogues-Proskauer, positivo, desarrolla un color rojo en pocos minutos después de una completa agitación del tubo.

Los resultados de la prueba no deben leerse más allá de una hora después de dejar los tubos en reposo ya que los microorganismos VP negativos pueden producir un color cobrizo que se puede interpretar como un falso positivo.

1.2.4. AGAR ROJO DE FENOL + AZÚCAR FERMENTABLE

Reactivos:

- 15 g de Caldo Rojo Fenol
- 13.5 g de Agar-agar
- 1 % del Azúcar fermentable
- 1 L de agua destilada con un pH final de 7.2 ± 0.2

Preparación:

Se suspenden los ingredientes en 1 L de agua destilada y se calientan hasta hervir a fuego lento. Se vierte en volúmenes de 3.5 ml en tubos de 13X100 con tapón de rosca y se esteriliza a 110°C por 5 minutos. Posterior a la esterilización se inclinan y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Dependiendo del azúcar utilizado sembrar microorganismos de referencia para efectos de control de calidad. Positivo cuando el viraje de color va de rojo-naranja a amarillo en presencia del ácido producido por la fermentación del azúcar.



1.2.5. AGAR ALMIDÓN

Reactivos:

- 23 g de agar nutritivo
- 10 g de almidón de papa soluble
- 1 L de agua destilada a pH final de 7.2 ± 0.1

Preparación:

Calentar para disolver el agar en 500 mL de agua. Disolver en 250 mL de agua el almidón. Combinar ambas soluciones y diluir a un litro. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Homogenizar y distribuir asépticamente en tubos estériles de 16X100 en volúmenes de 10 mL. Poner en plano inclinado y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Para la revelación de la hidrólisis del almidón se utiliza yodo-lugol, un vire en la coloración del medio a negro indica una prueba positiva.

1.2.6. AGAR ARGININA

Reactivos:

- 10.5 g de medio Moller DescarboxilasaBase.
- 1 % de arginina
- 13.5 g de agar-agar
- g de Purpura de bromocresol
- L de Agua destilada a pH final 6.8 – 7.0

Preparación:

Suspender los ingredientes en el agua destilada y calentar hasta ebullición. Distribuir en volúmenes de 4 mL en tubos de 13X100. Esterilizar a 121°C de 10 a 12 minutos, y dejar solidificar inclinando los tubos lo necesario para obtener una superficie de inclinada de 4 cm y una profundidad de 3 cm. Arginina deshidrolasa es un enzima que actúa sobre la L-arginina produciendo alcalinidad como resultado final, por lo tanto el indicador virará a rojo púrpura igual que en el caso de la detección de las descarboxilasas.

1.2.7. AGAR NITRATO

Reactivos:

- 25 g de caldo indol-nitrito
- 13.5 g de agar-agar



- 0.02 g de azul de bromotimol
- 1 L de agua destilada a pH final de 7.2 ± 0.1

Preparación:

Suspender los ingredientes en un litro de agua, mezclar y dejarlo reposar de 10 a 15 minutos. Agitar calentando con frecuencia y hervirlo durante un minuto, distribuir en tubos de 13X100 con tapón de rosca en volúmenes de 2.5 mL y esterilizar a 115°C durante 15 minutos, dejar enfriar en plano inclinado a temperatura ambiente. Algunas bacterias pueden usar nitratos como aceptor final de electrones en la respiración. El nitrato puede ser reducido a nitrito. Las Enterobacterias y las Pseudomonas son usualmente positivos. Las bacterias se inoculan en medios conteniendo nitrato potásico. El nitrito procedente de la reducción de células puede detectarse añadiendo alfa-naftilamina y ácido sulfanílico y produciéndose un color rosa-rojo.

1.2.8. GELATINA BACTERIOLÓGICA

Reactivos:

- 5 g de peptona de carne
- 5 g de extracto de carne
- 120 g de grenetina
- 1 L de agua destilada a pH final de 6.9 ± 0.1

Preparación:

Suspender los ingredientes en un litro de agua, mezclar y dejarlo reposar de 10 a 15 minutos para hidratar la grenetina. Agitar calentando con frecuencia y hervirlo durante un minuto, distribuir en tubos de 13X100 con tapón de rosca en volúmenes de 1.5 mL y esterilizar a 115°C durante 15 minutos. La mayoría de los polímeros son demasiado grandes para ser transportados dentro de las células. Las bacterias excretan enzimas extracelulares que hidrolizan esos polímeros transportando al interior de la célula en monómeros que les sirven para crecer. La producción de proteasas es evaluada por incorporación de una proteína (gelatina o caseína) en un medio sólido en placa. La placa se inunda con ácido que precipita la proteína no hidrolizada.

1.2.9. AGAR LECHE

Reactivos:

- 8 g de caldo nutritivo
- 25 g de leche descremada en polvo
- 15 g de agar-agar
- 1 L de agua destilada a pH final de 7.2 ± 0.2



Preparación:

Suspender el caldo nutritivo en 500 mL de agua destilada, reposar 15 minutos, hervir hasta dilución y esterilizar. Suspender la leche en polvo en 500 mL de agua, esterilizar. Mezclar las dos soluciones de forma aséptica y envasar en cajas Petri. Las proteasas son excretadas al medio para la degradación de proteínas, la caseína es la proteína de la leche que le confiere el color blanco, cuando la caseína es hidrolizada desaparece el color blanco alrededor del crecimiento microbiano.

1.2.10. REACTIVO DE KOVAC

Reactivos:

- 150 mL de Alcohol amílico ó Isoamílico puro
- 10 g de p-dimetil-amino-benzaldehído
- 50 mL de HCl concentrado

Preparación:

Mezclar los reactivos y envasar en goteros de 20 mL. Probar reactivos con cepas control en medios de cultivo específicos.

1.2.11. REACTIVO DE CLORURO FÉRRICO

Reactivos:

- 12 g de Cloruro férrico
- mL de HCl concentrado
- 100 mL de agua destilada

Aforar, mezclar y envasar en frascos con gotero de 20 mL. Probar reactivo con cepas control en medios de cultivo específicos.

1.2.12. REACTIVO DE ROJO DE METILO

Reactivos:

- 1 g de Rojo de metilo
- 300 mL de alcohol etílico al 95 %
- 200 mL de agua destilada

Disolver el rojo de metilo en el alcohol y posteriormente agregar el agua destilada, envasar en goteros de 20 mL. Probar reactivos con cepas control en medios de cultivo específicos.



1.2.13. PERÓXIDO DE HIDROGENO AL 3%

Reactivos:

- 3 mL de agua oxigenada con 11 volúmenes de oxígeno
- 100 mL de agua destilada

Aforar, mezclar y envasar en frascos con gotero de 20 mL. Probar reactivo con cepas control en medios de cultivo específicos.

1.3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE BACILLUS

En la siguiente tabla se presentan las características diferenciales de las especies de *Bacillus*, de acuerdo al libro de Diagnostico Microbiológico de Koneman y colaboradores del 2004.

Tabla 6. Identificación Bioquímica del Genero *Bacillus*.

	1	2	3	4	5	6	7
<i>B. anthraxis</i>	O	C, PC	-	+	-o LG+	-	F
<i>B. cereus</i>	ON	C,PC	-	+	V	+	-
<i>B. micoides</i>	ON	C,PC	-	+	V	+	-
<i>B. megaterium</i>	O,N	C,PC	V	+	V	-	-
<i>B. licheniformis</i>	O,N	C,PC	V	-	B	+	-
<i>B. subtilis</i>	O,N	C,CP	V	-	V	-	-
<i>B. firmus</i>	O,N	C,ST	+	-	V	-	F
<i>B. pumilis</i>	O,N	C,PC	+	-	V	-	-
<i>B. macerans</i>	O,S	ST,T	V	-	-	+	F
<i>B. polymyxa</i>	O,S	C,ST,T	+	-	V	+	F
<i>B. circulans</i>	O,S	C,ST,T	+	-	V	-	-
<i>B. stearothermophilus</i>	O,S	ST,T	+	V		-	F
<i>B. laterosporum</i>	O,S	C,CP	+	-	V	-	-
<i>B. alvei</i>	O,S	C,ST,T	+	-	V	-	F
<i>B. brevis</i>	O,S	C,ST,T	+	-	V	-	-
<i>B. sphearicus</i>	R,S	ST,T	+	V	V	-	OF
<i>B. coagulans</i>	O,N	ST,T	+	V	-	-	F
<i>B. thuringensis</i>	O,N	C,PC	+	+	B		-

1.- Morfología; 2. Localización; 3.- Movilidad; 4.- Bacilos con más de 1 μm de espesor; 5.- Acción sobre agar sangre; 6.- Lecitinasas; 7.- Gas a partir de glucosa (KONNEMAN *et al.*, 2008)

Tabla 7. Identificación Bioquímica del Genero *Bacillus* (Continuación)

	8	9	10	11	12	13	14
<i>B. anthraxis</i>	+	-	-	-	+	+	-
<i>B. cereus</i>	F	+	-	-	-	V	+
<i>B. micoides</i>							
<i>B. megaterium</i>	F	+	V	+	V	+	V
<i>B. licheniformis</i>	F	+	V	+	-	+	
<i>B. subtilis</i>	F	+	-	+	-	+	V
<i>B. firmus</i>	+	V	+	V	+	+	-
<i>B. pumilis</i>	F	+	-	+	-	+	-



<i>B. macerans</i>	+	V	+	+	+	+	+
<i>B. polymyxa</i>	+	+	V	+	+	+	+
<i>B. circulans</i>	F	+	+	+	+	+	+
<i>B. stearothermophilus</i>	+	-	-	V	+	+	+
<i>B. laterosporum</i>	F	+	-	+	-	-	+
<i>B. alvei</i>	+	-	-	-	+	+	+
<i>B. brevis</i>	OF	V	-	+	-	V	V
<i>B. sphearicus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. coagulans</i>	+	-	-	-	-	+	+
<i>B. thuringensis</i>	F	+	-	-	-	+	+

8.- Base de hidratos de carbono utilizados; 9.- Glucosa; 10.- Xilosa; 11.- Manitol; 12.- Lactosa; 13.- Sacarosa; 14.- Maltosa. (KONNEMAN *et al.*, 2008)

Tabla 8. Identificación Bioquímica del Genero *Bacillus*. (Continuación)

	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
<i>B. anthraxis</i>	-	-	+	-	V/A	-/v	V	+	V	+
<i>B. cereus</i>	V	V	V	V	-	V/A	-/V	V	+	V
<i>B. micoides</i>	V	V	V	V	-	V/A	-/V	V	+	V
<i>B. megaterium</i>	+	V	V	-	-	V/V	-/+	-	+	V
<i>B. licheniformis</i>	+	V	+	-	V/A	-/V	V	V	+	+
<i>B. subtilis</i>	+	V	V	-	V/A	-/V	V	+	+	+
<i>B. firmus</i>	V	-	V	-	V/V	-/V	-	V	V	+
<i>B. pumilis</i>	-	+	-	-	-	V/V	-/V	V	+	+
<i>B. macerans</i>	V	+	-	A/A	-/V	-	+	+	+	V
<i>B. polymyxa</i>	V	+	-	A/A	-/V	+	+	+	+	+
<i>B. circulans</i>	+	V	-	V	-	A/A	-/V	-	-	V
<i>B. stearothermophilus</i>	-	V	+	-	A/A	-/+	-	+	+	+
<i>B. laterosporum</i>	-	-	-	+	V	Alc/A	-/V	-	+	+
<i>B. alvei</i>	V	+	V	+	A/V	V/+	V	+	+	+
<i>B. brevis</i>	V	-	V	V	-	Acl/Acl	-/C	V	V	+
<i>B. sphearicus</i>	V	V	V	-	Acl/Acl	-/V	-	-	-	V
<i>B. coagulans</i>	-	-	-	-	A/A	-/+	+	-	-	+
<i>B. thuringensis</i>	-	-	(+D)	+	-	A/A	-/+	-	+	+

17.- Salicina; 18.- Hidrólisis de almidón; 19.- Desarrollo en caldo nutritivo con 6% de NaCl; 20.- agar urea de Christensen; 21.- Reducción de nitritos; 22.- Indol; 23.- TSI; 24.- VP; 25.- Hidrolisis de gelatina; 26.- hidrólisis de esculina; 27.- Desarrollo a 42°C (KONNEMAN *et al.*, 2008)

1.4. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA PARA LEVADURAS

Tabla 9. Identificación Bioquímica de Levaduras.

SUSTRATO	LEVADURA
Producción de ureasa	Positivo: <i>Cryptococcus infirmominiatum</i> , Negativo: <i>Sporobolomyces roseus</i>
Colonia de tonos rojos	Positivo: <i>Cryptococcus infirmominiatum</i> , Negativo: <i>Sporobolomyces roseus</i>
Asimilación de nitrato	Positivo: <i>Cryptococcus infirmominiatum</i> Negativo: <i>Sporobolomyces roseus</i>
Asimilación de inositol	Positivo: <i>Cryptococcus infirmominiatum</i> Negativo: <i>Sporobolomyces roseus</i>



Asimilación de galactosa	Positivo: <i>Rhodotondaglutinis</i> , Negativo: <i>Sporobolomycesroseu</i>
Asimilación de rafinosa	Positivo: <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , Negativo: <i>Rhodotorula minuta</i>
Asimilación de maltosa	Positivo: <i>Trichosporonpullulans</i> Negativo: <i>Yarrowialipolytica</i>
Formación de artroconidios	Positivo: <i>Trichosporonpullulans</i> Negativo: <i>Cryptococcuslaurentii</i>
Formación de hifas verdaderas	Positivo: <i>Trichosporonpullulan</i> Negativo: <i>Schizosaccharomycesoctosporus</i>
Asimilación de nitrato	Positivo: <i>Trichosporonpullulans</i> , Negativo: <i>Trichosporon moniliforme</i>
Asimilación de rafinosa	Positivo: <i>Schizosaccharomycespombe</i> , Negativo: <i>Schizosaccharomycesoctosporus</i>
Asimilación de nitrato	Positivo: <i>Cryptococcusalbidus</i> Negativo: <i>Cryptococcuslaurentii</i>
Formación de pseudomicelio	Positivo: <i>Cryptococcushumicolus</i> , Negativo: <i>Cryptococcuslaurentii</i>
Asimilación de eritritol	Positivo: <i>Pichiaanomala</i> , Negativo: <i>Candidainconspicua</i>
Asimilación de nitrato	Positivo: <i>Pichiaanomala</i> Negativo: <i>Candidacantarelli</i>
Asimilación de maltosa	Positivo: <i>Pichiaburtonii</i> Negativo: <i>Candidaboidinii</i>
Asimilación de galactosa:	Positivo: <i>Pichiaanomala</i> , Negativo: <i>Pichiasubpelliculosa</i>
Asimilación de maltosa	Positivo: <i>Pichiaburtonii</i> Negativo: <i>Saccharomycesfibuligera</i>
Asimilación de rafinosa	Positivo: <i>Debaryomycespolymorphus</i> Negativo: <i>Debaryomyceshansenii</i>
Asimilación de galactosa	Positivo: <i>Pichia farinosa</i> , Negativo: <i>Candidacantarelli</i>
Asimilación de nitrato:	Positivo: <i>Dekkera anómala</i> Negativo: <i>Dekkerabruxellensis</i>
Crecimiento con 1% de ácido acético	Positivo: <i>Dekkeraanomala</i> Negativo: <i>Dekkerabruxellensis</i>
Formación de hifas verdaderas	Positivo: <i>Dekkeraanomala</i> , Negativo: <i>Dekkerabruxellensis</i>
Fermentación de glucosa	Positivo: <i>Pichiacanadensis</i> Negativo: <i>Candidalactiscondensi</i>
Asimilación de maltosa	Positivo: <i>Pichiacanadensis</i> , Negativo: <i>Wickerhamielladomerquiai</i>
Asimilación de maltosa	Positivo: <i>Candidaversatilis</i> Negativo: <i>Candidalactiscondensi</i>
Asimilación de galactosa	Positivo: <i>Candidaversatilis</i> Negativo: <i>Cyteromycesmatritensis</i>
Asimilación de trehalosa	Positivo: <i>Candidaversatilis</i> , Negativo: <i>Candidaetchellsii</i>
Asimilación de celobiosa	Positivo: <i>Pichiajadinii</i> , Negativo: <i>Cyteromycesmatritensis</i>
Asimilación de manitol	Positivo: <i>Candidamagnoliae</i> , Negativo: <i>Candidalactiscondensi</i>
Asimilación de galactosa	Positivo: <i>Candidamagnoliae</i> , Negativo: <i>Candidanorvegica</i>
Asimilación de celobiosa	Positivo: <i>Dekkera anómala</i> Negativo: <i>Candidainconspicua</i>



Asimilación de manitol	Positivo: <i>Candida magnoliae</i> Negativo: <i>Candida lactis condensans</i>
Asimilación de galactosa	Positivo: <i>Candida magnoliae</i> , Negativo: <i>Candida norvegica</i>
Asimilación de celobiosa	Positivo: <i>Dekkera anomala</i> Negativo: <i>Dekkera bruxellensis</i>
Células con brotación bipolar	Positivo: <i>Saccharomyces ludwigii</i> Negativo: <i>Hanseniaspora varum</i>
Células grandes	Positivo: <i>Saccharomyces ludwigii</i> , Negativo: <i>Hanseniaspora varum</i>
Asimilación de rafinosa	Positivo: <i>Pichia ohmeri</i> , Negativo: <i>Candida sake</i>
Asimilación de maltosa	Positivo: <i>Pichia ohmeri</i> Negativo: <i>Kluyveromyces marxianus</i>
Formación de hifas	Positivo: <i>Pichia ohmeri</i> Negativo: <i>Debaryomyces hansenii</i>
Formación de película	Positivo: <i>Pichia ohmeri</i> Negativo: <i>Pichiaguilliermondii</i>
Crecimiento a 37°C	Positivo: <i>Pichia ohmeri</i> , Negativo: <i>Candida intermedia</i>
Formación de hifas verdaderas	Positivo: <i>Zygosaccharomyces hellenicus</i> , Negativo: <i>Pichiaguilliermondii</i>
Fermentación de glucosa	Positivo: <i>Zygosaccharomyces fermentati</i> , Negativo: <i>Debaryomyces hansenii</i>
Asimilación de trehalosa	Positivo: <i>Kluyveromyces lactis</i> , Negativo: <i>Kluyveromyces marxianus</i>
Crecimiento a 37°C	Positivo: <i>Candida tropicalis</i> Negativo: <i>Candida sake</i>
Pseudomicelio	Positivo: <i>Candida tropicalis</i> , Negativo: <i>Debaryomyces hansenii</i>
Colonia con tonos rojizos	Positivo: <i>Metschnikowia pulcherrima</i> , Negativo: <i>Candida sake</i>
Asimilación de manitol:	Positivo: <i>Zygosaccharomyces</i> Negativo: <i>Candida inconspicua</i>
Fermentación energética de glucosa	Positivo: <i>Zygosaccharomyces microellipsoideus</i> Negativo: <i>Candida vini</i>
Presencia de células en conjugación	Positivo: <i>Zygosaccharomyces microellipsoideus</i> Negativo: <i>Candida apicola</i>
Asimilación de rafinosa	Positivo: <i>Zygosaccharomyces microellipsoideus</i> , Negativo: <i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
Asimilación de maltosa	Positivo: <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> Negativo: <i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
Células grandes	Positivo: <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , Negativo: <i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
Formación de pseudomicelio	Positivo: <i>Kluyveromyces marxianus</i> Negativo: <i>Candida apicola</i>
Crecimiento a 37°C	Positivo: <i>Kluyveromyces marxianus</i> Negativo: <i>Lodderomyces elongisporus</i>



Asimilación de rafínosa	Positivo: <i>Kluyveromycesmarxianus</i> Negativo: <i>Lodderomyceselongisporus</i>
Formación de tubos germinativos	Positivo: <i>Candidaalbicans</i> , Negativo: <i>Lodderomyceselongisporus</i>
Asimilación de trehalosa	Positivo: <i>Kluyveromycesthermotderans</i> Negativo: <i>Torulasporadelbrueckii</i>
Asimilación de maltosa	Positivo: <i>Kluyveromycesthermotderans</i> , Negativo: <i>Torulasporadelbrueckii</i>
Formación de arthroconidios	Positivo: <i>Galactomycesgeotrichum</i> Negativo: <i>Candidavini</i>
Crecimiento a 37°C	Positivo: <i>Candidacatenulata</i> Negativo: <i>Candidavini</i>
Asimilación de maltosa	Positivo: <i>Candidacatenulata</i> , Negativo: <i>Candida rugosa</i>
Asimilación de trehalosa	Positivo: <i>Candidazeylanoides</i> , Negativo: <i>Candidavini</i>
Células grandes (> 5m)	Positivo: <i>Saccharomycespastorianus</i> Negativo: <i>Pichiamembranaefaciens</i>
Asimilación de galactosa	Positivo: <i>Saccharomycespastorianus</i> Negativo: <i>Saccharomycescerevisiae</i>
Asimilación de melibiosa	Positivo: <i>Saccharomycespastorianus</i> , Negativo: <i>Saccharomycescerevisiae</i>
Presencia de células en conjugación	Positivo: <i>Zygosaccharomycesmicroellipsoideus</i> Negativo: <i>Candidainconspicua</i>
Asimilación de rafínosa	Positivo: <i>Zygosaccharomycesmicroellipsoideus</i> , Negativo: <i>Zygosaccharomycesbisporus</i>
Asimilación de rafínosa	Positivo: <i>Saccharomyceskluyveri</i> , Negativo: <i>Candidainconspicua</i>
Asimilación de trehalosa	Positivo: <i>Saccharomyceskluyveri</i> Negativo: <i>Candidastellata</i>
Asimilación de maltosa	Positivo: <i>Saccharomyceskluyveri</i> , Negativo: <i>Saccharomycesexiguus</i>
Formación de pseudomicelio	Positivo: <i>Pichiafermentans</i> Negativo: <i>Candidainconspicua</i>
Crecimiento a 37°C	Positivo: <i>Pichiafermentans</i> Negativo: <i>Pichiamembranaefaciens</i>
Asimilación de xilosa	Positivo: <i>Pichiafermentans</i> Negativo: <i>Issatchenkiaorientalis</i>
Crecimiento en medio sin vitaminas	Positivo: <i>Issatchenkiaorientalis</i> , Negativo: <i>Issatchenkiaorientalis</i>
Asimilación de trehalosa	Positivo: <i>Candidaglabrata</i> , Negativo: <i>Candidainconspicua</i>