



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TIPIFICACION DE LAS CEPAS DE *Lactobacillus*
plantarum AISLADAS DEL POZOL POR MEDIO DEL
ANALISIS DE PERFILES DE RESTRICCION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

TERESITA ROMERO TORRES

DIRECTOR DE TESIS: M. en B. ADELFO ESCALANTE LOZADA



OCTUBRE 2000

283924



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
" Tipificación de las cepas de Lactobacillus plantarum aisladas del pozo
por medio del análisis de perfiles de restricción "

realizado por **Teresita Romero Torres**

Con número de cuenta **9033888-9** , pasante de la carrera de **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis Propietario	M. en B. Adelfo Escalante Lozada	<i>Jose Adolfo Escalante Lozada</i>
Propietario	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	<i>Amelia Farrés González-Saravia</i>
Propietario	M. en C. Arturo Carlos II Becerra Bracho	<i>Arturo Carlos II Becerra Bracho</i>
Suplente	Dr. Francisco Rufz Terán	<i>Francisco Rufz Terán</i>
Suplente	M. en C. Iveta Iuriskova Vrablova	<i>Iveta Iuriskova Vrablova</i>

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Edna María Suárez Díaz
Consejo Departamental de **Biología**,
Dra. Edna María Suárez Díaz
Coordinadora de Licenciatura



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del M. en B. Adelfo Escalante Lozada, al cual agradezco su incondicional apoyo, confianza, paciencia y profesionalismo.

A la Dra. Amelia Farrés por haberme dado la oportunidad de incorporarme a su laboratorio y por sus valiosos comentarios que dieron forma al trabajo final.

A mis sinodales M. en C. Arturo Becerra, M. en C. Iveta Imriskova y Dr. Francisco Ruiz quienes me dedicaron parte de su valioso tiempo y contribuyeron con críticas y comentarios, que de igual manera, delinearon el trabajo final.

Agradezco a Fundación UNAM y DGAPA (Proyecto IN210191) por el apoyo financiero proporcionado.

Dicho trabajo se realizó en el Laboratorio 312 del Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

DEDICATORIAS

A ti, esencia o sustancia, Dios personal o impersonal, conciencia del Universo o Voluntad sin conciencia y sin fin, qué importa, lo único que sé es que te amo.

A mamá y papá. Las palabras son sólo un símbolo que poco aciertan a expresar mi sentir. Mejor, mírenme a los ojos y observarán mi profundo amor y agradecimiento. Gracias por darme vida los amo.

A Lili y Juan, mis queridos hermanos, por disfrutar y compartir muy estrechamente conmigo cada etapa de mi vida. Gracias por su incondicional apoyolos amo.

A mi pequeño hermano Uli por llenar mi vida de alegría. A mis sobrinos Víctor, Mariana y Lorena, que sé bien que esto no les servirá de ejemplo, pues cada uno trae ya consigo su propia grandeza.

A mis abuelitos Cuca, Elena y Elpidio quienes con el ejemplo me han enseñado la solidaridad y unión de una verdadera familia. Gracias por enseñarme a ser humilde.

A mis tías, tíos, primas, primos y cuñados que siempre estuvieron muy pendientes de mi carrera ¡ Lo logramos !

Al Gordo que tan diferente fue la vida después de conocerte, que tan diferente fue el mirar al cielo mágica obscuridad, fascinante infinito, radiante Venus

A Ana, lindo angelito que Dios me envió para mostrarme la bondad de la vida.

A mis amigas Mairucha, Reventón, Queso, Karen y Humberto por los momentos tan padres que pasamos durante la carrera y por aquellos que no tenían tanto que ver con la ciencia.

A mis compañeros de la maestría Rulis, Taniux, Ady y en especial a Erik quien significó un sólido apoyo.

A la UNAM y en especial a mi querida Facultad de Ciencias por brindarme un espacio donde pase momentos inolvidables.

CONTENIDO

Resumen	i
I. Introducción	1
II. Generalidades	
1.1 Sistemática Bacteriana	3
1.1.1 Métodos fenotípicos	3
1.1.2 Métodos genotípicos	6
1.1.3 Clasificación numérica de los organismos	12
1.1.4 Taxonomía polifásica	16
1.2 Las bacterias lácticas y los alimentos fermentados de origen vegetal	19
1.3 Bacterias lácticas del pozol	21
1.4 <i>L. plantarum</i>	23
1.5 <i>L. plantarum</i> y los alimentos fermentados	25
III. Objetivos	26
IV. Material y Métodos	
4.1 Microorganismos empleados	27
4.2 Medios y condiciones de cultivo	27
4.3 Extracción de ADN cromosómico por gradiente discontinuo en CsCl-BrET	29
4.4 Selección de las enzimas de restricción	33
4.5 Digestión de ADN con enzimas de restricción	33
4.6 Electroforesis horizontal en campo constante	33
4.7 Análisis densitométrico	34
4.8 Análisis numérico	34
V. Resultados y discusión	36
VI. Conclusiones	48
VII. Recomendaciones	50
VIII. Bibliografía	51
IX. Anexo A	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los diferentes tipos de información empleados en la taxonomía polifásica.....	4
Figura 2. Resolución taxonómica de algunas de las técnicas más empleadas para la clasificación bacteriana	12
Figura 3. Clasificación de <i>L. plantarum</i>	24
Figura 4. Fotografía del gradiente CsCl-EtBr formado con la ultracentrifugación	31
Figura 5. Recuperación de la banda de ADN mediante punción con aguja estéril	32
Figura 6. Perfiles de restricción para la cepa 45 lilis generados por las enzimas <i>SfiI</i> y <i>SmaI</i>	37
Figura 7. Perfiles de restricción para la cepa 46 SnC generados por las enzimas <i>SfiI</i> y <i>SmaI</i>	37
Figura 8. Perfiles de restricción para la cepa 45 lilis generados por las enzimas <i>BglI</i> , <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i>	39
Figura 9. Perfiles de restricción para la cepa 46 SnC generados por las enzimas <i>BglI</i> , <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i>	41
Figura 10. Perfil de restricción y dendograma generado por la enzima <i>BglI</i> para las cepas de <i>L. plantarum</i> aisladas del pozol	45
Figura 11. Perfil de restricción y dendograma generado por la enzima <i>EcoRI</i> para las cepas de <i>L. plantarum</i> aisladas del pozol	46
Figura 12. Perfil de restricción y dendograma generado por la enzima <i>HindIII</i> para las cepas de <i>L. plantarum</i> aisladas del pozol	47

RESUMEN

El presente trabajo constituye una primera aproximación a un estudio polifásico de *L. plantarum*, enfoque que es requerido para tener una mejor descripción de las cepas dada la heterogeneidad fenotípica y genotípica que presenta el género.

Debido a que la variabilidad entre microorganismos puede ser expresada en múltiples y diferentes moléculas una clasificación que considere toda o la mayoría de la información sobre todos los aspectos conocidos de un organismo cubrirá partes esenciales de su genoma, que serán reflejados en una clasificación más completa, de aquí la importancia de una taxonomía polifásica para *Lactobacillus*.

El polimorfismo en longitud de los fragmentos de ADN (RFLP) y el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) se emplearon para tipificar a 22 cepas aisladas del pozol, identificadas bioquímicamente como *L. plantarum*, en paralelo con tres cepas de referencia de American Type Culture Collection (ATCC): ATCC 8014, ATCC 10241y ATCC 14431.

Las enzimas *BglI*, *EcoRI* y *HindIII* fueron seleccionadas para digerir el ADN de las cepas bajo estudio, pues generaron fragmentos cuantificables y distinguibles para la mayoría de las cepas. Se obtuvo un perfil de restricción único para cada cepa, incluyendo a las cepas de referencia, lo que reveló una marcada heterogeneidad genética en la especie. Asimismo, las diferencias en los perfiles se reflejarón en el agrupamiento de las cepas, en vista de que los tres dendogramas generados no muestran grupos estrechamente relacionados, sino que evidencian la formación de un grupo principal, que albergó alrededor del 85% de las cepas, a una distancia que osciló entre 0.51 y 0.52.

No se encontró una correlación entre la heterogeneidad genética encontrada y los resultados de identidad bioquímica. Así mismo, las cepas ATCC 8014 y ATCC 14431 mostraron una mayor relación con las cepas bajo estudio.

Los resultados obtenidos contribuyen a reforzar aspectos señalados por diversos autores sobre la falta de correlación entre la heterogeneidad genética y la identidad bioquímica, particularmente ante los diferentes comportamientos de las cepas consideradas como de referencia. Hecho que reafirma el concepto de que los estudios poblacionales deben abordarse con enfoques polifásicos para una mejor identificación de las cepas.

I. INTRODUCCIÓN

La identificación y clasificación bacteriana había representado un área poco interesante dentro de la microbiología y su realización se basaba fundamentalmente en pruebas fenotípicas clásicas o tradicionales. Los trabajos realizados por Carl R. Woese y colaboradores en los 70's, empleando la molécula de ARNr para estudiar la filogenia de los procariontes, promovieron un gran desarrollo en lo que a taxonomía bacteriana se refiere. El empleo de técnicas basadas en la utilización de ésta molécula o en los genes que la codifican (ADNr) revolucionaron la visión taxonómica y filogenética de todos los seres vivos (Vandamme et al. 1996).

La taxonomía bacteriana emplea diferentes tipos de información: genotípica, derivada de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y fenotípica, derivada de las proteínas y sus funciones, marcadores quimiotaxonómicos y un amplio rango de características expresadas.

El empleo de la información genotípica y fenotípica en una forma aislada para la identificación y/o caracterización de un grupo determinado, ha generado, en algunos casos, resultados que difieren al comparar ambos tipos de información (Hammes y Vogel, 1995).

Una clasificación que considere la información sobre todos los aspectos conocidos de un organismo en particular cubrirá partes esenciales de su genoma, lo que constituye un argumento que remarca una mayor estabilidad de una clasificación polifásica. La propuesta de integrar la información genotípica, fenotípica y filogenética para lograr un tipo consenso de taxonomía se aborda por la taxonomía polifásica. Esta ha sido aplicada a diversos grupos bacterianos para alcanzar una asignación de especie sobre la base de todos los datos fenotípicos y genotípicos disponibles.

Es conocido que la taxonomía del género *Lactobacillus* es insatisfactoria debido a que el género es fenotípicamente heterogéneo, e incluso algunas especies han mostrado también una heterogeneidad genotípica. Para llegar a una clara identificación de las

especies dentro de este género se propone una combinación de los diferentes tipos de información que se tengan disponibles y obtener una asignación consenso.

Este trabajo pretende caracterizar a cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas del pozol mediante el análisis de los perfiles de restricción. Esta caracterización molecular permitirá determinar la heterogeneidad genética de la especie y correlacionar la identificación fisiológica de las cepas con el análisis de agrupamiento obtenido a partir de la información generada de los perfiles.

Así mismo, este trabajo contribuirá al conocimiento sobre la microbiología del pozol (alimento fermentado tradicional), donde *L. plantarum* es uno de los microorganismos predominantes.

II. GENERALIDADES

2.1 SISTEMÁTICA BACTERIANA

La identificación y clasificación bacteriana había representado un área poco interesante dentro de la microbiología. Desde los 1970s, cuando Carl R. Woese y colaboradores comenzaron a estudiar la filogenia de los procariontes utilizando la molécula de ARNr 16S, se presentó un gran desarrollo en lo que a taxonomía bacteriana se refiere. El empleo de técnicas basadas en la utilización de ésta molécula o en los genes que la codifican (ADNr) revolucionaron la visión taxonómica y filogenética de todos los seres vivos (Vandamme y col. 1996).

Se emplean diferentes tipos de información en la taxonomía bacteriana: información genotípica, derivada de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) e información fenotípica, derivada de las proteínas y sus funciones, diferentes marcadores quimiotaxonómicos y un amplio rango de características expresadas (Fig. 1).

2.1.1 Métodos fenotípicos

Las pruebas fenotípicas clásicas o tradicionales son utilizadas como esquemas de clasificación en la mayoría de los laboratorios de microbiología, constituyendo la base para la descripción formal de los taxa (Vandamme y col., 1996). Se han desarrollado sistemas de identificación miniaturizada basada en caracteres nutricionales y bioquímicos. El procedimiento de estos sistemas incluye la comparación de un gran número de propiedades fenotípicas de un organismo con las mismas propiedades fenotípicas de otros organismos considerados como referencia. El grado de similitud con respecto a las cepas tipo es calculado mediante programas de computo. Los sistemas API (bioMérieux SA, La Balme-les-Grottes, Francia), Enterotubo II y Tubo Oxi-Ferm (Becton Dickinson Microbial Systems), Sistema Pasco MIC/ID (Difco Laboratories), Sistema Biolog (Biolog, Inc., Hayward, CA. USA), Sistema MicroID (General Diagnostic,

INFORMACIÓN GENOTÍPICA

ADN

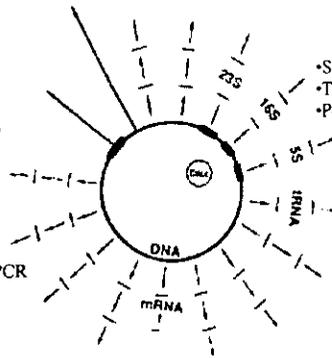
- ADN total:
- % G+C
 - Patrones de restricción (RFLP, PFGE)
 - Tamaño del genoma
 - Hibridaciones ADN:ADN

Segmentos de ADN:

- Pruebas de ADN basadas en PCR (ribotipificación, ARDRA, RAPD, AFLP)
- Sondas de ADN
- Secuenciación de ADN

ARN

- Secuenciación de bases
- Tamaño del genoma
- Perfiles ARN LMW



PROTEÍNA

- Patrón electroforético de proteína celular total
- Patrones de enzimas (Electroforesis de enzimas multifocus)

MARCADORES QUIMIOTAXONÓMICOS

- Ácidos grasos celulares
- Ácidos micólicos
- Lípidos polares
- Quinonas
- Poliaminas
- Composición de pared celular
- Exopolisacáridos

CARACTERÍSTICAS EXPRESADAS

- Morfología
- Fisiología (API)
- Enzimología
- Serología (monoclonal, policlonal)

INFORMACIÓN FENOTÍPICA

Figura 1. Esquema de los diferentes tipos de información empleados en la taxonomía polifásica. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), LMW (Low Molecular Weight). Tomado de Vandamme y col. (1996).

Div., Warner Lambert Co.), entre otros, son ejemplos de sistemas de identificación miniaturizados.

El análisis del patrón de ácidos grasos para la clasificación e identificación de bacterias es una técnica claramente establecida, su importancia para la identificación se basa en las diferencias estructurales de estas moléculas. De igual manera, el potencial del análisis de las quinonas isoprenoideas para la caracterización bacteriana está fundamentado en base a la estructura de estas moléculas: longitud de la cadena lateral isoprenoide, número de unidades isoprenoideas saturadas y por los diferentes tipos de quinonas (Busee y Auling, 1996).

Aunque el papel de las poliaminas en la célula aún no es claro, su importancia en el metabolismo bacteriana parece serlo, ya que su carácter universal y la variabilidad cuantitativa y cualitativa las hace figurar como marcadores quimiotaxonómicos, que dependiendo del grupo de organismo estudiado son capaces de evidenciar a nivel de género y especie (Busse y col. 1988; Yang y col. 1993).

La pirólisis evaluada en espectrometría de masas, la espectroscopia infraroja empleando transformada de Fourier y la espectroscopia Raman con resonancia UV son técnicas analíticas sofisticadas, las cuales examinan la composición química total de las células bacterianas. Estos métodos han sido utilizados para estudios taxonómicos de grupos particulares de bacterias (Magee, 1993).

La comparación de patrones de proteínas celulares obtenidos a partir de una electroforesis en gel de poliacrilamida-sulfato dodecil de sodio (SDS-PAGE) ha proporcionado un método muy seguro para comparar y agrupar a un gran número de cepas relacionadas muy estrechamente (Pot y col. 1994). Incluso numerosos estudios han revelado una correlación entre la alta similitud en el contenido de proteína celular total y la hibridización ADN/ADN (Costas, 1992). También se emplea el análisis del patrón de proteínas para las investigaciones que requieren una identificación a nivel de género o especie y para la detección de aislados idénticos de muestras naturales. Este método ha sido aplicado para la identificación y clasificación del género *Lactobacillus* (Dicks y van Vuuren, 1987; Pot y col., 1993, y Couto y Hogg, 1994).

En particular, el estudio de los diaminoácidos de la pared bacteriana y el análisis de los azúcares de ésta o de la célula total, son empleados para la clasificación y descripción de las bacterias Gram-positivas. Así mismo, para la descripción y diferenciación de las taxa Gram-positivas, se han reconocido cinco tipos de fosfolípidos, que inclusive permiten clasificar a bacterias nocardioformes y actinomicetes. Por otro lado, el análisis de los ácidos micólicos ha servido para distinguir a miembros del género corineriformes (tomado de Busse y col., 1996).

Cuando los organismos son identificados por caracteres fenotípicos, por ejemplo las pruebas miniaturizadas, es obligatorio incluir cepas de referencia, ya que varios factores pueden influenciar la calidad de la identificación. Usualmente las especies bacterianas consisten de diferentes cepas y/o biotipos, mostrando variación en el fenotipo, el cual también puede ser afectado por la ausencia o presencia de plásmidos que codifican para ciertas funciones metabólicas; la variación en el tamaño del inoculo y la duración de la incubación pueden afectar la interpretación de los resultados, de igual manera cepas recientemente aisladas pueden mostrar diferentes perfiles de reacción comparadas con aquellas que han estado conservadas o subcultivadas por un largo tiempo en el laboratorio (Vandamme y col., 1996).

2.1.2 Métodos genotípicos

La determinación del contenido G+C (G:Guanina y C:Citocina) es un método clásico considerado parte de la descripción estándar de los taxa bacterianos y generalmente la variación en el contenido de estas bases dentro de una especie no debe incrementar más del 5% y dentro de un género no más del 10% (Schleifer and Stackebrand, 1983). Estudios de hibridación ADN/ADN se emplean para la identificación a nivel de especie y el porcentaje en similitud es un valor indicativo indirecto de la similitud de secuencias entre dos genomas completos; un valor del 70% indica una relación a nivel de especie, mientras que valores entre el 20% y 60% evidencian a un nivel de género. Pruebas basadas en el ADN son utilizadas para la identificación de bacterias en diagnósticos médicos, la detección de bacterias recombinantes en el medio y en estudios de la

estructura y dinámica de poblaciones en un ecosistema microbiano. Las hibridizaciones ADN/ARNr son ampliamente utilizadas para clarificar relaciones filogenéticas, especialmente dentro de la clase Proteobacteria. Esta prueba combinada con otras características fenotípicas ha permitido el establecimiento de numerosos géneros: *Hydrogenophaga* y *Brevundimonas*, entre otros (Segers y col., 1994).

El ARNr es considerado como el mejor indicador de relaciones filogenéticas, debido a que está presente en todas las bacterias, es funcionalmente constante y está compuesto por dominios altamente conservados, así como por dominios altamente variables. La comparación de secuencias del ARNr 16S ha permitido la identificación de especies estrechamente relacionadas y proporciona de igual manera pruebas específicas para lograr una identificación precisa de los microorganismos. La secuenciación de los genes ARNr 16S, la amplificación de los mismos con "cebadores" conservados, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (de sus siglas en inglés PCR: Polymerase Chain Reaction) y la utilización de la transcriptasa reversa permitieron un avance muy importante en la filogenia bacteriana (Vandamme y col., 1996).

La comparación de los valores de similitud empleando ARNr 16S y la similitud encontrada al analizar el ADN para los mismos organismos, en algunos casos a resultado contradictoria, por ejemplo la similitud entre *Bacillus psychrophilus* y *Bacillus globisporus* empleando ARNr 16S es 99.9% y, en contraposición, la similitud utilizando ADN es del 23% (Fox y col., 1992). Estas observaciones sugieren obtener información adicional a cerca de otras características para obtener una descripción taxonómica confiable.

Los patrones de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) han permitido la diferenciación de cepas relacionadas muy estrechamente, su aplicación resulta muy relevante en el área clínica diferenciando a especies patógenas difíciles de distinguir, tales como *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* (Czajka y col., 1993) y cepas de *Staphylococcus aureus* (Saulnier y col., 1993).

La detección de todos los miembros de una comunidad en su ambiente natural presenta ciertos problemas debido a que no todos los microorganismos son susceptibles a cultivarse, esto se ha venido resolviendo gracias al desarrollo de técnicas de PCR, donde los genes de ARNr 16S son amplificados¹, clonados y secuenciados, y el número de secuencias diferentes que resultan indican, por tanto, la diversidad bacteriana dentro de la muestra. Para la detección y clonación de genes específicos ARNr 16S dentro de la comunidad, se utiliza una electroforesis en gradiente desnaturizante (DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis), la cual permite una separación de los fragmentos amplificados con la misma longitud (Muyzer y col., 1993).

Métodos de tipificación basados en el ADN

Los métodos de tipificación basados en el ADN generalmente se refieren a técnicas que permiten subdividir a las especies en diferentes tipos. Clásicamente, estas subdivisiones eran realizadas por medio de pruebas bioquímicas o serológicas, por su susceptibilidad a antibióticos, por bacteriocinas o fagos, etcétera. Ahora, con el gran desarrollo de técnicas basadas en caracteres genotípicos, se han generado una gran gama de métodos de tipificación basados directamente en el ADN. Idealmente, estas técnicas son universalmente aplicables, son reproducibles y fáciles de realizar, además de ser altamente discriminatorias. Aunque varias técnicas no cumplen con esta definición general, estos métodos han reemplazado en muchos laboratorios, a las técnicas clásicas (Maslow y col. 1993; Tenover y col. 1995)

Dentro de estos métodos se encuentran el análisis de plásmidos, ribotipos, análisis de las secuencias de ADN correspondientes al factor de elongación Tu, estudio de la proteína ribosomal S12 y proteínas flagelares. Con la introducción del PCR han surgido diferentes métodos de caracterización. Entre éstos se encuentran el análisis del ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), análisis de restricción del ADN amplificado, el polimorfismo en longitud de los fragmentos amplificados (AFLP: amplified fragment length

¹ La amplificación se realiza a partir de muestras naturales

polymorphism) y el análisis del polimorfismo en longitud de los fragmentos de digestión (RFLP: restriction fragments length polymorphism).

Se han realizado estudios de tipificación para el género *Lactobacillus* por Rodtong y col. (1993), Zhong y col. (1998), y específicamente para *L. plantarum* por Johansson y col. (1995) y Quere y col. (1997).

Análisis del polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción (RFLP: Restriction Fragments Length Polymorphism)

Los RFLP corresponden a la primera generación de métodos de tipificación basados en el ADN. La técnica consiste en la digestión del ADN genómico total por enzimas de restricción, generándose de esta forma fragmentos de diferentes tamaños de ADN, los cuales son separados y visualizados por una electroforesis en gel de agarosa, estableciéndose el polimorfismo en longitud de los mismos.

Con frecuencia el patrón de bandeo obtenido resulta muy complejo de analizar y comparar, debido a la gran cantidad de fragmentos generados. El número de fragmentos puede ser reducido con la selección de enzimas de restricción que raramente corten al ADN, reconociendo una combinación específica de seis a ocho bases. De esta forma, la técnica es referida como el análisis de los fragmentos de restricción de baja frecuencia.

El análisis de los fragmentos de restricción de baja frecuencia es dependiente a su vez del desarrollo de técnicas electroforéticas especiales, conocidas como electroforesis en campo pulsado, considerada como uno de los métodos de tipificación más discriminatorios basados en el ADN (Gordillo y col. 1993; Maslow y col. 1993; Tenover, 1995).

El RFLP puede ser usado para la detección de rearreglos en el genoma y mutaciones que afectan los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción, así como para

diferenciar cepas de alguna especie en particular y estudios epidemiológicos (Busse y col., 1996).

Taskanen y col. (1990) establecieron un método de identificación de cepas utilizando ADN genómico de lactococos, digiriéndolo con la enzima de restricción *Sma*I y corriendo las muestras en electroforesis de campo pulsado. Este método permitió diferenciar a dos diferentes subespecies de *Lactococcus lactis*: subespecie *lactis* y subespecie *cremoris*. Las dos subespecies difieren en propiedades industrialmente importantes, tales como la producción de ácido, la sensibilidad de infección por bacteriofagos, capacidad para degradar caseína y en el sabor y textura conferida al producto final. Los autores proponen esta técnica como un método simple y confiable para la identificación de cepas de lactococos, así como para el estudio de su evolución.

Se caracterizaron cepas de *Leuconostoc oenos* mediante sus perfiles de restricción de ADN (Lamoreux y col. 1993). Lamoreux y colaboradores estudiaron 41 cepas de *L. oenos* obtenidas de colecciones de diferentes países. La utilización de dos tipos diferentes de electroforesis: electroforesis en campo alternante transverso (TAFE: transverse alternating field electrophoresis) y electroforesis en campo constante, así como la utilización de una gama de enzimas de restricción, permitieron la tipificación de las cepas. De igual manera, fue posible calcular el tamaño del cromosoma que osciló entre 1.8 y 2.1 megabases. Así mismo, con el empleo de solo dos enzimas las 41 cepas se agruparon en 30 grupos de restricción.

El tamaño del cromosoma y el número de loci *rrn* de *Lactobacillus plantarum* fueron determinados por la digestión con diferentes enzimas de restricción y la posterior utilización de electroforesis de campo pulsado (Chevallier y col. 1994) y se encontraron los patrones de macrorestricción como cepa-específicos, lo que sugería que este método puede emplearse en procesos industriales para realizar un seguimiento de las cepas iniciadoras y detectar a cepas contaminantes.

Stahl y col. (1990) propusieron al análisis del patrón de restricción combinado con un análisis multivariado como una herramienta para la clasificación de *Lactobacillus* spp. En este trabajo se digirió el ADN de tres cepas de *L. plantarum* y siete cepas de *L. reuteri* con *Asp718*, *ClaI* y *EcoRI*. Las enzimas proporcionaron patrones de digestión reproducibles, además de una digestión completa del ADN en un número conveniente de fragmentos. Estos fragmentos, sugirió, pueden ser usados como pruebas para la identificación de un taxón específico.

A manera de resumen en la figura 2 se muestra la resolución taxonómica de algunas de las técnicas empleadas en la taxonomía bacteriana.

2.1.3 Clasificación numérica de microorganismos

La taxonomía numérica ha proporcionado nuevos métodos de clasificación basados en macromoléculas como el ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) y proteínas (Russek-Cohen y col., 1996). Además, el gran avance computacional de las últimas décadas ha permitido la resolución de algoritmos intensivos computacionalmente indispensables para la clasificación numérica.

Uno de los aspectos de este tipo de clasificación se centra en la medición del grado de relación entre un grupo de cepas o taxa. Existe una gran variedad de algoritmos diseñados para describir las relaciones gráficamente, con frecuencia en la forma de diagrama de árbol o dendograma, los cuales pueden o no, tener un enfoque evolutivo.

Construcción de un árbol

Existen, en general, tres grandes aproximaciones para la construcción de un árbol que evidencie las relaciones entre los diferentes taxa o moléculas. La primera se basa en la medición de la similitud y/o distancia (históricamente este tipo de construcción de árbol ha recibido la mayor atención en microbiología); la segunda aproximación se fundamenta

en métodos estadísticos o de máxima probabilidad, y finalmente, la tercera en el enfoque cladista (Russek-Cohen y col., 1996).

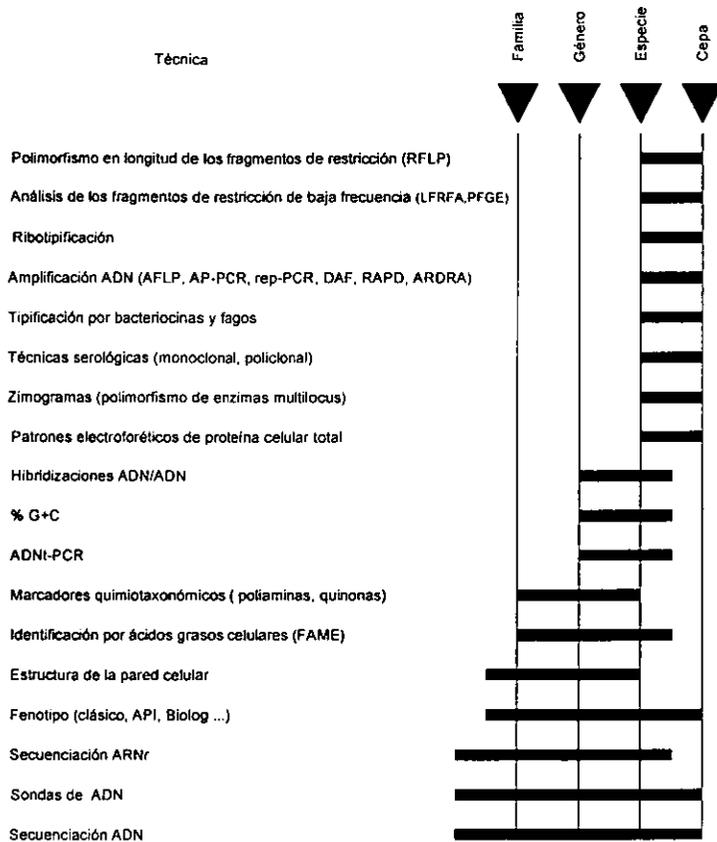


Figura 2. Resolución taxonómica de algunas de las técnicas más empleadas en la clasificación bacteriana. Las abreviaciones están definidas en la leyenda de la figura 1. Tomado de Vandamme, 1996.

Estimación de la distancia o disimilaridad

La medición de la distancia esta diseñada para definir que tan apartados o que tan disimilares son dos o más taxa, en base a su genotipo, fenotipo o a su filogenia. La medición usada es frecuentemente seleccionada sobre la base del tipo de caracteres.

Nei y Li (1979) propusieron un modelo matemático para calcular la distancia genética en términos de los fragmentos de restricción:

$$GD_{xy} = 1 - 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

donde GD_{xy} es la distancia genética entre x y y , N_x es el número de fragmentos (bandas) en la línea x , N_y es el número de fragmentos en la línea y , y N_{xy} es el número de fragmentos compartidos en las líneas x y y . Los datos que se proporcionan son de carácter binario, es decir, presencia o ausencia de fragmentos con una longitud determinada.

Nei y Li suponen que la divergencia genética del ADN entre dos poblaciones o especies se correlaciona con la proporción de fragmentos de restricción compartidos.

En el modelo el análisis de los datos de restricción se basa en distribuciones probabilísticas. Sitios de restricción originales (sitios que se conservan del ancestro común) se deduce presentan una distribución binomial, mientras que los sitios nuevos se distribuyen según Poisson, y los sitios compartidos, N_{xy} , evidencian una distribución binomial.

Método de agrupamiento en pares con promedio aritmético (UPGMA, de sus siglas en ingles: Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean)

El método de agrupamiento UPGMA es uno de los más simples para inferir la topología de un árbol (Li, 1997), originalmente fue desarrollado para la construcción de fenogramas taxonómicos; sin embargo, este puede ser utilizado para la construcción de árboles si la tasa de evolución es aproximadamente constante entre los diferentes grupos o taxa.

ALGORITMO. Este método emplea un algoritmo de agrupamiento secuencial, en el cual las relaciones topológicas son inferidas en orden del decremento en similitud de las unidades taxonómicas operacionales (UTO), sean taxa, cepas, grupos, etc. Los valores de distancia obtenidos son presentados en una matriz como la siguiente:

	UTO				
UTO	A	B	C	. . .	i
B	d_{AB}				d_{iB}
C	d_{AC}	d_{BC}			d_{iC}
D	d_{AD}	d_{BD}	d_{CD}		d_{iD}
.					
.					
.					
j	d_{Aj}	d_{Bj}	d_{Cj}		d_{ij}

donde d_{ij} representa la distancia entre la i-ésima y la j-ésima UTO.

El agrupamiento comienza con la identificación de las dos UTO que presentan mayor similitud entre sí, conformándose el primer grupo cuyo punto de ramificación es colocado a una distancia $d_{ij}/2$, de tal manera que la suma de la longitud de las ramas entre estas dos UTO's representa la distancia o disimilitud. Las dos UTO son tratadas como una única unidad taxonómica, la cual es referida como unidad taxonómica compuesta. Para lo cual

se requiere crear una nueva matriz y en ésta se identifica a otra unidad taxonómica que presente mayor similitud con la unidad taxonómica compuesta. Este mismo procedimiento es realizado con la generación de nuevas matrices, hasta que solamente dos unidades taxonómicas sean formadas. Cabe señalar que la distancia a la cual deberá de ser colocado el punto de ramificación para los siguientes grupos formados varía según el número de componentes de cada unidad taxonómica compuesta.

Método de la distancia transformada

Farris (1977) mostró que cuando la tasa de evolución no es constante, una transformación de la distancia puede corregir la topología de un árbol creado por el método de la distancia promedio (UPGMA), siempre y cuando se satisfaga la condición de un árbol aditivo (todas las sustituciones siendo contadas). La distancia transformada para las especies *i* y *j* es:

$$d'_{ij} = (d_{ij} - d_{ir} - d_{jr})/2 + C$$

donde *r* representa a la UTO de referencia y *C* es una constante para hacer a d'_{ij} positivo.

Cuando se está interesado en un árbol sin raíz se puede elegir a una de las unidades taxonómicas como organismo de referencia y determinar la topología del árbol. Sin embargo, debido a que los datos moleculares pueden presentar intrínsecamente mutaciones paralelas, retrocesos u otro tipo de alteración, se pueden introducir errores topológicos, por lo que un árbol sin raíz obtenido mediante el empleo de una UTO de referencia, no necesariamente será el mismo si lo obtenemos empleando otra UTO como referencia. Por esta razón es recomendable que en la aplicación de este método para un árbol sin raíz sea producido para cada UTO de referencia, y que el árbol más consistente o árbol consenso sea elegido.

Una vez generada la nueva matriz de distancia se aplica UPGMA para inferir la topología del árbol.

El método de la distancia transformada es únicamente empleado para la construcción de la topología, por lo que no estima la longitud de las ramas. Una vez que la topología es obtenida, la longitud de las ramas puede ser estimada utilizando Fitch y Margoliash's.

2.1.4 Taxonomía polifásica

La taxonomía polifásica se originó a principios de los 70's con el objetivo de integrar los diferentes tipos de información (genotípica, fenotípica y filogenética) existentes para los microorganismos e indicar un tipo consenso de taxonomía. El término "taxonomía polifásica" fue designado por Colwell en 1970 y es empleada para la delineación de los taxa a todos los niveles. Los términos clasificación polifásica e identificación polifásica se emplean válidamente en este contexto.

En principio, toda la información genotípica, fenotípica y filogenética puede ser incorporada en la taxonomía polifásica. Ésta se ha aplicado a diversos grupos bacterianos para alcanzar una asignación consenso sobre la base de todos los datos fenotípicos y genotípicos disponibles. El género *Xanthomonas* es un ejemplo de un grupo versátil bioquímicamente, pero filogenéticamente presenta un linaje muy estrecho. El uso de una variedad de técnicas ha demostrado que la clasificación previa es un sistema artificial, y que la clasificación e identificación basada sobre miembros específicos no fue siempre la correcta, (Vandamme, 1996). El género *Campylobacter*, en contraposición, representa un grupo restringido bioquímicamente de bacterias, las cuales constituyen un linaje filogenético extremadamente heterogéneo. Una vez realizado un análisis polifásico la estructura completa del grupo quedó bien definida, distinguiéndose genotípicamente tres géneros, los cuales fueron soportados por características ultraestructurales y quimiotaxonómicas. A nivel de especie, la congruencia entre la similitud del patrón de proteínas total y la hibridación fue claramente establecida (Vandamme, 1996).

Los estudios taxonómicos basados en una prueba única para la clasificación de bacterias muestran discrepancias con los análisis polifásicos realizados. Una clasificación que considere toda la información sobre todos los aspectos conocidos de un organismo en particular cubrirá partes esenciales de su genoma, y esto puede ser un argumento que remarque una mayor estabilidad de una clasificación polifásica, (Vandamme, 1996). Es por esto que no existe un estándar filogenético para la delineación de familias, géneros o especies.

Cada clasificación debe intentar arreglar a la diversidad natural de cepas en un sistema jerárquico. Debido a que la variabilidad entre organismos es expresada en múltiples y diferentes moléculas, esto explica porque los sistemas de clasificación monofásicos son débiles. Cada carácter revela parte de esta variabilidad, por lo tanto es útil y puede ser considerado, sin embargo la experiencia ha demostrado que algunos de estos caracteres presentan un valor superior y son parámetros relevantes para grupos taxonómicos particulares. Algunos de estos caracteres son: estudios de hibridación de ADN, análisis de la secuencia de ARNr, métodos de tipificación basados en el ADN, análisis de ácidos grasos total y análisis de proteínas total.

Es evidente que la realización de una taxonomía polifásica no es sencilla, el alcance del estudio es determinado principalmente por el problema mismo. Una prueba polifásica para la clasificación bacteriana debe incluir métodos para establecer una localización filogenética, métodos para comparar y agrupar un gran número de cepas dentro de grupos de bacterias similares, hibridación ADN-ADN para determinar las relaciones entre los grupos, así como métodos descriptivos que proporcionen información tanto genotípica como fenotípica adicional.

Taxonomía polifásica de bacterias lácticas

La estructura filogenética de las bacterias lácticas deducida a partir de la secuenciación de ARNr es actualmente clara, pero es diferente de los esquemas de clasificación quimiotaxonómicos y fisiológicos usados por casi un siglo.

El análisis filogenético de los lactobacilos, basado en la homología del ARNr 16s, ha permitido subdividirlo en tres grupos: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei-Pediococcus*, *Leuconostoc* y el grupo de otros lactobacilos .

La delimitación de las especies del género *Lactobacillus* por pruebas fenotípicas, específicamente por la presencia de la aldolasa fructosa 1-6 bifosfato, resultó en la subdivisión de estas bacterias en tres grupos fisiológicos: lactobacilos homofermentativos obligados, lactobacilos heterofermentativos facultativos y lactobacilos heterofermentativos obligados. Esta subdivisión se propuso a principios de siglo, a finales de los 70's sufrió algunas modificaciones y es aun utilizada.

Hammes y Vogel (1995) integraron la información fenotípica con la filogenética obteniendo otra subdivisión de los lactobacilos. En esta subdivisión las letras mayúsculas se refieren al tipo de fermentación y las letras minúsculas a los grupos filogenéticos: Grupo A (lactobacilos homofermentativos obligados) con dos subgrupos, Aa y Ab. Grupo B (lactobacilos heterofermentativos facultativos) con dos subgrupos, Ba y Bb. Grupo C (lactobacilos heterofermentativos obligados) con dos subgrupos Cb y Cc.

Se han venido realizando diferentes revisiones taxonómicas a partir de la última década e incrementan en dependencia a la información de la secuenciación del ARNr. No obstante, debido al amplio uso de sistemas comercializados para pruebas fenotípicas, y aunado al gran número de taxa, los análisis fenotípicos tradicionales mantienen su importancia.

Algunas cepas de lactobacilos aisladas del yoghurt y de diferentes tipos de quesos fueron identificadas y agrupadas de acuerdo a sus relaciones genotípicas y fenotípicas (Andrighetto y col., 1998). Veinticinco cepas fueron identificadas por su patrón de fermentación de carbohidratos (API 50 CHL), por sondas de ADN especie-específicas

mediante hibridización *dot blot* , por la amplificación y análisis de restricción del gen de ARNr 16s y por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando *primers* de oligonucleótidos especie-específicos. Nueve cepas identificadas con el sistema API 50 CH con una calidad de identificación "buena" y "muy buena" correlacionaron perfectamente con la identificación genotípica. El dendograma de relaciones genéticas obtenido a partir de esta última prueba permitió la identificación de cepas no identificadas por el perfil de fermentación de carbohidratos. Los resultados de este estudio demostraron la utilidad de diferentes criterios taxonómicos (genotípicos y fenotípicos) para la identificación de aislados naturales de lactobacilos termofílicos.

Finalmente, una combinación de las técnicas antes descritas, basadas tanto en el genotipo como en el fenotipo, serán empleadas como herramientas para mejorar la calidad de identificación de las cepas de *L. plantarum* aisladas del pozol.

2.2 LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y LOS ALIMENTOS FERMENTADOS DE ORIGEN VEGETAL

Las bacterias lácticas son un grupo de microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza, se asocian principalmente con ambientes lácteos, aunque algunas especies se encuentran comúnmente en la mayoría de las plantas, constituyendo éste su hábitat natural. En este grupo se encuentran los géneros *Lactobacillus* (*L. arabinosus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*), *Leuconostoc* (*Leuc. mesenteroides*), *Pediococcus* (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*), *Lactococcus* (*Lc. lactis*) y *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*) (Daeschel y col. 1987). El género predominante en las plantas es *Leuconostoc* (Daeschel y col. 1987), por lo que es frecuente su presencia en alimentos fermentados de origen vegetal, actuando principalmente como iniciador.

La participación de *Leuconostoc mesenteroides* en la iniciación de la fermentación de verduras, como la col agria y los pepinillos, y en el *kenkey* de Ghana (Christian y Niako, 1983), es ampliamente reconocida; así como su poca tolerancia a la acidez, que resulta en su reemplazo por cepas más resistentes, como *Lactobacillus plantarum* (Fleming,

1982). Ambos géneros son los principales productores de ácido durante la fermentación de yuca, y contribuyen a la producción del aroma típico de bebidas fermentadas como el *gari*, *fufu* y *lafun* (Okafor, 1977; Ngaba y Lee, 1979; Okafor y col., 1984; Onyekwere y col., 1989; Ofuya y Nnajifor, 1989; Oyewole y Odunfa, 1990; Oyewole, 1990).

Para el caso de masas agrias para producir pan, sobre todo de centeno, predomina el género *Lactobacillus*, aunque también se encuentran *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactococcus* (Oura y col. 1982). En el *ogi* de Nigeria (alimento a base de maíz, sorgo o migo) (Onyekwere y col., 1989; Banigo y col., 1983), el *uji* de Kenya (alimento fermentado de maíz y agua) (Gatumbi y col., 1983) y el *mawe* de Benin y Togo (alimento de maíz) (Hounhouigan y col., 1993), la mayor proporción de bacterias lácticas correspondió al género de *Lactobacillus*; no obstante fue posible aislar en algunos casos a *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus*.

Aunque las bacterias lácticas no tienen comúnmente la capacidad para hidrolizar el almidón. Cepas con capacidad amilolítica fueron reportadas por Giraud y col. (1993), quien encuentra principalmente a *Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. cellobiosus* y *L. plantarum*. De igual forma, en una masa de pozol y en muestras de col agria fue reportada la existencia de bacterias lácticas amilolíticas.

2.3 BACTERIAS LÁCTICAS DEL POZOL

El pozol es un alimento fermentado tradicional mexicano. Su nombre deriva del náhuatl *pozolli* que significa espumoso; éste es un alimento sólido, en forma de bolas de diferentes geometrías y tamaños.

El pozol es el resultado de una fermentación principalmente láctica de la masa de maíz, aunque también intervienen hongos y levaduras: Las bacterias lácticas son el grupo predominante que le confiere las características sensoriales principales al alimento como es el sabor ácido y aroma característicos. El pozol se diluye en agua en el momento en que va a ser ingerido, de manera que se consume en forma de bebida, considerándose

como alimento básico y como bebida ceremonial y curativa por poblaciones indígenas del sureste de México (Chiapas, Tabasco, Campeche y Yucatán, y en menor escala Veracruz y Oaxaca), y como bebida refrescante por los mestizos de la misma región del país (Ulloa y Herrera, 1976-1982).

Este alimento se elabora por los mayas de Yucatán, Campeche y Quintana Roo; los lacandones, tzotziles o chamulas, tzeltales, zoques, mames y choles de Chiapas; los chontales y choles de Tabasco y los zapotecos de Oaxaca.

El primer reporte sobre la presencia de bacterias lácticas en el pozol corresponde a Steinkraus (en Ulloa y col., 1983), el cual infiere el predominio de bacterias lácticas en las primeras horas de fermentación, y que quizás sean éstas las responsables de la producción de ácido láctico. Esto fue confirmado posteriormente por Silva-Villarreal (1984), Mozqueda-González y Escamilla-Hurtado (1988), Ramírez (1987) y Nuraida (1988), mostrando evidencias directas de que el pozol es fundamentalmente una fermentación láctica del maíz.

Silva-Villarreal (1984) encontró incrementos en la acidez de pozoles de la ciudad de Tapachula, Chiapas, durante las primeras 48 horas de fermentación y relaciona este incremento con la presencia de bacterias lácticas, de las que aisló y caracterizó por métodos bioquímicos tradicionales a *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermentum*. Mozqueda-González y Escamilla-Hurtado (1988) observaron que después de 48 horas de fermentación las bacterias Gram negativas prácticamente desaparecen, y que las bacterias lácticas (lactobacilos y estreptococos) aumentan en concentración, mientras que las levaduras se mantienen en un número estable, esta sucesión se asocia a una disminución progresiva del pH y a un aumento de ácido láctico.

Nuraida (1988) caracterizó 46 cepas de bacterias lácticas aisladas por Owens y Wachter en 1987 de pozoles de Tapachula, Chiapas. Las siguientes bacterias se aislaron en un intervalo de 6 días de fermentación: *Leuconostoc* spp. presente durante todo el tiempo de fermentación estudiado; *Lactobacillus* spp. heterofermentativos y *Streptococcus* spp. en

etapas tempranas y *Lactobacillus* spp. homofermentativos en etapas tardías de la fermentación. Las especies identificadas mediante el sistema de fermentación múltiple de carbohidratos, API 50 CH, fueron: *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus confusus*, *Lactococcus (Streptococcus) lactis* y *Lactococcus (Streptococcus) raffinolactis*.

Wacher (1995) realizó estudios sobre la microbiología del pozol y llevó a cabo una caracterización de las bacterias lácticas de este alimento mediante la utilización de pruebas bioquímicas convencionales: prueba de la catalasa, producción de dextrana a partir de sacarosa, hidrólisis de almidón y producción de CO₂ a partir de glucosa. Wacher reporta la presencia de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*, detectando el predominio de este último, por lo que se infirió que deben jugar un papel importante en la fermentación. Así mismo, aisló bacterias lácticas amilolíticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. De igual manera, menciona que deben jugar un papel importante en la fermentación debido al carácter amiláceo del sustrato.

Las bacterias lácticas aisladas del pozol por Owens y Wacher en 1987 y por Cañas (1991) (93 cepas) fueron identificadas en base a su patrón de fermentación de carbohidratos (Flores, 1996), mediante el sistema API 50 CH y el programa APILAB PLUS (Bio-Mérieux). El sistema API 50 CH consiste en la adición de una suspensión bacteriana a un conjunto de pozos conteniendo cada uno un carbohidrato diferente y un control. Las muestras se incuban y se observan resultados a diferentes tiempos de fermentación. La capacidad de fermentar los carbohidratos se determina por el cambio de color en las muestras. El programa APILAB PLUS, una vez alimentado con los datos del patrón de fermentación de las diferentes cepas, proporciona un porcentaje de identificación del taxón² y la calidad de identificación³ (excelente, muy buena, buena, baja, aceptable, dudosa y no válida). Flores identificó bacterias de los géneros de *Lactococcus*,

² El porcentaje de identificación es un estimado de que tan estrechamente el perfil de carbohidratos se corresponde al taxón designado, comparado con todos los taxa de la base de datos.

³ La calidad de identificación es una asignación atribuida en base al porcentaje de identificación y al índice T, este último indica la relación entre la cepa identificada y la cepa de referencia del taxón.

Lactobacillus y *Leuconostoc*, predominando las especies de *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum*. En particular, las cepas identificadas como *L. plantarum* presentaron una calidad de identificación que osciló entre excelente, muy buena y aceptable.

2.4 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum es una bacteria gram positiva, no esporulante, en forma de varilla recta, su tamaño generalmente oscila entre 0.9-1.2 μm de ancho y entre 3- 8 μm de largo. Se puede encontrar en forma individual, en pares o formando pequeñas cadenas. Es aislada de productos lácteos, *sauerkraut* (fermentación láctica de la col), vegetales encurtidos, masas agrias, estiércol de vaca, boca humana, tracto intestinal y aguas residuales (Bergey's, 1986).

L. plantarum es una especie conocida por su variación fenotípica (cepas con capacidad para reducir nitrato, cepas móviles, cepas con actividad de pseudocatalasa, etc.) (Pot y col. 1994). Estudios de hibridación ADN:ADN realizados por Dellaglio y col. (1975) mostraron que solo ocho cepas de *L. plantarum* de las 28 que investigaron presentaban una relación del 46-65% de ADN/ADN con la cepa tipo, las cuales mostraban una alta relación con *Lactobacillus pentosus*. *L. pentosus* ha sido considerado como una especie homóloga a *L. plantarum*, por lo tanto no esta incluida en Approved List of Bacterial Names (Skerman y col., 1980); Esta especie fue reportada por Zanoni y col., (1987). Sin embargo, Collins y col. (1991) encontró mas del 99% de similitud entre las secuencias del RNAr 16S, confirmando que *L. plantarum* y *L. pentosus* están estrechamente relacionados. El porcentaje de G+C del ADN de *L. plantarum* es de 44 -46 (Bd, Tm). En base a la similitud ADN/ADN cepas de esta especie forman dos grupos genotípicamente relacionados uno con otro a un nivel del 50 al 60%. *Lactobacillus pentosus* y otras cepas designadas como *L. plantarum* forman un tercer genotipo solamente relacionado a un nivel del 50% (Bergey's, 1986).

Las relaciones filogenéticas de *L. plantarum* basadas en la molécula ARN 16s se muestran en la figura 3. En ésta se observa su relación estrecha con *Lb. pentosus*.

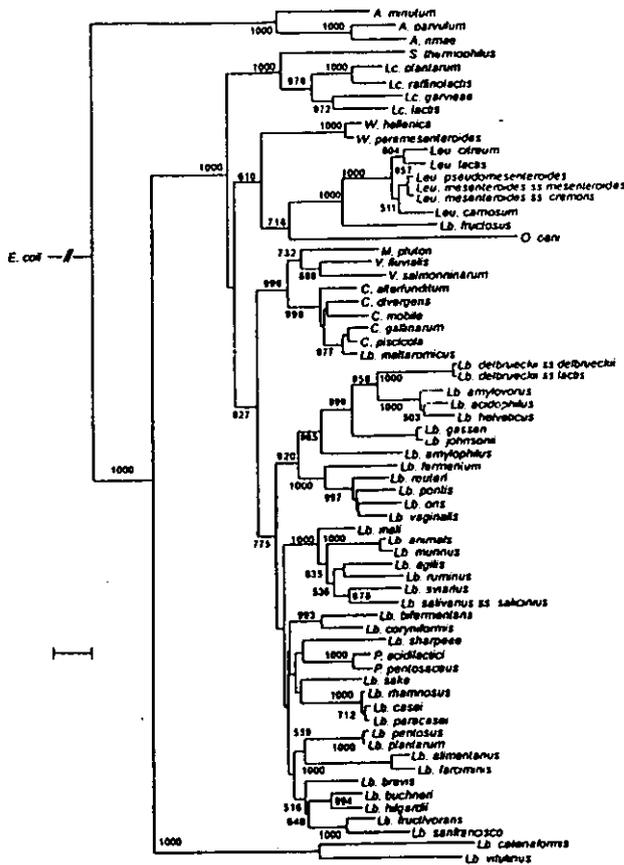


Figura 3. Árbol filogenético basado en la secuenciación del ARNr 16s que muestra las relaciones filogenéticas entre las especies de *Lactobacillus*. Abreviaciones: A., *Atopobium*; S., *Streptococcus*; Lc., *Lactococcus*; W., *Weissella*; Leu., *Leuconostoc*; Lb., *Lactobacillus*; O., *Oenococcus*; M., *Melissococcus*; V., *Vagococcus*. Los números en el dendograma señalan los valores de "bootstrapping" con n=1000.

2.4.1 *Lactobacillus plantarum* y los alimentos fermentados

Lactobacillus plantarum es una bacteria láctica heterofermentativa facultativa utilizada para la fermentación de alimentos, principalmente de vegetales. Esta es económicamente importante para el control de la fermentación, ya que previene el desarrollo de microorganismos contaminantes (Chevallier, 1994) y contribuye a las características sensoriales finales del alimento, aunque también es utilizado como iniciador.

L. plantarum está implicado en el proceso fermentativo de alimentos para consumo humano, como el sauerkraut (fermentación láctica de la col) (Pederson, 1979), en las salchichas fermentadas en seco (Lücke, 1994), en fermentaciones de aceituna, resistiendo altas concentraciones de sal (Ruiz-Barba y col. 1994); en la fermentación de pepinillos, completando el estado final del producto (Vaughn, 1985); para la preparación de quesos (Tzanetakis and Litopoulou-Tzanetakis, 1992). De igual manera participa en la nutrición animal como es la preservación de cultivos (Weinberg y col. 1993; Merry y col. 1995), en la fermentación de desechos de cangrejos y peces (Abazinge y col. 1993; Lassén, 1994) y en la fermentación de desechos de granjas avícolas (Urlings y col. 1993).

En el *uji*, alimento fermentado a base de maíz y agua de Kenya, *L. plantarum* es el principal responsable de la fermentación láctica. Giraud y col. (1993) aislaron una cepa de *L. plantarum* con actividad amilolítica (α -amilasa extracelular) de la fermentación de los tubérculos de yuca, para la producción de *gari* (alrededor de 80 millones de personas en el oeste de África lo consumen) (Akinrele y col. 1962). Para el caso de algunas masas agrias, para la producción de pan, éste participa proporcionando la elasticidad de la masa (Oura y col. 1982).

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Tipificación de una colección de cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas del pozol por análisis de perfiles de restricción para determinar su heterogeneidad genética.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar las enzimas de restricción que permitan una mayor resolución de los perfiles de restricción.
- Tipificación de las cepas por agrupamiento empleando el método UPGMA.
- Correlacionar la heterogeneidad genética obtenida con los resultados de identidad bioquímica.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Microorganismos empleados

Se emplearon 25 cepas de bacterias lácticas identificadas fisiológicamente por Flores (1996) como *Lactobacillus plantarum* (Tabla 1). Estas cepas fueron aisladas por Wachter y Owens a partir de muestras de pozol elaborado por un productor indígena de la Ciudad de Tapachula, Chiapas, y por Cañas (1991) de muestras de pozol de San Cristóbal de las Casas, Chiapas.

Las cepas fueron conservadas por el método de congelación en perlas de vidrio perforadas, con glicerol (Technical Service Consultants, Ltd) a -70° C.

Como cepas de referencia se emplearon cuatro cepas tipo de *Lactobacillus plantarum* pertenecientes a la colección de American Type Culture Collection (ATCC): ATCC10241, ATCC 8014, ATCC 14917 y ATCC 14431.

4.2 Medios y condiciones de cultivo

Para la reactivación de las cepas conservadas, se tomó una perla de vidrio y se adicionó a un vial con caldo APT (Anexo A). El vial se incubó a 29° C por 24 o 48 h. Una vez reactivadas las cepas se tomó una alícuota de 1 ml de estos viales para inocular matraces de 250 ml con 50 ml de caldo APT, los cuales se incubaron a 29° C por 16 h.

El medio utilizado para el crecimiento de las bacterias lácticas fue el caldo APT (Difco 0655-17-9), esterilizado a 121° C durante 15 minutos.

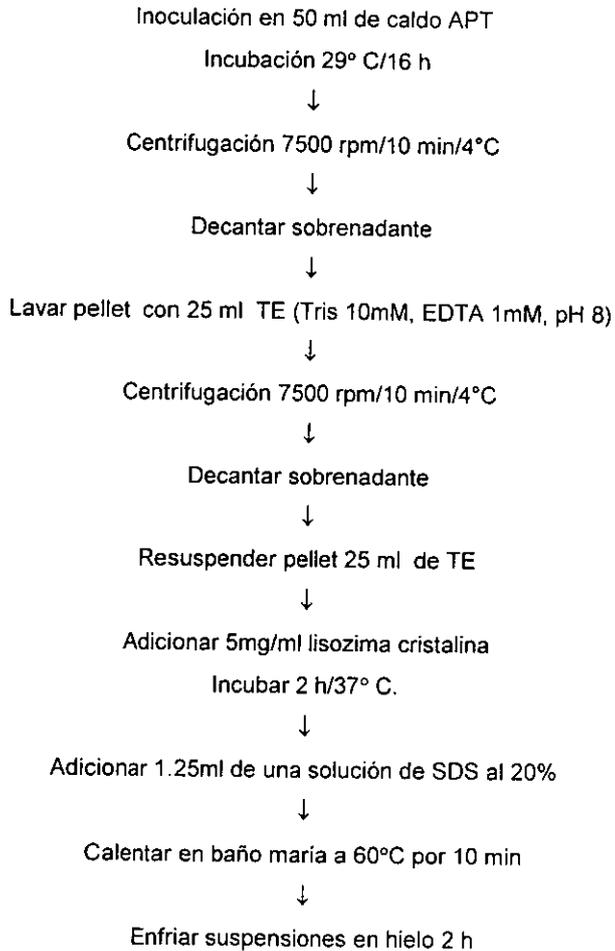
CEPA	CALIDAD DE IDENTIFICACIÓN	PORCENTAJE DE IDENTIFICACIÓN
30 amil	Aceptable	83.6
5 T	Excelente	99.9
6 T	Dudosa	71.1
46 Sn C	Muy buena	99.4
2 Lilis	Dudosa	44.2
5 Lilis	Excelente	99.9
6 Lilis	Excelente	99.9
9 Lilis	Excelente	99.9
13 Lilis	Buena	96.0
14 Lilis	Excelente	99.9
15 Lilis	Excelente	99.9
16 Lilis	Muy buena	99.0
18 Lilis	Excelente	99.0
20 Lilis	Excelente	99.9
21 Lilis	Buena	98.6
30 Lilis	Aceptable	81.3
33 Lilis	Excelente	99.9
34 Lilis	Excelente	99.9
35 Lilis	Excelente	99.9
38 Lilis	Muy buena	99.7
42 Lilis	Excelente	99.9
43 Lilis	Excelente	99.9
44 Lilis	Excelente	99.9
45 Lilis	Muy buena	99.9
46 Lilis	Excelente	99.9

Tabla 1. Resultados de la identificación bioquímica de las cepas de *L. plantarum* aisladas del pozol por el Sistema API 50 CH y Programa APILAB PLUS [Bio-Merieux] (Tomado de Flores, 1996).

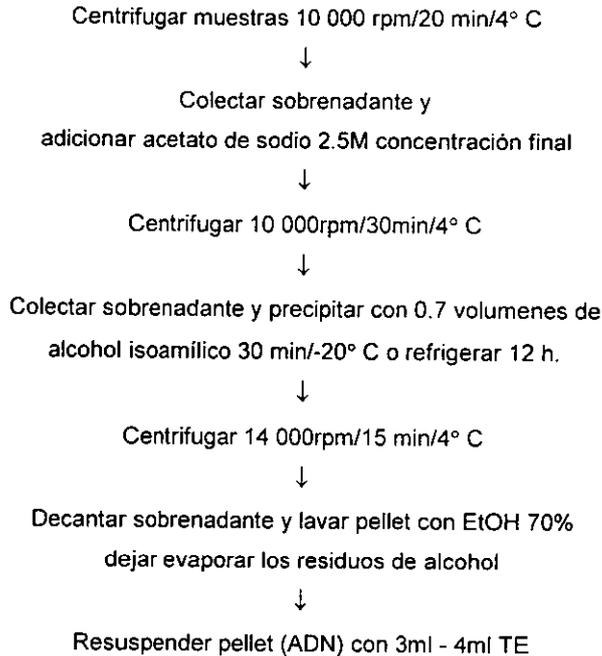
4.3 Extracción de ADN cromosomal por gradiente discontinuo en Cscl-EtBr

El método consiste en cuatro fases principales:

Fase I. Lisis Celular. En esta fase se eliminan los residuos del medio de cultivo y se lisa pared y membrana celular.



Fase II. Purificación y precipitación de ADN



Fase III. Formación del gradiente discontinuo CsCl-EtBr por ultracentrifugación.

Una vez resuspendidas las muestras se adiciona 1.05g/ml de CsCl. La solución se pasa a tubos Beckman Quick-Seal, con capacidad máxima de 5 ml. Se adicionan 0.4ml de EtBr con una concentración de 10mg/ml. Los tubos se llenan en su totalidad con una solución de TE/CsCl y se balancean. Las muestras se ultracentrifugan (Ultracentrifuga XL-90) a diferentes revoluciones en un rotor NVT-90. El programa seguido se presenta a continuación:

90 000 rpm/1h 30 min

87 000 rpm/15 min

85 000 rpm/15 min

81 000 rpm/30 min

80 000 rpm/30 min

La figura 4 muestra una fotografía del gradiente formado en los tubos, donde se evidencian las bandas correspondientes al ADN plasmídico y ADN cromosomal. La recuperación de la banda se ejemplifica en la figura 5.

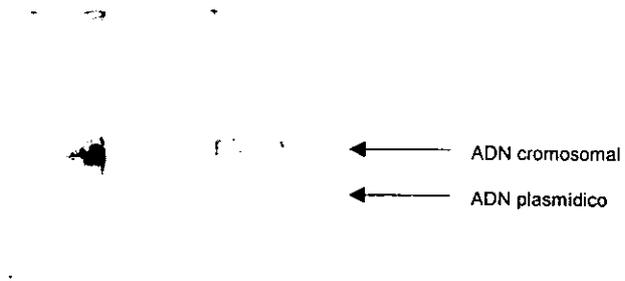


Figura 4. Fotografía del gradiente CsCl-EtBr formado con la ultracentrifugación.

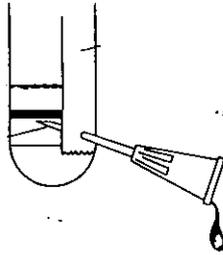
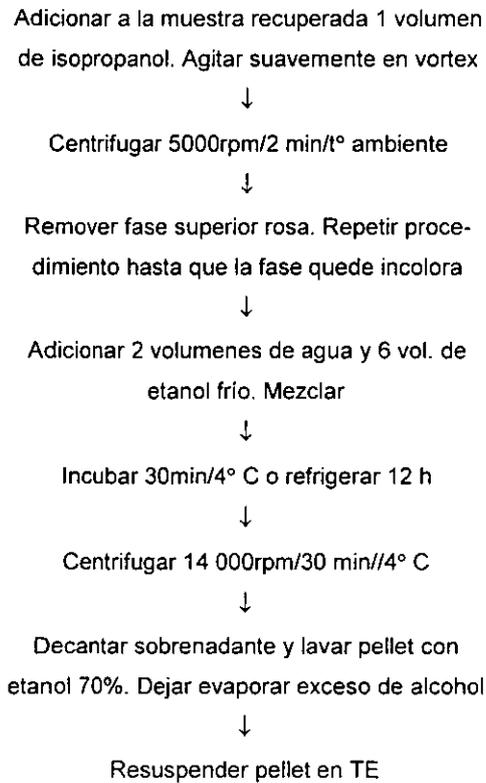


Figura 5. Recuperación de la banda de ADN mediante punción con una aguja estéril.

Fase IV. Eliminación de EtBr y CsCl. Para eliminar el exceso de EtBr en el ADN se lavaron las muestras con isopropanol de acuerdo a la siguiente metodología:



4.4 Selección de las enzimas de restricción

Los criterios para la selección de las enzimas de restricción fueron: porcentaje de G+C (G:Guanina y C: Citocina) del género *Lactobacillus* (40-45%), tamaño de la secuencia de reconocimiento y lo reportado en la literatura, en cuanto al empleo de enzimas para el análisis de restricción de bacterias lácticas.

Las enzimas seleccionadas bajo los criterios antes mencionados fueron *EcoRI*, *HindIII*, *SmaI*, *SfiI* y *BglII*, las cuales se emplearon para las digestiones de las cepas de *L. plantarum*, incluidas las cepas de referencia. La digestión se realizó bajo condiciones estándar de reacción (Maniatis, 1998).

4.5 Digestión de ADN con enzimas de restricción: *EcoRI*, *Hind III* y *BglII*

El ADN de las 25 cepas de bacterias lácticas aisladas del pozol y las 4 cepas de referencia de *Lactobacillus plantarum* se digirieron con las enzimas: *BglII* (Quantum, Research Organics), *EcoRI* (Boehringer Mannheim) y *HindIII* (Amersham -Life Science-), cuyas secuencias de reconocimiento son GCCN4VNGGC, GVAATTC y AVAGCTT, respectivamente (G:Guanina, C:Citocina, A:Adenina, T:Timina y N: cualquier nucleótido).

La cantidad de ADN digerido para todas las muestras, en general, fue de 1.95 µg en 20 µl de volumen final⁴. Para asegurar una digestión total del ADN, se realizaron digestiones a cinco diferentes tiempos (1, 2, 5, 12 y 24 horas) con 2 unidades de enzima. Al término de este experimento preliminar, se notó una disminución en la actividad de las tres enzimas, por lo que se decidió adicionar 5 unidades de enzima con un tiempo de digestión de 12 h a la temperatura recomendada, 37° C.

4.6 Electroforesis horizontal en campo constante

Las muestras digeridas se sometieron a una electroforesis horizontal en una cámara Horizon[®] 59 (GIBCO BRL). Se utilizaron geles de agarosa (Bio-Rad) al 1.25%.

Las muestras se corrieron a 50 volts, durante 2.56 h, empleando un buffer TBE 1x (Anexo A). Al final de cada corrida los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (EtBr) al 0.01 % durante 2 minutos. Posteriormente, los geles se lavaron para eliminar el exceso de EtBr y se fotografiaron (Cámara Polaroid) sobre una lámpara de luz ultravioleta.

Es importante mencionar que la electroforesis de campo constante se consideró suficiente para separar los fragmentos de ADN al obtenerse una buena definición de las bandas en corridas preliminares.

4.7 Análisis densitométrico

El patrón de bandeo sobre las fotografías se registró con un densitómetro modelo GS-700 (Bio-Rad) empleando las diferentes opciones para optimizar la imagen. Cada perfil fue analizado en el programa Molecular Analyst[®]/PC, el cual permite analizar los perfiles determinando las diferencias en intensidad y posición de las bandas en la imagen. De esta forma, se construyeron gráficas de densidad óptica contra distancia, para cada cepa y para las tres diferentes enzimas empleadas. Cabe señalar que a cada gráfica se le removió el ruido del fondo y se le efectuaron alisamientos, según se indica en el manual de instrucciones del densitómetro.

Cada gráfica consistió en una serie de picos que representaban a cada banda de la imagen. La distancia a la que se encontraba el centro de cada pico se tomó como la distancia representativa en la que se localizaba la banda. Es importante mencionar que los picos que presentaban una densidad óptica menor o igual a 0.1 quedaron eliminados del análisis, debido a que la banda representada por estos picos no se apreciaba en la fotografía del gel.

4.8 Análisis numérico

El análisis numérico implicó la construcción de una matriz basada en la presencia o ausencia de bandas únicas para cada enzima. Una vez construida la matriz se estimó la

⁴ El ADN se cuantificó en un espectrofotómetro a una longitud de onda (λ) de 260 nm.

distancia o disimilitud entre las cepas mediante el programa Treecon for Windows (Van de Peer y Wachter, 1994), el cual estimó la distancia empleando el modelo matemático propuesto por Nei y Li (1979) e infirió la topografía del diagrama de árbol mediante el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) utilizando la corrección del método de distancia transformada, empleando como grupo externo a la cepa 45lilis. Para la construcción de un diagrama de árbol sin raíz la elección del grupo externo se basa en aquel que proporcione el árbol más consistente o árbol consenso, en este caso los árboles obtenidos utilizando a otras cepas como grupo externo presentaban topologías muy similares, por lo que la elección de la cepa 45 lilis como grupo externo se basó en la excelente definición de su perfil de restricción.

En este mismo programa se realizó un tipo de análisis estadístico denominado "Bootstraping" con la finalidad de mostrar la robustez del diagrama de árbol generado. El análisis consiste en crear aleatoriamente matrices de distancia y cuantificar cuantas de éstas coinciden en formar la misma topografía del árbol presentado.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El establecimiento de las condiciones de extracción de ADN de las cepas bajo estudio y cepas de referencia presentó inicialmente ciertas dificultades. Al realizar la extracción con un método práctico y sencillo como los propuestos por Stahl y col. (1990) y Lamoureux (1993) el ADN se obtenía degradado y contaminado, a consecuencia de un alto contenido de polisacáridos presentes aún en las muestras. Por tal motivo se decidió emplear una técnica que incluyera un método de purificación exhaustivo. La técnica seleccionada fue el gradiente discontinuo de CsCl-BrEt que permitió la extracción del ADN con buena calidad y con una relación 260/280 nm menor a 1.

Las enzimas de restricción se seleccionaron en base al porcentaje de G+C del género *Lactobacillus* (40-45%), tamaño de la secuencia de reconocimiento y en lo reportado en la literatura en cuanto al empleo de enzimas para el análisis de restricción de bacterias lácticas.

Taskanen (1990) y Le Bourgeois (1989) emplearon la enzima *SmaI* para digerir el ADN de cepas de lactococos, reportando que esta enzima produce una distribución de fragmentos de ADN útil para el análisis del genoma de bacterias lácticas. Por ello, inicialmente se planteó trabajar con esta enzima; sin embargo, al digerir el ADN de algunas cepas de *L. plantarum* con esta enzima se generaron perfiles no definidos de fragmentos (Fig. 6 y Fig.7), por lo que se descartó su empleo en el estudio.

Se probaron entonces *EcoRI* y *HindIII*, pues con ellas Lamoureux (1993) generó perfiles de restricción que permitieron la diferenciación de cepas de *Leuconostoc oenos* al generar fragmentos de ADN definidos entre 9 y 23 kpb. De igual forma, Rodtong (1993) empleó estas enzimas como un paso previo para la ribotipificación de cepas de *Lactobacillus*. En el caso de algunas cepas bajo estudio, se obtuvo un número de bandas cuantificable, así como una buena definición de las mismas (Fig. 8 y Fig. 9), por lo tanto, se decidió emplearlas en el estudio.

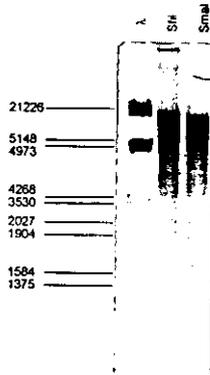


Figura 6. Perfiles de restricción para la cepa 45 lilis generados por las enzimas *SfiI* y *SmaI*.

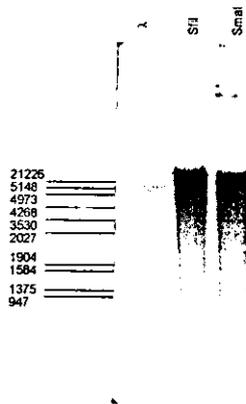


Figura 7. Perfiles de restricción para la cepa 46 SnC generados por las enzimas *SfiI* y *SmaI*.

El empleo de las enzimas *BglI* y *SfiI* se basó principalmente en su contenido de G+C y en el tamaño de la secuencia de reconocimiento, GCCN₄↓NGGC y GGCCN₄↓NGGCC, respectivamente (aunque también han sido reportadas por cortar el ADN de bacterias lácticas), bajo estos criterios se esperarían cortes restringidos por parte de éstas. La enzima *SfiI* produjo un gran número de fragmentos de ADN, que bajo las condiciones de corrida no se lograron definir, en consecuencia se decidió no emplear esta enzima para las digestiones subsecuentes (Fig. 6 y Fig.7). La enzima *BglI* por su parte, generó fragmentos visibles y cuantificables en los geles para las cepas probadas (Fig. 8 y Fig. 9).

Por lo anterior, *BglI*, *EcoRI* y *HindIII* fueron seleccionadas para realizar la digestión del total de cepas empleadas en este trabajo.

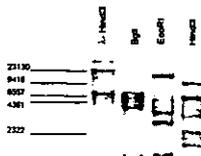


Figura 8. Perfiles de restricción para la cepa 45 lilis generados por las enzimas *BglI*, *EcoRI* y *HindIII*.

En la figura 10 se observa el perfil de restricción característico para cada cepa, generado por la enzima *BglI*, asociado al dendograma de distancia y a la calidad de identificación obtenida para cada cepa por el Sistema API 50 CH. En esta figura se muestran únicamente 25 patrones de bandeado, 22 de éstos corresponden a las cepas bajo estudio y 3 corresponden a las cepas de referencia (ATCC 14431, ATCC 8014 y ATCC 10241). La cepa tipo ATCC 14917 presentó problemas con respecto al análisis densitométrico, esto debido a que en el gel no se observaban bandas definidas sino un barrido de la muestra, y esto se generalizó para las tres diferentes enzimas empleadas en el trabajo. Las cepas 9 lilis, 2 lilis y 15 lilis presentaron el mismo problema, por lo cual no se incluyen en el trabajo.

Como se observa cada cepa mostró un perfil de restricción único, incluyendo a las cepas de referencia, observando bandas compartidas entre algunas cepas. El dendograma derivado del análisis numérico muestra la formación de un grupo principal, grupo I ($d = 0.51$) que comprende a la mayoría de las cepas: 21 cepas en estudio y 2 cepas de referencia (ATCC 14431 y ATCC 8014). Dentro del grupo se encuentran cepas con calidad de identificación excelente, muy buena, buena, aceptable y dudosa.

Las cepas 35 lilis y 16 lilis quedaron aisladas del grupo principal. Asimismo, a este nivel de similitud quedaron excluidas las cepas ATCC 10241 y 45 lilis.

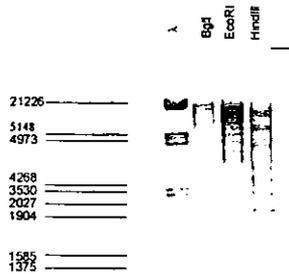


Figura 9. Perfiles de restricción para la cepa 46 SnC generados por las enzimas *BglI*, *EcoRI* y *HindIII*.

La figura 11 presenta el patrón de bandeo, calidad de identificación por el Sistema API 50 CH y el dendograma para 20 cepas problema y 2 cepas de referencia (ATCC 8014 y ATCC 10241), generados por la enzima *EcoRI*. Además de las cepas faltantes antes mencionadas. Con esta enzima no se definieron los perfiles de las cepas 30 amil y 18 lilis. Es apreciable que también con esta enzima se generaron perfiles de bandeo distintos para cada cepa, incluyendo a las cepas de referencia.

El análisis del dendograma permite observar un grupo principal correspondiente a esta enzima (grupo I) ($d= 0.51$), que conjuntó a 19 cepas con calidad de identificación entre excelente y dudosa y a la cepa de referencia ATCC 8014. A este nivel quedan excluidas de nueva cuenta las cepas ATCC 10241 y 45 lilis. La cepa 13lilis quedó sin agrupar.

Los patrones de bandeo, calidad de identificación y el dendograma generado por la enzima *Hind III* se muestran en la figura 12. Se presentan 21 patrones, 19 se corresponden con las cepas bajo estudio y 2 con las cepas de referencia (ATCC 8014 y ATCC 14431). La misma heterogeneidad en los perfiles es apreciable también con esta enzima. El dendograma delimita la formación de un grupo: el grupo I ($d= 0.52$) formado por 18 cepas incluida la cepa de referencia ATCC 14431. La cepa 20lilis quedó aislada y las cepas 45lilis y ATCC 8014 quedaron eliminadas a ese nivel de similitud. Las cepas problema agrupadas presentan una calidad de identificación que va desde excelente hasta dudosa.

La determinación de los grupos designados en los dendogramas se apoyó en un tipo de análisis estadístico denominado "bootstrapping", con el fin de probar la robustez o confianza de las ramas presentes en los árboles. Estos valores se muestran en cada rama.

Se observa que las ramas que albergan a los grupos principales (Grupos 1) en los dendogramas poseen un valor de "bootstrapping" entre 190 y 192 con $n=200$, lo que significa que de las 200 matrices que se crean aleatoriamente entre 190 y 192 generan la conformación de esta rama que agrupa a la mayoría de las cepas. Ahora bien, las ramas que se forman dentro de cada uno de los grupos presentan valores muy bajos por lo que una división en subgrupos resultaría poco confiable.

Los dendogramas obtenidos a partir de las tres enzimas de restricción presentan topologías diferentes entre sí. Esto es de esperarse ya que los patrones de bandeo para una cepa en particular fueron diferentes para las tres enzimas. Específicamente, *Bgl I* generó patrones de bandeo mejor definidos en comparación con las otras enzimas; no obstante, también generó patrones difíciles de analizar para algunas cepas. La enzima *Hind III* fue la que generó un mayor número de cortes, lo que propició que un mayor número de cepas se excluyeran del análisis. *EcoRI* presentó un comportamiento intermedio entre estas dos enzimas. En términos generales, los tres dendogramas presentan, a una $d=0.52$, un grupo principal constituido por la mayoría de las cepas bajo

estudio, cuya calidad de identificación bioquímica se encuentra entre excelente y dudosa, y no presentan grupos estrechamente relacionados.

En el grupo formado en cada dendograma se encuentran incluidas cepas de referencia, las cepas ATCC 8014 y ATCC 14431 aparecen dentro del grupo principal para dos dendogramas (Fig. 10 y Fig. 11, y Fig. 10 y Fig. 12, respectivamente). Esto indica una mayor relación de éstas con las cepas problema, correlacionando con sus fuentes de aislamiento, la cepa ATCC 8014 fue aislada del ensilado de maíz y ATCC 14431 del ensilado de pasto.

En relación a la presencia de cepas con calidad de identificación dudosa dentro de los grupos principales se puede inferir que éstas pertenecen a la especie *L. plantarum*; no obstante, su identidad tiene que ser reforzada con el empleo de otras técnicas.

Con respecto a la correlación de la identificación fisiológica con los agrupamientos realizados, se esperaba que las cepas se agruparan en base a su similitud para fermentar carbohidratos, es decir, que las cepas con la misma calidad de identificación (excelente, muy buena, buena o aceptable) presentaran un mayor número de bandas en común y por ende se agruparan con niveles bajos de disimilitud; así mismo, se esperaba que las cepas con calidad de identificación dudosa presentaran un número menor de bandas compartidas con estas cepas. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, cada cepa con cada enzima, mostró un perfil de restricción diferente compartiendo un número de bandas restringido entre sí, en consecuencia no se observó ninguna correlación en los dendogramas, o al menos no con la suficiente solidez para considerarlos. Lo anterior refuerza lo señalado por diversos autores en cuanto a la falta de correlación entre la heterogeneidad genética y la identidad bioquímica, particularmente ante los diferentes comportamientos de las cepas consideradas como de referencia.

Es importante señalar que las cepas de referencia identificadas por métodos bioquímicos como *L. plantarum*, según ATCC, también mostraron perfiles de restricción únicos con un número mínimo de bandas compartidas entre sí. Lo anterior permite retomar las

observaciones realizadas por Vandamme (1996) al respecto del empleo de pruebas monofásicas para la clasificación de los microorganismos, ya que se ha visto que estas pruebas pueden excluir características importantes de los microorganismos, lo que provoca que los sistemas de clasificación no posean bases sólidas. Esto conlleva al problema de definir bajo que criterios o caracteres se delinea una especie o cepa, así como la importancia que tomara cada uno de éstos. La importancia de una taxonomía polifásica es que permite la conjunción de información genotípica, fenotípica y filogenética. Esta información integrada constituye una base muy sólida para la definición de criterios de clasificación, determinando a aquellos que sean relevantes para un organismo en particular.

Resulta evidente que el análisis del polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción reveló una marcada heterogeneidad genética entre las cepas problema y las propias cepas de referencia, entendiéndose como heterogeneidad genética a las variaciones que existen en la secuencia de nucleótidos entre genes o en este caso entre genomas completos.

Dicks y van Vuuren (1987) encontraron evidencias de la heterogeneidad genética de la especie *Lactobacillus brevis* mediante el análisis numérico del patrón de proteínas. Pot y col. (1993) confirmaron la heterogeneidad de *Lactobacillus acidophilus* mediante el patrón de proteínas (SDS-PAGE). Por su parte, Dellaglio (1975) evidenció en su trabajo una posible heterogeneidad genética de *Lactobacillus plantarum* al encontrar que solo 8 cepas de esta especie, de 28 investigadas, mostraban porcentajes de hibridización ADN/ADN entre 45-65% con respecto a la cepa tipo, y las demás no mostraban señal de hibridización.

Los trabajos mencionados presentan evidencias de la heterogeneidad genética del género *Lactobacillus*. Asimismo, los resultados obtenidos en este estudio muestran la heterogeneidad genética que presentan las cepas de *L. plantarum* aisladas del pozol al analizar los perfiles de restricción generados por las enzimas *BglII*, *EcoRI* y *Hind III*, evidencia que se sumaría a apoyar esta característica del género *Lactobacillus*.

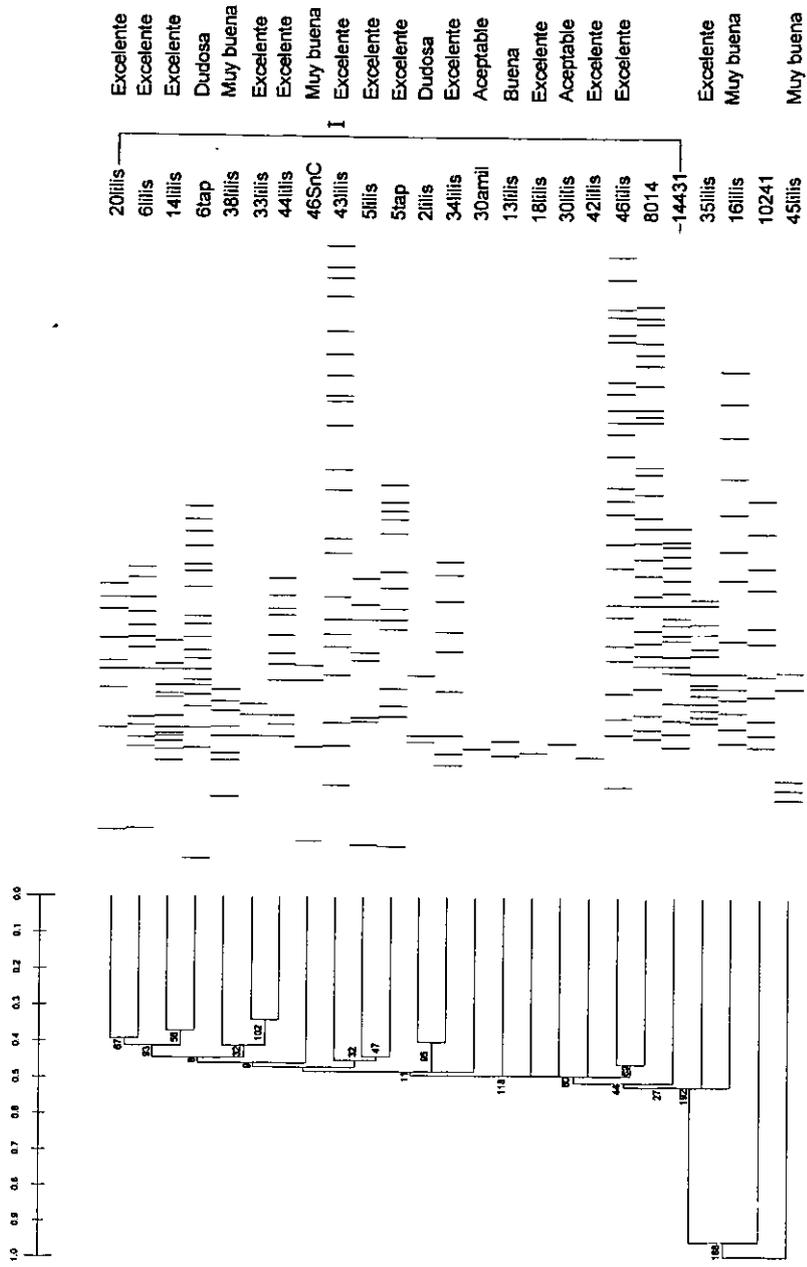


Figura 10. Perfil de restricción y dendrograma generado por la enzima BglI para las cepas de *L. plantarum* aisladas del pozol. El número en el dendrograma señala el valor de "bootstrapping", n=200.

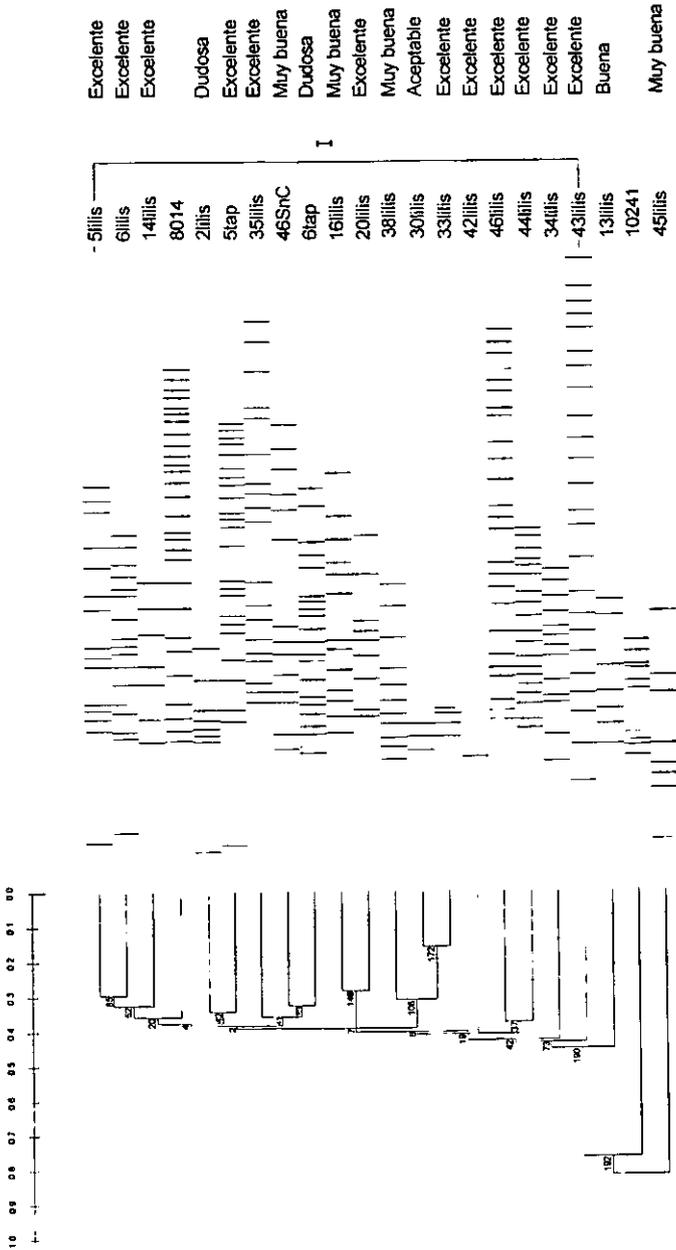


Figura 11. Perfil de restricción y dendrograma generado por la enzima EcoRI para las cepas de *L. plantarum* aisladas del pozo. El número en el dendrograma señala el valor de "bootstrapping", n=200.

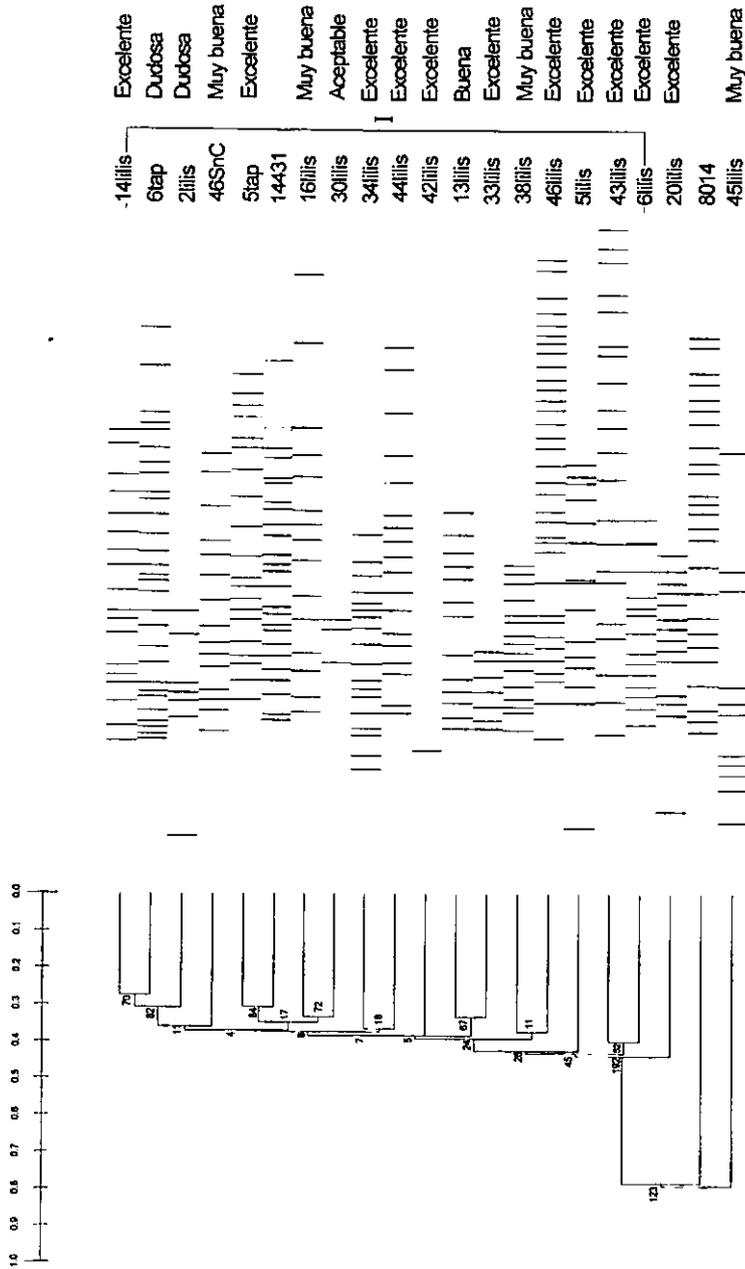


Figura 12. Perfil de restricción y dendrograma generado por la enzima HindIII para las cepas de *L. plantarum* aisladas del pozol. El número en el dendrograma señala el valor de "bootstrapping", n=200.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ Las enzimas de restricción *BglII*, *EcoRI* y *HindIII* generaron un número de fragmentos cuantificables y distinguibles en comparación con las enzimas *SmaI* y *SfiI*. Los fragmentos oscilaban entre 2kpb – 20kpb.
- ✓ La enzima *BglII* mostró una mejor distribución de fragmentos en comparación con *EcoRI* y *HindIII*. Sin embargo, para algunas cepas, las tres enzimas generaron patrones de bandeado no definidos debido al gran número de fragmentos generados.
- ✓ Las cepas bajo estudio presentaron un perfil único y diferente para cada enzima de corte (*BglII*, *EcoRI* y *HindIII*).
- ✓ Las cepas de referencia, de igual forma, mostraron perfiles de restricción únicos, lo que permite señalar que es necesario homogeneizar los criterios de definición de especie o cepa tipo para un determinado estudio.
- ✓ Los tres dendogramas derivados del análisis numérico presentan un grupo principal que alberga entre 80-85% del total de las cepas a una distancia entre 0.51 y 0.52.
- ✓ No se encontró correlación entre la identificación fisiológica y el agrupamiento de las cepas debido a la gran heterogeneidad de los perfiles de restricción.
- ✓ Las cepas de referencia ATCC 8014 y ATCC 14431 muestran una mayor relación con las cepas bajo estudio.
- ✓ Con este trabajo se puede inferir que las cepas con calidad de identificación dudosa, según el Sistema API 50 CHL, pertenecen a la especie de *L. plantarum* al ubicarse dentro de los grupos principales. No obstante, es requerida una corroboración.

- ✓ Los perfiles de restricción y el análisis de agrupamiento generados por las tres enzimas evidencian una gran heterogeneidad genética de las cepas, incluidas las cepas de referencia de *L. plantarum*.
- ✓ Este trabajo constituye una primera aproximación a un estudio polifásico de *L. plantarum* proporcionando información relevante de su genotipo.
- ✓ El análisis del polimorfismo en longitud de los fragmentos de ADN (de sus siglas en inglés RFLP) constituye una técnica rápida y sencilla útil para un estudio polifásico.

VII. RECOMENDACIONES

- Se sugiere el empleo de una cámara de electroforesis de campo pulsado para determinar el perfil de restricción de las cepas que fueron excluidas en el análisis, debido a que su perfil no logró definirse en la cámara de campo constante.
- Se recomienda continuar con los estudios polifásicos de *L. plantarum* , sobre todo realizar pruebas de PCR especie-específica o hibridaciones especie-específica para apoyar a la identificación fisiológica.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abazinge, M.D.A., Fontenot, J. P., Allen, V.G. and Flick, G.J. (1993) Ensiling characteristics of crab waste and wheat straw treated with different additives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 657-661.
- Akinrele, I.A., Cook, A.S. & Holgate, R.A. (1962) The manufacture of *gari* from cassava in Nigeria. *1st Int. Congress of Food Science and Technology. Proceedings* Vol. 4, pp 633-644.
- Andrighetto, C., P. De Dea, A. Lombardi, E. Neviani, L. Rossetti, y G. Giraffa (1998) Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. *Res. Microbiol* **149**, 631-643.
- Bergey, D. H. (1986) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8 edición . The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA, pp 1-664.
- Busse, J. Y G. Auling (1988) Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the Proteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol* **11**,1-8.
- Busse, J., E.B.M. Denner, W. Lubitz (1996) Classification and identification of bacteria: Current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology* **47**, 3-38.
- Cañas, O. (1991) Variaciones microbiológicas asociadas al método de elaboración de pozol en la zona Altos de Chiapas. *Tesis de Maestría*. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Campus Guaymas. México, 95 pp.
- Chevallier, B., J.C. Hubert y Benoit Kammerer (1994) Determination of chromosome size and number of *rrn* loci in *Lactobacillus plantarum* by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters* **120**, 51-56.
- Christian W.F.K. y Nyako K.O. (1983) Ghanian kenkey. En: *Handbook of Indigenous fermented Foods*. K.H. Steinkraus (De.). Marcel Dekker, N. York, pp 220-226.
- Collins, M. D., Rodrigues, U.M., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J. A. E., Martínez-Murcia, A., Phillips, B. A., Williams, A. M. & Wallbanks, S. (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**, 5-12.
- Costas, M. (1992) Classification, identification and typing of bacteria by the analysis of their one-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic protein patterns. *Adv. Electrophor* **5**, 351-408.

-
- Couto, J.A. y T.A. Hogg (1994) Diversity of ethanol-tolerant lactobacilli isolated from Douro fortified wine: clustering and identification by numerical analysis of electrophoretic protein profiles. *Journal of Applied Bacteriology* **76**,487-491.
 - Czajka, J., N. Bsat, M. Piani, W. Russ, K. Sultana, M. Wiedmann, R. Whitaker y C.A. Batt (1993) Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16s rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms. *App. Environ. Microbiol* **59**, 304-308.
 - Daeschel M.A., Anderson R.E. y Fleming H.P. (1987) Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiology Reviews* **46**, 357-367.
 - Dellaglio, F., Bottazzi, V. & Vescovo, M. (1975) Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **25**, 160-72.
 - Dicks, L.M.T. y J.J. Van Vuuren (1987) Relatedness of hetrofermentative *Lactobacillus* species revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**(4),437-440.
 - Farris, J. S. (1977) On the phenetic approach to vertebrate classification. En: *Major Patterns in Vertebrate Evolution*. M.D. Hecht, P. C. Goody, y B.M. Hecht (Ed.). Plenum Press, N. York, pp 823-850.
 - Fleming H.P. (1982) Fermented Vegetables. En: *Fermented Foods*. A.H. Rose (Ed.). Economic Microbiology, Vol. 7. Academic Press, Londres, pp 227-258.
 - Flores, T. (1996) Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. U.N.A.M. México. 71pp.
 - Gatumbi R. W., N. Muriru y Mbugua S.K. (1983) Kenyan *uji*. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.) Marcel Dekker, N. York, pp 198-203.
 - Giraud E., Gosselin L., Marin B., Parada J.L. y Raimbault M. (1993) Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 276-282.
 - Gordillo, M. E., K.V. Singh, C.J. Baker and B.E. Murray (1993) Typing of group B streptococci: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1430-1434.
 - Hammes, W.P. y R.F. Vogel (1995) The genus *Lactobacillus*. En: *The genera of lactic acid bacteria. The lactic acid bacteria*. B.J.B. Wood y W.H. Holzapfel (Ed.). Vol 2. Blackie Academic & Professional, Glasgow, Scotland, pp 19-54.
-

-
- Hounhouigan D.J. Nout M.J.R., Nago C.M., Houben J.H. y Rombouts F.M. (1993) Characterization and frequency distribution of species of lactic acid bacteria involved in the processing of mawe, a fermented maize dough from Benin. *International Journal of Food Microbiology* **18**, 279-287.
 - Johansson, M.L. M. Quednau, G. Molin, y A. Ahrné (1995) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Letters in Applied Microbiology* **21**, 55-159.
 - Lamoreux, M. H. Prévost, J. F. Cavin, C. Diviès (1993) Recognition of *Leuconostoc oenos* strains by the use of DNA restriction profiles. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **39**, 547-552.
 - Lassén, T.M. (1994) Evaluation of conditions for fermentation of fish offal. *Agricultural Science in Finland* **4**, 11-17.
 - Li, Wen-Hsiung (1997) Molecular phylogenetics methods. En: *Molecular evolution*. Sinauer Associates. E.U.A. pp 99-147.
 - Lücke, F.K. (1994) Fermented meat products. *Food Research International* **27**, 299-307.
 - Magge, J. (1993) Whole-organism fingerprinting. En: *Handbook of new bacterial systematics*. M. Goodfellow and A.G. O'Donnell (Ed.). Academic Press Ltd., London. pp 383-427.
 - Maniatis, T., E.F. Fritsch y J. Sambrook (1989) *Molecular Cloning 2ª Edición*. Tomo I. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 - Maslow, J.N., M.E. Mulligan, and R.D. Arbeit (1993) Molecular epidemiology application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect. Dis.* **17**: 153-164.
 - Mauguin, S. and Novel, G. (1994) Characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. *Journal of Applied bacteriology* **76**, 616-625.
 - Merry, R.J., Dhanoa, M.S. and Theodorou, M.K. (1995) Use of freshly cultured lactic acid bacteria as silage inoculants. *Grass and Forage Science* **50**, 112-123.
 - Mozqueda- González E. y Escamilla Hurtado L. (1988) Chemical and microbiological study of lactic acid fermentation in pozol (a mexican corn-based beverage). En: *Proceedings of the seminar: Solid state fermentation in bioconversion of agroindustrial raw materials*. M. Raimbault (Ed.). ORSTOM, 25,26,27 julio, Montpellier.
 - Muyzer, G., E.C. De Waal y A.G. Uitterlinden (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16s rRNA. *Appl. Environ. Microbiol* **59**, 695-700.

-
- Nei, M. y W. Li. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**(10), 5269-5273.
 - Ngaba P.R. y Lee J.S. (1979) Fermentation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Food Science* **44**, 1570-1571.
 - Nuraida, L. (1988) *Studies on microorganisms isolated from pozol, a mexican fermented maize dough*. Msc Thesis, Faculty of Agriculture and Food, Department of Food Science and Technology, University of Reading, United Kingdom, 80 pp.
 - Ofuya C.O. y Nnajifor C. (1989) Development and evaluation of a starter culture for the industrial production of *gari*. *Journal of Applied Bacteriology* **66**, 37-42.
 - Okafor N. (1977) Microorganisms associated with cassava fermentation for *gari* production. *Journal of Applied Bacteriology* **42**, 279-284.
 - Okafor N., Ijioma B. y Oyolu C. (1984) Studies on the microbiology of cassava retting for foo-foo production. *Journal of Applied Bacteriology* **56**, 1-13.
 - Onyekwere O.O., Akinrele I.A., Koleose O. A. y Heys G. (1989) Industrialization of *gari* fermentation. En: *Industrialization of Indigenous fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 363-410.
 - Oura E., Suomalainen y Viskari R. (1982) Breadmaking. En: *Fermented Foods*. A.H. Rose (Ed.). Economic Microbiology, Vol.7. Academic Press, Londres, pp 87-146.
 - Oyewole O.B. y Odunfa S.A. (1990) Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during *fufu* production. *Journal of Applied Bacteriology* **68**, 145-152.
 - Oyewole O.B. (1990) Optimization of cassava fermentation for *fufu* production: effects of single starter cultures. *Journal of Applied Bacteriology* **68**, 49-54.
 - Pederson, C.S. (1979) *Microbiology of Food Fermentations*. Westport, CT: AVI Publishing Co.
 - Pot, B., P. Vandamme y K. Kersters (1994) Analysis of electroforetic whole-organism protein fingerprintings. En: *Modern microbial methods. Chemical methods in prokariotic systematics*. M. Goodfellow y A. G. O'Donnell (ed.). John Wiley & Sons. Inglaterra, pp 493-521.
 - Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K. and Schleifer, K. H. (1994) Taxonomy of lactic acid bacteria. En: *Bacteriocins of lactic acid bacteria: Genetics and Applications* (De Vuyst, L. & Vandamme, E.J. Eds.). Chapman and Hall, Glasgow, UK., pp 13-89.
 - Pot, B. C. Hertel, W. Ludwig, P. Descheemaeker, K. Kersters y K. Schleifer (1993) Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii*

-
- strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *Journal of General Microbiology* **139**, 513-517.
- Quere, F., A. Deschamps y M.C. Urdaci (1997) DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology* **82**, 783-790.
 - Ramírez J. F. (1987) *Biochemical studies on Mexican fermented corn food-pozol*. Ph. D. Thesis, Faculty of the Graduate School, Cornell University, N. York, 176 pp.
 - Rodtong, S. Y G. W. Tannock (1993) Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(10),3480-3484.
 - Ruíz-Barba, J.L. , Cathcart, D.P., Warner, P.J. and Jiménez-Díaz, R. (1994) Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in spanish-style green olive fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2059-2064.
 - Russek-Cohen, E. y R. R. Colwell (1996) Numerical Clasification of microorganisms. En: *Molecular microbial ecology manual*. Akkermans Anton, Dirk van Elsas jan y Frans J. de Bruijin (Ed.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
 - Saulnier, P. C. Bourneix, G. Prévost y A. Andremont (1993) Random Amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **31**,982-985.
 - Sclifer, K. H. y E. Stackebrandt (1983) Molecular systematics of prokariotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**,143-187.
 - Segers, P., M. Vancannyt, B. Pot, U. Torck, B. Hoste, D. Dewettinck, E. Falsen, K. Kersters y P. De Vos (1994) Classification of *Pseudomonas diminuta* and *Pseudomonas vesicularis* in *Brevundimonas* gen. Nov. As *Brevundimonas diminuta* comb. Nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. Nov. Respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**,499-510.
 - Silva-Villareal E.C. (1984) *Estudios preliminares sobre la fermentación del pozol en Tapachula, Chiapas*. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas. 44pp.
 - Taskanen, E., L. Debra, L. Tulloch, A.J. Hillier y B. E. Davidson (1990) Pulsed-field gel electrophoresis of smai digest of lactococcal genomic dna, a novel method of strain identification. *Applied and Environmental Microbiology*, **56** (10), 3105-3111.
 - Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing and B. Swaminathan (1995) Interpreting chrosomal DNA restricction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2233-2239.

-
- Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetakis, E. (1992) Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria in Feta and Teleme, two greek cheeses from ewes milk. *Journal of Dairy Science* **75**, 1389-1393.
 - Ulloa M. y T. Herrera (1976-1982) Estado Actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche y tepache. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México*, **47-53**. Serie Botánica, 145-163.
 - Ulloa M., Herrera T. y Taboada J. (1983) Mexican pozol. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 226-233.
 - Urlings, H.A.P., Bijker, P.G.H. and Van Logtestijn, J.G. (1993) Fermentation of raw poultry by-Products for animal nutrition. *Journal of Animal Science* **71**, 2420-2426.
 - Van de Peer, Y., R. De Wachter (1994) TREECON for windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* **10**,569-570.
 - Vandamme, P. B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters y J. Swings (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*. **60**(2),407-438.
 - Wachter C. (1995) *Estudios sobre la microbiología del pozol*. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Química. UNAM. México.
 - Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Yaira Hen and Azrieli, A. (1993) The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 512-518.
 - Yang, P., P. De Vos, K. Kersters y J. Swings (1993) Polyamine patterns as chemotaxonomics markers for the genus *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**,709-714.
 - Zannoni, P., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A. & Collins, M. D. (1987) *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson and Anderson) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 339-341.
 - Zhong, W. K. Millsap, H. Bialkowska-Hobrrzanska y G. Reid (1998) Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(7), 2418-2423.

IX. ANEXO A

Caldo APT*

Componente	Cantidad (g)
Extracto de Bacto-levadura	7.5
Bacto-triptona	12.5
Bacto-dextrosa	10
Citrato de sodio	5
Hidrocloreuro de tiamina	0.001
Cloruro de sodio	5
Fosfato dipotasico	5
Cloruro de manganeso	0.14
Sulfato de magnesio	0.8
Sulfato ferroso	0.04
Complejo mono-oleato sorbitan	0.2

* Fórmula por litro

Solución TE

Componente	Concentración
Tris	10 mM
EDTA	1mM
Ajustar pH a 8	

Solución TBE 1x

Componente	Concentración
Tris	89 mM
Ácido bórico	89 mM
EDTA	2 mM
Ajustar pH a 8	