

## CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN GANADO JERSEY DE TIERRAS ALTAS<sup>1</sup>

**Melvys Jacqueline Vega-Quintero<sup>2</sup>; Rosa Itzela Quintero-Montenegro<sup>3</sup>;**

**Howard Junca<sup>4</sup>**

### RESUMEN

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son microorganismos unicelulares procariotas responsables del proceso de fermentación de los alimentos como: leche, carnes y vegetales, es decir, degradan carbohidratos y producen ácido láctico. La composición de bacterias del ácido láctico en la leche, constituyen factores importantes en la elaboración industrial de productos lácteos de alta calidad. La diversidad de bacterias del ácido láctico presentes en la leche de la raza vacuna Jersey, supone indicadores biológicos de los procesos de fermentación láctica, para la fabricación de leche fermentada, quesos, yogurt y otros productos derivados de la leche. El tipo de especie bacteriana utilizado como iniciador en el proceso de fermentación, refiere un factor determinante en la calidad y características sensoriales del producto final. El objetivo es determinar las características fenotípicas y genotípicas de las bacterias del ácido láctico en la leche de ganado Jersey. La raza Jersey es un ganado vacuno británico introducido en las Tierras Altas de Chiriquí, cuyo potencial como fuentes de producción de leche en Panamá, específicamente en el área de estudio, es de gran interés en el desarrollo socioeconómico y es valorada como una raza de lechería en la actividad ganadera. El alcance de la investigación está enmarcado en la identificación de las bacterias del ácido láctico por métodos moleculares y actividad enzimática. Como hallazgo se plantea la diversidad biológica de *Streptococcus*, *Streptobacillus* y *Bifidobacterium* identificada en la leche del ganado Jersey, con actividad enzimática de 2% heterofermentativa y 92% homofermentativa, las cuales revelan beneficios para la fabricación de lácteos.

**Palabras clave:** Bacterias ácido lácticas, fenotipo, fermentación, genotípico, indicadores biológicos.

<sup>1</sup>Recepción: 09 de febrero de 2024. Aceptación: 06 de marzo de 2024. Tesis de Doctorado en Ingeniería de Proyectos, Universidad Tecnológica de Panamá, Facultad de Ciencias y Tecnología.

<sup>2</sup>Universidad Tecnológica de Panamá, Facultad de Ciencias y Tecnología. e-mail: [melvys.vega@utp.ac.pa](mailto:melvys.vega@utp.ac.pa) / [melvysjv@hotmail.com](mailto:melvysjv@hotmail.com); ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4303-4994>

<sup>3</sup>Universidad Tecnológica de Panamá, Facultad de Ciencias y Tecnología. e-mail: [rosa.quintero@utp.ac.pa](mailto:rosa.quintero@utp.ac.pa); ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-1342-932>

<sup>4</sup>Microbiomas Foundation, Colombia. e-mail: [info@howardjunca.com](mailto:info@howardjunca.com)



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN JERSEY CATTLE MILK FROM TIERRAS ALTAS DISTRICT

### ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are unicellular prokaryotic microorganisms responsible for the fermentation process of foods such as: milk, meat and vegetables, that is, they degrade carbohydrates and produce lactic acid. The composition of lactic acid bacteria in milk are important factors in the industrial production of high-quality dairy products. The diversity of lactic acid bacteria present in the milk of the Jersey cattle breed is biological indicators of the lactic acid fermentation processes for the manufacture of fermented milk, cheese, yogurt and other products derived from milk. The type of bacterial species used as initiator in the fermentation process is a determining factor in the quality and sensory characteristics of the final product. The objective is to determine the phenotypic and genotypic characteristics of lactic acid bacteria in the milk of Jersey cattle. The Jersey breed is a British cattle breed introduced in the Chiriquí Highlands, whose potential as sources of milk production in Panama, specifically in the Chiriquí Highlands, is of great interest in socio-economic development and is valued as a dairy breed in livestock activity. The scope of the research is framed in the identification of lactic acid bacteria by molecular methods and enzymatic activity. As a finding, the biological diversity of *Streptococcus*, *Streptobacillus* and *Bifidobacterium* identified in the milk of Jersey cattle is proposed, with enzymatic activity of 2% heterofermentative and 92% homofermentative, which reveal benefits for the manufacture of dairy products.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, phenotype, fermentation, genotypic, biological indicators.

### INTRODUCCIÓN

La investigación se fundamenta en la identificación y análisis de la diversidad biológica de las bacterias del ácido láctico presentes en la leche entera de la raza de ganado vacuno Jersey, en el distrito de Tierras Altas de la provincia de Chiriquí, República de Panamá. El objetivo del proyecto es evaluar la composición de bacterias del ácido láctico en la leche entera de la raza Jersey como potencial para la producción de derivados lácteos probióticos de calidad en la industria láctea. El aporte de la investigación al conocimiento sobre la composición microbiológica de la leche entera de la raza Jersey, radica en la identificación de la diversidad de especies de bacterias ácido láctico, para la fermentación y generación de nuevos modelos de procesos lácteos en la industria. El ganado vacuno



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Jersey, es una raza británica (Isla Jersey) productora de leche y carne, con mejor composición nutricional y propiedades químicas a diferencia de las razas Guernsey, Suizo Pardo, Ayrshire y Holstein, de acuerdo con el análisis comparativo (Vega y Quintero, 2023) y según las referencias aportadas por De los Reyes et al. (2010).

Las bacterias del ácido láctico, lácticas o lacto-bacterias, son microorganismos unicelulares procariontes, es decir, organismos constituidos por una sola célula, cuyo núcleo no está definido o delimitado por una membrana nuclear (Ville, 1996). Se presentan en tres formas: esféricas denominadas cocos, cilíndrica denominados bacilos y cilíndrica divididas en dos partes en sus extremos denominadas bífidas. Las bacterias lácticas con formas esféricas y cilíndricas se presentan en agrupaciones en cadenas, las cuales se denominan Streptococos y Streptobacilos, respectivamente (Carroll et al., 2016).

Además, las bacterias lácticas no requieren de oxígeno para los procesos metabólicos (respiración), por lo que, las identifica anaeróbicas. La respiración celular se realiza, a través, de la ruta metabólica anaeróbica conocida como fermentación láctea o fermentación del ácido láctico, el cual ocurre en el citosol de la célula y en el que se oxida parcialmente la glucosa para obtener energía y el producto de desecho es el ácido láctico (Madigan y Martiniko, 2009).

También, pueden ser identificadas en cepas de bacilos, cepas de cocos o cepas de bacilos bífidas y son reconocidas como Gram positivas (+) por la coloración púrpura (azul intenso o morado) de acuerdo con la tinción diferencial de Gram (Ramírez-López y Vélez-Ruíz, 2016). López-Jácome et al. (2014) indica que las bacterias Gram (+) retienen el cristal violeta después de la decoloración, debido a que tienen pared celular gruesa, de allí el color que las identifica. Ramírez-López y Vélez-Ruíz (2016) afirman que fisiológicamente las bacterias del ácido láctico pueden generar la fermentación homoláctica o heteroláctica y procesos enzimáticos de oxidasa y catalasa negativa.

En la industria, las bacterias lácticas son importantes en procesos de producción de quesos, yogurt, mantequilla, leche fermentada, vinagre, vinos, embutidos, vegetales



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

encurtidos, en la fabricación de medicamentos, cosméticos y de otros productos químicos, así como en el tratamiento de las aguas residuales (Madigan y Martiniko, 2009).

Las leches fermentadas son productos preparados a partir de la leche entera, parcial o totalmente descremada, concentrada o bien sustituida, total o parcialmente con leche descremada en polvo, pasteurizada o esterilizada y fermentada por medio de microorganismos específicos, siendo las principales las bacterias lácticas (García et al., 2010). Cuando las fermentaciones de la leche son realizadas por las bacterias lácticas se producen metabolitos como el ácido láctico, etanol, bacteriocinas y muchos otros compuestos que conservan la leche y le imparten características organolépticas distintivas (Shirai et al., 1996).

Las bacterias lácticas son un grupo de microorganismos probióticos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Su clasificación está basada en la morfología, modo de fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas), el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido y la habilidad para crecer en medios altamente alcalinos o ácidos. Describe que la función de géneros de bacterias lácticas y otros microorganismos como probióticos, determinan las propiedades de las bacterias para la conservación y desarrollo de las características sensoriales de los alimentos como el olor, sabor, textura y calidad nutritiva. Además, que las principales aplicaciones de la bacteria lácticas se producen en la elaboración de las leches fermentadas y diversas variedades de quesos (Ramírez et al., 2011).

Para el estudio de la identificación y la genética de los microorganismos, Hernández, (2003) refiere algunas técnicas de biología molecular, entre las cuáles menciona la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), electroforesis de ácidos nucleicos y proteínas, secuenciación de DNA clonación de fragmentos de DNA. En microbiología permiten la detección de fragmentos de ácidos nucleicos (DNA o RNA) que son específicos de cada microorganismo, en diferentes materiales o muestras. Además, permiten la identificación de la especie bacteriana (Stambouljan, 2019).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

El aislamiento, identificación y caracterización de grupos de bacterias lácticas en una muestra de queso venezolano ahumado andino artesanal realizado por Alvarado et al. (2007), se identificó tres géneros de bacterias *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. Además, se describieron la morfología de las cepas y se observó la actividad metabólica como cultivos iniciadores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ÁREA DE ESTUDIO

La zona de estudio la constituye el distrito de Tierras Altas, el cual se localiza en la provincia de Chiriquí, República de Panamá, en la Cuenca Hidrográfica No. 102 denominada Chiriquí Viejo - Cuenca Alta (Figura 1). Está conformada por los corregimientos de Volcán, Cerro Punta, Cuesta de Piedra, Nueva California y Paso Ancho. Se caracteriza por su zona de vida bosque muy húmedo con 43,26% de la superficie y bosque húmedo tropical con 15,93%. Comprende clima oceánico de montaña y clima tropical de montaña media y alta. Los suelos de textura mimosa, color chocolate oscuro, formas irregulares con alta permeabilidad. La precipitación media anual de la cuenca es de 3,322 mm (Autoridad Nacional del Ambiente [ANAM], 2014).

Se realizó inspección en la zona de estudio, se tomaron datos de campo a través de observaciones *in situ*, sobre las características de las fuentes de extracción leche de ganado Jersey. También, se recopiló la información sobre las características biogeográficas del área de estudio con un equipo Garmin GPSMAP 66i. Se elaboró la cartografía del área de estudio a través de *Sistema de Información Geográfica* (SIG), cuyos datos fueron tomados en campo.

Se seleccionaron seis sitios de muestreos (fincas Grado A), en el corregimiento de Volcán, distrito de las Tierra Altas. En cada sitio se realizó un muestreo en frecuencia de 15 días por período de dos meses (diciembre a enero). En total se tomaron 24 muestras, cada muestra fue compuesta tomada de tercer chorro de la ubre de una vaca Jersey, previa desinfección, a través de equipo de ordeño instalado en los cuatro pezones. La vaca Jersey seleccionada como ejemplar en cada finca fue rotulada en la oreja con un dispositivo, para



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

la identificación en los subsiguientes muestreos. Las muestras fueron preservadas en envases esterilizados y en etanol absoluto en proporción de 4:9. Se aplicaron pruebas microbiológicas a cada muestra, las cuales se realizaron en el laboratorio microbiológico del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA), Universidad Tecnológica de Panamá y Laboratorio Microbiomas Foundation, Colombia. El análisis de datos se realizó con software especializado en estadística *Statistical Package for the Social Science-SPSS, 2017* y por comparación genética microbiana (Lozupone et al., 2011).



**Figura 1. Distrito de Tierras Altas en la cuenca hidrográfica del río Chiriquí Viejo con base en datos recolectados en campo y procesados en Sistema de Información Geográfica (SIG), 2018. Instituto Geociencias, Universidad de Panamá.**



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Las pruebas microbiológicas realizadas fueron las siguientes:

### **1. Determinación de las características fenotípicas de las bacterias del ácido láctico.**

- Aislamiento, purificación y preservación de las bacterias del ácido láctico: Este proceso implica la obtención de colonias bacterianas del ácido láctico puras y libres de contaminantes. Las bacterias del ácido láctico de 24 muestras se aislaron a través del método de siembra con asada en medio de cultivo de agar triptona soja (TSA), incubada a 38° C por 24 horas. La purificación se realizó mediante la técnica de Baird Parker incubada a la misma temperatura y tiempo. La preservación de las colonias de bacterias del ácido láctico se realizó en caldo luria (luria Bertani) incubada a 35° C por 24 horas (Acevedo et al., 2013).
- Identificación morfológica y agrupación de las bacterias del ácido láctico: Se emplearon técnicas de frotis, fijación y tinción diferencial para la identificación de bacterias Gram positivas y negativas (Aquiahuati-Ramos et al., 2012). Las placas de bacterias del ácido láctico obtenidas fueron observadas en el microscopio Nikon Eclipse E200, con magnificación de 40x, 100x, 400x y 1000x (Nikon Company, 2016).
- Identificación de cepas y recuento de colonias: El método empleado permitió el conteo preciso de células de bacterias del ácido láctico. Se realizó mediante el método de tinción de las bacterias con fluorescente naranja acridina e iluminación a longitud de onda determinada, cuyas señales fluorescentes emitidas por las bacterias fueron recogidas por un foto-detector. El conteo se realizó automáticamente en el microscopio (Heer, 2007).
- Determinación de la oxidasa y catalasa: Para detectar la enzima oxidasa, se empleó la prueba de oxidasa a través de un método directo, el cual activa la reacción enzimática del sistema citocromo oxidasa para la identificación de bacterias patógenas como la *Neisseria* (+) y la *Pseudomonas*, que suponen contaminantes de la leche. Para esta prueba se utilizó cultivo bacteriano de las muestras de leche y la solución acuosa de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (reactivo de Kovacs) al 1%, el cual tiñe las colonias oxidasa positiva de color lavanda que degrada a púrpura, ante la presencia de las bacterias indicadas. Para la detección de la enzima catalasa se aplicó la prueba de catalasa. Esta



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

enzima se encuentra en las bacterias patógenas *Streptococcus* y cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, lo que supone contaminación bacteriana de la leche. Se utilizó el peróxido de hidrógeno al 30% y cultivo bacteriano de las muestras de leche (Fernández et al., 2010).

- **Determinación de la actividad enzimática:** Mediante la siembra por estrías en medio de cultivo M5, se determinaron las cepas como homolácticas o heterolácticas (elaborado con un monosacárido denominado fructuosa como fuente de carbono), incubadas a 35° C. Se consideran homolácticas cuando el medio cambia a color verdoso y heteroláctica cuando no hay cambio de color (celeste) (Zuñiga et al., 1993).

Los cultivos fueron observados en Estereoscopio Binocular SFX-33 OPTIKA.

- **Determinación de la cinética de crecimiento de las bacterias del ácido:** El estudio del comportamiento de crecimiento poblacional de las cepas de bacterias del ácido láctico se llevó a cabo a través de este procedimiento. Se inoculó 100 ml de leche al 100% concentrada pasteurizada con 1 ml de agua peptonada preparada con  $10^3$  UFC/ml de la cepa de bacterias del ácido láctico a analizar. Para evaluar el recuento ( $\log_{10}$  UFC  $g^{-1}$ ) en función del tiempo, se tomaron muestras de la anterior preparación, se inocularon en agar MRS y M17, *Lactobacillus* y *Lactococcus*, respectivamente. La incubación se realizó a 34° C por 8, 16, 24, 32, 48, 56, 64 y 72 horas. El conteo se realizó mediante observaciones macroscópicas, cámara de Neubauer y luego se elaboró la curva de crecimiento bacteriano (Ramírez-López y Vélez-Ruíz, 2016). Los cálculos paramétricos de crecimiento de las bacterias del ácido láctico se realizaron mediante el método propuesto por (Infansón y Rojas, 2016).

- **Determinación del antagonismo cruzado de las bacterias del ácido láctico:** Este proceso implicó la identificación de cepas compatibles para su aplicación potencial en la iniciación de fermentaciones lácticas. Se utilizaron 100  $\mu$ l de cultivo de bacterias del ácido láctico procedente de la leche, por cada 30 ml de caldo (Agar MRS - Becton Dickinson France, S.A.). Luego de la solidificación de las muestras, se hizo cuarto pocillos en el agar y se agregó 100  $\mu$ l del sobrenadante libre de células. Se aplicó refrigeración a 4° C, incubación a 30° C por 24 horas. Concluido el periodo, se verificó si existió la inhibición de crecimiento



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

de bacterias del ácido láctico, mediante la presencia de halos, indicador de incompatibilidad o antagonismo (Ramírez-López y Vélez-Ruíz, 2016).

## **2. Determinación de las características genotípicas (moleculares) de las bacterias ácido lácticas.**

Las características genotípicas corresponden al conjunto de información genética contenida en el DNA (genoma), la cual identifica en forma específica cada especie, en este caso las bacterias ácido lácticas. El método para la identificación se basó en la extracción y purificación del DNA, la amplificación génica, secuenciación genética y el análisis bioinformático.

**Extracción y purificación del DNA:** Consistió en la lisis o rompimiento de las estructuras contenidas en el citoplasma, la liberación de los líquidos, la retirada o purificación de las sustancias y la detección de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), métodos aplicados con base en Olivares, 2020 y Villegas-Plazas et al., 2019. La extracción a base de dodecil sulfato sódico (SDS) y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), adición de buffer TE 1x, realización de lisis mecánica e incubaciones en frío (Blanco-Jarvio et al., 2014).

**Amplificación Génica:** Se refiere al aumento en el número de copias de un fragmento de DNA, con la finalidad de aumentar el número de copias de un gen en el genoma de las bacterias del ácido láctico con base en las técnicas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), descritas en (Crespo et al., 2011). El procedimiento consistió en preparar la mezcla de PCR: 10 ng de DNA extraído molde, regulador de la Taq DNA Polimerasa (1X) (Invitrogen, Brazil),  $MgCl_2$  (2 mM), los iniciadores (16S SENSE y 16S ANTISENSE) (0.4  $\mu$ m), Taq DNA Polimerasa (IU) (Invitrogen). La mezcla se utilizó en las reacciones de amplificación utilizando un termociclador de DNA (TECHNE Inc. Burlington, NJ, U.S.A) a 35 ciclos en condiciones desnaturalización de 94° C, 1 min, alineamiento a 54° C, 1 min, polimerización a 72° C, 1 min. Los productos finales de la reacción en cadena de la polimerasa fueron analizados en gel de agarosa al 1% con regulador TAE 1X, teñido con Bromuro de etidio. El corrido del gel se realizó por 2 horas (Ramos-Izquierdo et al., 2009).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

**Secuenciación Genética:** Se refiere a la ordenación y construcción de los genotipos del DNA (16S) de las bacterias del ácido láctico. La secuenciación se realizó por el método de microarrays, en el cual se empleó un soporte poroso (cristal) para facilitar la miniaturización. La detección de los pares de nucleótidos se basó en la técnica de fluorescencia y desarrollo de oligonucleótidos. Se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos por (Campion y Canul, 2004).

**Análisis Bioinformática (bancos de datos genéticos):** Identificación de especies de las bacterias del ácido láctico, se realizó por comparación de los genotipos obtenidos con la secuenciación genética y las reportadas en los bancos de datos (Acceso a datos Beta Diversidad para comparación), referenciadas en Villegas-Plazas et al. (2019).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Características fenotípicas de las bacterias del ácido láctico.

#### ▪ Morfología, Agrupación, Cepas y Recuento de las Bacterias del Ácido Láctico

Se muestra tres tipos de cepas de bacterias del ácido láctico (BAL) identificadas en la leche de ganado Jersey, las cuales son: los bacilos, bifidobacilos y los cocos (Cuadro 1). De cada muestra se obtuvo un cultivo puro que se caracterizó por el tipo de cepa (especie) identificada, por lo cual, se derivaron 11 cepas de bacilos con recuento total de 33 colonias promedio, una cepa de bifidobacilos con recuento total de dos colonias promedio y 12 cepas de cocos con recuento total de 41 colonias promedio. Significa que la proporción de cepas encontradas representa el 44% bacilos, 8% de bifidobacilos y 48% cocos. La mayor cantidad de colonias se encuentra en los cocos. La morfología identificada para las cepas de bacilos corresponde a cilíndricas; para las cepas bifidobacilos la morfología identificada es cilíndrica con sus extremos en forma de V, mientras que para los cocos la forma identificada es redonda. De acuerdo con las observaciones microscópicas, las formas y agrupaciones de las cepas de bacilos se presentaron en forma de bastón dispuestas en cadena, por lo que, se identificaron como estreptobacilos (*Streptobacillus*) (Figura 2). Las cepas de cocos se presentaron en forma circular y en agrupaciones en cadena, las cuales se identificaron como estreptococos (*Streptococcus*) (Figura 3). Las cepas bifidobacilos se identificaron cilíndricas dividido en dos partes en los extremos y en agrupaciones



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

ramificadas (Figura 4). Los resultados coinciden con los tipos de cepas, morfología y agrupaciones descritas por Carroll et al., 2016.

Según la tinción diferencial Gram positiva (+) o negativa (-), (Cuadro 1), las cepas de bacilos, bifidobacilos y las cepas de cocos se reportaron como Gram (+), por el color púrpura (azul intenso). Por consiguiente, se identificaron *Streptobacillus* Gram (+), *Streptococcus* Gram (+) y *Bifidobacillus* Gram (+). Significa que las bacterias identificadas pertenecen al grupo de bacterias del ácido láctico (BAL). Lo anterior revela la diversidad de especies de bacterias ácido lácticas, las cuales influyen en la producción y calidad de productos lácteos, por sus cualidades aromáticas y velocidad de fermentación láctica. Por comparación con los resultados de Ramírez-López y Vélez-Ruíz (2016), se reporta que las bacterias del ácido láctico corresponden a Gram (+) y pueden tener variabilidad de formas, agrupación y características influyentes en la fermentación de la leche, por lo que, constituye un potencial de interés en los procesos lácteos. En los seis sitios de toma de muestra, las bacterias ácido lácticas se distribuyeron en forma heterogénea en abundancia y diversidad.



**Figura 2. Agrupación y morfología identificada (Estreptobacilos). Tinción Gram (+). Microscopio Nikon Eclipse E200 (Nikon Company, 2016). Laboratorio de Microbiología del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA), Universidad Tecnológica de Panamá.**



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

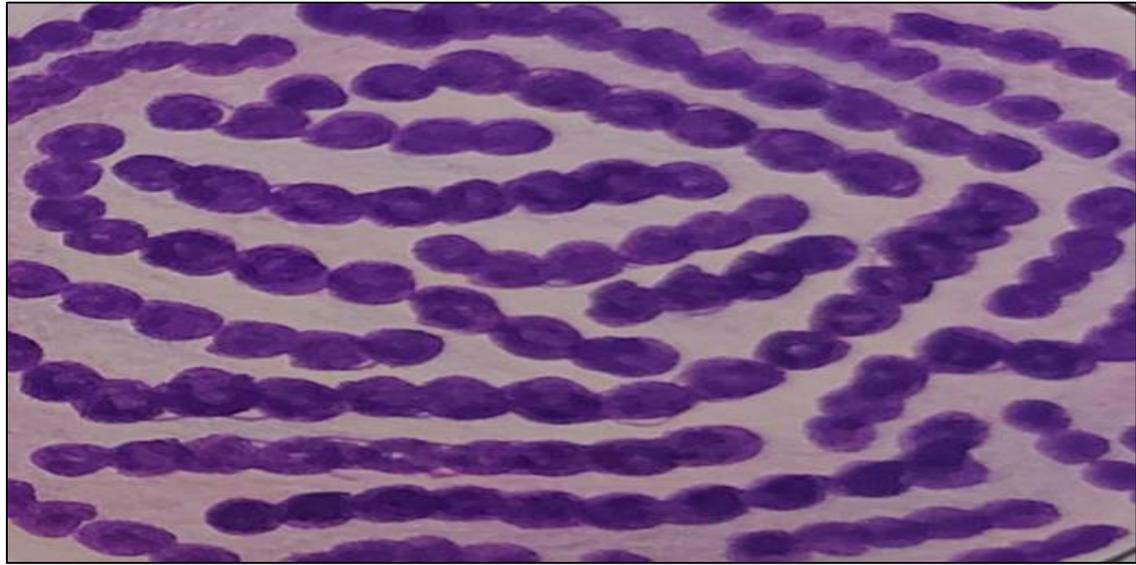
**Cuadro 1. Caracterización fenotípica de las bacterias ácido láctica.**

No. de Muestras	Cultivos Obtenidos	Cepas Obtenidas	Recuento de Colonias Obtenidas Promedio	Tinción Diferencial (Gram positiva/negativa)	Agrupación Identificada	Morfología Identificada
M1	Puros	Bacilos	4	Positiva (+)	Streptobacilos	Célula en forma cilíndrica con disposición en cadenas
M2	Puros	Cocos	3	Positiva (+)	Streptococos	Célula en forma redonda con disposición en cadenas
M3	Puros	Bacilos	2	Positiva (+)	Bifidobacilos	Célula en forma cilíndrica con disposición en forma de V en los extremos
M4	Puros	Cocos	3	Positiva (+)	Streptococos	Célula en forma redonda con disposición en cadenas
M5	Puros	Bacilos	4	Positiva (+)	Streptobacilos	Célula en forma cilíndrica con disposición en cadenas
M6	Puros	Bacilos	3	Positiva (+)	Streptobacilos	Célula en forma cilíndrica con disposición en cadenas
M7	Puros	Cocos	5	Positiva (+)	Streptococos	Célula en forma redonda con disposición en cadenas
M8	Puros	Bacilos	3	Positiva (+)	Streptobacilos	Célula en forma cilíndrica con disposición en cadenas
M9	Puros	Cocos	4	Positiva (+)	Streptococos	Célula en forma redonda con disposición en cadenas
M10	Puros	Cocos	4	Positiva (+)	Streptococos	Célula en forma redonda con disposición en cadenas
M11	Puros	Bacilos	3	Positiva (+)	Streptobacilos	Célula en forma cilíndrica con disposición en cadenas
M12	Puros	Bacilos	3	Positiva (+)	Streptobacilos	Célula en forma cilíndrica con disposición en cadenas
M13	Puros	Bacilos	2	Positiva (+)	Streptobacilos	Célula en forma cilíndrica con disposición en cadenas
M14	Puros	Cocos	2	Positiva (+)	Streptococos	Célula en forma redonda con disposición en cadenas
M15	Puros	Cocos	4	Positiva (+)	Streptococos	Célula en forma redonda con disposición en cadenas
M16	Puros	Bacilos	2	Positiva (+)	Streptobacilos	Célula en forma cilíndrica con disposición en cadenas
M17	Puros	Cocos	3	Positiva (+)	Streptococos	Célula en forma redonda con disposición en cadenas
M18	Puros	Cocos	4	Positiva (+)	Streptococos	Célula en forma redonda con disposición en cadenas
M19	Puros	Cocos	2	Positiva (+)	Streptococos	Célula en forma redonda con disposición en cadenas
M20	Puros	Bacilos	3	Positiva (+)	Streptobacilos	Célula en forma cilíndrica con disposición en cadenas
M21	Puros	Bacilos	4	Positiva (+)	Streptobacilos	Célula en forma cilíndrica con disposición en cadenas
M22	Puros	Bacilos	2	Positiva (+)	Streptobacilos	Célula en forma cilíndrica con disposición en cadenas
M23	Puros	Cocos	4	Positiva (+)	Streptococos	Célula en forma redonda con disposición en cadenas
M24	Puros	Cocos	3	Positiva (+)	Streptococos	Célula en forma redonda con disposición en cadenas

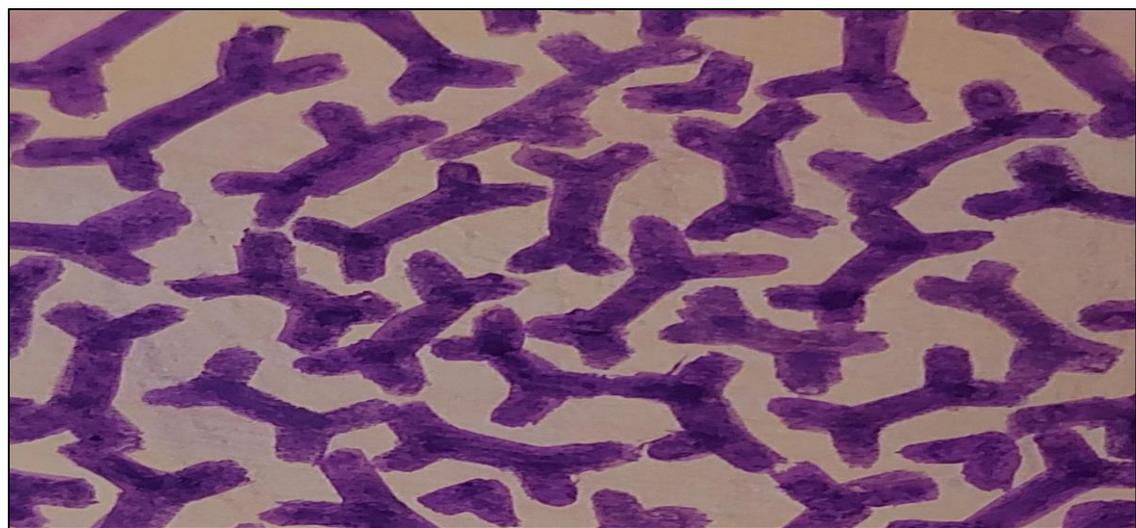
Fuente: Pruebas de las bacterias del ácido láctico, 2018. Laboratorio de Microbiología del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA), Universidad Tecnológica de Panamá.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)



**Figura 3. Agrupación y morfología identificada (Streptococos). Tinción Gram (+). Microscopio Nikon Eclipse E200 (Nikon Company, 2016). Laboratorio de Microbiología del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA), Universidad Tecnológica de Panamá.**



**Figura 4. Agrupación y morfología identificada (Bifidobacilos). Tinción Gram (+). Microscopio Nikon Eclipse E200 (Nikon Company, 2016). Laboratorio de Microbiología del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA), Universidad Tecnológica de Panamá.**



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

## ▪ Catalasa, Oxidasa y actividad enzimática de las Bacterias del Ácido Láctico

En cuanto a las pruebas de oxidasa y catalasa (Cuadro 2), se presentaron negativas para las cepas de bacilos, bifidobacilos y cocos, puesto que, en las pruebas no hubo producción de gas, lo que significa que las enzimas oxidasa y catalasa están ausentes en estas cepas. El proceso indica que las cepas de bacilos, bifidobacilos y cocos corresponden a bacterias anaerobias (respiración celular en ausencia de oxígeno). Por lo tanto, la vía de respiración celular es la fermentación. En las 24 muestras analizadas (Cuadro 2) se identificó dos tipos de actividad enzimática de fermentación, las cuales son: heteroláctica y homoláctica. Las muestras M6 y M13 reportadas con cepas de bacilos (*Streptobacillus*), fueron las únicas donde se identificó la fermentación heteroláctica, ya que, el medio no cambio de color, permaneció en color celeste (Figura 5 a). Significa que el 2% de las muestras totales de las bacterias del ácido láctico (BAL) corresponden a heterofermentativas, por lo tanto, este grupo de cepas utilizan la ruta de la pentosa para el proceso de fermentación láctica. La fermentación homoláctica, se identificó en las 22 muestras restantes (M1 a M5; M7 a M12 y M14 a M24), reportadas con cepas de bacilos, bifidobacilos y cocos (*Streptobacillus*, *Bifidobacillus* y *Streptococcus*), debido al cambio de color del medio verdoso (Figura 5 b). Refiere que el 92% de las muestras totales de BAL son homofermentativas, por consiguiente, degradan glucosa por la vía glucólisis en la fermentación láctica. Estos resultados guardan similitud, con los reportados por Ramírez-López y Vélez-Ruíz (2016), donde afirma dos aspectos importantes de los análisis sobre las cepas de bacterias del ácido láctico a) que aquellas cepas con resultado de catalasa y oxidasa negativa no tienen producción de gas al adicionar  $H_2O_2$  b) las bacterias del ácido láctico se consideran homolácticas, aquellas cepas cuyo medio cambia a verdoso; mientras que las cepas que no producen cambios en el color del medio (celeste) se consideran heterolácticas. La implicación que tiene estos hallazgos en los procesos industriales lácteos, es que la leche derivada del ganado Jersey posee características microbiológicas, bioquímicas y actividad enzimática diversas, que aportan diferentes rutas metabólicas para degradar los carbohidratos (lactosa). Por lo tanto, podrían reducir el tiempo de proceso, sabor, color y olor del producto final.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

**Cuadro 2. Prueba de Oxidasa, catalasa y actividad enzimática de las bacterias del ácido láctico.**

No. Muestras	de Cultivos Obtenidos	Cepas Obtenidas	Prueba Oxidasa	Prueba Catalasa	Actividad Enzimática Identificada
M1	Puros	Bacilos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M2	Puros	Cocos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M3	Puros	Bacilos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M4	Puros	Cocos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M5	Puros	Bacilos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M6	Puros	Bacilos	Negativa (-)	Negativa (-)	Heteroláctica
M7	Puros	Cocos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M8	Puros	Bacilos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M9	Puros	Cocos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M10	Puros	Cocos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M11	Puros	Bacilos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M12	Puros	Bacilos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M13	Puros	Bacilos	Negativa (-)	Negativa (-)	Heteroláctica
M14	Puros	Cocos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M15	Puros	Cocos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M16	Puros	Bacilos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M17	Puros	Cocos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M18	Puros	Cocos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M19	Puros	Cocos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M20	Puros	Bacilos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M21	Puros	Bacilos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M22	Puros	Bacilos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M23	Puros	Cocos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica
M24	Puros	Cocos	Negativa (-)	Negativa (-)	Homoláctica

Fuente: Pruebas de las bacterias del ácido láctico, 2018. Laboratorio de Microbiología del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA), Universidad Tecnológica de Panamá.

#### ▪ Cinética de Crecimiento de las Bacterias del Ácido Láctico

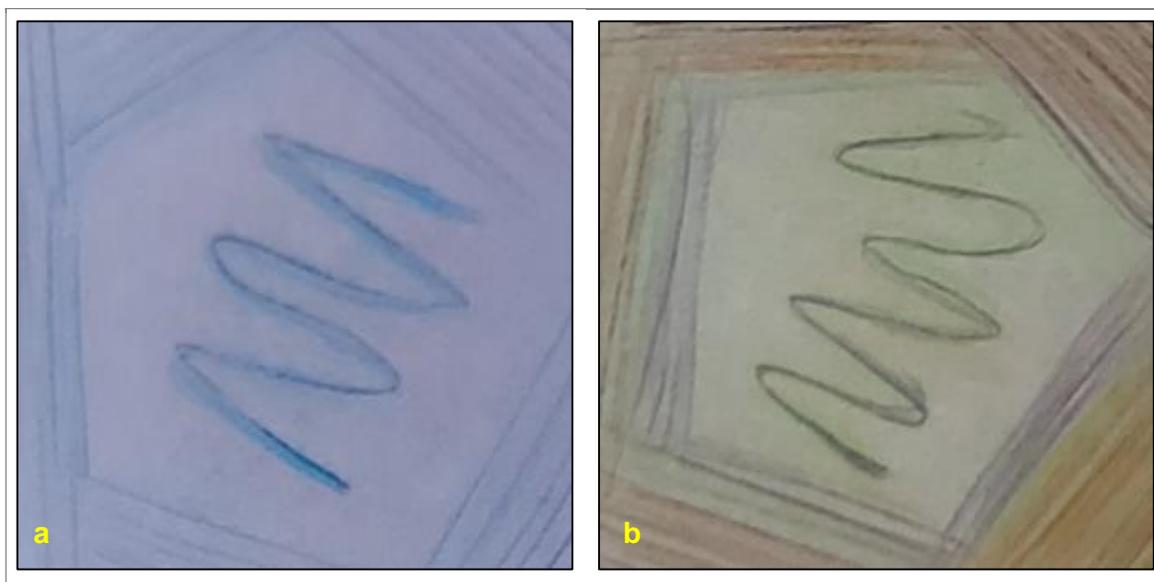
El comportamiento de las cepas obtenidas de la cinética de crecimiento de las bacterias del ácido láctico se muestra en la curva de crecimiento en función a los diferentes tiempos tomados.

La cinética de crecimiento poblacional de las bacterias del ácido láctico (Cuadro 3), refieren que la población de células en la muestra M1 en el medio de cultivo Agar MRS que identifica las cepas de *Streptobacillus* (conocidas como *Lactobacillus*), en comparación con población de células en la muestra M24 en Agar M17, que determina las cepas de



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

*Streptococcus* (conocidas como *Lactococcus*), a temperatura estandarizada a 34° C, difieren en el crecimiento poblacional. Los resultados se reflejaron en dos muestras, ya que, se consideró las pruebas en la fase inicial y la fase final de tomas de muestras. Las especies *Lactobacillus* y *Lactococcus* identificadas son susceptibles a responder al crecimiento en medios de cultivo Agar MRS y Agar M17, respectivamente, conocidos como indicadores de especies y su cinética de crecimiento.



**Figura 5. Actividad enzimática a) Heteroláctica b) Homoláctica. Estereoscopio Binocular SFX-33 OPTIKA. Laboratorio de Microbiología del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA), Universidad Tecnológica de Panamá.**

Los *Lactobacillus* presentan mayor crecimiento poblacional que los *Lactococcus*, en la medida que transcurre el tiempo de exposición en los medios de cultivos. En la Figura 6, se muestra que el crecimiento poblacional de los *Lactobacillus* se manifiesta en forma exponencial, es decir, el número de células se incrementa proporcionalmente al aumentar el tiempo de exposición en el medio nutritivo. El punto máximo de crecimiento se alcanza a las 72 horas con log 44,79, luego el crecimiento se mantiene constante de 96 a 120 horas. En el caso del crecimiento poblacional de los *Lactococcus* (Figura 7), el crecimiento poblacional es similar y de carácter proporcionalmente directo. El crecimiento máximo se alcanza a las 72 horas, pero con valor menor en log 44,65. Estadísticamente la diferencia



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

de valores entre los *Lactobacillus* y *Lactococcus*, corresponde a Log 0,14, considerado similar. De acuerdo con la comparación de estos resultados con los obtenidos por Agudelo et al. (2010), ambas cepas (*Lactobacillus* y *Lactococcus*), presentan cinética de crecimiento similar. Igualmente, estos resultados se contrastaron con los presentados por López (2016) y se determinó que las dos cepas mencionadas, modelan la curva de crecimiento bacteriano en tres fases: fase de adaptación (inicial), fase exponencial (ascenso del crecimiento) y fase estacionaria (se detiene el crecimiento poblacional y se mantiene constante), Figura 6 y 7. El análisis de la cinética de crecimiento poblacional de *Lactobacillus* y *Lactococcus*, revelan el comportamiento de crecimiento poblacional favorable para la fermentación láctica y la posibilidad de uso de estos microorganismos como fermentos iniciadores para mejorar los procesos en la industria láctea.

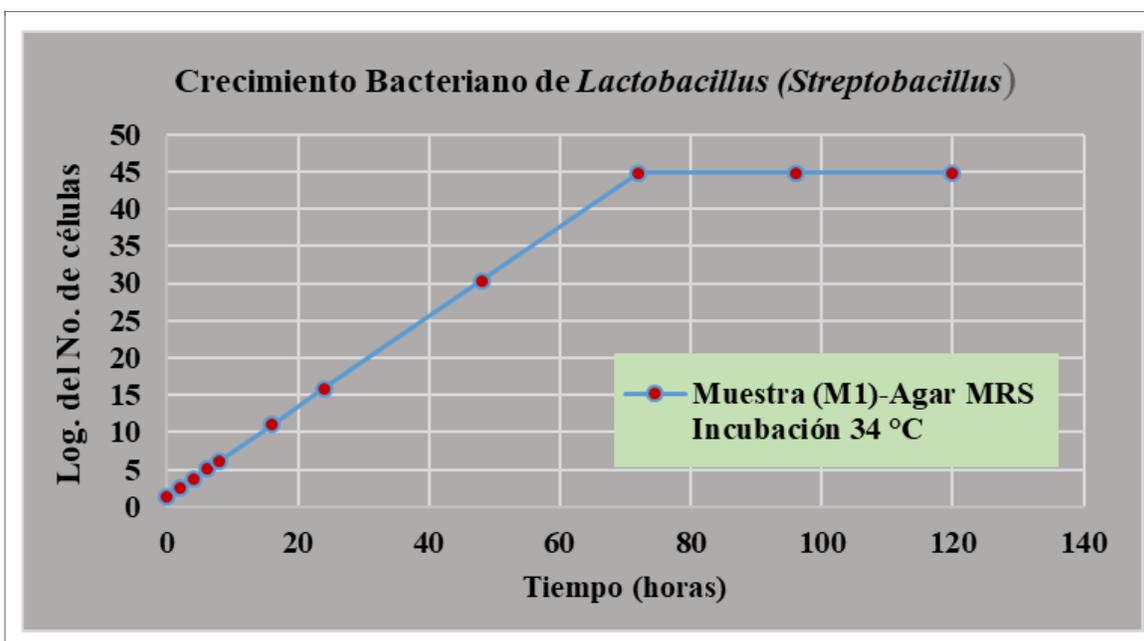
**Cuadro 3. Cinética de crecimiento poblacional de las bacterias del ácido láctico.**

Tiempo horas (h)	Cepas (Crecimiento Poblacional)			
	Muestra (M1)-Agar MRS Incubación 34 °C Streptobacilos		Muestra (M24) - Agar M17 Incubación 34 °C Streptococos	
	Número de células bacterianas $X=X_0e^{\mu t}$	Logaritmo del número de células bacterianas (Log X)	Número de células bacterianas $X=X_0e^{\mu t}$	Logaritmo del número de células bacterianas (Log X)
0	28	1.45	20	1.3
2	448	2.65	320	2.51
4	7168	3.85	5120	3.71
6	114688	5.1	81920	4.91
8	1835008	6.23	1310720	6.12
16	$1.20 \times 10^{11}$	11.07	$8.58 \times 10^{10}$	10.93
24	$7.88 \times 10^{15}$	15.89	$5.62 \times 10^{15}$	15.75
48	$2.21 \times 10^{30}$	30.34	$1.58 \times 10^{30}$	30.19
72	$6.24 \times 10^{44}$	44.79	$4.46 \times 10^{44}$	44.65
96	$6.23 \times 10^{44}$	44.79	$4.40 \times 10^{44}$	44.64
120	$6.22 \times 10^{44}$	44.79	$4.35 \times 10^{44}$	44.64

Fuente: Pruebas de las bacterias ácido láctico, 2018. Laboratorio de Microbiología del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA), Universidad Tecnológica de Panamá y los cálculos del número de células de las BAL, mediante el modelo matemático por Ramírez-López y Vélez-Ruiz, 2016).

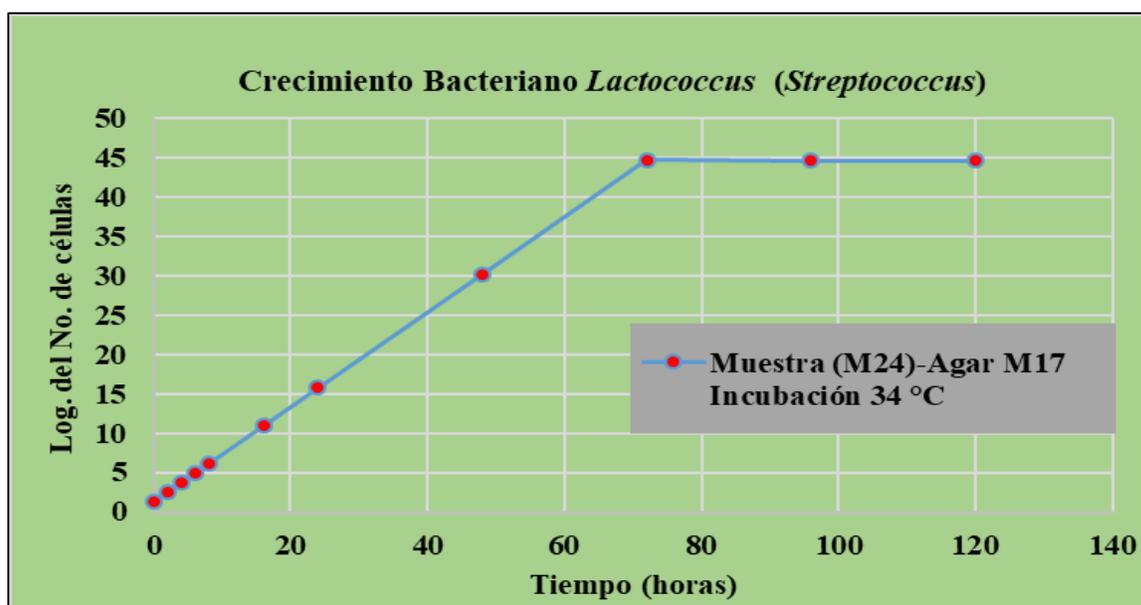


Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)



Fuente: Pruebas de las bacterias ácido láctico, 2018. Laboratorio de Microbiología del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA), Universidad Tecnológica de Panamá.

**Figura 6. Cinética de crecimiento de bacterias del ácido láctico (*Streptobacillus*).**



Fuente: Pruebas de las bacterias ácido láctico, 2018. Laboratorio de Microbiología del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA), Universidad Tecnológica de Panamá.

**Figura 7. Cinética de crecimiento de bacterias del ácido láctico (*Streptococcus*).**



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

### ▪ Antagonismo Cruzado de las Bacterias del Ácido Láctico

La compatibilidad de las bacterias ácido lácticas, refieren la afinidad fisiológica y bioquímica entre las especies para la actividad enzimática, por el contrario, la incompatibilidad indica disimilitud fisiológica y bioquímica de las especies (Ramírez-López y Vélez-Ruíz, 2016). Los resultados obtenidos revelan que siete pares y un impar de cepas son compatibles fisiológica y bioquímicamente, pues en la unión de cepas no se formó halos (indicador de compatibilidad en la prueba de antagonismo cruzado). Las propiedades identificadas son determinantes en la aplicación de los procesos lácteos, ya que, permiten obtener mixtos o mezclas de cepas para favorecer la biomasa de microorganismos, por ende, modificar la velocidad de fermentación láctea y el producto formado con características específicas de sabor, olor y color en los procesos industriales en contraste, el resultado obtenido en el par de cepa incompatible, identificado antagónico, pues se formó halos, permitió reconocer mixtos de cepas que son inadecuados para utilizar en procesos lácteos .

En lo que se refiere a la prueba del antagonismo cruzado, se presentó negativa (Cuadro 4). Se determinó al azar la compatibilidad de cepas en las siguientes muestras: M17 y M24; M8 y M24; M12 y M24; M1 y M24; M8, M1 y M12; M1 y M3; M8 y M3; M24 y M3. De acuerdo con las observaciones microscópicas, los conjuntos de muestras mencionados presentaron sobrenadantes libres de las células en los pocillos del medio de cultivo (agar), sin formación de halos, lo que indica la compatibilidad entre las cepas. Por lo tanto, estos cultivos mixtos revelan potenciales iniciadores de fermentación láctica con características variadas. Por el contrario, las cepas M17 y M8 (Figura 8), en las pruebas del antagonismo cruzado, resultaron positivas, ya que, se identificó la formación de halos de inhibición en el medio de cultivo (Agar MRS), lo que indica que no es posible la mezcla de los conjuntos de cepas M17 y M8, no hay afinidad fisiológica, bioquímica y son antagónicas. La presencia o ausencia de halos (indicador) en las muestras revelan antagonismo (incompatibilidad) o afinidad (compatibilidad), respectivamente en las cepas de bacterias ácido lácticas. El comportamiento presencia-ausencia de halos, se explica por el efecto de la susceptibilidad de las bacterias ácido lácticas a partir de su exposición a la concentración estandarizada de Agar MRS. Por comparación, estos resultados son similares a los obtenidos por Ramírez-López y Vélez-Ruíz (2016), donde muestra el antagonismo cruzado entre las cepas de bacilos y cocos.

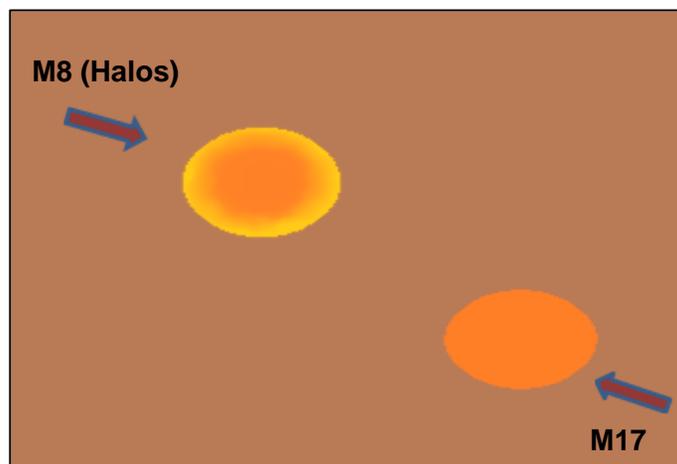


Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

**Cuadro 4. Prueba del antagonismo cruzado entre cepas (compatibilidad o antagonismos).**

No. Muestras	de Cultivos Obtenidos	Prueba del Antagonismo Cruzado	Indicador fisiológico	Carácter Fisiológico	Agrupación Identificada
M17	Puros	Negativo	Sin formación de halos	Compatible	<i>Streptococcus</i>
M24	Puros	Negativo	Sin formación de halos		<i>Streptococcus</i>
M8	Puros	Negativo	Sin formación de halos	Compatible	<i>Streptobacillus</i>
M24	Puros	Negativo	Sin formación de halos		<i>Streptococcus</i>
M12	Puros	Negativo	Sin formación de halos	Compatible	<i>Streptobacillus</i>
M24	Puros	Negativo	Sin formación de halos		<i>Streptococcus</i>
M1	Puros	Negativo	Sin formación de halos	Compatible	<i>Streptobacillus</i>
M24	Puros	Negativo	Sin formación de halos		<i>Streptococcus</i>
M17	Puros	Positivo	Sin formación de halos	Antagónico	<i>Streptococcus</i>
M8	Puros	Positivo	Formación de halos		<i>Streptobacillus</i>
M8	Puros	Negativo	Sin formación de halos	Compatible	<i>Streptobacillus</i>
M1	Puros	Negativo	Sin formación de halos		<i>Streptobacillus</i>
M12	Puros	Negativo	Sin formación de halos	Compatible	<i>Streptobacillus</i>
M1	Puros	Negativo	Sin formación de halos		<i>Streptobacillus</i>
M3	Puros	Negativo	Sin formación de halos	Compatible	<i>bifidobacillus</i>
M8	Puros	Negativo	Sin formación de halos		<i>Streptobacillus</i>
M3	Puros	Negativo	Sin formación de halos	Compatible	<i>bifidobacillus</i>
M24	Puros	Negativo	Sin formación de halos		<i>Streptococcus</i>
M3	Puros	Negativo	Sin formación de halos	Compatible	<i>bifidobacillus</i>

Fuente: Pruebas de antagonismo cruzado de las bacterias ácido láctico, 2018. Laboratorio de Microbiología del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA), Universidad Tecnológica de Panamá.



Fuente: Elaboración propia. Estereoscopio Binocular SFX-33 OPTIKA. Laboratorio de Microbiología del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA), Universidad Tecnológica de Panamá.

**Figura 8. Antagonismo cruzado de las bacterias del ácido láctico (BAL): conjunto de cepas M8 y M17. La cepa M8 *Streptobacillus (Lactobacillus)* produce halos. La cepa M17 *Streptococcus (Lactococcus)* no produce halos. Ambas cepas son antagónicas.**



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

## 1. Características genóticas (moleculares) de las bacterias del ácido láctico

Las referencias obtenidas del análisis molecular para la identificación de las especies de bacterias del ácido láctico (Cuadro 5), indican que la composición del microbioma de bacterias del ácido láctico se definen en seis especies identificadas y distribuidas en tres géneros los cuales son: el género *Streptococcus* (*Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*), género *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, y *Lactobacillus delbrueckii*) y el género *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum*). El género *Streptococcus* representa el 33% de composición de especies, el género *Lactobacillus* el 50% y el género *Bifidobacterium* el 17%.

Los valores indican que la agrupación de *Lactobacillus* es la predominante en el microbioma de bacterias del ácido láctico y su diversidad biológica es más acentuada debido a la mayor cantidad de especies. La diversidad de especies identificadas en la leche de ganado Jersey coinciden con los reportados en investigaciones realizadas por Ramírez et al., 2011. También el género *Bifidobacterium*, identificado en la cepa M3, con la especie *Bifidobacillus bifidum*, revela la presencia de especies probióticas en la leche de ganado Jersey. En cuanto a la distribución de las bacterias de ácido lácticas en los sitios de toma de muestras, los resultados fueron los siguientes:

Sitio 1: 50% *Streptococcus*, 25% *Lactobacillus*, 25% *Bifidobacterium*.

Sitio 2: 75% *Lactobacillus*, 25% *Streptococcus*.

Sitio 3: 50% *Lactobacillus*, 50% *Streptococcus*

Sitio 4: 50% *Lactobacillus*, 50% *Streptococcus*

Sitio 5: 25% *Lactobacillus*, 75% *Streptococcus*

Sitio 6: 50% *Lactobacillus*, 50% *Streptococcus*

El hallazgo se corresponde con los reportados en las investigaciones realizadas por Ramírez et al., 2011, donde se identificaron los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, cepas del grupo de bacterias ácido lácticas.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

**Cuadro 5. Especies identificadas por análisis molecular en función de las agrupaciones obtenidas de la prueba del antagonismo cruzado.**

No. de Muestras	Cultivos Obtenidos	Especies Identificadas por Análisis Molecular	Mezcla de Cepas Identificadas como Cultivos Iniciadores
M17	Puros	<i>Lactococcus lactis</i>	Compatible
M24	Puros	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
M8	Puros	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Compatible
M24	Puros	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
M12	Puros	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Compatible
M24	Puros	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
M1	Puros	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Compatible
M24	Puros	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
M17	Puros	<i>Lactococcus lactis</i>	Compatible
M8	Puros	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
M8	Puros	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Compatible
M1	Puros	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
M12	Puros	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Compatible
M1	Puros	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
M3	Puros	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Compatible
M8	Puros	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
M3	Puros	<i>Bifidobacillus bifidum</i>	Compatible
M24	Puros	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
M3	Puros	<i>Bifidobacillus bifidum</i>	

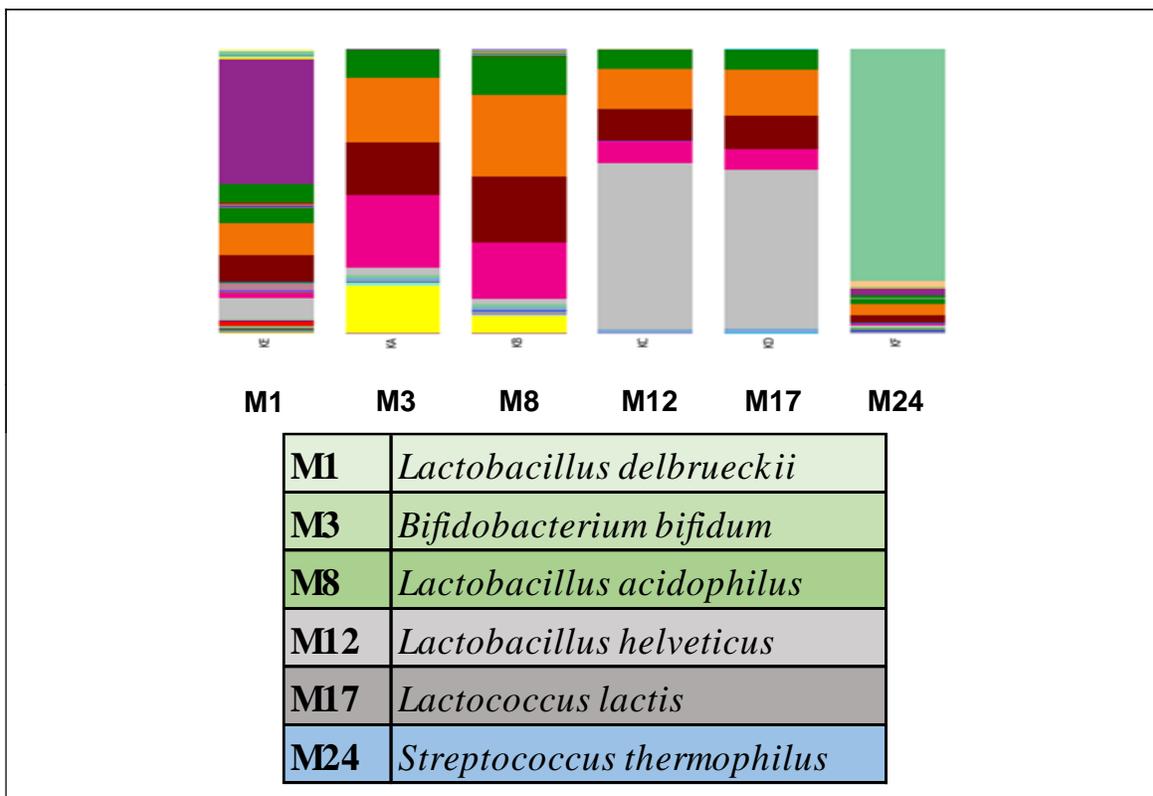
Fuente: Elaboración propia con base en resultados obtenidos de las extracciones de DNA en las bacterias ácido láctico, 2018. Laboratorio de Biología Molecular de Microbiomas Foundation, Colombia y Laboratorio de Microbiología del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA), Universidad Tecnológica de Panamá.

La secuenciación DNA de las cepas aisladas puras M1, M3, M8, M12, M17, M24 representada en los bloques 1, 2, 3, 4, 5 y 6 (Figura 9) refieren la disposición, distribución y diversidad genotípica de cada una de las especies identificadas, importantes en la diferenciación para el reconocimiento molecular e identificación de especies de bacterias del ácido láctico. Los genotipos identificados (Figura 9) se corresponden con los encontrados en las investigaciones de Cremonesi et al. (2018), los cuales son: *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Bifidobacterium bifidum*. Los hallazgos sobre los genotipos de las bacterias ácido lácticas, han permitido comprender y descifrar el código genético de estas bacterias, por ende, su



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

identificación, abordar las posibles formas de comportamientos fisiológicos y bioquímicos aplicables a los procesos industriales de fermentación láctea y producción de derivados lácteos. Lo anterior sugiere, áreas de investigación futura basada en la relación entre los genotipos de las bacterias ácido lácticas y los procesos de fermentación láctica.



Fuente: Elaboración propia con base en resultados obtenidos de las extracciones de DNA, amplificación genética PCR y secuenciación con acceso a datos Beta Diversidad para comparación (Bioinformática). Laboratorio de Biología Molecular de Microbiomas Foundation, Colombia y Laboratorio de Microbiología del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA), Universidad Tecnológica de Panamá.

**Figura 9. Secuenciación DNA (genes) que definen las especies de bacterias del ácido láctico.**

Referente a las limitantes para el desarrollo de la técnica de secuenciación de DNA, han sido la disponibilidad de los laboratorios especializados de biología molecular y la accesibilidad a bancos de datos informáticos disponibles para la comparación de genotipos de bacterias ácido lácticas.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

## CONCLUSIONES

- Las formas y agrupaciones predominantes de bacterias ácido lácticas en la leche de ganado Jersey, fueron los estreptococos, estreptobacilos y bifidobacilos, correspondientes a Gram+.
- En la leche de ganado Jersey se producen dos tipos de actividad enzimática de fermentación, las cuales son: heteroláctica y homoláctica.
- El crecimiento de bacterias ácido lácticas se manifiesta en forma exponencial modeladas en la fase de adaptación, fase exponencial y fase estacionaria, favorables a la fermentación láctica.
- Se manifestó compatibilidad entre las cepas de bacterias ácido lácticas, lo que revela la potencialidad para producir mixtos como iniciadores de fermentación láctica.
- La composición de las bacterias del ácido láctico que caracteriza la leche de ganado Jersey, es diversa: dos especies correspondiente al género de *Streptococcus*, tres especies pertenecientes al género *Lactobacillus* y una especie representada en el género *Bifidobacillus*.

## REFERENCIAS

- Acevedo, R.L., Severiche, C., y Castillo, M., (2013). *Biología y microbiología ambiental*. Prácticas de laboratorio. Primera Edición. EUMED.NED, España. 94 p.
- Agudelo, C., Ortega, R., y Hoyos, J. (2010). Determinación de los parámetros cinéticos de los inóculos lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 y bacterias ácido lácticas de yogurt. Facultad de Ciencias Agropecuarias. *Universidad de Cauca. Colombia*, 8(2), 8-16. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612010000200002](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000200002)



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

- Alvarado, C., Chacón, Z., Rojas, J., Guerrero, B., y López, G. (2007). Aislamiento, identificación y caracterización de las bacterias del ácido láctico de un queso venezolano ahumado andino artesanal Su uso como cultivo iniciador. *Revista Científica*, 17(3), 301 – 308. [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592007000300014](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592007000300014)
- Aquihuati-Ramos, M.A., Volke, T., Prado, L., y Shirai, K. (2012). *Manual de Practicas de laboratorio-microbiología general*. Primera Edición. Editorial Casa Abierta al Tiempo. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México, D.F.
- Autoridad Nacional del Ambiente. (2014). *Informe del Estado del Ambiente, GEO-Panamá*. Panamá, República de Panamá. Editora Novo Art S.A. Apoyo de: Oficina Regional para América Latina y el Caribe, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) / Banco Interamericano de Desarrollo (BID). ISBN: 978-9962-651-33-8, 168 pp. [http://www.pnuma.org/deat1/pdf/GEO\\_Panama\\_2014.pdf](http://www.pnuma.org/deat1/pdf/GEO_Panama_2014.pdf)
- Blanco-Jarvio, A., Martínez-López, A., y Bautista-García, A. (2014). Optimización de un protocolo de extracción de DNA total para la amplificación de marcadores moleculares funcionales específicos de organismos desnitrificantes. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Av. Instituto Politécnico Nacional S/N, Col. Playa Palo de Santa Rita, A.P. 592. La Paz, B.C.S, México. C.P. 23096. *CICIMAR Oceanides*, 29(2), 37-44. <https://doi.org/10.37543/oceanides.v29i2.138>
- Carroll, K. Morse, S., Mietzner, T., y Miller, S. (2016). *Microbiología Médica*. 27 Edición. Editorial McGraw Hill Education /Interamericana Editores, S.A. Mexico, D.F. 865 p.
- Campion, R., y Canul J.C. (2004). *Métodos fisico-químicos en biotecnología: secuenciación de ácidos nucleicos*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de México. Cuernavaca NOR. 47 p.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Cremonesi, P., Ceccarani, C., Curone, G., Severgini, M., Pollera, C., Bronzo, B., Riva, F., Amadori, M., Trevisi, E., Vigo, Daniele., Moroni, P., y Castiglioni, B. (2018). Milk microbiome diversity and bacterial group prevalence in a comparison between healthy Holstein fresian and rendena cows. *PloS one*, 13(10), 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205054>

Crespo, E., De La Mora, A., Martínez, A., y Staines, H. (2011). *Manual de prácticas de biología molecular*. Programa de Biología. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México. 69 p. [https://www.academia.edu/8094770/UNIVERSIDAD\\_AUT%C3%93NOMA\\_DE\\_CIUADAD\\_JU%C3%81REZ\\_INSTITUTO\\_DE\\_CIENCIAS\\_BIOM%C3%89DICAS\\_DEPARTAMENTO\\_DE\\_CIENCIAS\\_QU%C3%8DMICO\\_BIOL%C3%93GICAS\\_PROGRAMA\\_DE\\_BIOLOG%C3%8DA](https://www.academia.edu/8094770/UNIVERSIDAD_AUT%C3%93NOMA_DE_CIUADAD_JU%C3%81REZ_INSTITUTO_DE_CIENCIAS_BIOM%C3%89DICAS_DEPARTAMENTO_DE_CIENCIAS_QU%C3%8DMICO_BIOL%C3%93GICAS_PROGRAMA_DE_BIOLOG%C3%8DA)

De los Reyes, G., Molina, B., y Coca, R. (2010). *Calidad de la leche cruda: Primer foro sobre ganadería lechera de la zona Alta de Veracruz*. Sistemas Pecuarios del Estado de Veracruz. Memorias. México. 10 p. [https://www.uv.mx/apps/agronomia/foro\\_lechero/Bienvenida\\_files/CALIDADDELA\\_LECHECRUDA.pdf](https://www.uv.mx/apps/agronomia/foro_lechero/Bienvenida_files/CALIDADDELA_LECHECRUDA.pdf)

Fernández, A. García, C., Sáez, J., y Valdezate, S. (2010). *Procedimiento en microbiología clínica: métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. SEIMC, Edición No. 1. España.

García, M., Quintero, R., y López, M. (2010). *Productos lácteos en biotecnología alimentaria*. Limusa Noriega Editores. García Garibay M., Quintero Ramírez Rodolfo, Agustín López – Munguía Canales. Compiladores. México, D.F. 163-178 p.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

- Heer, G. (2007). *Microbiología de la Leche*. Cátedra de Tecnología de la Leche. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UNL. 19 p.
- Hernández, P. (2003). Técnicas moleculares: un avance en el diagnóstico y conocimiento de patologías oculares. *Molecular Techniques Reviews*, 1 (1), 113-123. <https://ciencia.lasalle.edu.co/svo/vol1/iss1/9/>
- Infansón, B., y Rojas, A. (2016). *Curva de crecimiento bacteriano en la producción de proteínas recombinantes*. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción. Paraguay. NSI DENV Cn3D 4.3.1. 27 p.
- López-Jácome, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, C., y Franco, F. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados. Xochimilco. *Revista Investigación en Discapacidad-Medigaphic*, 3(1), 10-18. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>
- López, L. (2016). *Curva de crecimiento bacteriano en la producción de proteínas recombinantes*. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 27 p.
- Lozupone, C., Lladser, M.E., Knights, D., Stoumbaugh, J., y Knight, R. (2011). UniFrac: An effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal*, 5(2), 169-172. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133>
- Madigan, M., y Martiniko, J. M. (2009). *Brock biología de los microorganismos*. Brock, Barrachina, Coral, et. al (Traducción). Duodécima Edición. Pearson Educación, S.A. Ribera del Loira, 28. Madrid, España.
- Nikon Company. (2016). *Operating Instructions. Microscope ECLIPSE E200 MV Series, E200 LED MV Series*. <https://www.mvi-inc.com/wp-content/uploads/E200MV%20LED%20E200%20MV.pdf>



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Olivares, M. S. (2020). *Estudio de Metodologías de Extracción y Purificación de DNA de Alimento para Amplificación por PCR*. Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

<https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/16094/13813%202020%20tesis%20Olivares%20soledad.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Ramírez-López, C., y Vélez-Ruíz, J. (2016). Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla, Ex Hacienda Sta. Catarina Mártir S/N, Cholula, Puebla. C.P.72810. México. *Información Tecnológica*, 27(6), 115-128.

[https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-07642016000600012](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642016000600012)

Ramírez, J., Rosas, P., Velázquez, M., Ulloa, J., y Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, (7), 1-16.

<http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>

Ramos-Izquierdo, B., Bucio-Galindo, A., Bautista-Muñoz, C., Aranda-Ibáñez, E., e Izquierdo-Reyes, F. (2009). *Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical*. *Revista Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*, 25(2),159-171.

[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-29792009000200006](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792009000200006)

Stambouljan, D. (2019). Técnicas moleculares de microbiología en la práctica diaria. *Revista Bioanálisis*, 15-17.

[https://www.stambouljan.com.ar/pdf/Tecnicas\\_moleculares.pdf](https://www.stambouljan.com.ar/pdf/Tecnicas_moleculares.pdf)

Shirai, K. Guerrero, I., y Lara, P. (1996). *Bacterias lácteas en alimentos fermentados*. *Revista Ciencia*, 47, 125-137.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Sistema de Información Geográfica. (2018). *Software desarrollado por Compañía Propietaria ESRI* (Environmental Systems Research Institute). Versión aportada por el Instituto Geociencias, Universidad de Panamá.

Statistical Package for the Social Sciences-SPSS. (2017). *Software desarrollado por Compañía International Business Machines*. Versión aportada por el Instituto de Geociencias, Universidad de Panamá.

Vega, M. J., y Quintero, R. I. (2023). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la leche de ganado Jersey en Panamá. *Revista Ciencia Agropecuaria*, No. 36, 96-117. <http://www.revistacienciaagropecuaria.ac.pa/index.php/ciencia-agropecuaria/article/view/607/487>

Ville, C. (1996). *Biología*. Espinosa, Roberto (traducción). Octava Edición. Editorial McGraw-Hill Editores, S.A. de C.V. P.S. México, D.F. 944 p.

Villegas-Plazas, M., Wos-Oxley, M., Sánchez, J., Pieper, D., Thomas, O., y Howard, J. (2019). Variations in microbial diversity and metabolite profiles of the tropical marine sponge *xestospongia muta* with season and depth. [Project: RG Microbial Ecology: Metabolism, Genomics and Evolution - Microbiomas Foundation](https://doi.org/10.1007/s00248-018-1285-y). *Microbial Ecology*, 78, 243-256. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1285-y> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30413836/>

Zúñiga, M., Pardo, I., y Ferrer, F. (1993). An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 18 (1), 37– 42.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las Fincas del distrito de Tierras Altas, provincia de Chiriquí, por proporcionar el hato de ganado Jersey para la toma de muestras de leche y al Instituto de Geociencias de la Universidad de Panamá, por el apoyo con el SIG y SPSS. Igualmente, a los colaboradores del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA) y Universidad Tecnológica de Panamá, por facilitar los laboratorios para la realización de las pruebas físicoquímicas y microbiológicas. También, agradecimiento al laboratorio físicoquímico y microbiológico, planta térmica de pasteurización, ultrapasteurización y esterilización de la Empresa Procesadora de lácteos Riba Smith, provincia de Panamá. También agradecimiento al Laboratorio de Biología Molecular de Microbiomas Foundation, Colombia.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)