

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD MICROBIOLÓGICA DEL
POZOL MEDIANTE PCR-DGGE CON EL GEN *rpoB***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

P R E S E N T A

Q.A. GABRIELA LÓPEZ VELASCO

Tutora: DRA. MA. DEL CARMEN WACHER RODARTE

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2006



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.

El **Comité Tutorial** que asesoró el desarrollo del proyecto de tesis estuvo formado por:

Dra. Ma. Del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Dra. Esperanza Martínez Romero	Instituto de Ciencias Genómicas, UNAM
Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM

El **Jurado de Examen de Maestría** estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Sergio Sánchez Esquivel	I. Investigaciones Biomédicas. UNAM
Secretario	Dra. Esperanza Martínez Romero	I. Ciencias Genómicas, UNAM
Suplente	Dra. Gloria Soberón Chávez	I. Investigaciones Biomédicas. UNAM
Suplente	Dr. Francisco Ruíz Terán	Facultad de Química, UNAM

Reconocimientos

El proyecto de tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Ma. Del Carmen Wachter Rodarte en el laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y biotecnología en el conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para los estudios de maestría con número de registro 184884.

Se agradece a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por el complemento de beca otorgado para los estudios de maestría.

Se agradece al Instituto de Investigación para el desarrollo (IRD) por el apoyo económico brindado.

Se agradece y reconoce la colaboración del Dr. Jean-Pierre Guyot durante la elaboración del proyecto.

Se agradece a la M en C. Sandra Bolaños Núñez por su importante colaboración en la asesoría técnica para la aplicación de la técnica DGGE.

Se agradece a la Dra. Teresita Saenz por su colaboración durante el proceso de clonación de productos de PCR.

Se agradece al Dra. Gloria Díaz por su asesoría técnica en el manejo de equipo básico de microbiología.

Se agradece a la M en C. Laurel Elidé Fabila Ibarra por su asesoría técnica en el manejo del equipo Fluor-S, centrífugas y el Software Diversity Data Base.

Se agradece a la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch y la Dra. Esperanza Martínez Romero como miembros del comité tutorial por sus importantes contribuciones a la dirección de este proyecto.

Agradecimientos:

Con todo mi cariño le agradezco a la Dra. Carmen Wachter: Por darme la oportunidad de trabajar con usted y por dirigir mi trabajo, pero muy especialmente le agradezco su invaluable amistad, comprensión, tiempo y confianza que siempre me brindó. También le agradezco todas sus enseñanzas no solo como profesora sino como una gran mujer, pues siempre serán una importante guía para mi vida. La quiero mucho.

A la Dra. Angela Sotelo López y al Profesor Bernardo Lucas: Por siempre darme todo su apoyo y cariño, pero sobre todo por su valiosa amistad y ejemplo de constante trabajo que me han enseñado a salir adelante.

A Sandra. Nunca tendré palabras suficientes para agradecerle todo tu apoyo y disposición para enseñarme, pero sobre todo te agradezco que siempre has sido un apoyo incondicional para mí, no solo como mi vecina de mesa, sino como mi maestra y como una gran amiga para toda la vida. Eres una gran mujer. Gracias por todo tu cariño y por tantas pláticas. Te quiero mucho Sandriux.

A Gloria. Por siempre brindarme un minuto de tu tiempo para ayudarme, por ser tan atenta conmigo y por tu gran amistad y cariño.

A Tere. Por tu amistad, cariño y paciencia para siempre enseñarme con tanta disposición todo lo que sabes. Gracias.

A Alex, Alicia y Ernesto. Por hacer mi estancia en la maestría una experiencia inolvidable, por compartir tantas horas de preocupación y diversión por todo su apoyo y su amistad. Los quiero mucho.

A Alberto Pérez. Por todas tus pláticas siempre amenas y divertidas, por tu gran apoyo y por tu larga amistad. Te quiero mucho pandita.

A todos mis compañeros del 324 y 321. Mariana, Migue, Dafne, Olivier, Esaú, Fernanda, Rocío, Lupita y Sr. Lorenzo. Gracias por su apoyo.

A los miembros de mi Comité Tutorial: Dra. Esperanza y Dra. Maricarmen, gracias por compartir conmigo su experiencia y por ayudarme a mejorar mi proyecto.

A los miembros de mi Jurado, gracias por todas sus opiniones y contribuciones para la presentación de esta tesis.

A la UNAM y a los PUMAS. Por toda la dicha, la alegría y experiencia que me han dado como estudiante de esta gran Universidad.

Dedicatorias:

A Manuel. Por siempre volar de la mano conmigo y por luchar juntos ayer, hoy y siempre, por tu amistad, respeto, y apoyo incondicional, por todo el amor, la alegría y la paz que le das a mi vida. Gracias por la maravillosa vida y la familia que siempre tendremos juntos. Te amo con todo mi corazón pescado.

A Alma. Gracias por ser mi madre y enseñarme con tu ejemplo de vida todo lo que sé. Te amo madre.

A mi hermano Gonzo. Por ser un hermano único y maravilloso, por enseñarme a divertir y hacerme sonreír siempre.

A mi hermana Miriam. Gracias por toda tu amistad y tu cariño, por todos los años que has estado conmigo incondicionalmente, por todos tus consejos y apoyarme tanto.

A mi abuelo. Por ser un gran padre para mí.

A mi Yaya⁺, mi Yeya⁺ y mi Yayo⁺. Por darme su amor y una maravillosa familia. Siempre están en mi corazón.

A mi familia. Papá, Martita, Guyu, Paty, Glen, Paty, Mary, Bimbos, Bebetiki, Carmen, Celia, Gaby, Marisela, Sandra, Miguel, Berenice, Familia Herrera-Alonso. Gracias por su amistad y su ejemplo.

A mis amigos. Noriko, Alejandra, Johan, Daniela, Almita, Fercita, Toño, Ponchito, Yuyis, Sandra, Fidel, Burger, Fermín, Mauricio, Israel, Rosita, Lety, Lucy, Sra. Vicky. Su amistad es invaluable y siempre serán un gran apoyo para mí. Los quiero mucho.

A Karlita, Marcos, Luis, Mónica, Ponchito, Maris, Ethel, Güeritos, Wendy y Mau. Por todo su apoyo, por querer tanto a Manuel y por todas las experiencias y alegrías que hemos compartido.

A Jorge Placencia. Por tu amistad y cariño. Por compartir tu experiencia conmigo.

A Alberto⁺, Angelica, Toto y Xila, por su amistad y toda las experiencias que nos han unido. Los quiero mucho.

A Pietro y Daysi, por acompañarme siempre y ser una gran alegría y compañía.

A Mateo y todo lo que viene.....

INDICE GENERAL

Contenido

Tema	Página
Resumen	1
Capítulo 1. Introducción	2
Capítulo 2. Objetivos	3
Capítulo 3. Antecedentes	
3.1. El pozol	
A. Elaboración del pozol	4
B. Usos del pozol	8
C. Aspectos generales sobre microbiología y características físicoquímicas del pozol	9
D. Fuentes de microorganismos presentes en el pozol	10
E. Cambios microbiológicos y bioquímicos durante la fermentación del pozol	11
3.2. Las bacterias lácticas	
A. Características generales	12
B. Revisión de los distintos géneros	14
3.3. Diversidad microbiana	17
A. Estudios evolutivos a partir de genes conservados	19
B. Biodiversidad en ambientes complejos	20
C. Aplicación de secuencias conservadas en el estudio de la diversidad microbiana	22
D. Biodiversidad en el pozol	23
E. Herramientas moleculares para el estudio de la Biodiversidad en el pozol	25
3.4. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante	26
A. Fundamentos técnico-prácticos de la técnica DGGE	27
B. Procedimiento general de la técnica DGGE	31
3.5. Heterogeneidad intragenómica en la secuencia del gen RNA ribosomal 16S en genomas bacterianos	33

3.6. Aplicación del gen <i>rpoB</i> como alternativa al problema de heterogeneidad inherente del gen 16S rRNA	35
3.7. Aplicación de la técnica PCR-DGGE	39
A. Aplicación de PCR-DGGE en alimentos	39
Capítulo 4. Hipótesis	42
Capítulo 5. Estrategia experimental	43
Capítulo 6. Materiales y Métodos	
6.1. Muestreo de pozol	45
6.2. Extracción de DNA de cepas puras	46
6.3. Extracción de DNA de pozol	47
6.4. Amplificación por PCR del gen <i>rpoB</i> de DNA de cepas puras y de DNA de pozol	49
6.4.1. Optimización del método de amplificación	50
a. Cambios en las condiciones de alineamiento durante la reacción de PCR	50
b. Detección de amplificación preferencial durante la reacción de PCR	51
6.5. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante perpendicular al campo eléctrico	53
6.6. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante paralelo al campo eléctrico	53
6.7. Clonación de productos de PCR	54
6.8. Extracción de plásmidos de células transformadas	55
6.9. Caracterización de microorganismos del pozol y análisis de comunidades	56
A. Obtención del patrón de bandas para la identificación de microorganismos	56
B. Identificación de bandas obtenidas a partir de los geles de DGGE de microorganismos que no pudieron ser identificados con el patrón de bandas	57

C. Análisis de comunidades microbianas	57
Capítulo 7. Resultados y discusión	
7.1. Condiciones de PCR para la amplificación del gen <i>rpoB</i>	59
7.2. Comprobación de la correcta amplificación del gen <i>rpoB</i> mediante la clonación de un fragmento del gen <i>rpoB</i> en <i>E. coli</i>	60
7.3. Establecimiento de las condiciones de concentración de desnaturalizante en DGGE (geles perpendiculares)	63
7.4. Aplicación y optimización de la técnica DGGE, para la identificación de microorganismos de pozol utilizando la amplificación del gen <i>rpoB</i> (geles paralelos)	65
7.5. Elaboración del patrón de bandas y discusión de los problemas inherentes a la amplificación del gen <i>rpoB</i>	68
A. Elaboración del patrón de bandas	68
B. Verificación de la reproducibilidad de método	70
C. Verificación de la presencia de amplificación preferencial	72
7.6. Análisis de muestras de pozol	77
A. Identificación de bandas	78
B. Análisis de microorganismos presentes en las distintas muestras de pozol	79
C. Análisis de la comunidad microbiana en los diferentes productores de pozol	98
D. Análisis de las comunidades microbianas de pozol, en los distintos tiempos de fermentación en el centro y superficie de la bola de pozol	112
Capítulo 8. Conclusiones	116
Capítulo 9. Bibliografía	119
Capítulo 10. Anexo	127

INDICE DE TABLAS

Tabla	página
Capítulo 3	
Tabla 3.1. Organismos identificados a partir de las secuencias de 16S rDNA en una biblioteca de clonas de DNA de pozol basados en los resultados del análisis de secuencias de nucleótidos del NCBI	24
Tabla 3.2. Número de copias de rRNA encontradas en diversas especies microbianas	34
Capítulo 6	
Tabla 6.1. Condiciones de la reacción de PCR para amplificar el gen <i>rpoB</i> en cepas puras y en pozol	49
Tabla 6.2. Protocolo de PCR para la amplificación del gen <i>rpoB</i> en cepas puras y en pozol	49
Tabla 6.3. Secuencia de los cebadores empleados para la amplificación por PCR	50
Tabla 6.4. Condiciones de la reacción de PCR para amplificar el gen <i>rpoB</i> en cepas puras y en pozol	50
Tabla 6.5. Combinaciones de DNA de distintas cepas puras en una reacción de PCR para determinar la presencia de amplificación preferencial	51
Tabla 6.6. Combinaciones de DNA de distintas cepas puras en una reacción de PCR para determinar la existencia de amplificación preferencial	52
Capítulo 7	
Tabla 7.1. Transformación de <i>E. coli</i> con el kit TOPO TA Cloning ® , se muestran los resultados de los controles pUC y blanco (sólo vector) así como de la transformación con los productos de PCR del gen <i>rpoB</i> de <i>Lactobacillus plantarum</i>	60
Tabla 7.2. Resultados obtenidos de la secuenciación del fragmento del gen <i>rpoB</i> de <i>Lb. plantarum</i> clonado en <i>Escherichia coli</i> , se muestran los datos de porcentaje de identidad de la secuencia de nucleótidos así como el tamaño del fragmento amplificado	62
Tabla 7.3. Análisis estadístico con la prueba de Análisis de varianza, intervalos múltiples de Duncan y t-Student para las distintas reacciones de PCR estudiadas con una temperatura de alineamiento de 50°C	73
Tabla 7.4. Análisis estadístico con la prueba de t-Student para las distintas reacciones de PCR estudiadas con una temperatura de alineamiento de 60°C	76

Tabla 7.5. Bandas detectadas en los geles de DGGE en muestras de pozol, se muestra el número de banda que está asignado en los geles digitalizados posteriormente, además del estado actual de identificación de las mismas

INDICE DE FIGURAS

Figura	página
Capítulo 3	
Figura 3.1. Grupos filogenéticos de bacterias lácticas y bacterias lácticas gram positivas relacionadas, con bajo y alto contenido de G+C en el DNA (parte alta y baja respectivamente)	13
Figura 3.2. Árbol filogenético de bacterias lácticas y bacterias relacionadas, la barra indica 10% de divergencia esperada en la secuencia	14
Figura 3.3. Gel perpendicular de DGGE	28
Figura 3.4. Gel paralelo de DGGE	29
Figura 3.5. Diagrama que muestra el desarrollo para la aplicación de la técnica DGGE en matrices alimentarias	32
Figura 3.6. Subunidades de la RNA polimerasas en eubacterias	36
Capítulo 5	
Figura 5.1. Montaje de la técnica de PCR-DGGE con bacterias lácticas aisladas de pozol	43
Figura 5.2. Aplicación de la técnica de PCR-DGGE a muestras de pozol	44
Capítulo 7	
Figura 7.1. Productos de PCR obtenidos a partir de DNA de muestras de pozol con los primers <i>rpoB2014r</i> y <i>rpoB1698 f</i> , A: marcador de pesos moleculares, carriles 1-9 corresponden a DNA de pozol obtenido de la superficie de la bola, carriles 10-16 corresponden a DNA de pozol obtenido del centro de la bola	59
Figura 7.2. Electroforesis en gel de agarosa (1.8%, 65V, 1 hora) de los plásmidos extraídos de las colonias transformadas. Carril A: marcador de pesos moleculares, B, C: plásmidos extraídos de colonias crecidas en ampicilina, D, E: plásmidos extraídos de colonias crecidas en kanamicina	61
Figura 7.3. Gel perpendicular de la mezcla de DNAs de cepas puras identificadas como <i>Lb. plantarum</i> , <i>S. infantarius</i> , utilizando un gradiente desnaturizante en un intervalo de 20% a 70%. Se muestra el intervalo de concentración en el que se aprecia la separación de DNA de ambas cepas puras	63
Figura 7.4. Gel perpendicular de productos de PCR de pozol (centro y superficie) utilizando un gradiente de concentración de 20% a 70% de desnaturizante, entre las líneas se indica el porcentaje de concentración en el cual se logra la mejor separación de fragmentos de los microorganismos presentes en el pozol	64
Figura 7.5. Gel paralelo (45-60% de desnaturizante, 85V, 17 horas), L: microorganismos identificados previamente como <i>Lactobacillus plantarum</i> . L.p: <i>Lactobacillus pentosus</i> , S.b: <i>Streptococcus infantarius</i> , Le.a: <i>Leuconostoc</i>	

argentum, Le.c: *Leuconostoc citreum*. W: *Weisella confusa* 65

Figura 7.6. Esquematación de los resultados obtenidos con los gradientes empleados a fin de optimizar el gradiente de la técnica PCR-DGGE. Cada bloque muestra la concentración trabajada e indica hasta donde migró el bloque de bandas del patrón de cepas puras 67

Figura 7.7. Gel DGGE (30-60% desnaturizante, 85V, 17 horas) de fragmentos amplificados del gen *rpoB* de cepas puras aisladas previamente de pozol, 1. *S. infantarius*, 2. *Lactococcus lactis*. 3. *Lb. plantarum* 4. *W. confusa*. 5. *Leuc. citreum*. 6. *Leuc. argentum*. 7. *Lb. raffinolactis*. 8. *Lb. pentosus* 68

Figura 7.8. Geles de DGGE (30-60% desnaturizante, 85V, 17 horas), para el duplicado obtenido de los productos de amplificación del productor 7, se muestran los resultados obtenidos para la masa recién molida (mrm), tiempo cero, uno, dos y tres de la fermentación correspondientes a las cero, 24, 48 y 72 horas respectivamente en la superficie de la bola de pozol. 71

Figura 7.9. Gel DGGE (30-60% desnaturizante, 85V, 17 horas), que muestra las bandas obtenidas por la amplificación de un fragmento del gen *rpoB* en cepas puras. Carril 1 (amplificación de la mezcla de templado de DNA de *S. infantarius*, *L. plantarum* y *W. confusa*), Carril 2 (amplificación de la mezcla de templado de *L. plantarum* y *W. confusa*), Carril 3 (amplificación de la mezcla de templado de *S. infantarius* y *W. confusa*), Carril 4 (amplificación de la mezcla de templado de *S. infantarius* y *L. plantarum*), Carril 5 (amplificación de *L. plantarum*), Carril 6 (amplificación de *W. confusa*), Carril 7 (amplificación de *S. infantarius*) 72

Figura 7.10. Gel DGGE (30-60% desnaturizante, 85V, 17 horas), que muestra las bandas obtenidas por la amplificación de un fragmento del gen *rpoB* en cepas puras. Carril 1 (amplificación de *S. infantarius*). Carril 2 (amplificación de *L. plantarum*), Carril 3 (amplificación de *W. confusa*), Carril 4, 5 y 6 (amplificación de la mezcla de templado de DNA de *S. infantarius*, *Lb. plantarum* y *W. confusa*) 75

Figura 7.11. Digitalización del patrón de bandas obtenido por PCR-DGGE para los productores 1, 2, 3 y 4 a diferentes tiempos de fermentación en la superficie (A) y en el centro (B) de la bola de pozol. Los tiempos de fermentación son (to inicio de la fermentación después de realizada la bola, t1 24 horas, t2 48 horas, t3 72 horas) 79

Figura 7.12. Digitalización del patrón de bandas obtenido por PCR-DGGE para los productores 5, 6 y 7 a diferentes tiempos de fermentación en la superficie (A) y centro (B) de la bola de pozol. Los tiempos de fermentación son (to inicio de la fermentación después de realizada la bola, t1 24 horas, t2 48 horas, t3 72 horas) 80

Figura 7.13. Índice de riqueza a diferentes tiempos de fermentación, en el centro y en la superficie de la bola de pozol, para los siete diferentes productores 93

Figura 7.14. A Digitalización del patrón de bandas obtenido por PCR-DGGE para la masa recién molida para los distintos productores. **B.** Dendrograma construido a partir del método UPGMA para las muestras de pozol, de los patrones de bandas del pozol obtenidas a partir del coeficiente de similitud de Dice **99**

Figura 7.15. A y B Digitalización del patrón de bandas obtenido por PCR-DGGE para el tiempo cero de fermentación en la superficie y centro de la bola de pozol respectivamente. **C y D** Dendrogramas construidos a partir del método UPGMA para las muestras de pozol al tiempo cero de la fermentación, de los patrones de bandas del pozol obtenidas a partir del coeficiente de similitud de Dice para el tiempo cero de fermentación en la superficie y centro de la bola de pozol respectivamente **101**

Figura 7.16. A y B Digitalización del patrón de bandas obtenido por PCR-DGGE para las 24 horas de fermentación en la superficie y centro de la bola de pozol respectivamente. **C y D** Dendrogramas construidos a partir del método UPGMA para las muestras de pozol a las 24 horas de la fermentación, de los patrones de bandas del pozol obtenidas a partir del coeficiente de similitud de Dice **103**

Figura 7.17. A y B Digitalización del patrón de bandas obtenido por PCR-DGGE para las 48 horas de fermentación en la superficie y centro de la bola de pozol respectivamente. **C y D** Dendrogramas construidos a partir del método UPGMA para las muestras de pozol a las 48 horas de la fermentación, de los patrones de bandas del pozol obtenidas a partir del coeficiente de similitud de Dice **106**

Figura 7.18. A y B Digitalización del patrón de bandas obtenido por PCR-DGGE para las 72 horas de fermentación en la superficie y centro de la bola de pozol respectivamente. **C y D** Dendrogramas construidos a partir del método UPGMA para las muestras de pozol a las 72 horas de la fermentación, de los patrones de bandas del pozol obtenidas a partir del coeficiente de similitud de Dice **109**

Figura 7.19. Promedios de diversidad de bacterias detectadas en la superficie de las muestras de pozol de diferente productores a diferentes tiempos de fermentación **112**

Figura 7.20. Promedios de diversidad de bacterias detectadas en el centro de las muestras de pozol de diferente productores a diferentes tiempos de fermentación **113**

Figura 7.21. Promedios de dominancia de bacterias detectadas en la superficie de las muestras de pozol de diferente productores a diferentes tiempos de fermentación. **114**

Figura 7.22. Promedios de dominancia de bacterias detectadas en el centro de las muestras de pozol de diferente productores a diferentes tiempos de fermentación **114**

RESUMEN

Para estudiar la diversidad en la composición microbiológica del pozol (bebida preparada a partir de masa de nixtamal fermentada que es sometido a un proceso de fermentación natural y por lo tanto no controlado puede dar origen a una microbiota variada), se han usado métodos independientes de cultivo, como el PCR-DGGE. Se extrae el DNA de las muestras y se amplifica una región del gen ribosomal 16S rDNA con cebadores específicos para Bacteria. Los productos de PCR obtenidos (del mismo tamaño, pero con secuencias diferentes) se separan en un gel con gradiente desnaturizante de urea-formamida. Esta técnica fue empleada anteriormente con la región V3 del gen ribosomal 16S rDNA; sin embargo la obtención de bandas múltiples para los cultivos puros dificultaba la asignación de bandas y análisis de geles. Este comportamiento se debe a que existe microheterogenicidad en el gen, esto es varias copias del mismo gen. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la diversidad de la microbiota presente en diferentes muestras de pozol usando una región del gen *rpoB*, del cual se ha reportado no ser multicopia y puede usarse como gen marcador para la identificación de microorganismos.

Se emplearon 7 muestras de pozol provenientes de distintos productores de Tabasco, Villahermosa, las cuales fueron sometidas a un proceso de fermentación durante 72 horas. Se extrajo DNA de cada una de las muestra tanto del centro como de la superficie de la bola de pozol en 5 tiempos distintos de la fermentación: tiempo cero (masa recién molida), 24, 48 y 72 horas. Se realizó la amplificación de una región del gen *rpoB* y finalmente se aplicó la técnica DGGE a los productos de amplificación.

La aplicación del gen *rpoB* resultó tener ventajas respecto al gen 16S rRNA, pues al obtenerse en la mayoría de los casos una banda representando a un microorganismo, facilitó el estudio de la diversidad microbiana en el pozol.

Dentro del estudio de la diversidad microbiana, se obtuvieron resultados que permitieron concluir que durante la fermentación del pozol es posible un mejor establecimiento de los microorganismos en el centro de la bola de pozol que en la superficie. Además se determinó que se desarrolla una microbiota que varía entre el pozol de un productor y otro; sin embargo fue posible detectar el predominio de un conjunto de microorganismos en todas las muestras: *S. infantarius*, *W. confusa* y *Lact. lactis* durante toda la fermentación y *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum* y *Leuc. mesenteroides subsp. mesenteroides* a partir de las 48 horas. Se consideró que estos constituían la microbiota básica de la fermentación y se atribuyó la gran diversidad microbiológica observada a la presencia ocasional de otros microorganismos en las muestras de pozol de los distintos productores.

INTRODUCCIÓN

El pozol es una bebida ácida que se prepara diluyendo en agua la masa de nixtamal fermentado. Es una fermentación natural, ya que no se inocula, sino que depende de los microorganismos que se encuentran naturalmente en la masa. Se encuentra entonces una microbiota compleja en la que participan una variedad de bacterias, levaduras y mohos. Los métodos moleculares para el análisis de comunidades microbianas (como la amplificación por PCR de genes ribosomales, seguida de DGGE) han revelado que existe una diversidad mayor a la encontrada con métodos de cultivo básico, lo que ha permitido la descripción más rápida y con mayor resolución de las comunidades microbianas. Se ha reportado sobre los cambios microbiológicos que ocurren durante la fermentación; sin embargo no se había tomado en cuenta la posible variabilidad microbiológica existente en el pozol proveniente de distintos productores debida a que ocurre una fermentación natural. En un trabajo previo se determinó esta variabilidad en muestras de pozol de Villahermosa, Tab., analizando patrones de bandas obtenidas mediante la separación por DGGE de la región V3 del gen ribosomal 16S. Se presentó el problema de la dificultad para asignar una banda a cada microorganismo, ya que se obtenían varias para cada microorganismo puro. Este fenómeno, que se conoce como microheterogeneidad, se ha atribuido a la presencia de varias copias del gen ribosomal, las cuales presentan variaciones en sus secuencias. Una alternativa sería el uso de genes que tengan una sola copia. Este es el caso del gen *rpoB* (el gen de la subunidad beta de la RNA polimerasa), que además de no presentar heterogeneidad intragenómica, posee las características deseadas para un gen que puede ser utilizado como herramienta filogenética esto es: que es común en todas las bacterias, que tiene secuencias conservadas así como regiones variables y que es funcionalmente homólogo, por lo que su aplicación al estudio de la ecología microbiana como una herramienta molecular, podría permitir obtener resultados más confiables en el estudio de la diversidad bacteriana de alimentos como el pozol.

OBJETIVO

Determinar la variabilidad en la microbiota de muestras de pozol de diferentes productores de Villahermosa, Tabasco, mediante el uso del gen *rpoB* como alternativa al uso de genes ribosomales.

Objetivos específicos:

- ✓ Determinar las condiciones óptimas para la obtención de productos de PCR con la secuencia del gen *rpoB* utilizando cepas puras que fueron aisladas previamente del pozol.
- ✓ Optimizar las condiciones de la técnica PCR-DGGE, con el fin de obtener la mejor resolución de bandas en los geles.
- ✓ Obtener el DNA de las muestras de pozol usadas en el trabajo de Bolaños (2004) mediante un proceso de extracción y a partir de éstos generar los productos de PCR con el gen *rpoB*.
- ✓ Aplicar la técnica PCR-DGGE a los fragmentos del gen *rpoB* generados de las muestras de pozol obtenidas de los distintos productores.
- ✓ Identificar los microorganismos presentes en el pozol en base a la secuenciación de las bandas obtenidas por los geles DGGE utilizando una región del gen *rpoB*.
- ✓ Determinar si existen diferencias en la composición microbiológica entre las diferentes muestras de pozol, en los diferentes tiempos de fermentación y entre la superficie y el interior de cada muestra.

CAPITULO 3. ANTECEDENTES

3.1 EI POZOL

El pozol es una bebida tradicional fermentada elaborada a base de maíz. Comúnmente es elaborada por la población india y mestiza en el sureste de México. (Sainz et. al. 2001) Dentro de los estados donde esta bebida es consumida se encuentran básicamente: Tabasco, Chiapas, Yucatán, Oaxaca, Veracruz, Guerrero y Quintana Roo (Wacher, 1999). El pozol es consumido desde tiempos prehispánicos, como una importante parte de la alimentación diaria de diferentes grupos étnicos (Wacher et. al. 2000). Esta bebida ha tenido una gran importancia ceremonial, pues ya desde aquellos tiempos se usaba como ofrenda en las diversas festividades mayas relacionadas con el cultivo y la cosecha del maíz (Ulloa et. al. 1987). Bebidas semejantes a esta pueden considerarse: la chichia en Latinoamérica, el Koko en Ghana, el Kenkey y mahewu en Sudáfrica en los cuales el maíz no está nixtamalizado. (Escobar A. 1996, Ulloa, 1983).

A. Descripción general de la elaboración del pozol

El proceso de elaboración de pozol se puede describir de la siguiente manera, los granos de maíz son cocidos en agua (aproximadamente 1% w/v) con cal (nixtamalización) hasta que se hinchan los granos y se desprenden el pericarpio, de este modo se obtiene el nixtamal. Con este último se elabora la masa, de la cual se hacen bolas que son envueltas en hojas de plátano y posteriormente se dejan fermentar a temperatura ambiente, por un periodo que va desde 4 a 5 días y en ocasiones dos semanas o más. Una vez fermentada la masa, se diluye en agua y se bebe solo o adicionado de sal, azúcar, miel o chiles secos molidos (Ulloa et. al. 1987).

Existe una modalidad de pozol, llamada chorote, que se prepara en Chiapas fermentando una mezcla de nixtamal y cacao molido (Ulloa et. al. 1987, García et. al. 1999.).

Debido a que algunos componentes fibrosos no pueden solubilizarse completamente durante la nixtamalización y el sedimento está presente en la bebida cuando la masa se

suspende en agua. A la población mestiza no le agrada este sedimento, y aparentemente ha modificado el proceso indígena adicionando un segundo proceso de cocción en agua de los granos de nixtamal para reducir el sedimento (Wacher et. al. 2000).

A continuación se describen los pasos reportados por Cañas et. al. 1993 involucrados en la obtención del pozol.

a. Limpieza de maíz

El maíz se limpia para eliminar material extraño y granos podridos, comúnmente se agrega agua al maíz crudo, de manera que lo cubra por lo menos de 10 a 15 cm. Se deja reposar unos minutos y se procede a retirar todo lo que flota, que es maíz picado o podrido, y cascarillas. O bien, un método muy tradicional consiste en vaciar el maíz de un canasto sostenido a cierta altura, a otro que se encuentra más abajo. Mientras el maíz cae, se sopla con un sombrero o cartón y así se separa la cascarilla. Posteriormente es necesario separar manualmente los granos malos.

b. Nixtamalización

Consiste en la cocción de los granos en agua con cal y su objetivo es lograr la separación de la cascarilla del grano. Los productores comerciales la llevan a cabo en cubetas de metal y los familiares, en recipientes de peltre o de barro.

La cal, que se adquiere en el mercado local, se puede agregar directamente sobre el maíz seco, al que después se le adiciona el agua, o sobre la mezcla de maíz con agua. Algunos productores mestizos suspenden previamente la cal en agua, esperan a que se asienten y la agregan sin el sedimento, los indígenas la añaden directamente.

La cantidad de cal necesaria, la cual ha sido conocida por experiencia, es muy importante, ya que si es insuficiente, dará dureza al maíz obteniéndose “maíz duro para puercos”. Si la cantidad es mayor a la necesaria, es necesario lavar muy bien para eliminar el exceso y debe hacerse en un tiempo no mayor a cuatro horas; de lo contrario, el grano de maíz se impregna de cal y el color y sabor del pozol se alteran. Durante la nixtamalización, el maíz adquiere un color amarillo, que se elimina con el lavado.

La cocción se lleva a cabo en hogueras, y ésta termina cuando el hollejo se puede eliminar fácilmente al frotar el grano con los dedos; el tiempo oscila entre los 60 y 120 minutos.

c. Lavado del nixtamal

Se lleva a cabo con agua potable, y tiene como fin la eliminación de la cascarilla. El maíz contenido en recipientes perforados se lava y se frota con las manos hasta que el agua residual sea transparente. Otra técnica consiste en agregar agua al nixtamal dentro de una cubeta, frotar los granos y transferirlos manualmente a otra cubeta con agua limpia, y así sucesivamente hasta que el agua de lavado quede libre de turbiedad.

d. Segunda cocción o “Reventado”

Esta operación representa la diferencia más importante entre el pozol indígena y mestizo. Consiste en cocer el nixtamal en agua hasta que el grano de maíz “revienta” o “florece”. Esta operación es sólo hecha por productores mestizos. El tiempo de cocción varía de 3 a 8 horas y el grado de reventado determina la consistencia final del pozol. Esto en realidad permite la obtención de un producto más fino.

e. Remojo

Precede a la molienda y se lleva a cabo, en el caso del pozol indígena, incluyendo el agua del último lavado del nixtamal (en frío); el pozol mestizo se remoja con el agua de reventado (en caliente). Por lo general el remojo dura toda la noche y permite aumentar la retención de humedad, para evitar que el maíz se seque durante la molienda.

f. Molienda

Se lleva a cabo al día siguiente de la nixtamalización o reventado. Esta se lleva a cabo en un molino comercial, manual o bien con una piedra o metate.

Para la molienda se agrega un poco de agua y algunos productores consideran que la calidad y características sensoriales del pozol varían de acuerdo con el molino empleado.

Resulta importante destacar que durante la molienda se observan focos potenciales de contaminación microbiana. Los molinos de mano jamás se desarmen para su limpieza. Es común desechar la primera tapa de masa que sale, ya que desprende un olor que es

inaceptable en el producto. En el caso de molinos comerciales se limpia una vez al día, al término de la jornada, esta limpieza es un raspado en seco de la masa que queda adherida al molino. La piedra se enjuaga con agua después de su uso.

g. Elaboración de la bola

Inmediato a la molienda, se forman bolas a mano, con la masa previamente amasada de manera vigorosa, durante poco tiempo (40 a 80 segundos), estas bolas se elaboran moldeando la masa con las dos manos, o sobre la mesa, que generalmente, se enjuaga previamente con agua. Durante la formación de la bola, todos los indígenas y algunos mestizos, utilizan agua para hidratar la masa. Tanto la manipulación de la masa, como el agua agregada en esta etapa pueden ser, al igual que la molienda, fuentes importantes de inóculo para la fermentación.

La temperatura de las bolas de pozol, varía de acuerdo con el tipo de proceso por el cual fueron obtenidos. Así, la temperatura interna de las bolas terminadas, varía de 20 a 27°C y la externa, de 20 a 24°C.

La forma y peso de la bolas también varía entre productores. La forma puede ser ovalada y redonda, mientras que el peso puede estar en el intervalo de 15 gramos a 1 kilogramo, siendo el pozol indígena el de mayor peso.

h. Envoltura

Una vez amasado, el pozol se envuelve tradicionalmente en hojas de plátano, sin embargo actualmente es común envolverlo en bolsas de plástico.

Algunos indígenas argumentan que la hoja retarda la acidificación del pozol, sin embargo, la bolsa de plástico actualmente es preferida por ser más económica y por disminuir el peso y el volumen del producto.

i. Fermentación

La mayoría de los consumidores prefieren el pozol fresco, es decir, el que se preparó el mismo día. Aunque no es muy ácido, ya presenta cierto grado de fermentación ya que el tiempo que transcurre entre su preparación (envoltura) y su consumo (aproximadamente

8 horas), es suficiente para que las bacterias lácticas responsables de la acidificación alcancen su máximo desarrollo.

Entre los indígenas es más frecuente el consumo de pozol maduro o agrio, sobre todo los hombres que realizan trabajo de campo, porque argumentan que les da energía para trabajar. La maduración, que consiste en dejar las bolas de pozol envueltas en hojas de plátano a temperatura ambiente, tiene generalmente una duración máxima de cuatro días. Algunas personas lo fermentan por más tiempo y lo consumen cuando ya presentan un notorio crecimiento superficial de mohos.

B. Usos del pozol

Los indígenas elaboran el pozol primariamente en sus casas para consumo familiar, sin embargo algunos de ellos son productores a gran escala y elaboran el pozol para venta (Wacher et. al. 1993).

El pozol es consumido básicamente por adultos, niños e infantes como bebida refrescante, que además es fuente de nutrientes. Cravioto y colaboradores (1955) reportaron que el pozol contiene más proteína cruda, niacina, riboflavina, lisina, triptofano y menos tiamina y fósforo que el maíz utilizado en su preparación. Además encontraron que la proteína del pozol es de mejor calidad que la del maíz debido al incremento de aminoácidos indispensables, particularmente lisina. Todo lo anterior, debido al proceso de fijación de nitrógeno atmosférico.

Algunos grupo étnicos del sureste de México, como los chontales y choles de Tabasco; los mayas de Campeche, Yucatán y Quintana Roo; los lacandones, tzotziles o chamulas, tzeltales, zoques, choles y mames de Chiapas y los zapotecos de Oaxaca lo consumen como alimento básico. Algunos de ellos llevan bolas de pozol como provisión para viajes largos (Wacher, 1999).

También es utilizado como medicina para controlar la diarrea, reducir fiebre así como para curar o prevenir infecciones (Herrera et. al. 1975), ya que se ha encontrado que inhiben diversos grupos de bacterias, levaduras y hongos. Comunidades indígenas desde la

antigüedad preparaban como cataplasmas de pozol enmohecido para curar infecciones superficiales. Los lacandones han utilizado el pozol mezclado con miel para bajar la fiebre y controlar la diarrea y otros padecimientos intestinales, de manera semejante al uso que hacen otras personas de medicamentos o alimentos que contienen levaduras y lactobacilos (Ulloa et. al. 1987).

Los mayas también lo utilizan como ofrenda en ceremonias relacionadas con el cultivo y la cosecha de maíz (Wacher et. al. 1999).

C. Aspectos generales sobre microbiología y características fisicoquímicas del pozol

Es de apreciarse que durante la elaboración de pozol, no existe ningún paso de inoculación de microorganismos para llevar a cabo la fermentación.

Así pues, la fermentación de pozol es **no-controlada** e involucra hongos, bacterias y levaduras. Los organismos primarios de la fermentación son las bacterias ácido lácticas (Nuraida et al. 1995). Ampe et al. (2000) encontraron que *Lactococcus* y *Leuconostoc spp.*, son dominantes al inicio de la fermentación, por otro lado *Lactobacillus* y *Streptococcus spp.* dominan al final de la misma. También se han encontrado bacterias mesófilas aerobias y *Enterobacteriaceae* que están presentes durante la fermentación (Wacher et al. 1993).

Durante la fermentación, el valor de pH de la masa cae de un valor inicial de aproximadamente 7 – 7.5 a 5 – 4 en 12 horas. La microbiota es dominada por bacterias lácticas. Wacher et al. han reportado concentraciones máximas (u.f.c/g) de 10^9 de bacterias lácticas, 10^7 bacterias mesófilas aerobias, 10^6 enterobacterias, 10^6 levaduras y 10^4 hongos.

Dentro de las levaduras prevalentes están las del género *Candida*, con poblaciones arriba de 10^8 ufc/g en peso de masa de 2 días de fermentación, y levaduras filamentosas, como *Trichosporon cutaneum* y *Geotrichum candidum*, con poblaciones arriba de 10^7 ufc/g en dos días también. El crecimiento de hongos superficiales incluye también diferentes especies encontrándose también levaduras de tipo amilolítico, sin embargo no se ha

encontrado que ocurra licuefacción en la masa, lo que sugiere que la amilólisis no es significativa en la fermentación (Nuraida et al. 1995).

Dentro de las características químicas observadas durante la fermentación se encuentran las siguientes:

Aproximadamente después de medio día de fermentación se ha observado que los valores de pH son de 4 a 4.7. Durante 6 a 9 días de almacenamiento, el pH declina a aproximadamente 3.6 a 3.9. En algunos casos se ha apreciado que en la superficie de la masa hay valores de pH de aproximadamente 4 a 4.4 (Nuraida et al. 1995).

Las concentraciones de acidez titulable (como peso de ácido láctico/ peso de agua) se encuentran en valores de entre 0.45% a 0.35% en pozol indígena y mestizo respectivamente, en este último se han encontrado valores de acidez un poco más alto que oscilan entre 0.6% a 0.7%. Respecto al contenido de glucosa libre se han encontrado valores menores a 2g/L y el contenido de humedad en el pozol oscila entre valores de 58 a 71% (Nuraida et al. 1995).

D. Fuentes de microorganismos presentes en el pozol

Se encontró que el remojo del nixtamal permite el crecimiento de diversos tipos de bacterias, incluyendo bacterias lácticas, mesófilos aerobios y enterobacterias, los cuales después constituyen la microbiota inicial del pozol.

La molienda en molinos comerciales inocula la masa con grandes números de bacterias lácticas, mesófilos aerobios y adiciona levaduras. Cuando la microbiota inicial del remojo se elimina por calor, los granos de la molienda en el molino comercial inoculan la masa con una microbiota de bacterias ácido lácticas, mesófilos aerobios, enterobacterias y levaduras.

Así mismo se ha visto que las levaduras no crecen en el agua del remojo y que son adicionadas en el pozol primariamente durante la molienda. Evidentemente la masa

retenida en espacios muertos en el molino que constituyen una masa fermentada la cual sirve como una fuente de inóculo de bacterias lácticas y contaminantes indeseables.

Otros pasos del proceso, incluyendo el contacto con tablas de madera, manipulación manual y exposición al aire, contribuyen solo en menor cantidad al inóculo de microorganismos en comparación con el remojo y la molienda (Nuraida et. al., 1995).

E. Cambios microbiológicos y bioquímicos durante la fermentación de pozol

Como se mencionó anteriormente, se ha hecho evidente que la fermentación inicial del pozol está dada por bacterias ácido lácticas. En ausencia del acceso al aire, como en el pozol mestizo, se encuentran otros microorganismos que no están presentes en concentraciones suficientes para ocasionar cambios bioquímicos significativos en el sustrato. Donde el acceso de aire es permitido, como en el pozol indígena tradicional que es envuelto en hojas de plátano, se ha apreciado un crecimiento extensivo de hongos en la superficie. Y es posible que esta microbiota contribuya con las características sensoriales al producto.

Las bacterias lácticas no hidrolizan el almidón bajo condiciones aeróbicas, pero cerca de dos terceras partes de ellas muestran algo de hidrólisis bajo condiciones anaeróbicas. Del mismo modo, la mitad de las levaduras aisladas del pozol muestran algo de actividad amilolítica, ciertamente no muy elevada, pues como ya se mencionó no se encuentra licuefacción de la masa, sin embargo, puede ser, que se requieran bajos niveles de actividad amilolítica para un crecimiento microbiano máximo así como para la acidificación de la masa (Nuraida et al. 1995).

Posteriormente se mencionarán con amplitud tópicos relacionados con la biodiversidad bacteriológica existente en el pozol, pues como hasta ahora se ha hecho notar, la microbiota de este producto es compleja.

3.2 LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas han tenido un papel relevante en la historia debido, sobre todo, a su aplicación en alimentos fermentados, ya que su aplicación ha dado lugar al desarrollo de características sensoriales definidas en distintos productos, tales como quesos, yogurt, mantequillas y por supuesto el pozol. Debido a esto su estudio ha sido importante sobre todo para la industrialización de diversos productos que incluyen beneficios a la salud, a continuación se muestra una breve revisión de los diversos microorganismos involucrados en esta clasificación.

A. Características generales

Cuando se habla de bacterias lácticas (LAB) los microbiólogos se refirieron a ellas como ciertas especies del genero *Lactobacillus*, *Lactococcus* (*Streptococcus*), *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Sin embargo, estudios basados en quimiotaxonomía y estudios filogenéticos han resultado en un dramático cambio en su nomenclatura. Filogenéticamente las LAB pertenecen a una rama de las clostridias de las bacterias gram positivas, son catalasa negativas, no formadoras de esporas, cocos o cocobacilos, y tiene menos de 55 mol% como contenido de Guanina y Citosina en su DNA. Los hidratos de carbono fermentables son utilizados como una fuente de energía. Las hexosas son degradadas principalmente a lactato (homofermentativas) o a lactato y productos adicionales tales como acetato, etanol, CO₂, formato o succinato (heterofermentativas). Las LAB son encontradas en alimentos (productos lácteos, carnes fermentadas, masas agrias, vegetales fermentados, ensilados, bebidas) en plantas, en genitales, intestinos y tracto respiratorio en hombre y animales (Wood, 1995).

Las LAB más importantes en alimentos pertenecen al género *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Labotacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetraganogenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Stiles, 1997).

Los datos de la secuencia de 16 S rRNA de LAB sugieren nuevas agrupaciones que pueden establecer líneas taxonómicas. No todos los nuevos grupos han sido establecidos en la taxonomía bacteriana, pero recientes consideraciones filogenéticas,

indican que lactobacilli, leuconostoc y pediococci serán reclasificadas como tres grandes grupos, el grupo de *Leuconostoc*, *Lactobacillus delbrueckii*, y *Lactobacillus casei-Pediococcus*. Otro género establecido *Carnobacterium* (atípico, ácido sensitivo, lactobacilli), *Tetragenococcus* (previamente *Pediococcus halophilus*) y *Vagococcus* (previamente streptococci móvil) forman un grupo filogenético con el genero *Enterococcus*. Algunas de estas relaciones se indican en la figura 3.1, adoptada por Schleifer y Ludwig (1995).

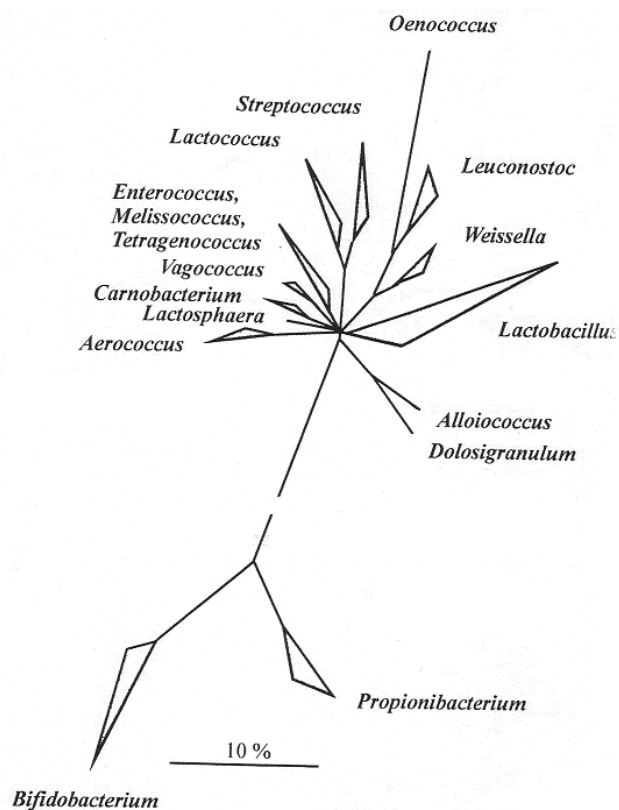


Figura 3.1. Grupos filogenéticos de bacterias lácticas y bacterias lácticas gram positivas relacionadas, con bajo y alto contenido de G+C en el DNA (parte alta y baja respectivamente) (Stiles, 1997).

B. Revisión de los distintos géneros

a. Género *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*

Los tres géneros son tratados separadamente debido a sus diferencias morfológicas, fisiológicas y de patrones de fermentación, sin embargo filogenéticamente, se encuentran inter-mezclados. A partir de los datos de 16 S rRNA de lactobacilli y organismos relacionados se obtuvo un árbol filogenético utilizando diferentes métodos. Esos análisis mostraron que el grupo de *Leuconostoc* está claramente separado de otras bacterias lácticas, mientras que los otros dos grupos, *Lb. delbrueckii* y *Lb. casei*, aún están más relacionados y puede ser difícil distinguir entre ellos. Esto se muestra en la figura 3.2.

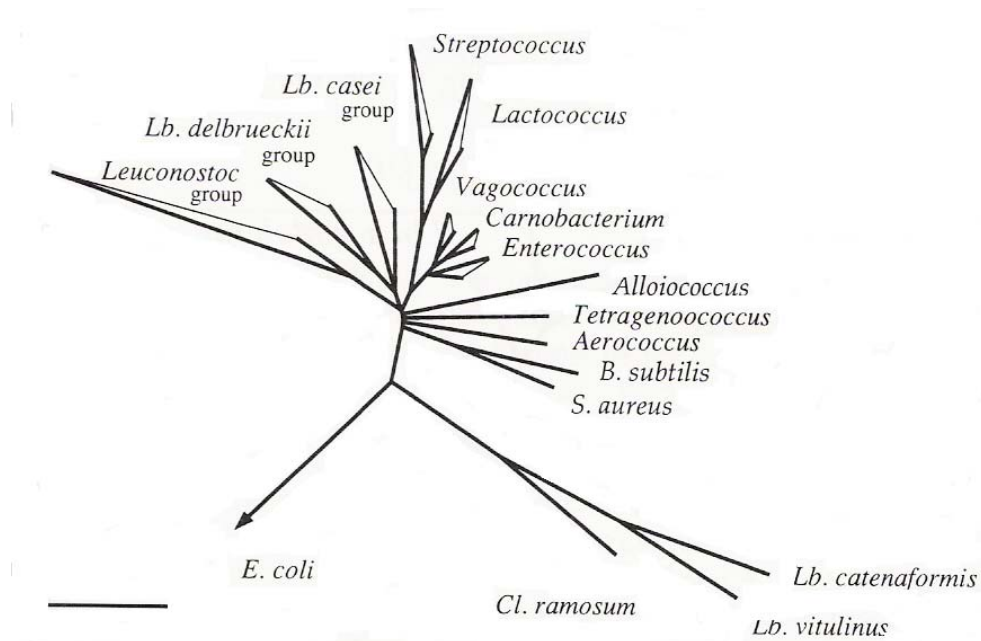


Figura 3.2. Árbol filogenético de bacterias lácticas y bacterias relacionadas, la barra indica 10% de divergencia esperada en la secuencia (Stiles, 1997).

El grupo comprende a *Lb. delbrueckii* y otros lactobacilos homofermentativos tales como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus kefiranofaciens*.

El grupo, llamado *Lb. casei-Pediococcus* es el más grande de los tres, comprende más de 30 especies de *Lactobacillus* y 5 especies de pediococos. La mayoría de los miembros son organismos heterofermentativos facultativos sin embargo algunos son hetero u homo fermentativos obligados entre los cuales destacan el *Lb. plantarum*, *P. pentosaceus*, *Lb. brevis* entre otros.

Finalmente el grupo compuesto por todos los miembros del género *Leuconostoc* que son lactobacilos heterofermentativos obligados. Estos se encuentran divididos en dos subgrupos uno que comprende todos los leuconostoc (excepto *Leuconostoc paramesenteroides*) y *Lactobacillus fructosus*, mientras el otro subgrupo consiste de lactobacilos heterofermentativos obligados y *Leuc. paramesenteroides*. (Wood, 1995. Stiles, 1997).

b. El género *Carnobacterium*

Atípicamente los aislados de carne de pollo, carne de vacuno empacada o pescado están fisiológica y bioquímicamente relacionados y fueron puestos en un nuevo género, *Carnobacterium*. En contraste con otros lactobacilos, estos no pueden crecer en agar con acetado sino a pH de 8.5-9.0. Este género consiste en cinco especies: *C. divergenes*, *C. funditum*, *C. gallinarum*, *C. mobile* y *C. piscicola*. (Wood, 1995)

c. Los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*.

A partir de estudios basados en la secuencia de 16 S rRNA, se pensó separar a los estreptococos en tres grupos genéticamente distintos: *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* y *Lactococcus*. La única excepción es *Streptococcus thermophilus* que no se incluyó en este género debido a que es un organismo iniciador importante en la manufactura de queso y yogurt (Stiles, 1997).

El género *Streptococcus sensu stricto* puede ser dividido en el piogénico y oral o estreptococo viridans. La relación intragenérica de los generos *Streptococcus sensu stricto* fue estudiada por hibridación DNA-rRNA y por el análisis de la secuencia parcial de 16S rRNA. Encontrando que *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus uberis* pertenecen a los estreptococos piogénicos mientras que el grupo de estreptococos orales se subdivide en cuatro grupos *S. mutans* con siete especies, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus anginosus*, ambos con tres

especies y *Streptococcus oralis* con seis especies. *Streptococcus bovis* forma junto con *Streptococcus equinus*, y *Streptococcus alactoyticus*, un grupo distinto bien separado del grupo piogénico y oral. Dos especies distintas; *S. aciominimus* y *S. suis* son genéticamente distintos y muestran no tener relación específica con ninguna de las otras especies de estreptococos (Wood 1995).

El genero *Lactococcus* incluye estreptococos no móviles, mesófilicos y que contienen el antígeno N. Las especies más importantes son *Lc. garviae*, *Lc. lactis*, *Lc. plantarum* y *Lc. raffinolactis* (Wood, 1995). El uso de lactococos ha sido amplio en la industria y tecnología de cultivos iniciadores, particularmente el uso de *Lc. lactis* que produce un gran número de bacteriocinas siendo la más importante nisina que es un antibiótico de relativo amplio espectro contra bacterias gram positivas como *Clostridium botulinum* y sus esporas, de ahí su importancia como un conservador de alimentos (Stiles, 1997).

En el género *Enterococcus* se acomodó a las especies *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium*. Este género contiene 19 especies. Estudios con 16 S rRNA indican que los enterococos pueden estar relacionados con los géneros *Carnobacterium* y *Vagococcus* más que con *Streptococcus* y *Lactococcus*, las cuatro especies *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae* y *Enterococcus mundii*, forman un grupo distinto de *Enterococcus avium*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus malodoratus* y *Enterococcus pseudoavium* y dos especies más son *Enterococcus casseliflavus* y *Ent. gallinarum* (Wood, 1995).

d. El género *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Tetragenococcus* y *Atopobium*

El género *Aerococcus* contiene dos especies: *Aerococcus urinae* y *Aerococcus viridans*. Estos pueden ser distinguidos de otras especies catalasa negativas, son cocos gram positivos y tiene una tendencia a dividirse en dos planos en ángulos rectos para formar tétradas. Este género representa una línea distinta de descendencia dentro de las bacterias gram positivas con bajo contenido de guanina citosina en el DNA.

El género *Alloiococcus* está representado por cocos gram positivos, que se presentan como diplococos o tétradas y están fenotípicamente más relacionados a los aerococos y estreptococos, mostrando la característica de ser catalasa positivos. Incluye una bacteria única, *Alloiococcus otitis*, debido a que fue aislada de el oído medio del humano.

El género *Tetragenococcus* proviene de una reclasificación del *Pediococcus halophilus*, el cual no mostraba relación cercana con otros pediococos. Se encontró por el análisis de secuencias del 16S rRNA una descendencia separada de los aerococos y pediococos. De la misma manera el género *Atopobium* es una reclasificación de *Lactobacillus minutus* que no correspondía a las bacterias gram positivas con bajo contenido de guanina citosina, sino que está más relacionada con las bacterias de alto contenido de guanina citosina (Wood, 1995).

e. El género *Bifidobacterium*

Miembros del género *Bifidobacterium* exhiben un alto contenido de guanina y citosina en el DNA (55-67mol%). Basados en el análisis de la secuencia de 16S rRNA, se sabe que pertenecen a bacterias gram positivas con alto contenido de guanina citosina. Fisiológicamente son bacterias lácticas, sacarolíticas y productoras de lactato y acetatos como productos finales de la fermentación, sin embargo contienen una ruta especial para la fermentación de hexosas, llamada ruta Bifida o ruta de la fructosa-6-fosfato. La ruta completa involucra enzimas de la glucólisis y de la ruta de las pentosas fosfato y contiene una segunda fosfoacetolasa que rompe a la fructosa-6-fosfato en acetil-fosfato y eritrosa-fosfato. La presencia de esta enzima, es una característica confiable para la identificación de bifidobacterias (Wood, 1995). La importancia de éstas ha radicado en contribuir al funcionamiento adecuado del intestino, incluyendo bacterias con capacidad probiótica como *B. longum*, *B. bifidum* y *B. infantis*, que actualmente se incluyen en productos lácticos con fines terapéuticos que aportan beneficios nutricionales. Se ha encontrado que dominan en el tracto intestinal en infantes, particularmente los amamantados del seno materno, protegiendo contra patógenos entéricos y actuando como estimulantes al sistema inmunológico (Stiles, 1997).

3.3 DIVERSIDAD MICROBIANA

En general se puede mencionar que los microorganismos ocupan un lugar peculiar en la vida humana. Por ejemplo la actividad en la biosfera depende en gran medida de las actividades realizadas por los microorganismos.

Los suelos, se sabe, contienen billones de microorganismos de diferentes tipos, en su mayoría desconocidos. Actualmente se conocen solo cerca de 5000 de ellos, esto es, que han sido formalmente descritos (en contraste con el medio millón de especies de insectos descritas).

La razón de lo mencionado reside, en el hecho de que los microorganismos, no son visibles a simple vista; gracias a la invención del microscopio por Leeuwenhoek pudieron ser vistos, observándose así ciertos detalles morfológicos lo que permitió hacer ciertas clasificaciones.

No fue sino hasta el siglo XIX y gracias al desarrollo de técnicas de cultivo, que ciertos microorganismos pudieron ser clasificados por criterios nutricionales y aislados de cultivos puros. Actualmente las herramientas moleculares y las perspectivas ofrecidas por las secuencias genéticas han ayudado a conocer más a fondo la diversidad de microorganismos encontrados y sin duda, han cambiado la percepción de la diversidad microbiana (Pace. 1997).

Todos los descubrimientos antes mencionados, junto con la aplicación de nuevas técnicas han permitido conocer la fisiología microbiana y su bioquímica lo que ha permitido la aplicación de microorganismos a diferentes áreas tales como la medicina y alimentos por mencionar algunas. Sin embargo, el uso de técnicas moleculares ha mostrado que solo una pequeña fracción de la diversidad microbiana ha sido cultivada de todos los ambientes que se han investigado. Aún existen una gran cantidad de ambientes no explorados que son reservorio de diversos microorganismos que podrían ser potencial fuente de antibióticos, antifúngicos y otros productos de importancia y gran aplicación (Keller et al. 2004).

Desafortunadamente, sólo un pequeño porcentaje de los microorganismos puede ser identificados usando técnicas tradicionales de cultivo. Por ejemplo, en ciertos ambientes, la comunidad microbiana es descrita solo en parte, debido a que sólo una pequeña fracción de las especies son recuperadas (Ampe et al. 2000). Esto ocurre en ambientes tales como los suelos, ríos, alimentos fermentados, flora del rumen en rumiantes, ambientes “hot springs”, microorganismos que viven en ambientes extremos etc., que son ambientes complejos y de gran diversidad microbiana.

Se han desarrollado una gran diversidad de métodos con el fin de estudiar la diversidad microbiana, que no requieren el cultivo de microorganismos.

Entre los más importantes podemos mencionar:

- ✓ Las secuencias de rRNA,
- ✓ FISH (fluorescencia por hibridación in situ),
- ✓ DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante),
- ✓ TGGE (electroforesis en gel con gradiente de temperatura),
- ✓ RFLP (polimorfismo con fragmentos de restricción)
- ✓ T-RFPL (polimorfismo con fragmentos de restricción terminal)

La desventaja de estos métodos es que a partir de ellos no es posible conocer la función de los microorganismos encontrados en su ambiente (Keller et al. 2004). **Sin embargo conocer la diversidad presente en diversos ambientes es un inicio para poder conocer a su fisiología.**

La diversidad microbiana se puede definir como la suma de las diferentes especies en un ambiente dado. A su vez ésta puede ser definida usando diversos criterios, por ejemplo, filogenia, fisiología, metabolismo y genómica (Keller et al. 2004).

El gen ribosomal 16S refleja relaciones evolutivas entre los microorganismos (Woese et al. 1987). El estudio de la secuencia de estos genes permite su identificación, ya que el RNAr es una molécula distribuida universalmente, que tiene una función homóloga en todos los organismos, además de presentar zonas moderadamente conservadas y zonas variables. Por otra parte, el RNAr presenta secuencias huella u oligonucleótidos cortos que son únicos para ciertos grupos de organismos, lo que ha permitido que sea empleado como herramienta en estudios de ecología microbiana.

A. Estudios evolutivos a partir de genes conservados

La evolución de los microorganismos fue objeto de especulaciones controvertidas durante mucho tiempo. Se construyó un árbol filogenético de los procariotas cuando C. Woese

secuenció las bases del RNAr de un gran número de bacterias. A partir del grado de semejanza entre las secuencias de bases de diversos organismos pudo concluir que todos los organismos derivan de una raíz común (Schliegel, 1999).

En general las secuencias altamente conservadas, que tienen un papel central y por consiguiente durante la evolución, solo cambian lentamente, por lo que pueden poner de manifiesto parentescos entre organismos que divergieron hace tiempo, mientras que secuencias que evolucionan rápidamente pueden utilizarse para determinar cómo evolucionan especies relacionadas. Es de esperar que la aplicación continua de estos métodos permitirá seguir el curso de la evolución con cierta exactitud (Pace. 1997).

Los tipos filogenéticos de organismos, “filotipos” y su distribución en comunidades naturales puede ser examinado por la secuencia de genes de RNAr obtenido de DNA aislado directamente de un ambiente dado. El análisis de ecosistemas microbianos de esta manera, es más que un ejercicio taxonómico, porque las secuencias proveen herramientas experimentales que pueden ser usadas para la identificación, monitoreo y estudio de ambientes microbianos en ecosistemas naturales.

Los genes de RNA ribosomal son obtenidos del DNA aislado directamente del ambiente. Gracias a que estas secuencias de RNAr son están altamente conservadas se pueden sintetizar “primers” o cebadores universales que permiten mediante la reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) amplificar las secuencias variables y dominios filogenéticos. Posteriormente la mezcla de estos genes individuales podrán posteriormente ser separados por diversas técnicas y ser identificados (Pace. 1997).

B. Biodiversidad en ambientes complejos

Una gran variedad de organismos, muchos aún desconocidos, forman parte de la microbiota presente en diversos ambientes. Aunque el número de bacterias en los océanos es enorme, la diversidad de procariotes en ambientes acuáticas es estimada en un orden de magnitud menor que en ambientes como el suelo. Dependiendo del método usado, se estima que el número de especies que existen en una muestra difieren sustancialmente. Simplemente, se ha estimado que el número de diferentes especies en una muestra de suelo incluye 467, 6300, 10,000 y hasta 500,000 géneros, de acuerdo con

distintos métodos utilizados. Se ha especulado acerca de la diversidad a larga escala, Curtis y colaboradores estimaron que la diversidad bacteriana del océano difícilmente excede de 2×10^6 especies, mientras que la diversidad de suelos se ha calculado contiene aproximadamente 4×10^6 especies distintas. Ahora bien, si se consideran ambientes extremos, aún poco explorados por el hombre, tal como comunidades subsuperficiales, ambientes hidrotérmicos y ambientes llamados “hot springs”, el problema de la biodiversidad se vuelve aún más complejo pues en estos ambientes existen una gran variedad de variaciones geoquímicas que sin duda afectan la biodiversidad y de ellos se han aislado un gran número de organismos con aplicación potencial, tal es el caso de la Taq polimerasa aislada de *Thermus aquaticus* (Chien, 1976).

Debido a esto, el conocer e incorporar instrumentos de medición y técnicas moleculares para la caracterización de las comunidades microbianas presentes en ellos puede dar lugar al entendimiento de estos ambientes y poder predecir así su biodiversidad (Keller et al. 2004).

La ecología microbiana en alimentos ha comenzado a tener importancia en los últimos años, como es el caso de los ambientes anteriormente descritos. Los métodos para extracción de DNA han sido usados para detectar específicamente microorganismos por amplificación parcial de 16 S rDNA con PCR con primers o cebadores específicos o por hibridación con pruebas de 16S o 23S rDNA. Sin embargo las estructuras formadas por estas comunidades no ha sido lo suficientemente estudiada usando estas herramientas, especialmente no en ambientes complejos como es el caso de alimentos tradicionales fermentados.

Un análisis de diversidad bacteriana en alimentos fermentados es sin duda el primer paso en el estudio de su microbiología. Los alimentos tradicionales fermentados son ambientes que guardan una diversidad de microorganismos en sustratos específicos (Escalante et al. 2001).

Varios de estos alimentos fermentados se producen, la mayoría de las veces, a nivel casero o a pequeña escala, en muchas ocasiones con malas condiciones higiénicas y se obtienen productos de calidad variable. El estudio de estas fermentaciones permite

mejorar su elaboración rural y también producirlos a nivel industrial (Wacher et al. 1999). Sin embargo uno de los obstáculos más grandes para llegar a este tipo de mejoras es la falta de conocimiento acerca de la diversidad microbiana real y el papel que los microorganismos pueden jugar en el proceso (Escalante et al. 2001).

C. Aplicación de secuencias conservadas en el estudio de la diversidad microbiana.

Los microorganismos han sido tradicionalmente caracterizados de acuerdo con sus características fenotípicas, propiedades celulares observables y la estructura de los componentes celulares. Debido a que el cultivo es un prerrequisito para examinar tales propiedades, la mayoría de los microorganismos no puede ser caracterizada en sus ambientes naturales. Lo cual ha dado lugar a la imposibilidad de determinar la diversidad bacteriana total de una muestra de un ambiente.

Con el fin de luchar contra este problema, el uso de herramientas moleculares, particularmente el análisis de secuencias genes ribosomales (rDNA o rRNA), se han convertido en un método popular que ha hecho posible la detección de una gran diversidad microbiana en diferentes habitats (Escalante et al. 2001).

Las amplificaciones obtenidas a partir de dichas secuencias han sido utilizadas para la subsecuente generación de bibliotecas de clonas de 16S rDNA, las cuales son secuenciadas y analizadas para establecer la identidad de la secuencia y relaciones taxonómicas por comparación de resultados existentes en diversas bases de datos.

Se ha apreciado que las comunidades bacterianas están compuestas por una gran variedad de especies no cultivables (Escalante et al. 2001). En consecuencia, son especies que de no haber sido por el desarrollo de este tipo de técnicas, probablemente nunca hubieran sido caracterizadas por métodos comunes, dejando incompleto el estudio de la biodiversidad en los ambientes estudiados.

D. Biodiversidad en el pozol

En las últimas dos décadas, la diversidad microbiana de las fermentaciones naturales de materiales vegetales en países tropicales ha sido estudiada principalmente usando técnicas básicas de cultivo. Recientemente se ha encontrado que en el caso de alimentos fermentados, no todos los microorganismos que habían sido caracterizados por técnicas básicas de cultivo, eran los presentes en estos alimentos. Esto implica que los datos obtenidos por técnicas de cultivo no pueden ser usados para caracterizar la diversidad microbiana en alimentos fermentados, que los parámetros básicos tales como índices de biodiversidad y parámetros ecológicos tampoco pueden ser calculados.

En el caso particular de los alimentos fermentados como el pozol, el conocimiento de la diversidad se hace importante, pues tal conocimiento, podría dar lugar al conocimiento de la fisiología y función de estos microorganismos, y así estandarizar un cultivo iniciador lo que permitiría estandarizar la calidad de este alimento fermentado (Ampe et al. 2000).

La principal razón para la utilización de técnicas que sean independientes de cultivo es la falta de conocimiento de las condiciones reales bajo las cuales la mayoría de las bacterias crecen en su hábitat natural y la dificultad de desarrollar medios de cultivo que posean tales condiciones (Ercolini et al. 2004).

El pozol ha sido sujeto a una serie de análisis con el fin de conocer a la comunidad microbiana en este productos así como las interacciones entre la población existente utilizando herramientas moleculares.

En la tabla 3.1 se muestran los organismos identificados analizando la secuencia rDNA 16S a partir de la extracción de DNA del pozol.

Otros estudios que involucran también el análisis de la secuencia de 16S rRNA han demostrado la presencia de bacterias ácido lácticas con capacidad amilolítica, identificando a *Streptococcus infantarius*, bacterias comúnmente homofermentativas así como heterofermentativos facultativos como *Lactobacillus plantarum*. En general todas las bacterias con esta actividad aisladas del pozol son capaces de fermentar sacarosa,

maltosa, glucosa y fructosa, las cuales están presentes como azúcares solubles en el maíz, reflejando así su adaptación al hábitat (Díaz-Ruiz et al. 2003).

Algunas cepas de *Escherichia coli* también han sido recuperadas después de la fermentación del pozol (48 horas después), aún cuando los valores de pH oscilan entre 4.7 y 3.7. La presencia de este microorganismo, se sugiere, es debida a la presencia de micro ambientes en el pozol que permiten la sobrevivencia de este microorganismo aún cuando el pH del pozol sea bajo. Sin embargo el bajo valor de pH en alimentos ácidos fermentados ejerce una selección de los microorganismos. Solamente algunas clonas con la capacidad de tolerar o adaptarse a este ambiente ácido sobrevivirán (Sainz et al. 2001).

Tabla 3.1. Organismos identificados a partir de las secuencias de 16S rDNA en una biblioteca de clonas de DNA de pozol basados en los resultados del análisis de secuencias de nucleótidos del NCBI (Escalante et al. 2001).

Organismo identificado ^a	No. (%) de organismos identificados ^b	Designación de clona ^c
<i>Lactococcus lactis</i>	13 (37.1)	Pz 518 Pz 608 Pz 638 Pz 513 Pz 547 Pz 505
<i>Streptococcus suis</i>	3 (8.5)	Pz 504 Pz 406 Pz 525
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5 (14.3)	Pz 619
<i>Lactobacillus casei</i>	2 (5.7)	Pz 322
<i>Lactobacillus alimentarium</i>	8 (22.9)	Pz 634
<i>Lactobacillus delbruekii</i>	1 (2.9)	Pz 314
<i>Clostridium sp.</i>	1 (2.9)	Pz 507
Genes no ribosomales de <i>Alcaligenes Branchisepticus</i>	1 (2.9)	Pz 522
Genoma humano	1 (2.9)	Pz 613

a. Organismos que muestran el mayor porcentaje de identificación resultado del análisis en nucleótidos (non-redundant) de la base de datos NCBI con el programa BLAST

b. numero (%) calculado del número total de clonas para cada filotipo identificado

c. Designación de clon, de un fenotipo único detectado

E. Herramientas moleculares para el estudio de la biodiversidad en el pozol

Actualmente se han empleado diversas técnicas que permiten la caracterización de la diversidad microbiana en este tipo de alimentos. Tal es el caso de técnicas como DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante) y TGGE (electroforesis en gel con gradiente de temperatura) así como la amplificación de secuencias conservadas con PCR. DGGE será descrita con mayor detalle posteriormente, por el momento solo es importante mencionar que todas ellas son métodos que arrojan una huella característica de cada microorganismo y sin duda han abierto nuevos horizontes para el estudio de la diversidad microbiana, pues además permiten comparar, con resultados favorables, comunidades microbianas complejas (Ampe et al. 2000).

Independientemente de las dificultades encontradas por la dificultad en la resolución de bandas, existen otras dificultades a las que se enfrenta durante el estudio de la diversidad en un alimento debido a que las comunidades microbianas difieren tanto en su composición cuantitativa como cualitativa. La proporción relativa de los miembros de su comunidad está sujeta a cambios fisicoquímicos del ambiente así como a cambios fisicoquímicos y metabólicos causados por los organismos. Los organismos que son abundantes y cultivables bajo ciertas condiciones pueden no serlo por encontrarse en formas no cultivables o en un estado de dormancia. Debido al poder de la reacción en cadena de la polimerasa de amplificar pequeñas cantidades de DNA, los organismos que están en pequeñas cantidades en un ambiente pueden ser detectables, lo cual es una ventaja al emplear los métodos antes mencionadas. Sin embargo es importante mencionar que existen una serie de factores que empañan el poder de las técnicas como el DGGE debido a que ciertamente será necesaria la extracción de DNA, su amplificación por PCR y como se había mencionado anteriormente las dificultades inherentes al gen (Friedrich, 1997).

Entre estas dificultades se encuentran

- ✓ La adecuada recolección de la muestra
- ✓ La lisis celular para la extracción de DNA

- ✓ La amplificación por PCR que puede llevar a encontrar inhibidores de la amplificación, amplificación difeencial, formación de moléculas quiméricas, deleciones y mutaciones puntuales.
- ✓ Contaminación de DNA

Sin embargo si se cuenta con controles adecuados, es posible en la mayoría de los casos contender con estos puntos o buscar estrategias que permitan la obtención de resultados adecuados que den lugar a un exitoso análisis de una comunidad microbiana.

3.4 ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE DGGE

Como se ha mencionado anteriormente, las herramientas moleculares son cada vez más utilizadas para la identificación de microorganismos, evadiendo de este modo, el uso de técnicas de cultivo.

Sin embargo las técnicas que muestran huellas genéticas son capaces de proveer un perfil representativo de la diversidad genética de una comunidad microbiana de un ambiente específico.

La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) es quizás una de las técnicas independientes de cultivo más comúnmente usadas que proporcionan una huella genética de la microbiota en diversas muestras. Esta técnica está basada en la separación de secuencias amplificadas por PCR, dichas secuencias amplificadas pueden ser del mismo tamaño pero de diferente secuencia.

El PCR-DGGE de DNA ribosomal fue introducido por Muyzer et al. en 1993. Actualmente ha sido utilizada para el estudio de diversidad microbiana en muchos laboratorios del mundo (Muyzer et al. 1998 y Ercolini, 2004).

A. Fundamentos teórico-prácticos de la técnica DGGE

DGGE es un método electroforético capaz de detectar diferencias entre fragmentos de DNA del mismo tamaño pero con diferente secuencia. Esto es porque esos fragmentos pueden ser separados en un gel de gradiente desnaturizante basado en su perfil de desnaturización diferencial (melting profile) (Ercolini, 2004).

En un gel de acrilamida, las condiciones desnaturizantes están dadas por la urea y la formamida. Una solución de 100% de desnaturizante químico contiene 7M de urea y 40% de formamida en agua. Se preparan soluciones con alto y bajo contenido de desnaturizantes, se mezclan con la solución de acrilamida y se genera un gradiente de desnaturización lineal. La electroforesis se lleva a cabo a temperatura constante entre 55 y 65°C, comúnmente a 60°C (Muyzer et al. 1998).

En un gel DGGE, los fragmentos de DNA de doble cadena son sujetos a un incremento de concentraciones de agente desnaturizante, lo que provoca la fusión parcial en regiones discretas llamadas dominios de fusión (“melting domains”). La temperatura (T_m) de ese dominio es secuencia-específica. Una vez que la T_m más baja de dominio es alcanzada, parte del fragmento se funde parcialmente, creando una molécula “enramada”. Este comportamiento reduce la movilidad de DNA en el gel de acrilamida.

Los fragmentos de DNA del mismo tamaño pero de diferente composición en pares de bases, mostrará una respuesta diferente al gradiente desnaturizante. Las diferentes secuencias de los fragmentos de DNA tendrá dominios diferentes con valores diferentes de T_m que correrán diferentes distancias en el gel DGGE por lo tanto se separa (Ercolini, 2004).

DGGE puede ser utilizado con geles de gradiente desnaturizante paralelos o perpendiculares. En este último caso, el gradiente de desnaturización es perpendicular a la dirección de la electroforesis y el rango del gradiente es usualmente de 0 a 100% o de 20 a 100%, y son usados comúnmente para detectar el comportamiento de fusión de los fragmentos de DNA y para determinar experimentalmente los rangos óptimos de desnaturización a usar en experimentos de electroforesis paralela (Ver figura 3.3). Para lograr la separación de los fragmentos se utilizan los geles paralelos. El campo eléctrico y

el rango de desnaturalizante es en la misma dirección, permitiendo una mejor separación. Los geles paralelos son los más utilizados y permiten el análisis de múltiples muestras en un mismo gel (Ercolini, 2004) (Ver figura 3.4)

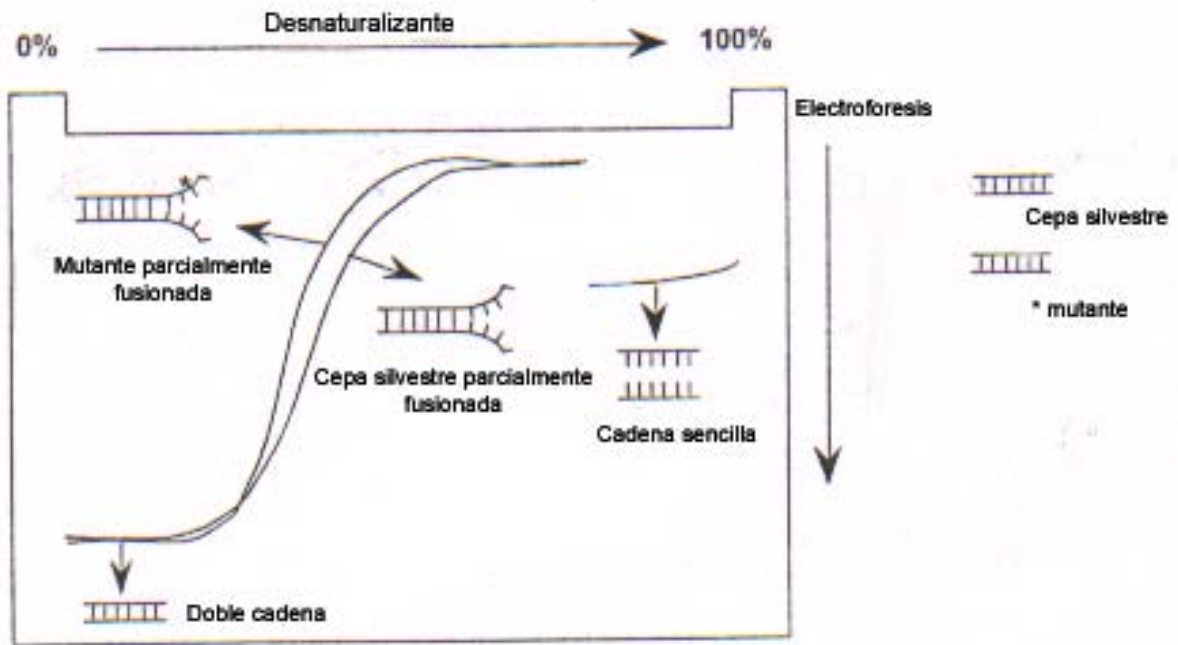


Figura 3.3. Gel perpendicular de DGGE

Un ejemplo de las propiedades de fusión en un gel perpendicular con gradiente desnaturalizante. A una baja concentración de desnaturalizante, El fragmento de DNA queda de doble cadena, pero como la concentración de desnaturalizante incrementa, el fragmento de DNA empieza a fundirse. Entonces, a muy altas concentraciones de desnaturalizante, el fragmento de DNA puede fusionarse completamente, creando dos cadenas sencillas.

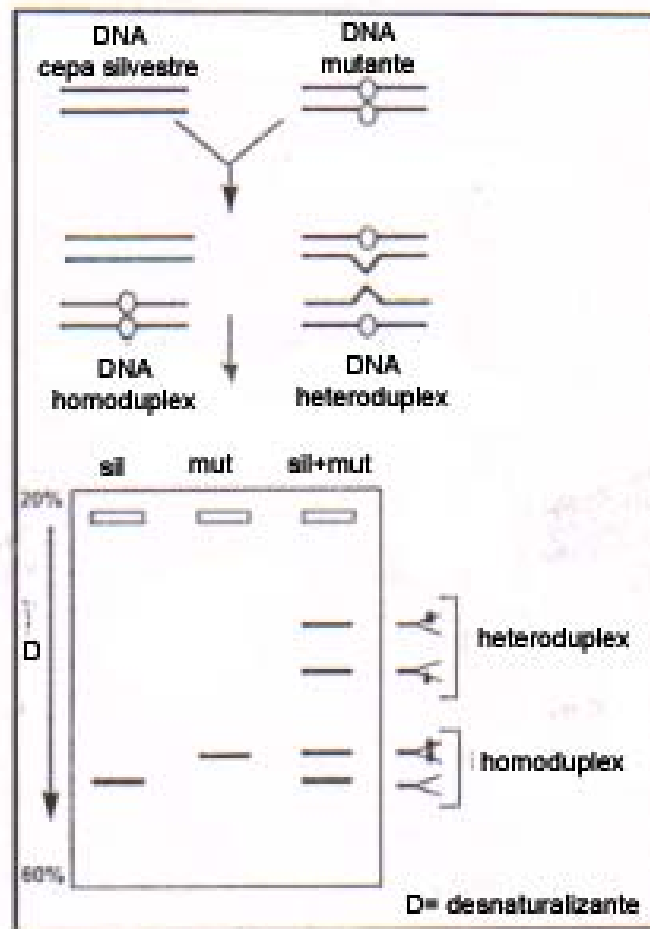


Figura 3.4. Gel paralelo de DGGE

Se muestra un ejemplo de un fragmento de DNA amplificado de una cepa silvestre y una mutante, y se muestra el realineado que genera cuatro fragmentos: dos heterodúplex y dos homodúplex que corren sobre un gel paralelo con gradiente desnaturalizante. El comportamiento de fusión de los heterodúplex es alterado, por lo tanto ellos se fusionan a menor concentración de desnaturalizante que los homodúplex.

Con el fin de evitar la disociación completa del fragmento de DNA de doble cadena, es necesario la introducción en uno de los extremos de los primers o cebadores una secuencia de 30 a 40 nucleótidos rica en guanina y citosina (conocida como grapa GC). Como alternativa al uso de grapas de GC, pueden introducirse al extremo 5' de uno de los primers o cebadores compuestos fotoactivables, como psoraleno, el cual se intercala entre las bases de las cadenas del DNA y se une covalentemente a ellas por irradiación por UV. Sin embargo existen muchas desventajas, una de ellas es que no se puede

reamplificar directamente porque hay un enlace covalente, y la irradiación con UV a los productos de PCR puede dañar el DNA amplificado causando múltiples bandas (Muyzer et al. 1998 y Ercolini, 2004).

El tiempo óptimo de electroforesis para obtener una separación adecuada de los fragmentos puede ser determinada experimentalmente, probando diferentes muestras en un gel paralelo a intervalos de tiempo constantes (Ercolini, 2004). Sin embargo se ha demostrado que entre más cortos sean los tiempos de electroforesis, es posible minimizar la inestabilidad del gradiente desnaturizante lo que resultará en una mayor y completa separación de bandas (Sigler et al. 2004).

B. Procedimiento general de la técnica DGGE

La técnica PCR-DGGE es comúnmente empleada en ecología microbiana porque es capaz de proveer una huella de la comunidad bacteriana en una muestra de un ambiente dado.

La extracción directa de DNA de los microorganismos presentes en la muestra permite la obtención de una mezcla que contiene DNA de especies bacterianas presentes en una muestra. Sucesivamente, la mezcla de DNA es usada como molde para la amplificación de PCR de una región particular variable de DNA de interés taxonómico. Todos los fragmentos tienen el mismo tamaño pero diferente secuencia, y pueden ser separadas por DGGE (Ercolini, 2004). El resultado final es una *huella que es específica de la muestra analizada y contiene una serie de bandas relacionadas con las especies microbianas presentes en la muestra*. La identificación de las especies puede obtener por purificación y secuenciación de bandas del perfil del DGGE. Así mismo de acuerdo a la intensidad de las bandas es posible obtener la proporción relativa de cada microorganismo (Muyzer et al. 1998 y Ercolini, 2004).

La figura 3.5 muestra un diagrama general que permite apreciar la forma en que es posible aplicar la técnica PCR-DGGE en muestras de alimentos. En realidad la extracción de DNA es lo que podría variar más existiendo diferentes métodos de extracción dependiendo la muestra; es decir, alimentos, agua, suelo, sedimentos etc.

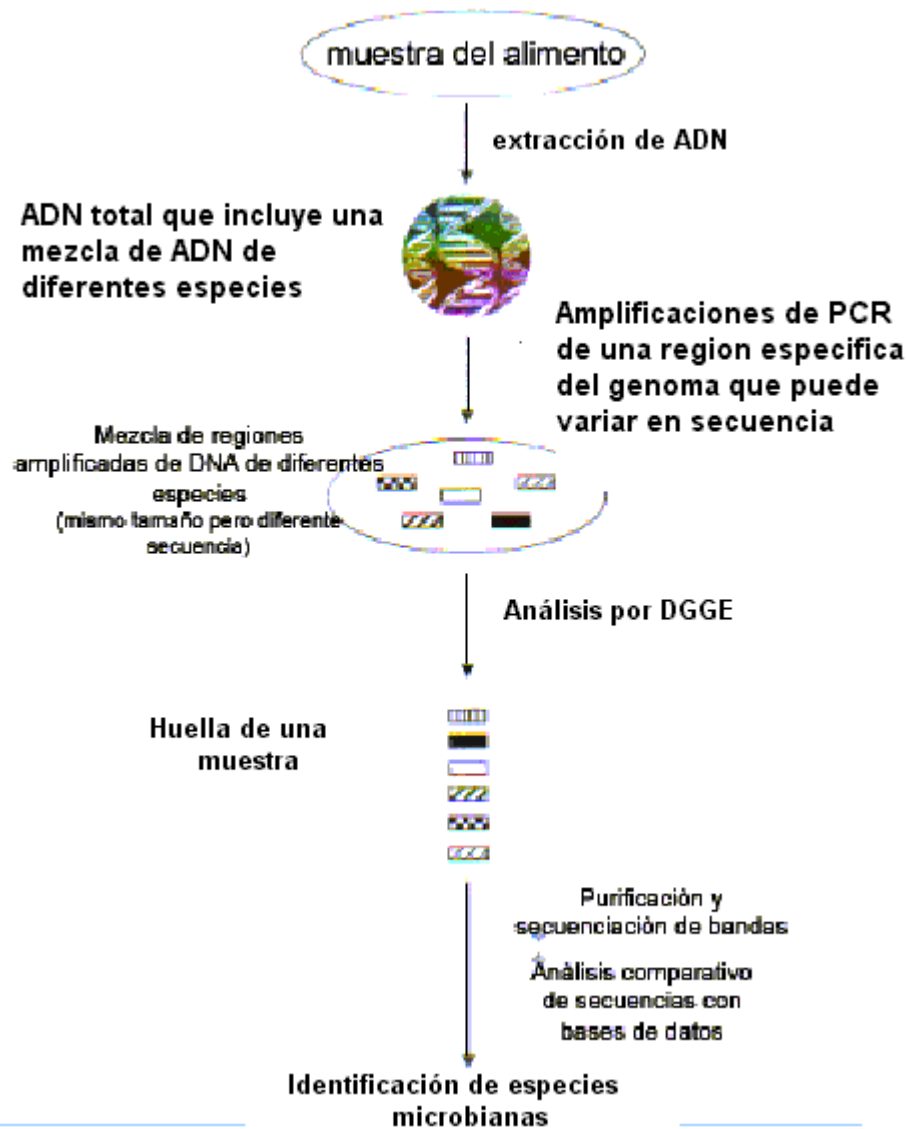


Figura 3.5. Diagrama que muestra el desarrollo para la aplicación de la técnica DGGE en matrices alimentarias.

3.5 HETEROGENICIDAD INTRAGENÓMICA EN LA SECUENCIA DEL GEN RNA RIBOSOMAL 16S EN GENOMAS BACTERIANOS

La comparación de las secuencias del gen de 16S rRNA permite inferir relaciones filogenéticas de bacterias y ha sido utilizada durante varias décadas. La secuencia de este gen ha sido en general aceptada como un cronómetro molecular por su funcionalidad constante, mostrando una estructura conservada y varias regiones variables, además de estar presente en todas las células y tener una secuencia relativamente corta.

Sin embargo, en ocasiones la resolución de la secuencia 16S rRNA es muy por ser un gen muy conservado lo que dificulta diferenciar entre especies que se encuentren relacionadas de manera muy cercana. Esto fue mostrado pues es posible que exista una considerable variación intraespecífica en la secuencia 16S rRNA. Parte de esta diversidad intraespecífica es causada por el hecho de que los genes de rRNA se encuentran organizados como parte de una familia multigénica, con número de copia para este gen que oscilan en un rango de 1 a 15.

El número de copias del operón rRNA refleja la estrategia ecológica del organismo como una muestra de la correlación entre la velocidad de respuesta del organismo a cambios en las condiciones y el número de copias del operón rRNA. En general los miembros de una familia multigene tiende a coevolucionar, pero el último grado del polimorfismo de la secuencia con la familia dependerá de la frecuencia de los mecanismos de interacción molecular, tales como la conversión génica (Coenye et al. 2003).

En la tabla 3.2 se muestran algunos ejemplos que permiten apreciar el número de copias del gen rRNA para distintos microorganismos.

Tabla 3.2. Número de copias de rRNA encontradas en diversas especies microbianas (Coenye et al. 2003)

Designación de especie y cepa	No. Acceso Gen Bank.	Número de copias de rRNA	Diferencia máxima (nucleótidos)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C68	AE007869	4	0
<i>Neisseria Meningitidis</i> MC 58	AE002098	4	0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 Sakai	BA000007	7	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	AE004091	4	1
<i>Salmonella enterica</i> CT18	AL513382	7	2
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD2210633	NC004603	11	5
<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168	AK111168	3	0
<i>Bacillus subtilis</i>	AL008126	10	12
<i>Clostridium perfringens</i> 13	BA000016	10	19
<i>Lactobacillus lactis</i> ILI403	AE005176	6	1
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	AL935263	5	2
<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705	AE014295	4	0
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA- 4680	BA000030	6	0

En todos estos casos no se encontró diferencia significativa en la diversidad intragenómica entre diferentes grupos filogenéticos y se encontró que la mayor heterogeneidad ocurre en las regiones variables V1 y V2 y en menor medida en V3 y V4 (Coenye et al. 2003).

Los métodos basados en la obtención de un patrón de bandas que proviene de una secuencia, permiten la identificación de especies presentes en una muestra. Dicho patrón de bandas del gel de DGGE o TGGE es usado para el análisis de comunidades.

Debido a la heterogeneidad del gen 16S rRNA, anteriormente mencionada, se aprecian varias bandas por especie, debido a la alta resolución del análisis de PCR-DGGE, que son el resultado de la presencia de múltiples copias de los genes ribosomales y del hecho de que las copias de los genes tienen diferenciación evolutiva. Por lo tanto, el fragmento amplificado del 16S rRNA aparecerá como varias bandas en un gel de DGGE o TGGE, y no como una banda única que es representativa de una especie particular. Por lo que el uso de 16S rRNA como herramienta de análisis para comunidades microbianas, aún cuando ha sido ampliamente utilizado está significativamente limitado por la heterogeneidad inherente del gen (Dahllöf, 2000).

3.6 APLICACIÓN DEL GEN *rpoB* COMO ALTERNATIVA AL PROBLEMA DE HETEROGENEIDAD INHERENTE DEL GEN 16S rRNA

Una solución a este problema sería el aprovechamiento de las ventajas que ofrecen los métodos como PCR-DGGE, pero utilizando un gene del cual exista una sola copia. El gene que podría contener los mismos atributos del 16S rRNA: que sea común en todas las bacterias, que tenga secuencias conservadas así como regiones variables, y que funcione como un reloj evolutivo, sería el gen de la subunidad beta de la RNA polimerasa, *rpoB*, que se ha sugerido que puede ser utilizado para la identificación de especies en alternativa al 16S rRNA (Dahlöf, 2000).

Un producto de PCR de este gen resultará en una sola banda en un gel DGGE, haciendo posible distinguir entre diferentes especies usando DGGE o TGGE sin tener la secuencia individual de bandas.

Las RNA polimerasas mejor caracterizadas son las de las eubacterias, de las que *E. coli* es un caso típico. En una eubacteria, una solo tipo de RNA polimerasa parece ser la responsable de casi toda la síntesis de RNA mensajero, y toda la síntesis de RNA ribosomal y de transferencia. En una célula de *E. coli* hay un número aproximado de 7000 moléculas de RNA polimerasa. Algunas de ellas están participando activamente en la transcripción; dependiendo de las condiciones de crecimiento. Las subunidades β y β' componen el centro catalítico; sus secuencias están relacionadas con las de las subunidades mayores de RNA polimerasas eucarióticas, lo que sugiere que estas secuencias definen características comunes a todas la RNA polimerasas. Estas son codificadas por los genes *rpoB* y *rpoC* respectivamente.

La función de la subunidad β es formar enlaces covalentes con el DNA molde, con el RNA producido y con los sustratos ribonucleótidos; las mutaciones en *rpoB* afectan a todas las etapas de la transcripción. En la figura 3.6 se muestran las subunidades de la RNA

polimerasa donde puede apreciarse la subunidad β como producto del gen *rpoB* (Lewin, 2001).

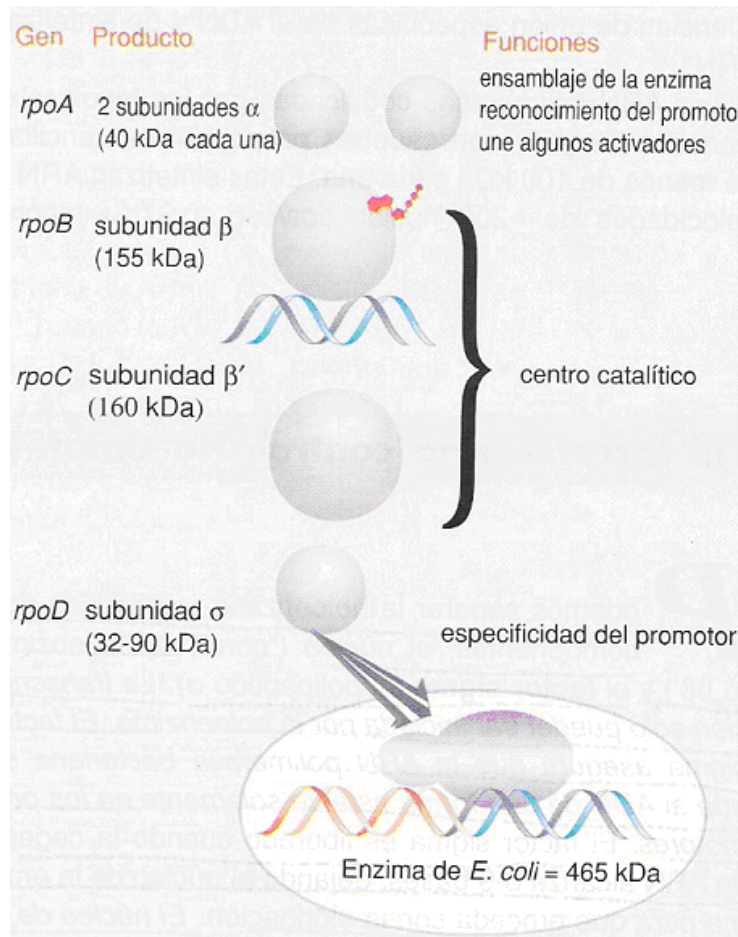


Figura 3.6. Subunidades de la RNA polimerasas en eubacterias (Lewin, 2001).

El uso del gen *rpoB* como una herramienta taxonómica ha sido ampliamente estudiada. Dentro de los estudios más interesantes se encuentran la generación de una base de datos de *rpoB* para 14 especies de *Enterobacteriaceae*. En esto se encontró que los niveles de divergencia entre secuencias del gen *rpoB* de diferentes cepas fueron marcadamente mayores que entre las secuencias de los genes 16S rRNA, lo que resulta en un alto poder discriminatorio. Los árboles filogenéticos obtenidos con *rpoB* fueron más compatibles con la clasificación de *Enterobacteriaceae* tradicional, que los obtenidos con 16S rRNA. Esto indica entonces que es una herramienta poderosa de identificación, la cual puede ser utilizada como un método universal de identificación bacteriana (Mollet et al. 1997).

Así mismo se han hecho estudios filogenéticos en especies de *Mycoplasma*, la cual es difícil de cultivar debido a que tiene requerimientos nutricionales poco usuales. En este estudio se utilizaron fragmentos de *rpoB* mostrando alto grado de variación en términos de tamaño y secuencia en las distintas especies, lo que permitió dividir a los micoplasmas en dos grupos; *pneumoniae* y *hominis*, lo cual fue consistente con trabajos realizados anteriormente con el análisis de la secuencia 16S rDNA, en donde también se habían encontrado altas variaciones intraespecíficas (Kim et al. 2003). Estudios filogenéticos similares se han hecho para *Coxiella burnetii* (Mollet et al. 1998), *Bartonella henselae* y *Bartonella quintana* (Ernesto et al. 2000), todos ellos involucrados en procesos infecciosos en humanos.

Para el caso de alimentos, el gen *rpoB* también ha comenzado a ser utilizado, Giacomazzi y colaboradores (2004). han trabajado con salmón ahumado, con el fin de conocer la microbiota presente en este producto, ya que posee una biodiversidad bastante compleja y la microbiota cambia durante el almacenamiento, hasta llegar a un proceso no deseado de putrefacción del producto, en dicho estudio se utilizó PCR-TTGE (electroforesis con geles de temperatura temporal) llegando a la conclusión de que la técnica es una herramienta promisoría para la caracterización de la comunidad bacteriana presente en esta matriz alimentaria.

Estudios similares utilizando PCR-DGGE, con el gen *rpoB* han sido reportados por Rantsiou y colaboradores (2004). para el seguimiento de la dinámica de población bacteriana durante la fermentación de alimentos, en este caso quesos madurados. Se obtuvieron también resultados exitosos en comparación con lo que habían reportado utilizando la secuencia del gen 16S rDNA.

Otra aplicación a este gen, ha sido para la identificación de microorganismos en muestras clínicas, tales como *Legionella pneumophila*, utilizando PCR-RFLP (de sus siglas en inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) permitiendo mayor confiabilidad y rapidez en su detección (Ko et al. 2003).

Para la utilización de la secuencia del gen *rpoB* se han empleado primers o cebadores obtenidos de las secuencias de *rpoB* de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus*

aureus y *Helicobacter pylorii* siendo los de *E. coli* los más utilizados para PCR-DGGE y PCR-TTGE (Dahllöf et al. 2000).

Para el caso de PCR-DGGE se usan los siguientes primers

- a. *rpoB*1698f, correspondiente a la posición 1643 en *E. coli*

5'-AACATCGGTTTGATCAAC-3'

- b. *rpoB*2041r, correspondiente a la posición 2041 en *E. coli*

5'-CGTTGCATGTTGGTACCCAT-3'

En el estudio de comunidades microbiológicas, la heterogeneidad del gen 16S rRNA no es el único problema con el que se debe enfrentar, existen también, la formación de heteroduplex, de quimeras y otros sesgos durante la aplicación de PCR.

El problema de la heterogeneidad puede ser resuelto como aquí se menciona, utilizando un gen que posea una sola copia, pero sigue existiendo la posibilidad de que haya formación de heteroduplex utilizando cualquier gen. La posibilidad de que haya un incremento en la formación de heteroduplex se da cuando incrementa la similitud entre secuencias; esto implica que la formación de heteroduplex intra especies debido a que en genes heterogéneos es más común que la formación de heteroduplex inter especies. Se han sugerido recomendaciones de cómo minimizar la formación de heteroduplex, una de ellas es incrementar la concentración de primers o cebadores y disminuir el número de ciclos de PCR. De este modo los análisis utilizando PCR-DGGE o PCR-TGGE podrían ser optimizados, sin embargo esta no es una solución total (Dahllöf, 2000).

Se ha sugerido que el uso de otros genes podrían ser la base del análisis de comunidades microbianas (Dahllöf et al. 2000).

Si bien el *rpoB* es una herramienta que actualmente está siendo utilizada con éxito, no es el único gen que se ha utilizado.

Otros genes que se han utilizado con éxito en estudios evolutivos son pseudogenes y genes centrales en el metabolismo. Recientemente se han determinado relaciones filogenéticas entre bacterias basándose en las secuencias de genes como *recA*, *atpD*,

gyrB, *gltA*, *glnA* (Kumada et. al. 1993, Torriani et. al. 2001, Christensen et. al., 1998, Inokuma et. al. 2001, Dauga, 2002). Los resultados obtenidos con la aplicación de estos genes han corroborado en muchos casos los resultados obtenidos con el 16S pero han revelado diferencias importantes.

Sin duda los genes mencionados anteriormente, también pueden ser una herramienta potencial para disminuir la dificultad en la separación adecuada de bandas por el método PCR-DGGE.

3.7 APLICACIONES DE LA TÉCNICA PCR-DGGE

Debido a la versatilidad de la técnica, ésta ha sido utilizada exitosamente en muchos campos de la ecología microbiana. Algunos ejemplo son (Ercolini, 2004):

- a. Estudios de comunidades microbianas en muestras de diversos ambientes sin necesidad de cultivo.
- b. Para la determinación de la dinámica de una comunidad microbiana en respuesta a variaciones ambientales
- c. Estudio de la estructura y evolución de comunidades microbiana de suelos, tracto gastrointestinal de organismos superiores e insectos, aguas de río, biorreactores para tratamiento de aguas y muestras clínicas.
- d. Actualmente se ha introducido a la microbiología de alimentos en el seguimiento de la fermentación de alimentos y el monitoreo de los cambios en las comunidades microbianas durante la fermentación (en bebidas, salsas y quesos principalmente).

A. Aplicaciones de PCR-DGGE en alimentos

La primera aplicación de PCR-DGGE en microbiología de alimentos, fue reportada por Ampe en 1999, que publicó un trabajo relacionado con la distribución de microorganismos en el pozol. Se identificaron bacterias ácido lácticas secuenciando fragmentos de DNA a partir de perfiles de DGGE obtenidos después de la extracción directa de DNA de muestras de pozol y la amplificación de la región variable V3 del gen 16S rDNA. Combinando los resultados del análisis de perfiles de DGGE, hibridación con 16S rRNA y la detección de productos de fermentación, se obtuvo información de los

posibles papeles biológicos de los tipos de microorganismo presentes en el pozol y el desarrollo de la fermentación. Fueron realizados estudios similares por Ercolini y colaboradores (2001a).

En un reporte reciente, en la fermentación de masa de cassava, Ampe y col. reportaron 10 especies bacterianas comparando técnicas de dependientes de cultivo e independientes de cultivo, este trabajo mostró la presencia de *Lactobacillus manihotivorans*, *Lb. fermentum*, y *Lb. crispatus*, identificados por la secuenciación de bandas de DGGE, que no habían podido ser recuperadas por técnicas de cultivo (Miambi et al. 2003).

La técnica también ha sido empleada para el seguimiento de la fermentación y los cambios microbiológicos en productos lácteos tales como queso Mozzarella y queso Siciliano elaborado artesanalmente, elaboración de salsas italianas, curado de vainilla, fermentación de la malta para elaboración de Whisky etc. (Ercolini, 2001b, Randazzo, et. al. 2002, Cocolin, 2001, Röling et. al. 2001).

Una aplicación importante de la técnica fue la detección de *Listeria* en alimentos, con genes diferentes del 16S rDNA. Cocolin y colaboradores (2000) lograron identificar cinco especies de *Listeria* amplificando el gen *iap* (invasión-associated protein), seguido de separación por DGGE. En este estudio se pudieron distinguir algunos serotipos de *Listeria monocytogenes*, considerándose a PCR-DGGE como un método rápido para la detección de especies de *Listeria* en alimentos.

PCR-DGGE ha permitido la identificación de microorganismos presentes en un cultivo, es decir puede utilizarse como un alternativa de aislamiento y para la caracterización de la diversidad microbiana. En este punto, PCR-DGGE permite rápidamente checar la diversidad de una comunidad bacteriana después de que esta ha sido cultivada en un medio de cultivo sólido o líquido el cual puede o no ser específico. Después de que se ha hecho el conteo de colonias en las placas, estas pueden ser colectadas y sujetas a extracción de DNA, seguido de un análisis PCR-DGGE. Consecuentemente cada huella DGGE puede ser obtenida para cada placa, cada dilución y cada medio de cultivo. Esto sin duda da una alternativa a las herramientas tradicionales para la identificación de especies dominantes (Ercolini et al. 2001b).

La aplicación de la técnica para comunidades eucarióticas también es una aplicación reciente y es importante debido al papel que juegan diversas levaduras en gran cantidad de alimentos fermentados. Ampe y colaboradores (1999) y ben Omar et al (2000), encontraron levaduras y hongos en muestras de pozol y yuca respectivamente, durante la fermentación. Ellos llevaron a cabo el análisis utilizando PCR-DGGE amplificando el gen 18S rDNA, encontrando en ambos casos bandas que correspondían a DNA no bacteriano. Otros estudios que han obtenido resultados exitosos para este tipo de comunidades, han sido aplicados en la fermentación de vinos (Cocolin et al. 2000) y para la identificación de levaduras en leche bronca (Ercolini, 2004).

Finalmente podría mencionarse una aplicación, que de explotarse adecuadamente podría aplicarse no sólo en el campo experimental sino en el campo industrial; se han reportado diversos estudios que permiten llevar a cabo con PCR-DGGE estudios de control de calidad en alimentos. Si se aplica la técnica a un molde de DNA extraído directamente de una matriz alimentaria, generará un perfil específico de cierto producto en cierto momento, dando las condiciones iniciales en que se utilizará esa matriz. La huella obtenida da una "imagen" de la microbiota del producto y esta puede ser tomada como una característica específica de ese alimento así como otras propiedades bioquímicas, estructurales o sensoriales. Podría entonces emplearse como una herramienta para el monitoreo del control de calidad (Ercolini, 2004).

CAPITULO 4. HIPOTESIS

El gen *rpoB* que codifica para la subunidad beta de la RNA polimerasa al poseer las características deseadas para se empleado como herramienta para estudios filogenéticos y no poseer heterogeneidad intragénica, permitirá la obtención de una sola banda característica de cada microorganismo en un gel de electroforesis de gradiente desnaturizante cuando se aplique a muestras de pozol, lo que permitirá el estudio de la diversidad microbiana en este alimento fermentado.

CAPITULO 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Figura 5.1. Montaje de la técnica de PCR-DGGE con bacterias lácticas aisladas de pozol.

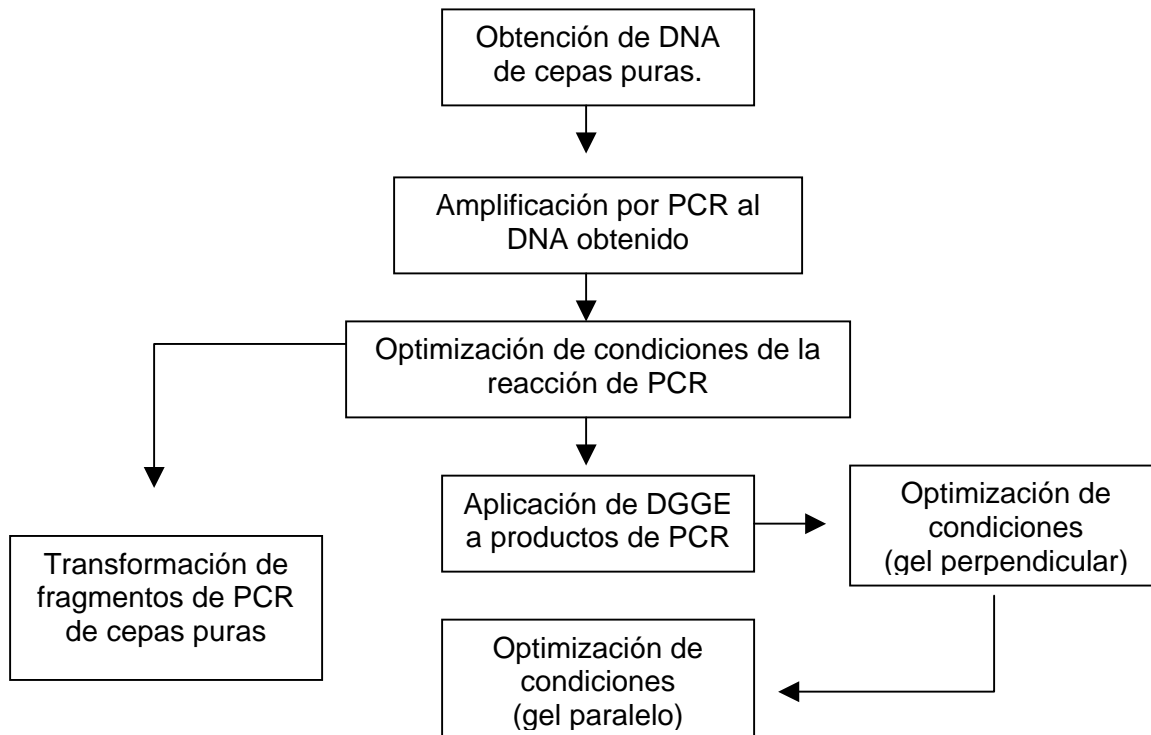
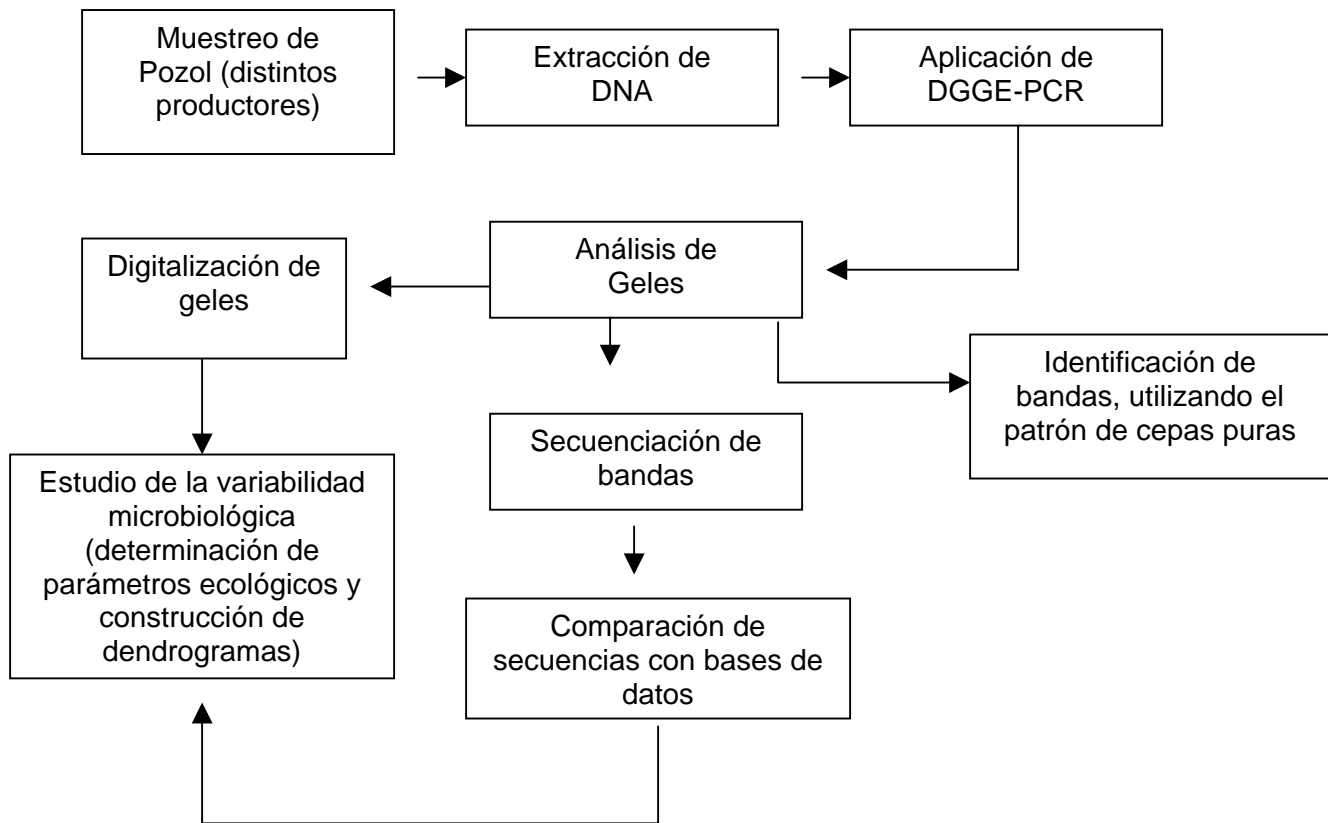


Figura 5.2. Aplicación de la técnica de PCR-DGGE a muestras de pozol.

CAPITULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MUESTREO DE POZOL

Se estudiaron 7 productores de pozol, cuya variabilidad microbiológica se determinó en un estudio previo por DGGE utilizando la región V3 del gen 16S (Bolaños 2004). La finalidad de estudiar los mismos productores fue mejorar metodología de DGGE utilizando dos genes distintos. Inicialmente se hizo con el gen 16S que mostró varias bandas correspondientes a un mismo microorganismo, en este trabajo se utilizó el gen *rpoB* con el que se obtuvo una sola banda por microorganismo.

El muestreo se realizó de la siguiente manera:

Productores 1, 2, 3, 5, 6

El pozol se recolectó en el mercado principal de la ciudad de Villahermosa. A excepción del productor 1, todos se encontraban en el mismo pasillo del mercado y la fuente de nixtamal fue la misma para todos ya que éste es producido centralmente en el mismo mercado.

Productor 4

El pozol se recolectó en el mercado principal de la ciudad de Villahermosa y tiene una producción individual del nixtamal.

Productor 7

El pozol se recolectó en la pozolería “La fuente” ubicado al noreste de la ciudad, con la producción individual del nixtamal.

De cada productor se tomaron muestras de masa recién molida (salida del molino), las cuales se colocaron inmediatamente en hielo y se tomaron muestras de aproximadamente 250 g con las que se hicieron 4 bolas, que fueron envueltas en hojas de plátano y se incubaron a 30°C.

De las cuatro bolas para los 7 productores una fue inmediatamente colocada en hielo y las restantes 3 bolas de cada productor se introdujeron en hielo después de 24, 48 y 72 horas respectivamente. Todas las bolas fueron posteriormente introducidas a un congelador a -20°C hasta su análisis.

En todos los casos los tiempos de incubación mencionados en el párrafo anterior fueron considerados después de que las masas fueron amasadas y colocadas en el punto de venta.

6.2 EXTRACCIÓN DE DNA DE CEPAS PURAS

Debido a que la técnica de DGGE implica la identificación de microorganismos a partir de las bandas obtenidas en un gel, es necesaria la elaboración de un patrón de cepas puras, las cuales han sido obtenidas previamente a partir del pozol. Por lo cual estas cepas fueron sometidas a un proceso de extracción del material genético, para después, poder amplificar la región del gen *rpoB* y a través de DGGE obtener un patrón de cepas puras. Se seleccionaron 20 cepas representativas que habían sido previamente identificadas utilizando el sistema API 50CH y caracterizadas por la técnica de RAPD. (ver anexo A.1)

El procedimiento fue el siguiente:

a. Activación de cepas puras

Del cepario, se obtuvo una perla de vidrio de un microorganismo deseado, ésta se introdujo en aproximadamente 4 mL de medio MRS estéril y se incubó por 24 horas. Al término de este tiempo, se tomó una asada del medio y se sembró en agar MRS, la caja se incubó por 24 horas. Ambas incubaciones se realizaron a 21°C . (Ver anexo A.2)

b. Extracción de DNA

Se colocaron aproximadamente 500 μL de amortiguador TES (Tris-EDTA-cloruro de sodio) en microtubos estériles, donde se resuspendió con un asa estéril aproximadamente una asada del tamaño de un grano de arroz del crecimiento obtenido en el agar MRS.

A esta mezcla se agregaron 20 μL de lisozima (10mg/ μL) y se incubaron a 37°C (Felisa termo baño) en un baño de agua por 15 minutos o bien un máximo de 60 minutos, hasta observar precipitación. Posteriormente se agregaron 8 μL de pronasa (20 mg/ μL) y 8 μL de RNAasa (10 mg/ μL), la mezcla se agitó vigorosamente y se incubó a 65°C durante 1 hora en un baño de agua. Al término de este tiempo se agregaron 120 μL de SDS (10% p/v), se agitó vigorosamente y se incubó a 65°C por diez minutos en un baño de agua. Al término, la mezcla de reacción se dejó enfriar y se adicionaron 600 μL de fenol-cloroformo (Sigma cat P4557), se agitó vigorosamente (extracción) hasta formar una emulsión blanca, después se centrifugó por 10 minutos a 5000 r.p.m y se observó la formación de tres capas, se extrajo la primera capa y se colocó en un eppendorf estéril, las dos capas de abajo se desecharon. A esta primera capa se le adicionó 1 mL de etanol (96%) frío (J.T Baker 9401-03), se agitó suavemente y se centrifugó (centrífuga HERMLE Z160M) a 14000 r.p.m, por 10 minutos, al término de éste tiempo y con mucho cuidado se retiró el etanol y se invirtió el eppendorf sosteniéndolo en una superficie y se dejó secar toda la noche, posteriormente se adicionaron 50 μL de agua destilada estéril, se dejó hidratar por 2 minutos y se agitó. (Ver anexo B)

Los productos de la extracción se analizaron por espectrofotometría a 260 nm con el fin de determinar su concentración y a través de un gel de agarosa al 1.8% (Ver anexo C) Este procedimiento se realizó para todas las cepas puras.

6.3 EXTRACCIÓN DE DNA DE POZOL

Se extrajo DNA de las muestras de pozol tanto de la superficie como del centro de la bola del pozol.

Para la extracción de DNA de la superficie se tomaron 5 g de la bola de pozol con una espátula estéril y para la extracción del centro, la bola se partió a la mitad y con una espátula estéril se tomaron 5 g de muestra de la parte central de la bola.

De acuerdo con la metodología reportada por Nübel y Ampe (1999), se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Las muestras se homogeneizaron en un Stomacher (400 SEWARD) por 5 minutos, A continuación se colocaron 1.5 mL la suspensión en dos microtubos y se centrifugaron (centrífuga HERMLE Z160M) a 14,000 r.p.m durante 10 min con el fin de eliminar partículas grandes. La capa superior obtenida se transfirió a un microtubo y se le adicionaron 20 μ L de lisozima (20 μ g/mL) y 10 μ L de mutanolisina (1UI/ μ L). La mezcla se agitó por 1 minuto y se incubó a 37°C por 1 hora o hasta visualizar viscosidad. El siguiente paso fue la adición de 10 μ L de pronasa (10 μ g/mL) y 20 μ L de RNAasa (10 μ g/mL), la mezcla se agitó vigorosamente y se incubó a 65°C por una hora. Posteriormente se agregaron 120 μ L de SDS (10% p/v) al tubo y se incubaron a 65°C por 10 minutos. Al término de este tiempo se dejó enfriar la mezcla de reacción y se adicionaron 300 μ L de NaCl 5 M, después se agregaron 650 μ L de solución de fenol cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) (Sigma P2069) y se agitó la mezcla fuertemente durante aproximadamente 30 segundos y 10 segundo en un vórtex a alta velocidad. La mezcla se centrifugó 3 veces por 5 minutos a 14000 rpm, hasta notar que la interfase fuera nula.

Posteriormente el sobrenadante se recuperó de el tubo y se transfirió a otro microtubo limpio y se adicionaron 1000 μ L de fenol-cloroformo (24:25) y se agitó en un vórtex durante 30 segundos. Después se sometió a centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm y el sobrenadante se transfirió nuevamente a microtubos limpios. Posteriormente se agregaron 250 μ L de isopropanol (J.T. Baker cat 9084-02), se agitaron suavemente y se incubaron durante 15 minutos a 10°C en el refrigerador para favorecer la precipitación del DNA , al término de este tiempo, se centrifugó el tubo a 14000 r.p.m y posteriormente se retiró el sobrenadante con micropipeta y se lavaron los precipitados con 1 mL de etanol (70% v/v) y se centrifugó por 15 minutos a 14000 r.p.m, el sobrenadante se desechó y el tubo se invirtió sobre una superficie y se dejó secar toda la noche, para después resuspender en 50 μ L de agua desionizada y estéril. Finalmente se evaluó la calidad de la extracción mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.8% (p/V) y por espectrofotometría midiendo su absorbancia a 260 nm (Ver anexo C).

6.4 AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN *rpoB* DEL DNA DE CEPAS PURAS Y POZOL

Una secuencia de la región del gen *rpoB* fue amplificada mediante la reacción de PCR utilizando las condiciones mostradas en la tabla 6.1 reportadas por Rantsiou y col. (2004)

:

Tabla 6.1. Condiciones de la reacción de PCR para amplificar el gen *rpoB* en cepas puras y en pozol.

Periodo	Temperatura/tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización	94°C/5 min	1
Desnaturalización	94°C/30 seg	25
Alineamiento	50°C/1.5 min	
Extensión	72°C/1.5 min	
Extensión final	72°C/10 min	1
Enfriamiento	4°C	1

Tabla 6.2. Protocolo de PCR para la amplificación del gen *rpoB* en cepas puras y en pozol.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración en la mezcla de reacción.
Amortiguador 10 X (High fidelity buffer)*	5	1X
Sulfato de magnesio *	2.5	50 mM
DNTPs (10 mM)*	1	0.2 mM
Cebador <i>rpoB1698f</i> (1X)	1	25 pmol/ μL
Cebador <i>rpoB2014r</i> (1X)	1	25 pmol/ μL
Taq polimerasa (5U/ μL)*, **	1	1 U/ μL
DNA (aprox 50 ng/ μL)	5	10 ng/ μL
Agua desionizada estéril	c.b.p 50 μL	-

* Invitrogen , ** Platinum[®] Taq DNA polymerase high fidelity

Tabla 6.3. Secuencia de los cebadores empleados para la amplificación por PCR.

Cebador	Secuencia
<i>rpoB1698f*</i>	5'-AACATCGGTTTGATCAAC-3'
<i>rpoB2014r</i>	5'-CGTTGCATGTTGGTACCCAT-3'

*Se adicionó una grapa de guanina-citosina con la siguiente secuencia:

5'-CGCCCCCCCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCCGCCCC-3'

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (PERKIN ELMER 2400). Al término de la reacción, el tamaño de los productos de PCR se evaluó en un gel de agarosa 1.8% (p/v). Ver Anexo C

6.4.1 Optimización del método de amplificación

a. Cambios en las condiciones de alineamiento durante la reacción de PCR

Debido a que durante la aplicación de la técnica de PCR-DGGE tanto de cepas puras como de muestras de pozol se encontraron bandas múltiples para algunos microorganismos, se decidió experimentar diferentes condiciones de temperatura de alineamiento a fin de aumentar la astringencia de la reacción y evitar así la formación de más de una banda. Se probaron además del protocolo mostrado en el punto 3 los protocolos mostrados en la tabla 6.4.

Tabla 6.4. Condiciones de la reacción de PCR para amplificar el gen *rpoB* en cepas puras y en pozol.

Periodo	Protocolo 1*	Protocolo 2*
Desnaturalización	94°C/5 min	94°C/5 min
Desnaturalización	94°C/30 seg	94°C/30 seg
Alineamiento	55°C/1.5 min	60°C/1.5 min
Extensión	72°C/1.5 min	72°C/1.5 min
Extensión final	72°C/10 min	72°C/10 min
Enfriamiento	4°C	4°C

* En ambos casos el número de ciclos así como las condiciones de concentración de reactivos se mantuvieron igual que las mostradas en las tablas 1 y 2 respectivamente.

b. Detección de amplificación preferencial durante la reacción de PCR

Bajo la sospecha que hubiera amplificación preferencial entre los géneros *Streptococcus* y *Weisella* se decidió llevar a cabo el siguiente experimento:

En una reacción de PCR siguiendo el protocolo mostrado en la tabla 6.1 y el protocolo 2 de la tabla 6.4 y manteniendo las mismas concentraciones mostradas en la tabla 6.1. Para ello se extrajo DNA de tres cepas puras: *Streptococcus infantarius*, *Weisella confusa*, *Lb. plantarum* aisladas en trabajos anteriores del pozol, posteriormente se ajustó la cantidad de DNA de tal modo que el DNA de las tres cepas tuviera la misma concentración; 50 ng/ μ L. La tabla 6.5 muestra las distintas combinaciones, las concentraciones de amortiguador, sulfato de magnesio, enzima, dNTPs y primers se mantuvieron constantes como se muestra en la tabla 6.2.

Tabla 6.5. Combinaciones de DNA de distintas cepas puras en una reacción de PCR para determinar la presencia de amplificación preferencial.

Microorganismo	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4	Reacción 5	Reacción 6	Reacción 7
<i>S. infantarius</i>	X		X	X	X		
<i>Lb. plantarum</i>	X	X		X		X	
<i>W. confusa</i>	X	X	X				X

X= se refiere a que la cantidad indicada de DNA del microorganismo estuvo presente en la reacción.

La concentración de DNA en todos los casos fue de 50 ng/ μ L y se emplearon 5 μ L de templado de cada microorganismo de acuerdo a la combinación mostrada.

Para analizar la presencia de amplificación preferencial con el protocolo 2 de la tabla 6.4 se realizaron las siguientes combinaciones que se muestran en la tabla 6.6.

Tabla 6.6. Combinaciones de DNA de distintas cepas puras en una reacción de PCR para determinar la existencia de amplificación preferencial.

Microorganismo	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4
<i>S. infantarius</i>	X	X		
<i>Lb. plantarum</i>	X		X	
<i>W. confusa</i>	X			X

X= se refiere a que la cantidad indicada de DNA del microorganismo estuvo presente en la reacción.

La concentración de DNA en todos los casos fue de 50 ng/ μ L y se emplearon 5 μ L de templado de cada microorganismo de acuerdo a la combinación mostrada.

Concluida la reacción de amplificación se tomaron 25 μ L de cada reacción y se aplicó la técnica de DGGE (ver punto 5 de esta sección), el gel una vez revelado se fotografió en el equipo Fluor-S (Biorad) a través del Programa Quantity One Versión 4 para Windows en el cual fue posible además, medir la intensidad de cada una de las bandas obtenidas. Con el fin de analizar los resultados, la intensidad de cada banda, medida como la altura de pico de cada una de las bandas se sometieron a un análisis de varianza y/o prueba t de Student (Montgomery, 1991) a fin de conocer si existía diferencia significativa con un 95% de confianza entre cada una de las bandas respecto a las bandas obtenidas en las reacciones 5, 6 y 7, para el caso de la tabla 6.5 y entre 2,3 y 4, para el caso de la tabla 6.6. En el caso del experimento 1 mostrado tanto en la tabla 6.5 como en la 6.6, fue necesario evaluar si existía diferencia significativa entre la intensidad de banda representadas por los productos de amplificación de los tres microorganismos, en caso de existir diferencia significativa, se aplicó la prueba de intervalos múltiples de Duncan para determinar entre qué bandas existía diferencia. (Montgomery, 1991). Todas las reacciones mostradas en la tabla 6.5 y 6.6 se llevaron a cabo por triplicado.

6.5 ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE PERPENDICULAR AL CAMPO ELÉCTRICO

En la sección de antecedentes se había mencionado, que el DGGE tenía dos modalidades una de ellas era utilizar un gradiente perpendicular al campo eléctrico, con el fin de obtener el mejor gradiente para llevar a cabo la separación de los fragmentos amplificados por PCR, en este caso se trabajaron dos concentraciones extremas a fin de que al terminar la electroforesis y revelar el gel se apreciara una curva sigmoide que corresponde al gradiente de desnaturalización en el cual se lleva a cabo de manera óptima la desnaturalización del producto amplificado (Ver figura 3.1 en antecedentes).

Para esta determinación se preparó un gel de poliacrilamida al 8% para PCR de productos de pozol y un gel de poliacrilamida para PCR de cepas puras utilizando un gradiente de desnaturalización de 20% (p/v) a 70% (p/v) de urea (7M) y formamida (40% p/v) y los geles se sometieron a electroforesis según el procedimiento descrito por Muyzner y col (1993) utilizando el equipo Bio-Rad DcodeTM (Cat. 170-9080) utilizando una temperatura de 60°C durante 120 minutos y una corriente de 100 V. Ambos geles fueron posteriormente revelados con bromuro de etidio (50µg/mL) por un periodo de 30 minutos, posteriormente los geles se lavaron con amortiguador TAE 1X durante 20 minutos y fueron observados con el equipo Fluor-S (BIO-RAD) (Ver Anexo D)

6.6 ELECTROFORESIS EN GELES DE GRADIENTE DESNATURALIZANTE PARALELO AL CAMPO ELÉCTRICO

Con el fin de lograr la elaboración de un patrón de bandas así como la separación de los productos de PCR en las muestras de pozol, se llevó a cabo una electroforesis paralela al campo eléctrico de los geles con el gradiente desnaturalizante óptimo para la adecuada separación (Ver figura 2 antecedentes). Para esto se cargaron 25 µL de los

productos de PCR (20 ng/ μ L) en los geles, utilizando un gradiente de desnaturalización de 30 a 60 % (p/v) de gradiente desnaturalizante con urea y formamida. (Ver anexo D). La electroforesis se llevó a cabo durante 17 horas a 60°C y con una corriente de 85 V. Posteriormente los geles fueron teñidos con plata (Ver anexo E) y se observaron con el equipo Fluor-S (BIO-RAD), este mismo sistema fue utilizado para la digitalización de los geles una vez obtenida la foto, los geles se analizaron en el programa Diversity Database, Versión 2.2 para Windows en donde fue posible digitalizarlos. Los geles se llevaron a cabo por duplicado, en caso de obtener reproducibilidad, se repitió la reacción de amplificación y se realizó nuevamente el gel.

6.7 CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR se clonaron con el fin de comprobar que no existe microheterogeneidad en el gen *rpoB*, así como comprobar la amplificación de este fragmento para su posterior identificación. Se decidió clonar el producto de PCR de una cepa pura de *Lb. plantarum* en *E. coli*. Para ello se utilizó el kit de clonación TOPO TA Cloning[®] de Invitrogen siguiendo el protocolo del proveedor y se utilizaron células competentes de *E. coli* (Transforming One Shot[®] Mach1^(TM)-T1).

Se mezclaron 2 μ L del producto de PCR (fue necesario agregar un volumen de polimerasa 10 veces mayor para permitir la formación de extremos cohesivos, debido a que la Taq polimerasa de alta fidelidad empleada contiene proof reading), 1 μ L de solución salina, 2 μ L de agua desionizada estéril y 1 μ L del vector PCR II - TOPO[®], se mezcló y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, permitiéndose así el ligado del vector con el producto de PCR. Así mismo se realizó un control sin producto de PCR y un control con el vector pUC para comprobar el éxito de la transformación.

A 50 μ L de células competentes de *E. coli* que se descongelaron en hielo se les agregó 2 μ L de la mezcla de reacción anterior (en el caso del pUC18 se agregaron directamente 1 μ L del vector) y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Al término de este tiempo se les dio un choque térmico por 45 segundos a 42°C en un baño de agua, terminado este procedimiento se transfirieron los tubos al hielo y se les agregaron 250 μ L de medio

S.O.C, se taparon los tubos y se agitaron suavemente. Posteriormente se incubaron las células a 37°C durante 1 hora con agitación a 200 rpm.

Se prepararon cajas con medio LB que contenían 50 µg/mL de kanamicina y otras cajas con 50 µg/mL de ampicilina (en el caso de pUC se prepararon cajas con 100 µg/mL de ampicilina) y se agregó extendiendo por la caja 40 µL X-gal (40 mg/mL) y se precalentaron a 37°C por media hora.

Se sembraron en las cajas petri alícuotas de 15 y 45µL de células transformadas y se incubaron por 12 horas a 37°C. Se seleccionaron las colonias blancas en el caso de las células transformadas con el producto de PCR y en el caso de pUC y el control sin producto de PCR se comprobó que las colonias fueran azules.

Las colonias blancas fueron sembradas en caldo LB y se incubaron por 12 horas a 37°C, al término de este tiempo se llevó a cabo la extracción del plásmido utilizando un Kit de Qiagen y se envió a secuenciar (Instituto de Fisiología Celular. UNAM). Las colonias blancas sembradas en caldo LB además se almacenaron a -70°C con glicerol para su posterior utilización (ver anexo F).

6.8 EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS DE LAS CÉLULAS TRANSFORMADAS

De los cultivos obtenidos de las colonias blancas seleccionadas y sembradas en caldo LB con antibiótico se prosiguió a la extracción del plásmido con el kit QIAGEN Plasmid Mini Kit siguiendo protocolo indicado por el fabricante (ver anexo G).

La identificación del microorganismo correspondiente a la secuencia clonada se realizó a través de la secuenciación del plásmido (Instituto de fisiología celular, UNAM) y posteriormente a través una base de datos utilizada para comparar las secuencias de los productos de PCR, National Center for biotechnology information (<http://ncbi.nih.gov>), utilizando los servicios de BLAST para buscar los microorganismos relacionados.

6.9 CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DEL POZOL Y ANÁLISIS DE COMUNIDADES

A. Obtención del patrón de bandas para la identificación de microorganismos

Se elaboró un patrón de bandas en un gel DGGE con productos de PCR de una región del gen *rpoB* obtenidos a partir de DNA de microorganismos aislados en trabajos anteriores del pozol, los microorganismos fueron los siguientes:

- a. *S. infantarius*
- b. *Lb. plantarum*
- c. *Lb. raffinolactis*
- d. *Lact. lactis*
- e. *Leuc. citreum*
- f. *W. confusa*
- g. *Leuc. argentum*
- h. *Lb. pentosus*

Obtenido el DNA de estos microorganismos así como sus productos de amplificación éstos se sometieron a una electroforesis con gradiente desnaturizante utilizando un gradiente de 30 a 60% de concentración de desnaturizante. Una vez que se obtuvo este gel así como los geles correspondientes a las muestras de pozol, los geles fueron digitalizados en el sistema Diversity Database versión 2.2 para Windows y se comparó banda a banda; correlacionando muestra y patrón para identificar a qué microorganismo correspondía cada una de las bandas. En el caso de las bandas que no pudieron ser identificadas por el patrón de bandas se realizó el siguiente tratamiento:

B. Identificación de bandas obtenidas a partir de los geles de DGGE de microorganismos que no pudieron ser identificados con el patrón de bandas

Las bandas seleccionadas se cortaron individualmente con un bisturí estéril y se colocaron por separado en microtubos que contenían 50 μ L de agua, los tubos se dejaron en el refrigerador por aproximadamente 18 horas, esperando que por difusión, los productos de PCR salieran. Después se tomó 1 μ L del producto de PCR extraído de la banda y se reamplificó de la misma manera que se describió anteriormente para la amplificación del DNA de cepas puras y de pozol mostrado en la tabla 6.1 y 6.2 de esta sección. Se comprobó la eficiencia del procedimiento mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.8% (p/v) (Ver anexo C).

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar con el cebador *rpoB1698f* al Instituto de Fisiología Celular. UNAM.

Los resultados de las secuencias se introdujeron a la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://ncbi.nih.gov>) utilizando el servicio de BLAST con el fin de identificar los microorganismos relacionados.

C. Análisis de comunidades microbianas

Cada uno de los geles fue digitalizado utilizando el software Diversity Database Versión 2.2 para Windows (Biorad). Y se compararon con el patrón de muestras que también fue previamente digitalizado por este sistema. Con el mismo sistema se elaboraron los dendrogramas que permitieron la interpretación del comportamiento de la comunidad microbiana y se obtuvo la intensidad de cada una de las bandas determinada como la altura de pico y con esto fue posible obtener los siguientes parámetros ecológicos:

Índice de riqueza (R)

Este índice se obtuvo por el conteo del número de bandas visibles para cada tiempo de fermentación.

Coefficiente de similitud de Dice SD. (matriz de distancias)

Tiene como fin obtener la similitud entre la microbiota de las diferentes muestras de cada combinación de par de muestras y a partir de aquí fue posible la elaboración de dendrogramas utilizando el software DIVERSITY DATABASE Versión 2.2 para Windows (Bio-rad). La ecuación empleada se muestra a continuación:

$$S_D = (2N_{AB}) / (N_A + N_B)$$

Donde SD. Es el coeficiente de similitud de dice, N_A y N_B el número total de bandas en los carriles seleccionados. N_{AB} el número de bandas comunes entre los carriles A y B.

Índice de diversidad

Se obtuvo a partir del índice general de diversidad de Shannon-Weaver (H) y fue calculado a través de la siguiente ecuación.

$$H = - \sum P_i \log_2 p_i$$

P_i es la probabilidad de importancia, que se obtiene a partir de la altura de los picos de las curvas densitométricas.

$$P_i = n_i / \sum n_i$$

Donde n_i es la altura del pico i en la curva densitométrica.

Índice de dominancia de Simpson (S)

El índice de dominancia de Simpson se calculó mediante la siguiente ecuación

$$S = \sum 1/P_i^2$$

Donde S es el índice de diversidad de Simpson y P_i es la proporción de individuos de la especie i en la comunidad.

CAPITULO 7. RESULTADOS y DISCUSION

7.1 CONDICIONES DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *rpoB*

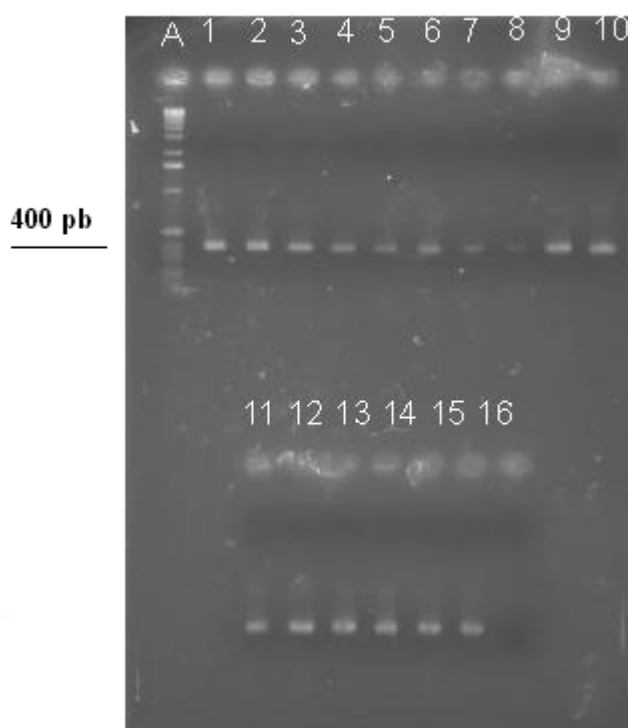


Figura 7.1. Productos de PCR obtenidos a partir de DNA de muestras de pozol con los primers *rpoB2014r* y *rpoB1698 f*, A: marcador de pesos moleculares, carriles 1-9 corresponden a DNA de pozol obtenido de la superficie de la bola, carriles 10-16 corresponden a DNA de pozol obtenido del centro de la bola.

De acuerdo con la metodología reportada por Rantsiou y col. (2004) y modificando el tipo de Taq polimerasa empleada (High Fidelity ® Platinum), se obtuvieron los productos de PCR mostrados en la figura 7.1 que de acuerdo con el marcador de pesos moleculares mostrado en el carril A, corresponden a aproximadamente 400 pares de bases, lo que concuerda con el tamaño del fragmento del gen *rpoB* esperado (Lewin, 2001). Las

condiciones reportadas en la metodología, fueron adecuadas para lograr la amplificación a través de PCR del gen *rpoB* de bacterias presentes en el pozol para su posterior utilización en la aplicación de geles de gradiente desnaturalizante.

7.2 COMPROBACIÓN DE LA CORRECTA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *rpoB* MEDIANTE LA CLONACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN *rpoB* EN *Escherichia coli*

A fin de comprobar que se hubiera amplificado el fragmento del gen *rpoB* adecuadamente, se llevó a cabo la amplificación del DNA de un microorganismo conocido característico del pozol, *Lb. plantarum*, y una posterior clonación del producto de PCR en *E. coli*.

A. Resultados de la transformación

Tabla 7.1. Transformación de *E. coli* con el kit TOPO TA Cloning® , se muestran los resultados de los controles pUC y blanco (sólo vector) así como de la transformación con los productos de PCR del gen *rpoB* de *Lactobacillus plantarum*.

Muestra y volumen de células transformadas inoculado (µL).	Número de colonias azules		Número de colonias blancas	
	Kanamicina	Ampicilina	Kanamicina	Ampicilina
Vector pUC				
15	-	6	-	0
45	-	38	-	0
Blanco (sólo vector)				
15	2	0	0	0
45	1	6	1	0
Vector + productos de PCR				
15	0	2	2	0
45	2	2	12	11

De acuerdo con la construcción del vector, que implica la introducción de la secuencia problema entre la secuencia del gen *lacZ*, la presencia de colonias azules tanto con el vector pUC como en el blanco (sólo vector) es satisfactoria pues implica la expresión del gen *lacZ* para la utilización de X-gal como sustrato cromóforo, implicando así que el protocolo de la transformación se siguió adecuadamente. Por otro lado, la presencia mayoritaria de colonias blancas en la muestra que contenía el vector más el producto de PCR de *Lb. plantarum* indica que hubo una disrupción del gen de tal modo que no es posible la utilización de X-gal e indica que la transformación se ha llevado a cabo con éxito. Los resultados se muestran en la tabla 1. De las colonias blancas se seleccionaron dos desarrolladas el medio que contenía kanamicina y 2 en el medio con ampicilina y se llevó a cabo la extracción de plásmidos, cuya migración en un gel de agarosa, mostró tener el tamaño del plásmido más un fragmento que corresponde al producto de PCR. (figura 7.2)

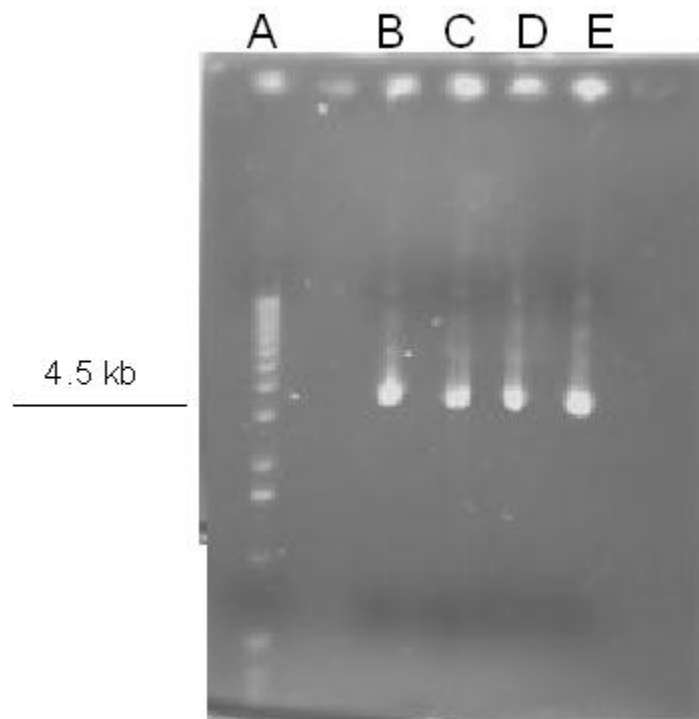


Figura 7.2. Electroforesis en gel de agarosa (1.8%, 65V, 1 hora) de los plásmidos extraídos de las colonias transformadas. Carril A: marcador de pesos moleculares, B, C: plásmidos extraídos de colonias crecidas en ampicilina, D, E: plásmidos extraídos de colonias crecidas en kanamicina.

B. Resultados de la secuenciación

Tabla 7.2. Resultados obtenidos de la secuenciación del fragmento del gen *rpoB* de *Lb. plantarum* clonado en *Escherichia coli*, se muestran los datos de porcentaje de identidad de la secuencia de nucleótidos así como el tamaño del fragmento amplificado.

Organismos resultantes de la comparación por BLAST	Comparación de la secuencia de nucleótidos ²				
	Colonia ¹	1k	2k	1A	2 ^a
	Nucleótidos/ aminoácidos	339	364	363	366
<i>L. plantarum</i> Region 3/11 del genoma. Cepa WCFS1	%identidad	99	99	98	98
<i>L. plantarum</i> Gen <i>rpoB</i>	% identidad	98	98	97	98

1. Colonias 1A y 2A son colonias desarrolladas en un medio con ampicilina 50mg/mL, 1K y 2K, colonias desarrolladas en un medio con kanamicina.
2. servicio BLAST, <http://ncbi.nlm.nih.gov>

Los datos mostrados en la tabla 7.2, corroboran la amplificación de un fragmento de aproximadamente 350 nucleótidos reportado anteriormente por Rantsiou y col. (2004), para las cuatro colonias seleccionadas. En los 4 casos se obtuvieron los mismos resultados cuando se compararon los nucleótidos y los aminoácidos, obteniéndose que el fragmento amplificado por PCR correspondió a una región del gen *rpoB*. Esto garantizó que la amplificación y las bandas obtenidas en los geles de DGGE, correspondieron a la región que se deseaba amplificar.

7.3 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE CONCENTRACIÓN DE DESNATURALIZANTE EN DGGE (GELES PERPENDICULARES)

Con el fin de establecer el intervalo adecuado de concentración de desnaturalizante para separar por DGGE los fragmentos de DNA, se realizaron dos geles perpendiculares; uno de productos de PCR de cepas puras y otro de productos de PCR de pozol. Los resultados se muestran en la figura 7.3.



Figura 7.3. Gel perpendicular de la mezcla de DNAs de cepas puras identificadas como *Lb. plantarum*, *S. infantarius*, utilizando un gradiente desnaturalizante en un intervalo de 20% a 70%. Se muestra el intervalo de concentración en el que se aprecia la separación de DNA de ambas cepas puras.

En la figura 7.3, es posible apreciar que el intervalo de concentración en el que se logra la separación de los productos de PCR de dos microorganismos oscila entre 44% y 64% de desnaturalizante. Se realizó un segundo gel, pero con los productos de PCR de pozol, a fin de establecer un gradiente de desnaturalización en el cual se lograr la separación de estos productos y así fuera posible consensar un gradiente único. De esta manera, en el momento de la realización de los geles paralelos para la elaboración de un patrón de

bandas de cepas puras y la posterior identificación en muestras de pozol, se trabajaron bajo las mismas condiciones de gradiente desnaturalizante.

Los resultados obtenidos con el gel perpendicular del DNA de pozol se muestran en la figura 7.4, apreciándose que el intervalo de concentración de desnaturalizante donde se logró la mejor separación de las bandas representativas de cada microorganismo se encuentra en un valor de 46% a 61%.

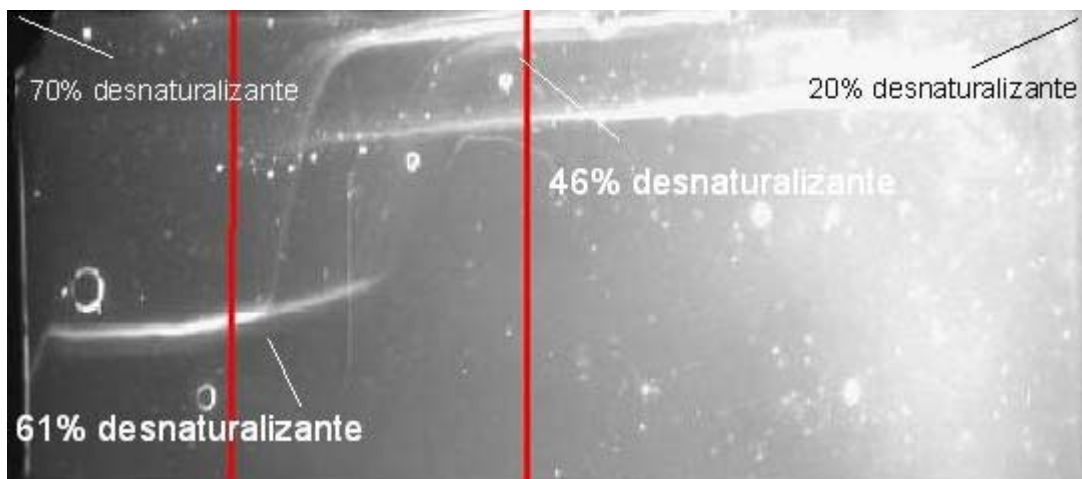


Figura 7.4. Gel perpendicular de productos de PCR de pozol (centro y superficie) utilizando un gradiente de concentración de 20% a 70% de desnaturalizante, entre las líneas se indica el porcentaje de concentración en el cual se logra la mejor separación de fragmentos de los microorganismos presentes en el pozol.

Considerando los resultados obtenidos de las figuras 7.3 y 7.4, se decidió utilizar un gradiente desnaturalización de 45% a 60% de desnaturalizante, considerando este gradiente, el que permitiría la mejor separación de bandas durante la elaboración de geles paralelos.

7.4 APLICACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DGGE, PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DE POZOL UTILIZANDO LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *rpoB* (GELES PARALELOS)

Uno de los puntos primordiales de este trabajo fue el de comprobar que la amplificación del gen *rpoB* y su posterior aplicación en DGGE, daría como resultado la existencia de “una sola banda” para cada microorganismo, evitando así el problema de microheterogeneidad reportado por Cilia et al. (1996), cuando se utiliza el gen 16S para la identificación de microorganismos. Con el fin de comprobar lo anterior, además de lograr la identificación de microorganismos en el pozol, se realizó un patrón de bandas de cepas puras, previamente identificadas. Los resultados se muestran en la figura 7.5.

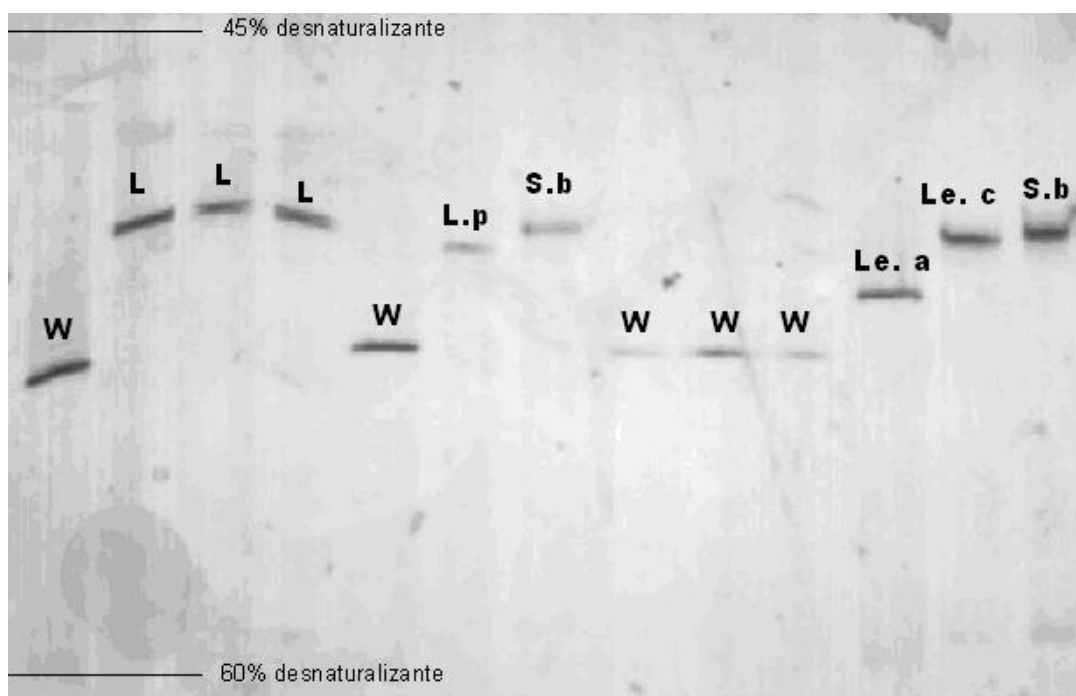


Figura 7.5. Gel paralelo (45-60% de desnaturizante, 85V, 17 horas), L: microorganismos identificados previamente como *Lactobacillus plantarum*. L.p: *Lactobacillus pentosus*, S.b: *Streptococcus infantarius*, Le.a: *Leuconostoc argentum*, Le.c: *Leuconostoc citreum*. W: *Weissella confusa*.

En la figura 7.5 es posible apreciar que se obtuvo una sola banda para cada microorganismo.

Esto permitiría entonces la identificación y elaboración de un patrón de referencia que serviría posteriormente para la identificación de microorganismos dentro de un ambiente dado, en este caso el pozol. Es posible apreciar para microorganismos de la misma especie como *W. confusa* (W), para *Lb. plantarum* (L) y para *S. infantarius* (S.b) presentaron el mismo corrimiento en el gel. Los microorganismos del género *Leuconostoc*, se separaron adecuadamente bajo las condiciones empleadas. En la figura 5 es posible apreciar que bandas identificadas como *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus infantarius* se encuentran en una misma zona del gel. Las bandas representadas por las demás especies del género *Weisella*, *Leuconostoc* y la especie *Lb. pentosus* muestran una separación adecuada entre sí y entre las dos especies de *Lb. plantarum* y *S. infantarius*.

Considerando lo anterior, el patrón de bandas aún cuando es adecuado respecto a que presenta un sola banda para cada microorganismo, presenta dificultades para la identificación entre especies en un mismo gel para algunos microorganismos como *Lb. plantarum* y *S. infantarius*. Por ello cambiar las condiciones en las cuales se corre el gel, fue la siguiente estrategia para lograr así la máxima separación de bandas que serían utilizadas posteriormente como patrón para la identificación de microorganismos.

Se observó que la migración de las bandas no era muy grande, es decir la mayoría de las bandas tenían una migración en el primer tercio del gel (datos no mostrados). Esto no es adecuado debido a que si durante la aplicación de la técnica PCR-DGGE a muestras de pozol, existieran bandas no contempladas en el patrón por arriba de esta migración, éstas podrían no ser observadas o bien podrían co-migrar con las bandas de los microorganismos identificados dando lugar a una mala interpretación de resultados.

A fin de optimizar las condiciones se modificaron voltaje, temperatura y tiempo, manteniendo el gradiente de concentración de 45-60% de desnaturizante; sin embargo no se obtuvieron mejores resultados que modificaran la distancia migrada por las bandas o bien que permitieran la separación adecuada entre microorganismos de distinta especie. Por ello se decidió modificar la concentración de desnaturizante a fin de optimizar la

separación. En la figura 7.6, se esquematizan las concentraciones empleadas y en cada bloque se muestra la migración observada en el patrón de bandas.

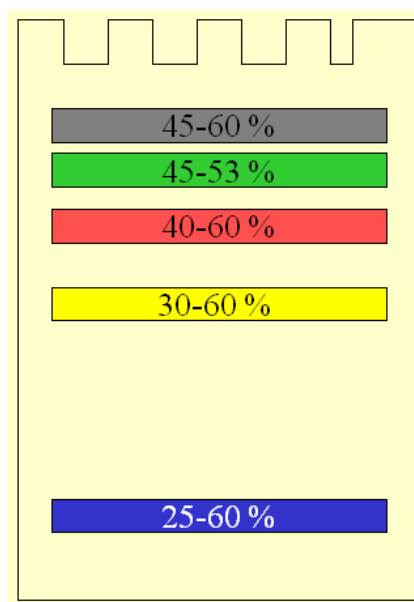


Figura 7.6. Esquematación de los resultados obtenidos con los gradientes empleados a fin de optimizar el gradiente de la técnica PCR-DGGE. Cada bloque muestra la concentración trabajada e indica hasta donde migró el bloque de bandas del patrón de cepas puras.

Como se aprecia en el esquema de la figura 7.6, la concentración de desnaturalizante determinada por el gel perpendicular permitía solo una migración corta de las bandas.

Si se abría demasiado el gradiente como en el caso de la concentración 25-60% de agente desnaturalizante la migración era excesiva y podría provocar la pérdida de bandas. El gradiente que permitió la mejor separación de bandas así como una migración adecuada fue la concentración de 30-60% de desnaturalizante, decidiéndose así utilizar este gradiente en la aplicación de la técnica PCR-DGGE tanto para la elaboración del patrón de cepas puras como para la aplicación a muestras de pozol.

7.5 ELABORACIÓN DEL PATRÓN DE BANDAS Y DISCUSIÓN DE LOS PROBLEMAS INHERENTES A LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *rpoB*

A. Elaboración del patrón de bandas

En la figura 7.7 se muestra el patrón electroforético de una región amplificada del gen *rpoB* de cepas puras aisladas previamente de pozol y caracterizadas por la secuencia del gen 16S rDNA.

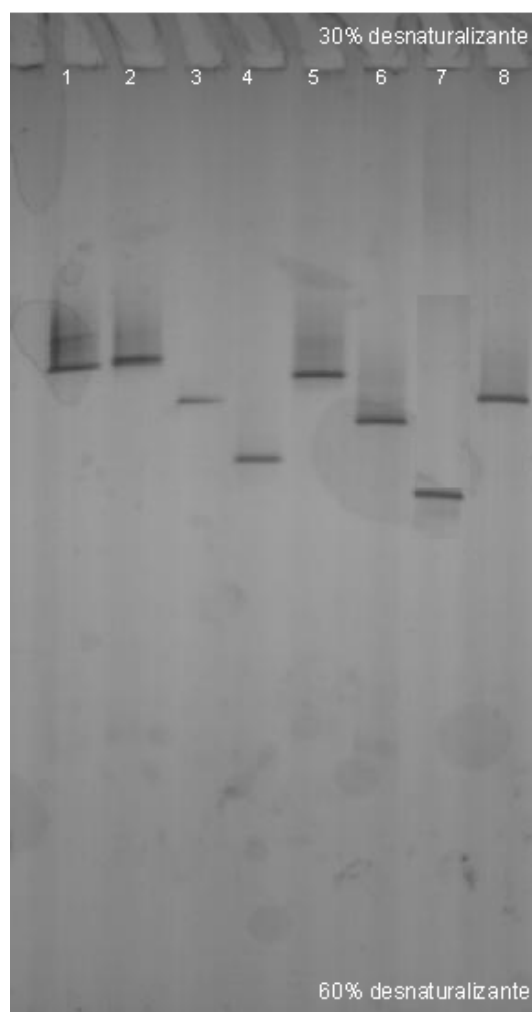


Figura 7.7. Gel DGGE (30-60% desnaturizante, 85V, 17 horas) de fragmentos amplificados del gen *rpoB* de cepas puras aisladas previamente de pozol, 1. *S. infantarius*, 2. *Lactococcus lactis*. 3. *Lb. plantarum* 4. *W. confusa*. 5. *Leuc. citreum*. 6. *Leuc. argentum*. 7. *Lb. raffinolactis*. 8. *Lb. pentosus*.

Se aprecia en la figura 7.7 que la migración del bloque de bandas mostrado por el patrón de cepas puras en el gel con gradiente desnaturalizante de 40-60% muestra una migración aproximadamente a la mitad del gel, esto permitió detectar bandas, aún de microorganismos no incluidos en el patrón, por arriba y por abajo del patrón.

Respecto a la separación entre especies, las bandas correspondientes a *S. infantarius* y *L. lactis* (carriles 1 y 2, figura 7.7), respectivamente presentan una migración semejante, problema que no fue posible solucionar bajo ninguna de las condiciones utilizadas previamente durante la optimización de condiciones para los geles paralelos. El mismo problema se presenta en las bandas correspondientes a *L. plantarum* y *L. pentosus* (carriles 3 y 8, figura 7.7). En los demás casos se aprecia una separación adecuada que permite distinguir entre las distintas especies. La solución más adecuada al problema, es que en el momento de aplicar la técnica a muestras de pozol, las bandas que correspondan a la migración de las bandas 1 y 2 así como 3 y 8 sean clonadas y secuenciadas a fin de verificar qué microorganismos se encuentran presentes en la muestra.

De *S. infantarius*, se observó más de una banda que no se había observado previamente. La apertura del gradiente talvez produjo una migración mayor de las bandas permitiendo una separación de las bandas que no había sido notada al trabajar con el gradiente de desnaturalizante de 45-60%.

La presencia de varias bandas particularmente en esta especie es de importancia por varias razones; la primera es que *S. infantarius* ha sido reportado como una especie predominante en el pozol (Díaz et al., 2003), por lo que se espera encontrarse al momento de aplicar la técnica a muestras de pozol, de estar representado este microorganismo por más de una banda podría dificultar la interpretación de resultados.

Otra razón es que *rpoB* no se encuentra representado, al menos para esta especie por una sola banda, sin embargo respecto al número de bandas obtenidas es siempre el mismo, es decir 4 bandas, como se aprecia en la banda 1 de la figura 7.9. Esto es uniforme a diferencia del gen 16S que puede mostrar un número variado de bandas para una sola especie en diferentes condiciones, es decir 2, 4 o hasta 8 bandas de manera no uniforme (Bolaños, 2004). Entonces si se conoce que el patrón de bandas para este

microorganismo es siempre de 4 bandas pueden analizarse los geles bajo esta consideración. Es posible que el gen en este caso posea más de una copia. Rantsiu y col. en 2004 reportaron haber encontrado más de una banda en algunas bacterias lácticas comprometidas con la fermentación de quesos con este mismo gen, así que podría sospecharse de la presencia de más de una copia del mismo.

B. Verificación de la reproducibilidad de método

Con el fin de verificar la reproducibilidad de la técnica de, se obtuvieron por duplicado productos de PCR de una región del gen *rpoB* en muestras de pozol. Además cada gel de DGGE se realizó por duplicado. Como se aprecia en la figura 7.8 el número de bandas obtenido en cada caso es el mismo. Aunque pueden encontrarse ligeras variaciones en la intensidad de bandas y esto puede ser debido a la amplificación; que durante este proceso no todos los templados se amplifican de la misma manera lo que puede influir en la intensidad de la banda. Se muestran resultados adecuados que indican que la técnica fue reproducible (sólo se muestran los resultados para un productor).

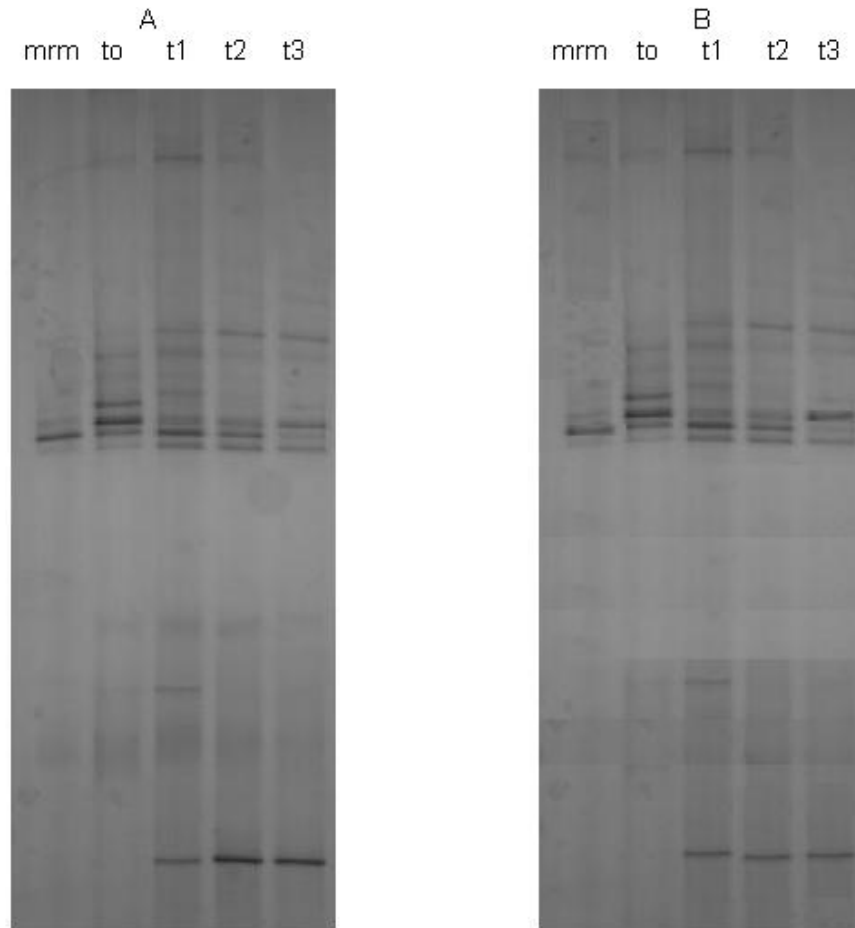


Figura 7.8. Geles de DGGE (30-60% desnaturizante, 85V, 17 horas), para el duplicado obtenido de los productos de amplificación del productor 7, se muestran los resultados obtenidos para la masa recién molida (mrm), tiempo cero, uno, dos y tres de la fermentación correspondientes a las cero, 24, 48 y 72 horas respectivamente en la superficie de la bola de pozol.

C. Verificación de la presencia de amplificación preferencial

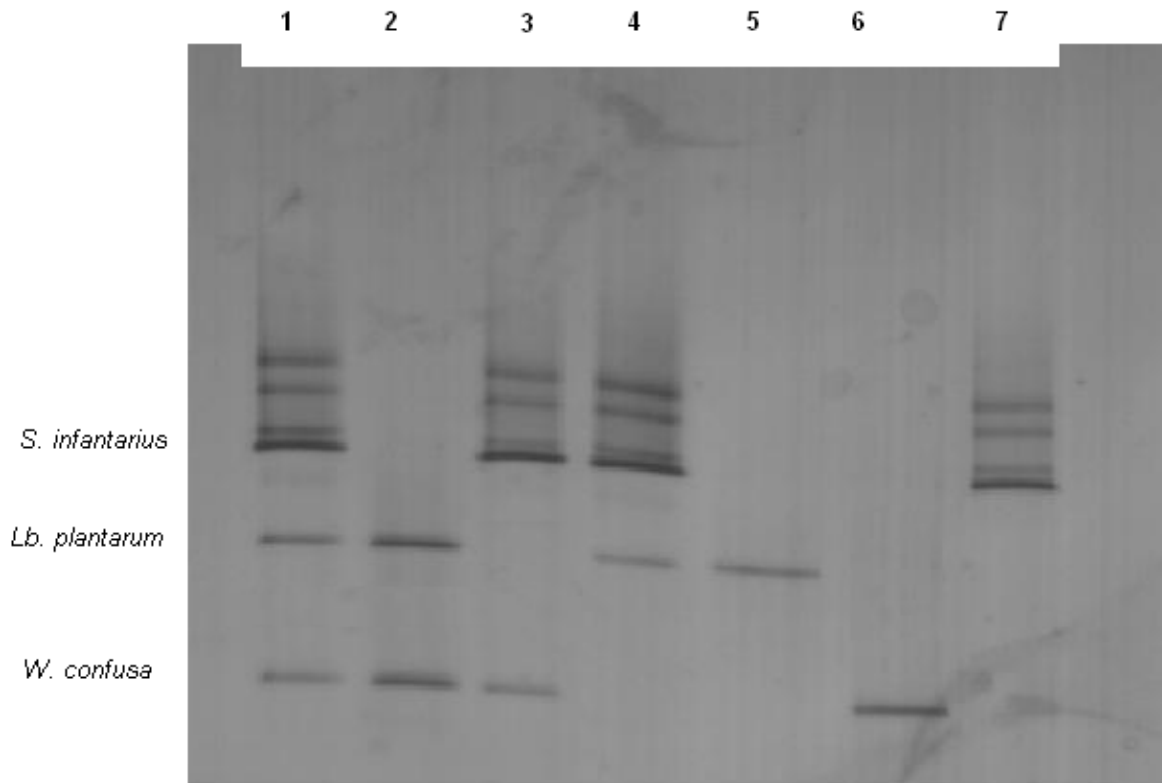


Figura 7.9. Gel DGGE (30-60% desnaturizante, 85V, 17 horas), que muestra las bandas obtenidas por la amplificación de un fragmento del gen *rpoB* en cepas puras. Carril 1 (amplificación de la mezcla de templado de DNA de *S. infantarius*, *L. plantarum* y *W. confusa*), Carril 2 (amplificación de la mezcla de templado de *L. plantarum* y *W. confusa*), Carril 3 (amplificación de la mezcla de templado de *S. infantarius* y *W. confusa*), Carril 4 (amplificación de la mezcla de templado de *S. infantarius* y *L. plantarum*), Carril 5 (amplificación de *L. plantarum*), Carril 6 (amplificación de *W. confusa*), Carril 7 (amplificación de *S. infantarius*).

Se considera que la técnica de DGGE es semi-cuantitativa, de manera que la intensidad de cada banda es proporcional a la concentración de ese microorganismo (Pintado, 2003), sin embargo se ha reportado que la amplificación preferencial en reacciones de PCR es posible (Reysenbach, 1992). Se decidió entonces verificar si era posible la existencia de una amplificación preferencial, que se ha reportado como una desventaja general en los métodos acoplados a PCR (Kirk, 2004). Para ello, concentraciones idénticas de templado de DNA de tres cepas puras que incluían *W. confusa*, *S. infantarius* y *Lb. plantarum* se sometieron a amplificación, realizando combinaciones entre ellas.

La figura 7.9 muestra el gel obtenido con las diferentes combinaciones de DNA de los tres diferentes microorganismos. A simple vista pueden observarse diferencias en la intensidad de bandas. El experimento mostrado en la figura 7.8 se realizó por triplicado (no se muestran resultados de los otros dos gels). Se realizaron análisis de varianza y pruebas de t-student para determinar si existía diferencia significativa entre la intensidad de bandas. Los resultados del análisis estadístico se muestran en la tabla 3.

Tabla 7.3. Análisis estadístico con la prueba de Análisis de varianza, intervalos múltiples de Duncan y t-Student para las distintas reacciones de PCR estudiadas con una temperatura de alineamiento de 50°C.

Microorganismo	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4	Reacción 5	Reacción 6	Reacción 7
<i>S. infantarius</i>	a,c		a,c	a,c	C		
<i>Lb. plantarum</i>	b,d	a,d		b,d		d	
<i>W. confusa</i>	b,f	a,e	b,g				e

Valor de confianza: 95%

Reacción 1: aplicación de prueba de Análisis de varianza e intervalos múltiples de Duncan

Reacciones: 2 a 7: aplicación de prueba de t-Student

Las letras a y b **dentro de la columna** indican si hay diferencia significativa entre los microorganismos para una misma reacción.

Las letras c, d, e, f, g, h indican si hay diferencia significativa **entre columnas** cuando se compararon con los experimentos que sólo contenían un microorganismo.

Resumen (x,y) primera letra: diferencia entre los organismos de la misma columna, segunda letra: diferencia entre diferentes columnas.

Con los resultados mostrados en la tabla 7.3 es posible observar que si se compara la intensidad de bandas de cada microorganismo en cultivo puro (carriles 5, 6 y 7), no existe diferencia significativa. Sin embargo; cuando se amplificaron en una reacción que contenía la misma concentración de DNA de las tres cepas (carril 1), la intensidad de la banda de *S. infantarius* es significativamente mayor que la de las otras dos cepas. Lo mismo se observó en mezclas en donde *S. infantarius* se encontraba con *W. confusa* (carril 3) ó con *Lb. plantarum* (carril 4), sin embargo la intensidad de la banda obtenida para este microorganismo en cultivo puro (reacción 6) no mostró diferencia significativa cuando se comparó con la intensidad de banda obtenida a partir de las reacciones 1, 2 y 4, por lo tanto no existe amplificación preferencial hacia *Lb. plantarum*. Cuando se compara la intensidad de la bandas en la mezcla de *Lb. plantarum* y *W. confusa* tampoco

se encontró diferencia significativa encontrando entonces que no hay amplificación preferencial entre estos dos microorganismos. Por lo tanto esto significa que efectivamente la disminución en la intensidad de las bandas en el carril 1 de la figura 7.9, si representa una diferencia significativa y permitiría decir entonces que *S. infantarius* se amplifica preferencialmente respecto a *W. confusa*.

La amplificación preferencial puede deberse a varios factores, como la longitud del fragmento a amplificar o bien al uso de primers degenerados (Farrelly, 1995). Este no es el caso pues se ha demostrado que un fragmento mayor a 600 pb puede ocasionar este problema y el fragmento amplificado en este caso es menor (aproximadamente 350 pb). Por otra parte cuando se diseñaron los primers para la amplificación del gen *rpoB* se descartaron los primers degenerados porque ocasionaban la aparición de varias bandas debido a obtención de varios fragmentos durante la amplificación (Dahllof, 2000). Se ha reportado que el plegamiento del templado así como la composición de guanina – citosina y las estructuras secundarias del DNA pueden ocasionar amplificación preferencial (Suzuki, 1996). A este respecto se reporta que entre menor número de G+C exista, las secuencias pueden amplificar preferencialmente con mayor frecuencia, por lo tanto concuerda con el resultado obtenido en donde *W. confusa* mostró una menor intensidad de banda mientras que las bandas correspondientes a *S. infantarius* mostraron una mayor intensidad, ésto partiendo del hecho de que *W. confusa* presentó un mayor corrimiento en el gel de DGGE (Figura 7.9) indicando entonces que su contenido de G+C es mayor. Lo anterior considerando el principio de separación de la técnica, en donde a mayor contenido de G+C migrarán más pues la desnaturalización es más difícil que en aquellas donde el contenido de G+C es menor y por lo tanto migran menos (Muyzer, 1998).

Con el fin de disminuir el problema de la amplificación preferencial se modificaron las temperaturas de alineamiento, a 55 y 60°C.

Con la temperatura de alineamiento de 55°C, no se logró la amplificación más que de un microorganismo, aún cuando se probaron distintas condiciones de reactivos y de templado de DNA (no se muestran los resultados).

Los resultados con el protocolo utilizando una temperatura de alineamiento de 60°C se muestran en la figura 7.10 y el análisis estadístico se muestra en la tabla 7.4.

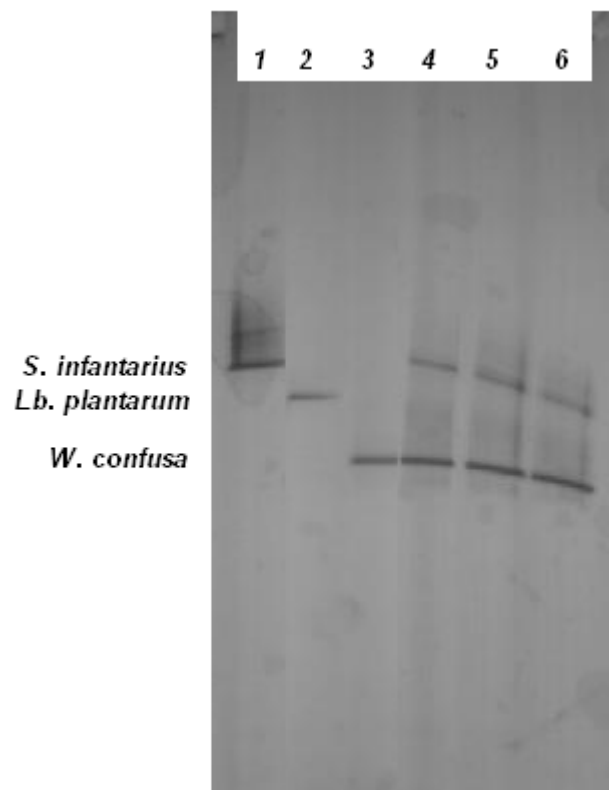


Figura 7.10. Gel DGGE (30-60% desnaturizante, 85V, 17 horas), que muestra las bandas obtenidas por la amplificación de un fragmento del gen *rpoB* en cepas puras. Carril 1 (amplificación de *S. infantarius*), Carril 2 (amplificación de *L. plantarum*), Carril 3 (amplificación de *W. confusa*), Carril 4, 5 y 6 (amplificación de la mezcla de templado de DNA de *S. infantarius*, *Lb. plantarum* y *W. confusa*).

Tabla 7.4. Análisis estadístico con la prueba de t-Student para las distintas reacciones de PCR estudiadas con una temperatura de alineamiento de 60°C.

Microorganismo	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4
<i>S. infantarius</i>	a,f	c		
<i>Lb. plantarum</i>	+++		d	
<i>W. confusa</i>	b,e			e

Valor de confianza: 95%

Las letras a y b **dentro de la columna** indican si hay diferencia significativa entre los microorganismos para una misma reacción.

Las letras c, d, e, f indican si hay diferencia significativa **entre columnas** cuando se compararon con los experimentos que sólo contenían un microorganismo.

Resumen (x,y) primera letra: diferencia entre los organismos de la misma columna, segunda letra: diferencia entre diferentes columnas.

Con los resultados de la figura 7.10, se aprecia lo siguiente: desaparecen las bandas múltiples obtenidas anteriormente para *S. infantarius*, lo cual sería una gran ventaja si se utilizara este protocolo de PCR. Aunque también hay que considerar que sólo una copia del gen *rpoB* se esté amplificando preferencialmente. Este resultado fue adecuado pues se pretendía la obtención de una sola banda por microorganismo. Sin embargo se apreciaron varias desventajas, la más importante es que no amplifica *Lb. plantarum* en la mezcla de reacción. Para este caso *W. confusa* muestra ahora una amplificación significativamente distinta respecto a *S. infantarius*, es decir, invierte los resultados obtenidos con el primer experimento mostrado en la tabla 7.3 y en la figura 7.9. El cambio en la astringencia del protocolo de PCR pudo ser el causante de estos nuevos resultados. Además bajo estas nuevas condiciones, se favorece la amplificación de *W. confusa* respecto a los demás microorganismos, por lo tanto es posible que *Lb. plantarum* y *S. infantarius* no tuvieran la misma oportunidad de alineamiento.

Dadas las circunstancias mencionadas durante todo el establecimiento de la técnica se decidió considerar a las siguientes condiciones para el estudio de la microbiota de pozol.

- ✓ Una concentración de desnaturizante que oscile entre 30 y 60% de concentración.
- ✓ Condiciones de electroforesis de 85V y 17 horas a 60°C

- ✓ la utilización del protocolo de PCR que involucre una temperatura de alineamiento de 50°C.

Para el análisis entonces, se considerará la posible aparición de varias bandas para *S. infantarius* así como la posible presencia de amplificación preferencial de este mismo microorganismo.

7.6 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE POZOL

Los resultados se describen en primer lugar analizando los microorganismos presentes entre los diferentes productores y en segundo lugar analizando a estas siete comunidades microbianas en conjunto a diferentes tiempos de fermentación. En el caso en que las bandas no correspondieran con ninguna en el patrón se determinó llevar a cabo el corte y la posterior secuenciación de las mismas.

Las bandas que correspondieron al mismo corrimiento de *S. infantarius* y *W. confusa* se cortaron y se secuenciaron a manera de corroborar su presencia en la comunidad microbiana y verificar la posible presencia de más de un microorganismo en la misma banda por la co-migración de las mismas.

A. Identificación de bandas

Haciendo consenso de todos los geles analizados para las siete muestras de pozol, se detectaron en total 16 bandas, no todas presentes en todas las muestras analizadas. El estado de análisis e identificación de cada una de ellas se muestra en la tabla 7.5.

Tabla 7.5. Bandas detectadas en los geles de DGGE en muestras de pozol, se muestra el número de banda que está asignado en los geles digitalizados posteriormente, además del estado actual de identificación de las mismas.

Banda	Microorganismo	Estado de identificación
1	<i>Enterococcus faecium</i>	Banda cortada y reamplificada para secuenciación ¹ 92% identidad
2	Ni	La secuenciación no arrojó ningún resultado confiable para la identificación de este microorganismo.
3	Ni	*
4	<i>S. infantarius / Lact. lactis</i>	Banda cortada y reamplificada secuenciación ¹ obteniéndose 98% identidad para el género <i>Streptococcus</i>
5	<i>Leuc. citreum</i> ³	Identificada por medio del patrón de bandas.
6	Ni	*
7	<i>Lb. plantarum /Lb. pentosus</i>	Banda cortada y reamplificada secuenciación ² , obteniéndose 99% identidad para el género <i>Lactobacillus</i>
8	<i>Leuc. argentum</i> ³	Identificada por medio del patrón de bandas
9	<i>Leuc. lactis</i>	Banda cortada y reamplificada para secuenciación ¹ 94% identidad
10	<i>W. confusa</i> ³	Banda cortada y reamplificada secuenciación ¹ obteniéndose 98% identidad para el género <i>Weisella</i>
11	<i>Lact. raffinolactis</i> ³	Identificada por medio del patrón de bandas
12	<i>Pediococcus dextrinicus</i>	Banda cortada y reamplificada para secuenciación ¹ 92% identidad
13	Ni	La secuenciación no arrojó ningún resultado confiable para la identificación de este microorganismo
14	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	Banda cortada y reamplificada para secuenciación ¹ 95% identidad
15	<i>Lb. fermentum</i>	Banda cortada y reamplificada para secuenciación ¹ 100% identidad
16	<i>Leuc. mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	Banda cortada y reamplificada para secuenciación ¹ 96% identidad

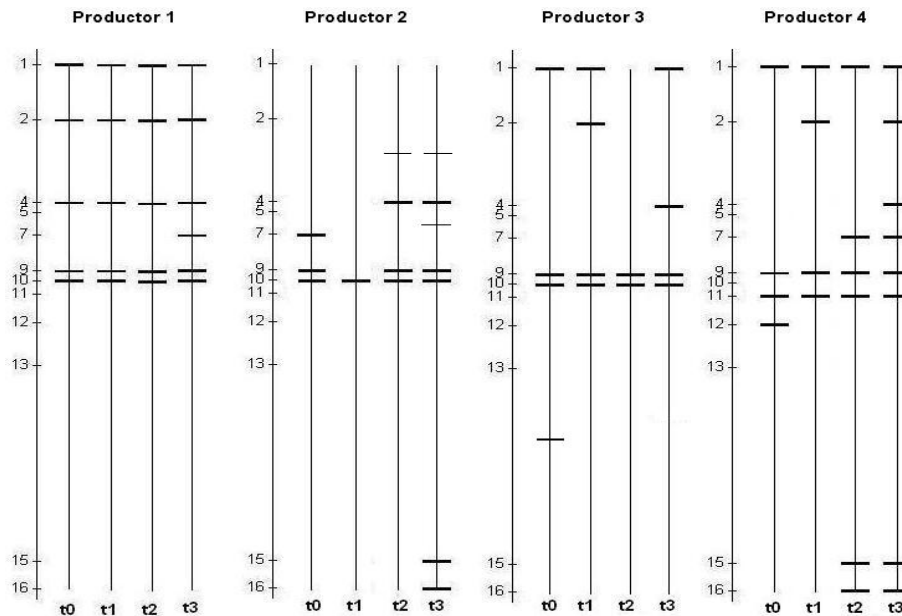
Ni: no identificada

¹ Bandas que fueron cortadas y secuenciadas, se muestra el porcentaje de identidad obtenido en el servicio BLAST para la identificación de las secuencias..

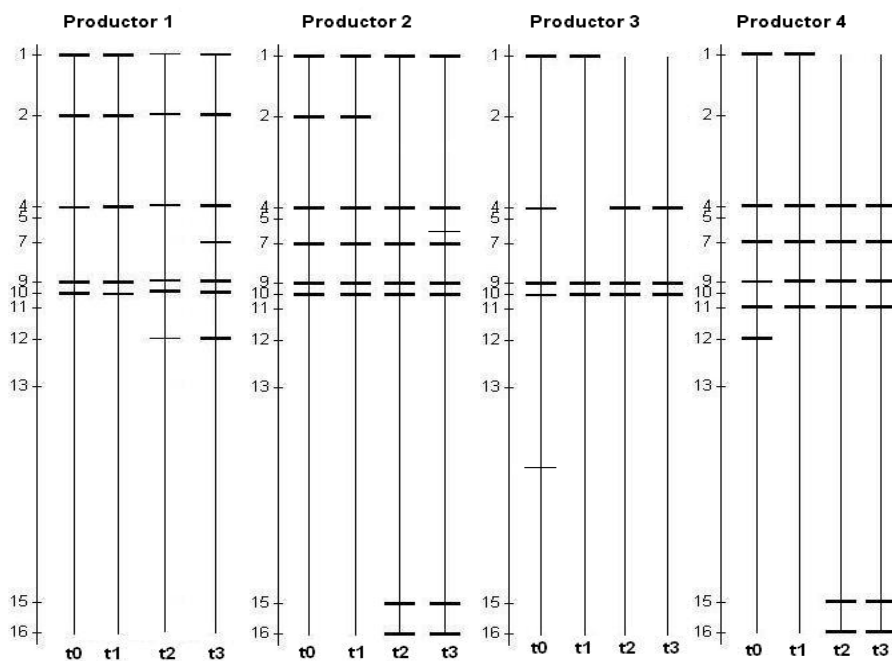
³ Bandas identificadas previamente por comparación con la secuencia 16S rDNA. (Bolaños, 2004)

* Bandas que no fueron posibles de identificar.

B. Análisis de los perfiles electroforéticos obtenidos en las distintas muestras de pozol

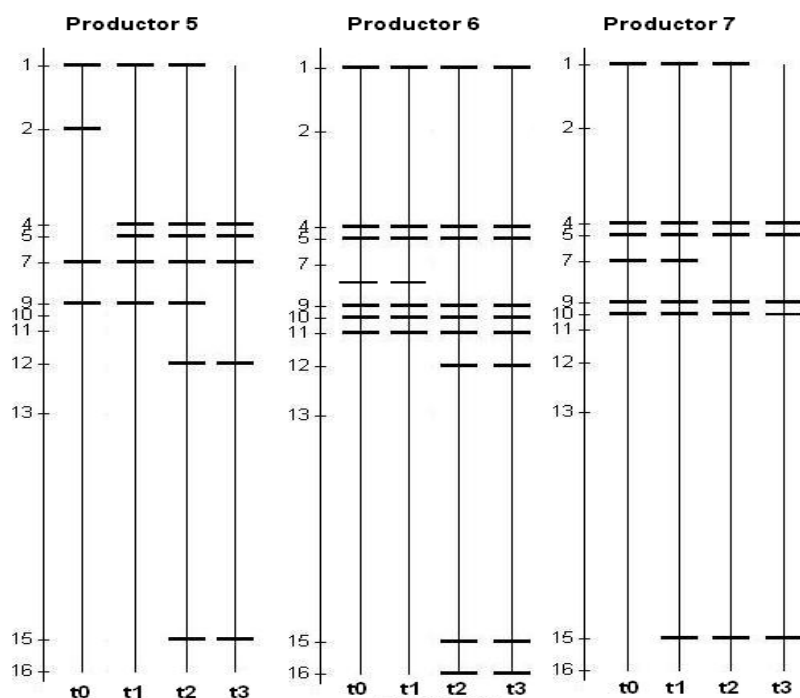


A

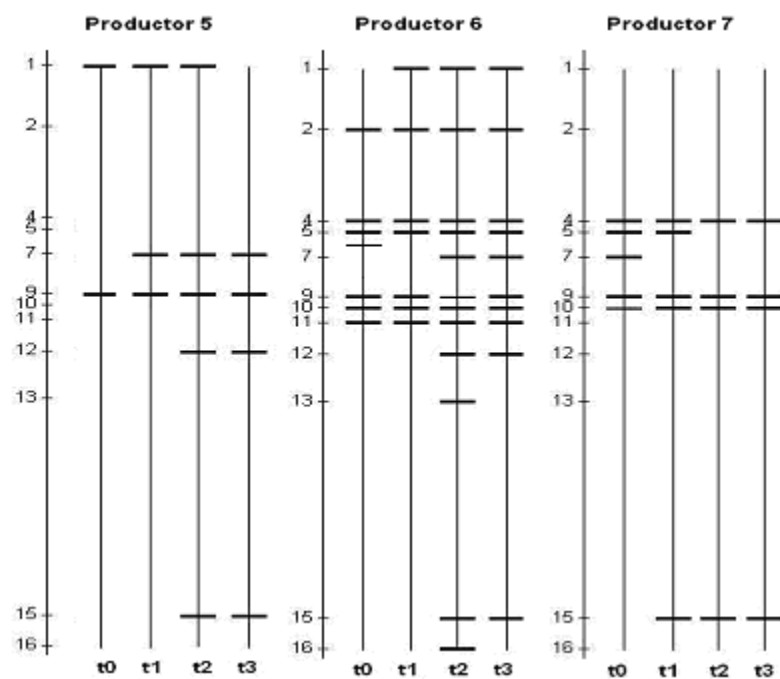


B

Figura 7.11. Digitalización del patrón de bandas obtenido por PCR-DGGE para los productores 1, 2, 3 y 4 a diferentes tiempos de fermentación en la superficie (A) y en el centro (B) de la bola de pozol. Los tiempos de fermentación son (t0 inicio de la fermentación después de realizada la bola, t1 24 horas, t2 48 horas, t3 72 horas).



A



B

Figura 7.12. Digitalización del patrón de bandas obtenido por PCR-DGGE para los productores 5, 6 y 7 a diferentes tiempos de fermentación en la superficie (A) y centro (B) de la bola de pozol. Los tiempos de fermentación son (t0 inicio de la fermentación después de realizada la bola, t1 24 horas, t2 48 horas, t3 72 horas).

En las figuras 7.11 y 7.12 se muestran los geles digitalizados para los distintos productores tanto en superficie como en el centro de la bola de pozol. A continuación se describen y analizan cada una de las bandas encontradas en los diferentes productores.

b.1 Banda 1 correspondiente a *Enterococcus faecium*

Esta banda se encontró de manera constante durante toda la fermentación en todos los productores, siendo más constante su presencia en el centro de la bola que en la superficie. Su presencia no es extraña en este tipo de alimentos ya que es una bacteria láctica característica de varios alimentos, particularmente alimentos africanos fermentados (Yousif, 2005). La presencia de este microorganismo se relaciona con el desarrollo de aromas así como otras características sensoriales que dan lugar a características especiales en diversos productos. En el caso del pozol, podría contribuir en el desarrollo de ciertas características de sabor y aroma. Más aún, se le ha atribuido un efecto benéfico como probiótico debido a su capacidad para combatir diversos patógenos. Puede contener factores de virulencia, lo cual a últimas épocas ha cuestionado su seguridad para su aplicación en otros productos, para el caso de *E. faecium* los factores que determinan su virulencia son mucho menores que los de otras especies comunes a éste género, como *E. faecalis* (Franz, 2003, Achemchem, 2005). De cualquier modo da mayor sustento a las especulaciones de que el pozol posee efectos benéficos al tracto digestivo (Herrera et. al., 1975).

En la figura 7.11 se aprecia que para el productor 1 la banda 1 se localiza durante toda la fermentación en el centro y en la superficie de la bola. En contraste con el productor 2, se detectó durante toda la fermentación pero solamente en el centro de la bola, sin detectarse en la superficie de la misma. Es importante mencionar que su ausencia o presencia puede deberse efectivamente a su bajo o nulo crecimiento que no fue posible detectar a través del gel DGGE, sin embargo su presencia es constante e intensa durante toda la fermentación, al menos en el centro. Para el productor 3 se detectó este microorganismo solamente en la masa recién molida y hasta las 48 horas de fermentación, en etapas finales de ésta el microorganismo ya no es detectado. En el caso del productor 4 se detectó *E. faecium* durante toda la fermentación en la superficie de la bola, pero para el centro esta banda solo se detectó durante las primeras 24 horas de la fermentación.

Si se analiza la figura 7.12, se aprecia que para el productor 5 se detecta este microorganismo tanto en el centro como en la superficie de la bola de pozol entre las 24 y 48 horas de fermentación. Posiblemente al igual que lo observado con los productores 3 y 4, su ausencia en etapas finales de la fermentación, pueda deberse a que su concentración disminuye y ya no es detectable por DGGE y que tal disminución sea debida a condiciones adversas que permitan la continuidad de su desarrollo. En el productor 6 se detectó de manera constante a este microorganismo durante todos los tiempos de fermentación tanto en el centro como en la superficie de la bola de pozol. Finalmente para el productor 7 esta banda se detectó desde la masa recién molida y durante todo el proceso de fermentación en la superficie de la bola de pozol sin detectarse en el centro de la bola.

En la mayoría de los productores, la presencia de *E. faecium* se hace evidente particularmente al inicio de la fermentación, sin embargo en etapas finales y particularmente en el centro se detecta una disminución en la intensidad de las bandas o bien ausencia de las mismas. Esto indica que su desarrollo se ve más comprometido al aumentar el tiempo de fermentación y más aún en el centro de la bola donde las condiciones de aireación pueden cambiar drásticamente, así como la actividad acuosa y por supuesto a la disminución de pH (Nuraida et. al., 1995). Esto puede colocar al microorganismo en condiciones desfavorables para continuar su desarrollo, sin embargo se hace presente durante las primeras 24 horas de fermentación, tiempo en el cual el pozol ha adquirido características sensoriales adecuadas (Wacher, 2000). Así que de ser la función de este microorganismo su participación en el desarrollo de características sensoriales, poseería un tiempo adecuado para lograrlo.

Otro aspecto relevante sería su función probiótica, mencionada anteriormente. Al no encontrarse de manera uniforme en todas las muestras de pozol, hace especular acerca de la calidad o funcionalidad probiótica en general, es decir esta característica puede variar entre los distintos productores dependiendo si el microorganismo se encuentra o no, dando lugar a sugerir que las características tanto sensoriales como funcionales del pozol, no son las mismas entre los diferentes productores.

b. 2 Bandas 2 y 13, no identificadas

Las bandas 2 y 13, aún después de haber sido cortadas y secuenciadas no arrojaron ningún porcentaje de identidad confiable. Es importante mencionar que la base de datos para el gen *rpoB* aún es limitada y puede significar entonces que las secuencias del gen para los microorganismos representados por estas bandas aún no se encuentren en la base de datos.

La presencia de la banda 2, parece ser de importancia para varios productores pues aparece en algunos durante todo el proceso fermentativo. Haciendo referencia a las figuras 7.11 y 7.12, se aprecia que para los productores 2, 6 y 7, en la superficie de la bola de pozol, esta banda no se detectó en ningún tiempo de fermentación. Para el caso de los productores 1, 3, 4, 5 y 7 en el centro de la bola de pozol tampoco fue detectable esta banda. Sin embargo, para el productor 1 se detectó durante toda la fermentación tanto en la superficie como en el centro de la bola. Para el productor 6 ocurre lo mismo en el centro de la bola de pozol y para los productores 3 y 4 en la superficie aparece durante las primeras 24 horas de la fermentación en la superficie de la bola.

Que su detección sea tan heterogénea entre los productores puede sin duda atribuirse a la variabilidad esperada entre los distintos productores, que podrían hacer de cada uno de los productos obtenidos, un producto con características distintas, nutricionales, sensoriales y microbiológicas.

La banda 13 sólo se detectó en el centro de la bola de pozol para la muestra del productor 6.

b. 3 Banda 3, no identificada

En la figura 7.11, se puede apreciar en el patrón de bandas del productor 2 una banda detectada en la superficie de la bola de pozol, desde las 48 horas de fermentación y hasta el final de la misma. La intensidad de la banda es ligera lo cual impidió su corte y posterior secuenciación. Debido a que sólo apareció en un productor se le restó importancia, sin embargo puede inferirse que este microorganismo sólo encuentra condiciones más favorables en la superficie de la bola y en etapas avanzadas de la fermentación.

b.4 Banda 4, correspondiente a *Streptococcus infantarius*

La banda 4 corresponde a *S. infantarius*, aún cuando en la elaboración del patrón en el gel de DGGE muestra co-migración con *Lact. lactis*. Cuando se cortó la banda y se envió a secuenciar sólo se obtuvieron resultados en el sistema BLAST para el género *Streptococcus*, la banda se cortó de dos geles obtenidos a partir de dos muestras de pozol (productores 4 y 6) y en ambos casos se obtuvo el mismo resultado.

La presencia de este microorganismo en los productores es ubicua particularmente en el centro de la bola de los diferentes productores de pozol, sin embargo en la superficie aparece en los tiempos finales de la fermentación. Estudios con el gen ribosomal 16S rDNA mostraron también su presencia tanto en el centro como en la superficie de la bola de pozol (Bolaños, 2004).

Su presencia debe ser de gran importancia debido a que previamente por técnicas de DGGE se detectó la presencia del género *Streptococcus* como dominante en el pozol a lo largo de toda la fermentación (Ampe, 1999).

Más aún se demostró que dentro del grupo de las bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol, el género *Streptococcus* es el que predomina, (Díaz, 2003). Esto es de importancia debido a que la presencia de azúcares sencillos para la fermentación aún cuando están presentes, es limitada en el pozol siendo el almidón entonces es una fuente prioritaria de obtención de energía para la producción de ácido láctico.

Díaz y col. en 2003, también reportan que este género posee la capacidad de sobrevivir a altos valores de pH y temperaturas, lo que puede promover su permanencia aún después de un proceso de nixtamalización y de este modo facilitar su desarrollo durante la fermentación. Además crece rápidamente en presencia de almidón con una conversión sustrato-biomasa eficiente lo que es una ventaja ecológica importante para su desarrollo y sobrevivencia respecto a otras bacterias ya que además su crecimiento en el pozol es posible ante valores de pH bajo, característica que es contraria a la reportada en la literatura para este microorganismo (Wood, 1995). Y al encontrarse durante toda la fermentación e inclusive hasta el final de la misma, es posible que sea resistente a valores de pH bajos, aunque todavía es necesario determinar su viabilidad en estas condiciones.

Los microorganismos del género *Streptococcus* se han reportado como microorganismos capaces de producir ácido láctico, de tal manera que contribuye a la disminución del pH característico del pozol, además mediante otras vías metabólicas estos microorganismos producen acetato, formato y etanol, que bien podrían contribuir a dar al olor y sabor característico del pozol. (Wood, 1995)

La distribución entre los distintos productores para este microorganismo es fue la siguiente:

En la muestra del productor 1 la banda correspondiente a *S. infantarius* se detectó durante toda la fermentación tanto en el centro como en la superficie de la bola. Resultados en trabajos anteriores presentados por Bolaños, en 2004 corroboran su presencia durante toda la fermentación y al igual que en este caso muestran bandas más intensas hacia el final de la misma.

Para la muestra del productor 2 la detección de este microorganismo comienza al final de la fermentación del pozol (48-72 horas) en la muestra proveniente de la superficie de la bola, sin embargo, su presencia es constante durante toda la fermentación en la muestra proveniente del centro. En el productor 3, solo se localiza en el centro de la bola, aumentando su intensidad hacia el final de la fermentación; en el caso de la superficie sólo se detecta hacia el final de la misma. El mismo comportamiento se apreció para el productor 2 en la superficie de la bola, lo que puede indicar que el establecimiento y producción de una biomasa detectable está más favorecida hacia el final de la fermentación, corroborando también la resistencia de esta especie a pesar de la disminución de pH (Díaz, 2003).

En el productor 4, *S. infantarius* se detecta de manera intensa desde el inicio de la fermentación y hacia el final de la misma en el centro de la bola de pozol, sin embargo en la superficie ésta se detecta sólo hacia el final de la fermentación. Este resultado junto con el obtenido para el productor 2 y 3 para este microorganismo, indican que este microorganismo encuentra condiciones más favorables en el centro de la bola durante todo el proceso de fermentación lo que le permite aparecer de manera dominante, sin embargo en la superficie su detección ha sido en estos productores solamente hasta el final de la fermentación. Esto podría indicar que la concentración de biomasa es suficiente

para su detección sólo hasta etapas tardías de la fermentación dando lugar a suponer que posiblemente las condiciones de acidez, disponibilidad de nutrientes o pH se vuelven adecuadas en la superficie de la bola de pozol hasta después de aproximadamente 48 horas.

Para el caso de la muestra del productor 5, *S. infantarius* no se detectó en el centro de la bola, Sin embargo se detecta su presencia en la superficie de la bola de pozol a partir de las 24 horas de fermentación. Finalmente para las muestras de los productores 6 y 7 la detección de esta especie se logra desde el inicio de la fermentación y hasta el final de la misma en la superficie y en el centro. Es importante mencionar que con excepción del productor 1, en los productores anteriores éste microorganismo no ha sido detectado en la masa recién molida y entonces es posible considerar que al principio de la fermentación existe una baja concentración del microorganismo y al avanzar el tiempo de la fermentación comienza a predominar por lo tanto debe poseer ventajas ecológicas sobre otros microorganismos que solo lograron su establecimiento en etapas iniciales de la fermentación.

b.5 Bandas 5 , 9 y 16 correspondientes a *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc lactis* y *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* respectivamente.

La banda 5 correspondió a *Leuc. citreum*, identificada a partir del patrón de bandas. La presencia de esta bacteria en el pozol no es constante en todos los productores, sin embargo en los productores 5, 6 y 7 aparece durante toda la fermentación. Al parecer su detección en el pozol, junto con la detección de otras especies del mismo género, podría tener importancia en el proceso fermentativo, debida a una contribución importante en la estructura sensorial del producto.

Este microorganismo ha sido encontrado en varios alimentos fermentados como el puto, que es arroz fermentado en las Filipinas, en productos de leche fermentada africanos, en pescados fermentados, en el almidón de yuca (Lee, 2005). Además fue previamente detectado en pozol (Ampe, 1999). Por lo tanto se considera que este microorganismo podría tener un papel importante en varias fermentaciones de alimentos.

La banda 16 fue correspondiente a *Leuc. mesenteroides subsp. mesenteroides* y se identificó a partir del corte de una banda de pozol, la cual fue posteriormente secuenciada e identificada.

La presencia de *Leuc. mesenteroides subsp. mesenteroides*, es constante en todas las muestras de pozol, con excepción de los productores 1 y 3. Este microorganismo se detectó tanto el centro como en la superficie de la bola, su presencia comienza a detectarse a partir de las 48 horas de fermentación y hasta el final de la misma y sólo en la muestra del productor 7 se detectó a partir de las 24 horas. El patrón de detección puede deberse a que se ha reportado que el género *Leuconostoc* posee una baja velocidad de crecimiento (Wood, 1995), lo cual puede dar lugar a que su detección se logre hasta altos tiempos de fermentación. En contraste, en otros productos vegetales se reporta como una de las primeras especies en desarrollarse (Lee, 2005).

A diferencia de los otros dos microorganismos de este género, *Leuconostoc lactis* parece ser predominante durante toda la fermentación junto con otros microorganismos de diferente género. Además Shaw y col. en 1989, reportaron que su presencia es importante para la fermentación de alimentos como el Kimichi, el cual durante su fermentación involucra un valor de pH bajo igual que durante la fermentación del pozol.

Leuc. lactis al igual que *Leuc. mesenteroides subsp. mesenteroides* se identificó a partir de la secuencia de una banda cortada de un gel (muestra del productor 2). Su presencia es constante durante toda la fermentación, en la mayoría de los productores de pozol, tanto en el centro como en la superficie de la bola.

En general estos microorganismos tienen la capacidad de producir pigmentos (Wood, 1995), los cuales en baja proporción podrían estar contribuyendo a proporcionar notas leves de color al producto. Más aún al ser heterofermentativos, producen bióxido de carbono dando un cambio de textura a diversos productos. Por otro lado, se sabe que microorganismos del género *Leuconostoc* producen diacetilo y acetoína a partir de citrato (Wood, 1995). Estos podrían contribuir a dar notas sensoriales de sabor y aroma al pozol, siendo quizás esta característica la más importante en los procesos de fermentación y posiblemente el papel más importante en el pozol. Además se ha reportado la producción de bacteriocinas (Daba, 1991), lo cual puede ser benéfico durante la fermentación para

evitar la incorporación de microorganismos no deseados al actuar como sustancias antibacterianas.

b. 6 Banda 6, no identificada

La banda 6 se detectó de manera esporádica en los productores 2 y 6 con una banda tenue, lo cual impidió que la banda pudiera ser cortada y secuenciada. Al no estar de manera dominante entre las distintas muestras, se le restó importancia, al igual que las bandas 2 y 3. La presencia de estos microorganismos no identificados y que aparecen de manera esporádica, muestran nuevamente la variabilidad existente entre las muestras de pozol.

b.7 Bandas 7 y 15, correspondientes *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* respectivamente.

La banda 7 corresponde a *Lb. plantarum* la cual al presentar co-migración con *Lb. pentosus* se cortó y secuenció, arrojando como resultado la presencia de una secuencia única correspondiente al género *Lactobacillus*. Su co-migración no es un resultado sorprendente pues se ha reportado que existe una alta similitud en sus secuencias y se les ha reportado inclusive como especies sinónimas (Zanoni, 1987).

Lb. plantarum está presente en todas las muestras de pozol, con excepción de las de los productores 3 y 6 en donde no se detecta durante todo el proceso fermentativo. Este microorganismo se detecta particularmente en el centro de la bola durante toda la fermentación y hacia el final de la fermentación en la superficie de la misma. Patrones similares se encuentran con el gen 16S rDNA (Bolaños en 2004), sin embargo en este último trabajo la banda de *Lb. plantarum* tiende a disminuir al final de la fermentación, en contraste con otros alimentos, particularmente de tipo africano, en donde se ha reportado que este microorganismo predomina hasta el final de la fermentación.

Al ser un microorganismo heterofermentativo facultativo, contribuye de manera importante a la producción de ácido láctico y por lo tanto a lograr la acidificación de diversos productos (Stiles, 1997). De ahí su importancia en el pozol, en donde la acidificación quizás sea la función más importante para lograr la calidad sensorial deseada en esta bebida. Más aún este microorganismo ha sido utilizado debido a esta propiedad como un organismo iniciador en un gran número de productos (Stiles, 1995).

La banda 15, fue cortada y secuenciada, encontrando que correspondía a *Lb. fermentum*, Este aparece en los productores 2, 4 y 6, hacia el final de la fermentación, aproximadamente a partir de las 48 horas, tiempo durante el cual es posible que encuentre las condiciones adecuadas para su crecimiento, por lo tanto la cantidad de biomasa producida puede ser suficiente para su detección en los geles DGGE, este microorganismo es considerado como heterofermentativo obligado, que fermenta hexosas a ácido láctico, acético y / o etanol a partir de glucosa, y en trabajos anteriores se ha descrito como una especie importante en la fermentación de alimentos compuestos de masas agrias (Stiles, 1997). Por lo tanto puede contribuir a la acidificación en etapas finales de la fermentación.

Esta especie no había sido previamente reportada en pozol, estudios basados en la secuencia de 16S rDNA han detectado la presencia de *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. alimentarium* y *Lb. delbruekii* (Escalante et al.,2001), sin embargo es importante considerar que la fracción del gen *rpoB* a secuenciar es pequeña y que puede haber ciertos errores en la identificación aún cuando el porcentaje de identidad sea adecuado.

Es importante mencionar que, en general, el género *Lactobacillus* se reporta como un de los microorganismos más importantes en las fermentaciones (Figueroa, 1987), sin embargo en el pozol aún cuando está presente no parece ser el de más importancia, si se compara con la detección de otros microorganismos como *S. infantarius* o *W. confusa*.

b.8 Banda 10, correspondiente a *Weissella confusa*

La banda 10 se identificó como *W. confusa*, la cual había sido previamente identificada con la secuencia del gen ribosomal 16S rDNA (Bolaños, 2004). Fue cortada y secuenciada para confirmar su identificación debido a que presenta en todos los casos una fuerte intensidad. Esto sugería una co-migración con algún microorganismo que intensificara la banda por existir más de un fragmento correspondiente a un microorganismo; sin embargo los resultados de la secuenciación demostraron la presencia de un gene amplificado.

En el caso del pozol, su presencia se detecta en todos los productores y lo hace durante toda la fermentación, tanto en el centro como en la superficie de la bola, siendo al igual

que *S. infantarius* un microorganismo predominante en la fermentación. Las excepciones fueron las muestras de los productores 4 y 5 en donde no se detectó en ningún tiempo de la fermentación, que puede deberse ciertamente a problemas de amplificación preferencial o bien a que no se estableció durante la elaboración del pozol.

Sin embargo *W. confusa* aún ante el problema de amplificación preferencial que presentó cuando *S. infantarius* estaba presente en la misma reacción de amplificación, la banda de este microorganismo muestra una intensidad en varios casos es mayor a la presentada por *S. infantarius*. Sin embargo sería importante mencionar que las condiciones de amplificación son distintas cuando se tienen tres templados conocidos de DNA en una reacción que cuando se trabaja con un sistema en donde el contenido y concentración de cada uno de los templados de DNA es incierto, como en el caso del pozol. Por lo tanto no sería posible asegurar que en esta matriz se tuvo el mismo problema durante la amplificación.

Este microorganismo ha sido encontrado en varios procesos de fermentación, tales como jugo, Tapai, Chili, Kimichi y atole, y aún cuando no se ha establecido cuál es su importancia se ha encontrado ampliamente en estos productos y por lo tanto se cree juega un papel importante durante la fermentación (Lee, 2005). Ampe y col. en 2000, también reportaron su presencia en el pozol. Los trabajos reportados a partir de la secuencia del gen ribosomal 16S rDNA por Bolaños en 2004, muestran resultados semejantes con la presencia de *Weisella* en el pozol. Esto podría significar que podría ser posible la producción de otros productos además del ácido láctico para contribuir al incremento de las características sensoriales del pozol.

Aún así no se reconoce el papel de este microorganismo en las fermentaciones. Se sabe que es una bacteria láctica heterofermentativa y capaz de vivir en condiciones de pH bajo y ha mostrado estar fuertemente relacionado con microorganismos del género *Leuconostoc* (Collins et al., 1993).

b.9 Banda11, correspondiente a *Lactococcus raffinolactis*

La banda 11 corresponde a *Lact. raffinolactis*, la cual fue identificada en las muestras de pozol, por medio del patrón de bandas y previamente fue identificada con la secuencia del gen ribosomal 16S rDNA (Bolaños, 2004).

La presencia de esta banda fue prevalente en los productores 4 y 6 durante toda la fermentación tanto en el centro como en la superficie de la bola y solamente se localizó en la masa recién molida en el productor 2. Estudios previos sobre el pozol concuerdan también con la presencia de este microorganismo en el producto, reportándolo en algunos casos como un género dominante durante el inicio de la fermentación como es el caso del productor 2 (Nuraida et al. 1995, Escalante et al., 2001, Bolaños, 2004).

Se sabe que los microorganismos del género *Lactococcus* son cocos homofermentativos productores de ácido láctico a partir de glucosa (Stiles, 1997), por lo tanto tendrían un papel importante en la acidificación del pozol. Stiles, también reporta su función antibacteriana a través de la producción de bacteriocinas, particularmente nisina, que sería de importancia en la inhibición de patógenos en el pozol.

Otro punto importante es que posee la capacidad de producción de ácido a partir del almidón, (Wood, 1995) que como se mencionó anteriormente es una fuente de carbono mayoritaria en el pozol.

b. 10 Banda 12, correspondiente a *Pediococcus dextrinicus*

La identificación de este microorganismo se realizó mediante el corte y posterior secuenciación de una banda, sin embargo después de analizarse por el servicio BLAST, se identificó como *P. dextrinicus* con un porcentaje de identidad de 92%. Este porcentaje es bajo, por lo que su identificación podría ser dudosa respecto a la especie, la cual no había sido reportada previamente en el pozol. Como se mencionó anteriormente la base de datos para el gen es aún limitada, por lo cual aún cuando su identificación como especie con es segura, podría hablarse de la presencia del género *Pediococcus* en las muestras de pozol.

Este género se detectó para los productores 1, 4 y 5 particularmente en el centro de la bola de pozol y después de las 24 horas de la fermentación. En los demás productores no se detectó en ningún tiempo de fermentación. Se detecta levemente en el centro de la bola de pozol a partir de las 48 horas de fermentación y se intensifica la banda en los tiempos finales de la fermentación. Esto podría tener lugar porque tanto las condiciones de limitación de oxígeno presentes en el centro de la bola así como las condiciones de pH

fueran más adecuadas para éste microorganismo que permite su detección hacia el final de la fermentación.

b. 11 Banda 14, correspondiente a *Paenibacillus amylolyticus*

La banda 14 fue cortada y secuenciada a partir de un gel de DGGE. Esta banda solo fue detectada en la muestra del productor 3 durante el tiempo cero de la fermentación, después ya no es detectable indicando que no encontró condiciones adecuadas para su establecimiento. Al detectarse en un productor sólo se atribuye su presencia como parte de la variabilidad existente entre los diversos productores, pero no parece tener importancia en la fermentación como un microorganismo dominante.

Sin embargo es importante mencionar que en un trabajo previo elaborado por Rivera en 2001, se demostró que microorganismos de esta especie pueden ser aislados del pozol sólo al inicio de la fermentación y que debido a la disminución de pH, estos microorganismos ya no son capaces de desarrollarse posteriormente y quizás sea la razón por la cual solo se detectó la banda al tiempo cero de la fermentación.

Este género ha sido encontrado en heces fecales de vacunos (Faria, 2005), por lo cual su presencia puede deberse a una contaminación durante el proceso de producción.

C. Análisis de la comunidad microbiana en los diferentes productores de pozol

A continuación se describe brevemente cómo se llevó a cabo el establecimiento de la microbiota durante el proceso de fermentación entre los diferentes productores, también se hace énfasis en el índice de riqueza, descrito como el número de bandas encontradas para cada muestra de pozol y finalmente se indica qué microorganismos, por ser dominantes, podrían ser los más importantes durante el proceso fermentativo. Nuevamente se hace referencia a las figuras 7.11 y 7.12 de esta sección.

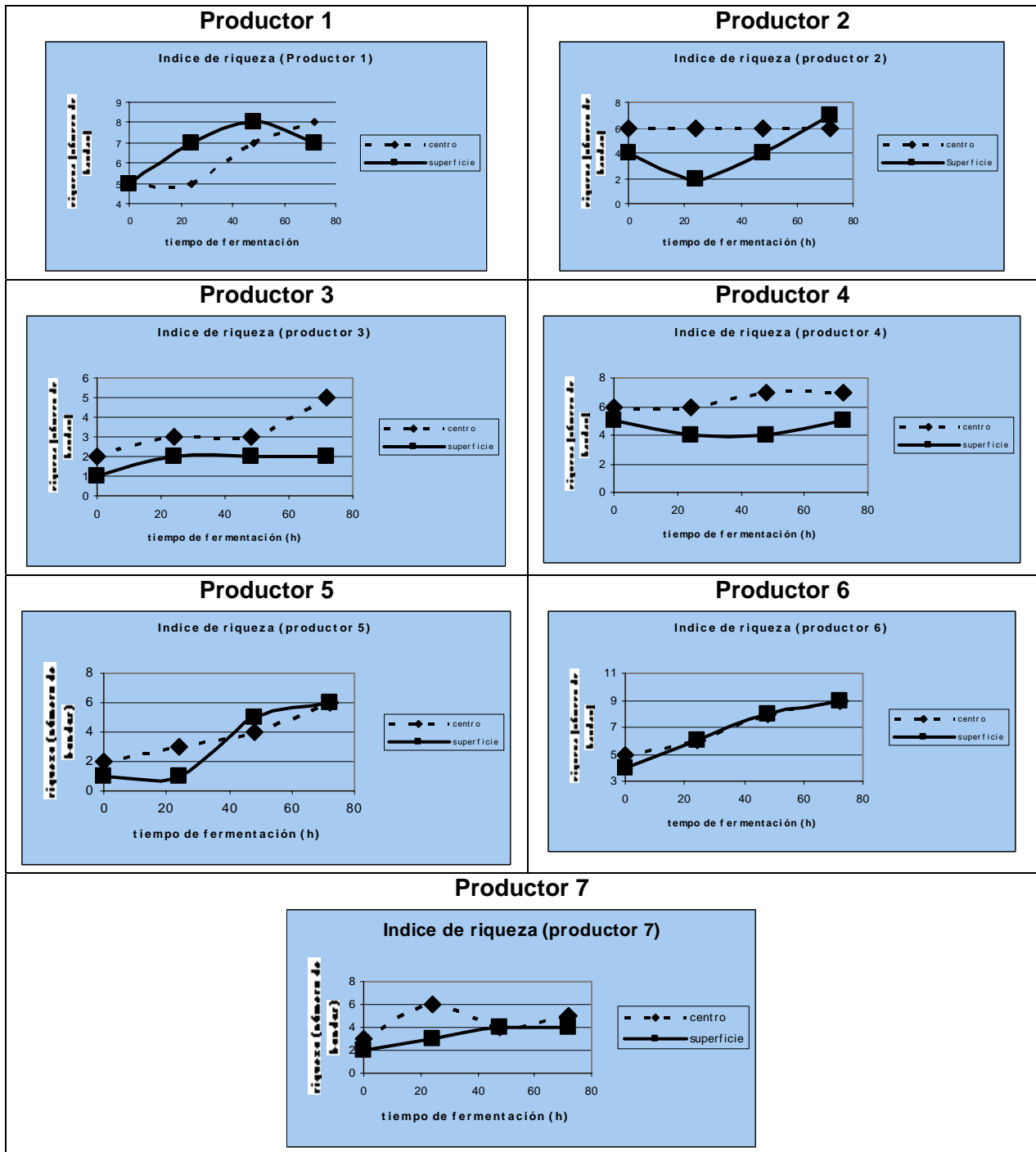


Figura 7.13. Índice de riqueza a diferentes tiempos de fermentación, en el centro y en la superficie de la bola de pozo, para los siete diferentes productores.

c. 1. Productor 1. Localización de la muestra: Primer piso del mercado donde se realizó el muestreo.

En las muestras de este productor desde el inicio de la fermentación, se observa el establecimiento de las bacterias correspondientes a las bandas 1, 2, 4, 9 y 10 las cuales se mantienen durante todo el proceso fermentativo, por lo que parecen entonces jugar un papel importante durante toda la fermentación de la bola de pozol para el productor.

Respecto al índice de riqueza mostrado en la figura 7.13, considerado como el número de bandas, se encuentra en general, que en la superficie de la bola es mayor que en el centro. Es posible que en el centro exista limitación de oxígeno (Nuraida, 1995), lo que da lugar a una menor variedad de microorganismos en la superficie de la bola.

En el centro de la bola se aprecia el mismo número de bandas hasta las 24 horas de fermentación, mostrando un importante incremento durante las siguientes etapas de fermentación. Ahora bien, en el caso de la superficie se aprecia que el índice de riqueza se mantiene constante durante toda la fermentación y aumenta sólo hasta después de las 72 horas.

c. 2 Productor 2. Localización de la muestra: Pasillo del mercado

Es posible apreciar a simple vista en la figura 7.11, un menor número de bandas en la superficie de la bola de pozol con respecto al centro, más aún si se aprecia la figura 7.13 que muestra el índice de riqueza para el productor 2. La gráfica correspondiente al centro de la bola se localiza por arriba. Esto podría indicar que el establecimiento de una microbiota se logró de mejor manera en el centro de la bola que en la superficie, ya que en esta última se observa además de un menor número de microorganismos una variación no uniforme en el establecimiento de la microbiota. Esto se aprecia con una oscilación importante en los índices de riqueza.

Leuc. lactis y *W. confusa* son predominantes. La presencia de la banda 11 correspondiente a *Lact. raffinolactis* ocurre solamente en la masa recién molida y después ya no es detectada, lo que da lugar a sugerir que para éste productor la carga microbiana de este microorganismo no fue suficiente o bien no encontró las condiciones adecuadas para su desarrollo.

c. 3 Productor 3. Localización de la muestra: Pasillo del mercado

A diferencia de los productores 1 y 2 el número de bandas detectado es considerablemente menor sobretodo en las muestras provenientes de la superficie de la bola de pozol. Mas aún en la gráfica que representa el índice de riqueza (figura 7.13, productor 3), es posible apreciar que éste tiende a aumentar y mantenerse después constante en el centro de la bola y en la superficie presenta fuertes variaciones lo que da lugar a especular que al igual que en este productor hubo dificultad para establecer una diversidad bacteriana adecuada durante el proceso de fermentación.

En este caso la presencia de *S. infantarius* solo se localiza en el centro de la bola, aumentando su intensidad hacia el final de la fermentación. En el caso de la superficie sólo se localiza hacia el final de la misma. El mismo comportamiento se apreció para el productor 2 en la superficie de la bola. Esto indica que es capaz de desarrollarse a partir de cuentas muy bajas y corrobora también la resistencia de esta especie a pesar de la disminución de pH (aproximadamente 4) de la masa (Díaz, 2003).

Las especies que parecen ser predominantes durante toda la fermentación, corresponden a *Leuc. lactis* y *W. confusa* identificadas como las bandas 9 y 10 respectivamente, en el caso de *Leuc. lactis* la intensidad de la banda obtenida es constante durante toda la fermentación tanto en el centro como en la superficie de la bola, en cambio para *W. confusa* se aprecia una banda poco intensa al tiempo cero de la fermentación y se intensifica a partir de las 24 horas y hasta el final de la misma.

c. 4 Productor 4. Localización de la muestra: Pasillo del mercado , elaboración de su propio nixtamal

En la figura 7.13, correspondiente al índice de riqueza de las muestras del productor 4 correspondiente al índice de riqueza, en el centro tienen mayor riqueza que en la superficie, a diferencia de los productores 2 y 3 existe un aumento en el índice de riqueza a medida que aumenta el tiempo de fermentación. Más aún es posible apreciar un establecimiento de una flora microbiana desde tiempos iniciales de la fermentación sobre todo en el centro de la bola. Esto puede deberse al origen de la muestra que aún cuando se hayan detectado especies similares a las de otros productores, es posible que el origen del nixtamal así como la elaboración del productor influya en el número de

microorganismos que ingresaron durante el proceso, lo que le permitió adquirir este patrón particular.

Las bandas que aparecen predominantemente durante toda la fermentación y desde la masa recién molida corresponden a *Leuc. lactis* y *Lact. raffinolactis* (bandas 9 y 11). En el caso de *Leuc. lactis* su intensidad es constante en la superficie de la bola pero en centro la intensidad de la banda es menor en etapas iniciales de la fermentación y aumenta a lo largo del proceso de fermentación. Puede ser de importancia considerar nuevamente que al presentarse microorganismos con estas características que no están presentes en otros productores, indicaría que existe una variación respecto al tipo de producto obtenido en lo que a su función y beneficios se refiere.

Para este productor no se detectó a *W. confusa* que había aparecido predominantemente en otros productores. Se obtuvieron resultados similares para este productor en los estudios realizados por Bolaños en 2004 con el gen ribosomal 16S rDNA.

c. 5 Productor 5. Localización de la muestra: Pasillo del mercado

La figura 7.13 para el productor 5 muestra la representación del índice de riqueza . En este caso, se aprecia que tanto en el centro como en la superficie de la bola, el índice de riqueza tiende a aumentar a medida que aumenta el tiempo de fermentación. Por otro lado la riqueza en el centro es mayor durante las primeras 24 horas de fermentación pero después de este tiempo el índice de riqueza para la superficie de la bola de pozol aumenta con respecto a la del centro.

Para este productor se aprecia la presencia de *Leuconostoc citreum* (banda 5) que no había sido detectada en productores anteriores. Su presencia muestra el mismo patrón observado para *S. infantarius*. Como se había mencionado anteriormente su presencia no es de extrañarse en alimentos fermentados, (Lee, 2005) y había sido previamente encontrada en el pozol, (Ampe, 1999) al igual que otras especies de este mismo género, parecen tener un papel importante en el proceso fermentativo en la producción de elementos importantes para las características de sabor y aroma del producto.

c. 6 Productor 6. Localización de la muestra: Pasillo del mercado

La figura 7.13 para el productor 6 muestra la representación del índice de riqueza. Quizás de todos los productores analizados en este estudio este productor fue quien presentó la mayor variedad de microorganismos y el establecimiento constante de especies durante todo el proceso de fermentación. Esto indica que aún cuando varias muestras provengan del mismo lugar donde se elaboró el nixtamal, la manufactura del producto influye en la introducción de microorganismos a distinto nivel dando lugar a una microbiota variada y compleja entre los distintos productores.

En este caso el índice de riqueza en la superficie y en el centro aumenta a medida que transcurre el proceso de fermentación. Más aún, el centro y la superficie de la bola, mantienen índices de riqueza similares a partir de las 24 horas de iniciada la fermentación.

En este caso la detección de las bandas 1, 4, 5, 9, 10 y 11 correspondientes a *E. faecium*, *S. infantarius*, *Leuc. citreum*, *Leuc. lactis*, *W. confusa* y *L. raffinolactis* es constante durante toda la fermentación, siendo detectadas desde la masa recién molida con excepción de *Leuc. citreum* y *L. raffinolactis* que se detectan sólo hasta el inicio de la fermentación. Esto sugiere que el establecimiento de una microbiota básica se logró desde el inicio del proceso fermentativo.

b. 7 Productor 7. Localización de la muestra: pozolería “La fuente”

A diferencia de otros productores, el índice de riqueza que se observa en la figura 7.13 para el productor 7 muestra una disminución a medida que transcurre el proceso de fermentación, cabe mencionar que a diferencia de los demás productores el lugar de muestreo de este productor fue distinto, pues no estaba en el mercado, sino en una pozolería. Lo que pudo influir en este comportamiento, no solo porque el origen del nixtamal es distinto sino también porque el procedimiento y lugar de elaboración es de diferente.

Al igual que lo descrito para el productor 6, las bandas 4, 9 y 10 correspondientes a *S. infantarius*, *Leuc. lactis* y *W. confusa* se detectan desde la masa recién molida y durante todo el proceso de fermentación tanto en el centro como en la superficie de la bola contribuyendo a la suposición del ingreso de estos microorganismos desde el proceso de

molienda. Esto difiere de lo que ocurre con *Leuc. citreum*, el cual se detecta una vez que ha comenzado el proceso de fermentación dando lugar a suponer, que en este caso, su incorporación ocurre en el proceso de elaboración de la bola. Por otro lado es importante mencionar que una vez establecido, se mantiene a lo largo de todo el proceso fermentativo en la superficie de la bola y hasta las 24 horas de fermentación en la superficie.

En general el índice de riqueza determinado en las muestras de pozol de todos los productores es muy variables no hay una constante que permita decir si en el centro o en la superficie es mayor y esto puede ser debido a la gran variabilidad entre los microorganismos presentes en el pozol y la posible dinámica de fermentación en la bola de pozol.

D. Análisis de las comunidades microbianas de pozol, en los distintos tiempos de fermentación en el centro y superficie de la bola de pozol

Una vez descritos los microorganismos encontrados en cada uno de los productores así como la posible funcionalidad de cada uno de los microorganismos detectados en las muestras analizadas por los distintos productores, se describen a continuación el comportamiento encontrado entre los diferentes productores. Esto permitió conocer qué tan relacionados se encuentran éstos, considerando que al menos el proceso de elaboración de la bola de pozol varió entre los distintos productores además de conocer como se agrupan bajo diferentes tiempos de fermentación y conocer que microorganismos predominan en estas distintas etapas.

d.1 Masa recién molida

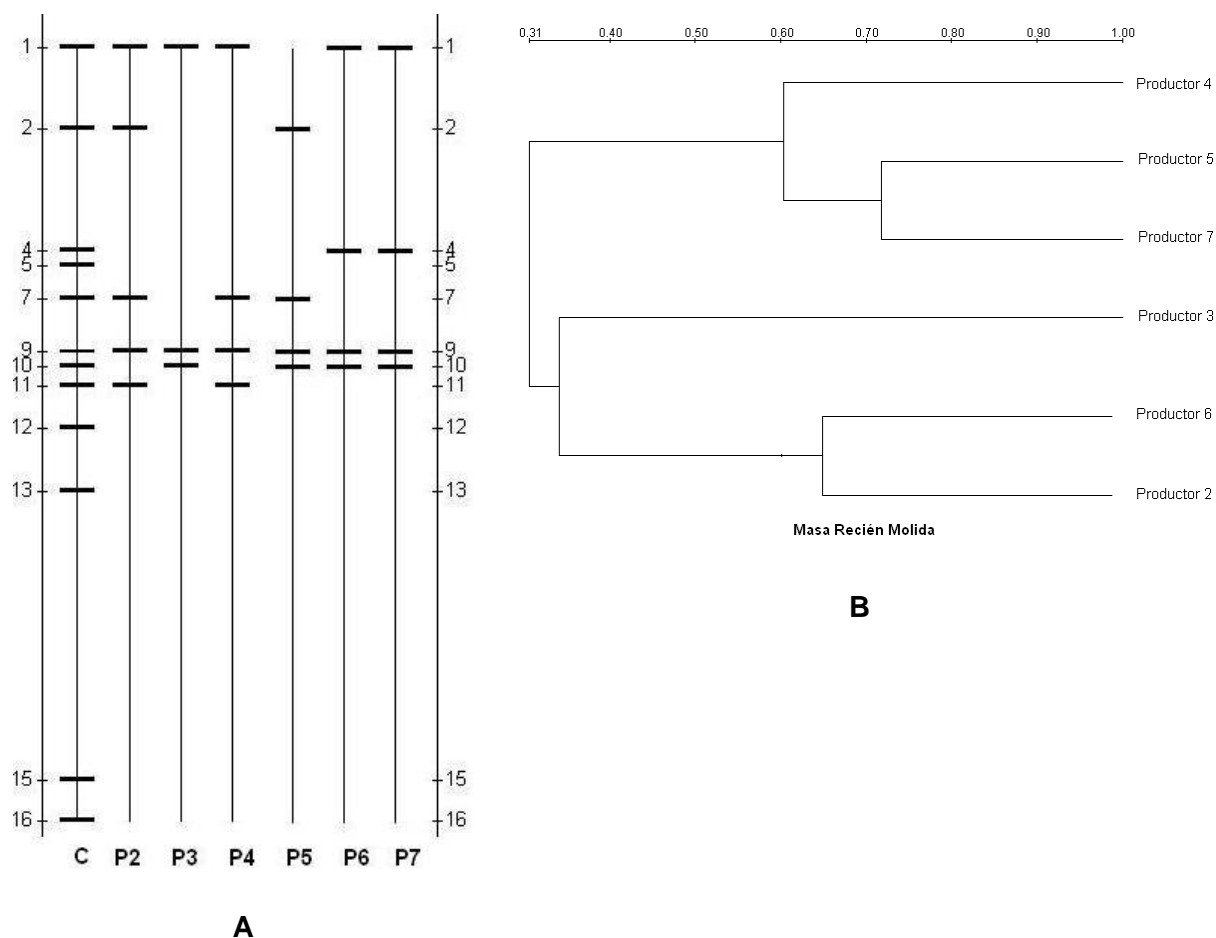


Figura 7.14. A Digitalización del patrón de bandas obtenido por PCR-DGGE para la masa recién molida para los distintos productores. **B.** Dendrograma construido a partir del método UPGMA para las muestras de pozol, de los patrones de bandas del pozol obtenidas a partir del coeficiente de similitud de Dice.

De acuerdo con los patrones de bandas obtenidos de los distintos productores, se observa una agrupación de los perfiles electroforéticos de los productores 5 y 7 de los cuales no se esperaría agrupación si se consideran que se encontraban en sitios distintos, sin embargo por el número de bandas que muestran además de su intensidad inferirse esta agrupación. En el caso de los productores 2 y 6, los perfiles electroforéticos también se encuentran agrupados, los perfiles de los productores 3 y 4 no se agrupan, indicando una alta variabilidad entre las muestras. Esto sugiere que la introducción de

microorganismos sucede después de la molienda ya que los productores 2, 3 y 5 usaron el mismo molino y tienen perfiles electroforéticos no relacionados.

Con excepción de la muestra del productor 5, *E. faecium* (banda 1) fue detectado en todos los productores. Infiriendo que su introducción al producto se lleva a cabo durante la elaboración de la masa. Lo mismo ocurre con *Leuc. lactis*, sin embargo para el caso de *S. infantarius* sólo se detecta en los productores 6 y 7, que es justamente en los productores donde aparece de manera dominante durante toda la fermentación. Por lo tanto sería posible considerar que de estar presente este microorganismo en una concentración mayor desde antes de la elaboración de la bola de pozol, se estableciera mejor. Como se describió en el análisis por productores, cuando éste no estuvo presente en la masa recién molida su detección es, en la mayoría de los casos, posible hasta etapas más tardías de la fermentación. Por lo tanto si se desarrolla a partir de cuentas bajas (no detectables) puede poseer alguna ventaja ecológica.

d. 2. Fermentación al tiempo cero

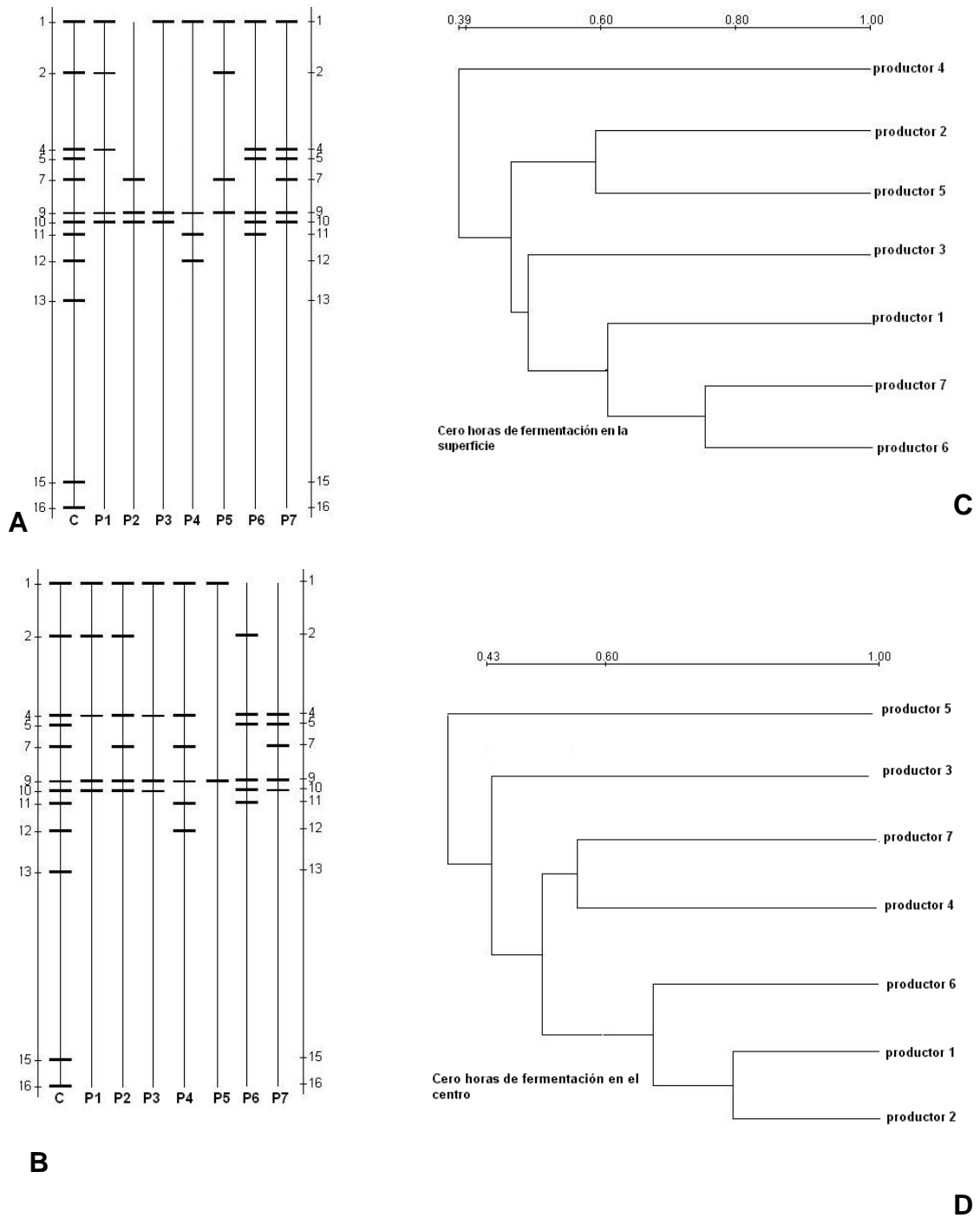


Figura 7.15. A y B Digitalización del patrón de bandas obtenido por PCR-DGGE para el tiempo cero de fermentación en la superficie y centro de la bola de pozol respectivamente. **C y D** Dendrogramas construidos a partir del método UPGMA para las muestras de pozol al tiempo cero de la fermentación, de los patrones de bandas del pozol obtenidas a partir del coeficiente de similitud de Dice para el tiempo cero de fermentación en la superficie y centro de la bola de pozol respectivamente.

Analizando la figura 7.15 es posible apreciar que el establecimiento de *E. faecium*, *Leuc. lactis* y *W. confusa* (bandas 1, 9 y 10 respectivamente) se logra al inicio de fermentación tanto en el centro como en la superficie de la bola. Para este tiempo de fermentación, *S. infantarius* (banda 4) se detectó en el centro de la bola en los perfiles de bandas de las muestras de pozol, indicando que su establecimiento se ve más favorecido en el centro que en la superficie durante etapas iniciales de fermentación. Considerando su función amilolítica, este dato es importante pues quizás gracias a esto, es posible la liberación de azúcares más sencillos que permitan un posterior establecimiento de diferentes especies.

De la superficie de la bola de pozol los perfiles electroforéticos de las muestras de los productores 3 y 4 no mostraron ninguna agrupación como se mostró para la masa recién molida. Al igual que éstos, el productor 1 tampoco logra ninguna asociación con ningún productor. Que la agrupación no se dé en estas primeras etapas es de esperarse pues posiblemente no ha sido posible un tiempo suficiente para el establecimiento de una flora más uniforme que permitiera una asociación.

En la superficie de la bola de pozol, los perfiles electroforéticos de las muestras correspondientes a los productores 2 y 5 forman un grupo al compartir las mismas especies con excepción de *Weisella*, entre las muestra de los productores 7 y 6 también se forma un grupo el cual a su vez se agrupa con el perfil electroforético del productor 1, debido a que los dos primeros comparten también en común distintas especies, aunque el productor 1 no contiene *Leuc. citreum* que lo separa del grupo.

En el centro, en cambio, no se mantiene la misma agrupación, por el contrario en este caso se agrupan los perfiles electroforéticos de los productores 7 y 4 formando un grupo y los perfiles de las muestras de los productores 1 y 2 que a su vez forman un grupo con el productor 6. En la masa recién molida los productores 7 y 4 se encontraban ya cercanos aunque no agrupados tal cual. Lo mismo ocurre entre los perfiles de los productores 6 y 2 que sí formaban un grupo en la masa recién molida y aunque se pierde la agrupación al inicio de la fermentación permanecen cercanos. Los perfiles electroforéticos de las muestras de los productores 3 y 5 permaneció sin agruparse.

d. 3 Fermentación a las 24 horas

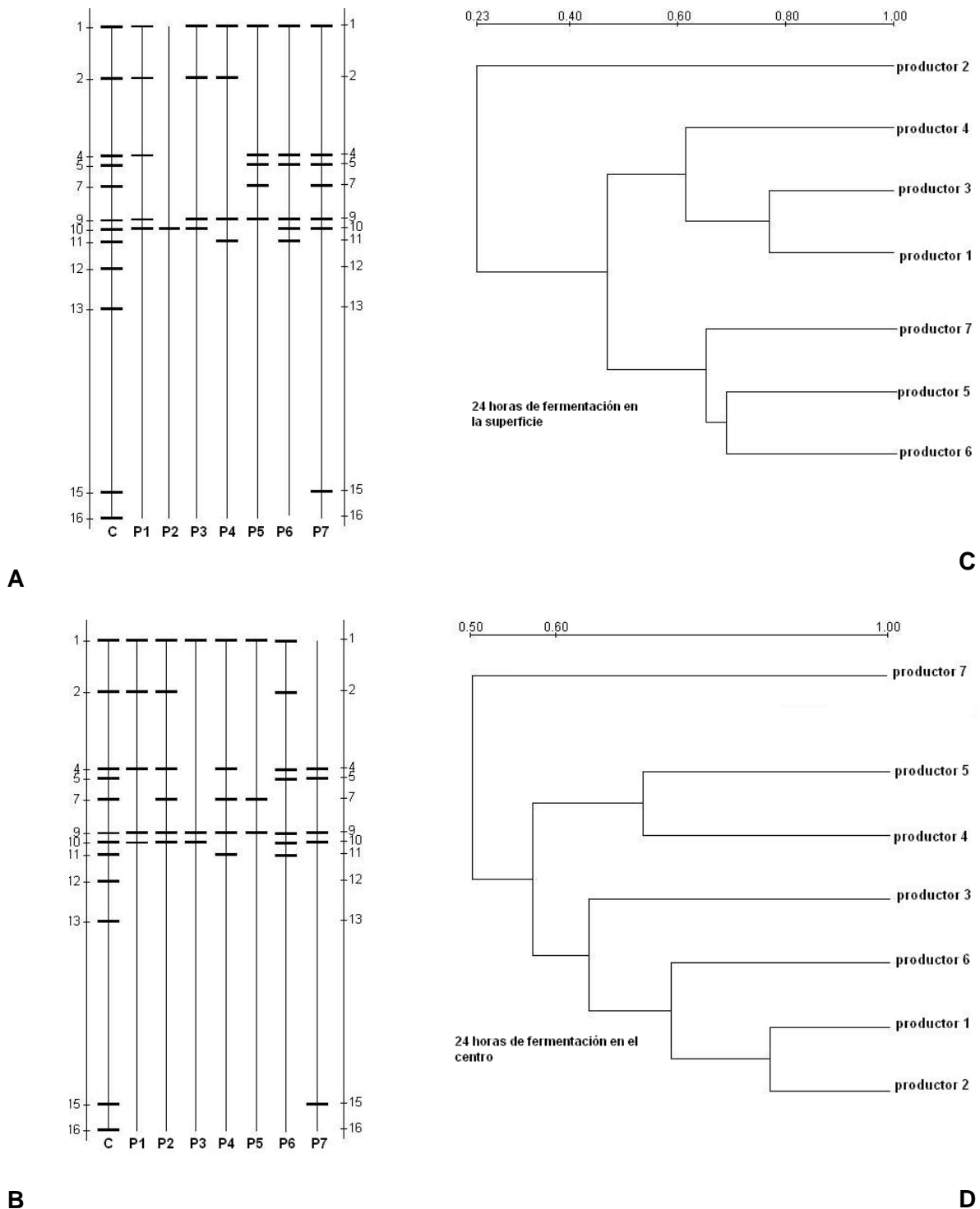


Figura 7.16. A y B Digitalización del patrón de bandas obtenido por PCR-DGGE para las 24 horas de fermentación en la superficie y centro de la bola de pozo respectivamente. **C y D** Dendrogramas construidos a partir del método UPGMA para las muestras de pozo a las 24 horas de la fermentación, de los patrones de bandas del pozo obtenidas a partir del coeficiente de similitud de Dice.

Si se analiza la figura 7.16 es posible visualizar un establecimiento de *E. faecium*, *S. infantarius*, *Leuc. lactis* y *Weisella* al menos en el centro de la bola de pozol después de 24 horas de fermentación.

Al igual que en los datos reportados por Bolaños en 2003 a través del análisis de estas comunidades con el gen ribosomal 16S rDNA , se obtuvieron asociaciones semejantes o al menos cercanas entre las poblaciones bacterianas del pozol de los distintos productores.

En el caso de la superficie de la bola el perfil electroforético de la muestra del productor 2 que permanecía agrupado con el perfil del productor 5 pierde su agrupación, pero se mantiene cercano al grupo formado por perfiles electroforéticos de los productores 1 y 3. Estos a su vez forman un grupo con el perfil electroforético de la muestra del productor 4 quienes comparten las bandas representadas por los mismos microorganismos, con excepción de la banda representada por *W. confusa* ausente en el productor 4.

Así mismo los perfiles electroforéticos de las muestras de los productores 5 y 6 forman un grupo el cual también se agrupa con el perfil de la muestra del productor 7 quienes comparten los mismos microorganismos presentando variaciones por la ausencia de *Lb. plantarum* en el perfil del productor 6 y la ausencia de *W. confusa* en el perfil de la muestra de productor 5.

Ahora bien, en el centro de la bola de pozol, la agrupación es diferente, aún cuando los perfiles electroforéticos de las muestras de los productores 7, 6 y 5 se mantienen cercanos como en la superficie ahora la agrupación se da entre los perfiles electroforéticos de las muestras de los productores 6 y 7 y el perfil de la muestra del productor 5 se agrupa ahora con el perfil de la muestra del productor 4 que entre sí comparten tres especies similares. Los perfiles electroforéticos de las muestras de los productores 1 y 2 se agrupan al compartir todas sus bandas con excepción de *Lb. plantarum* ausente en la muestra del productor 1 y junto con la muestra del productor 6 forman otro grupo separándose quizás por la presencia de *L. raffinolactis* ausente en las muestras de los productores 1 y 2. El perfil electroforético de la muestra productor 3 no mostró ninguna agrupación con algún productor aunque se mantiene cercano con el productor 6 como en la superficie de la bola.

En general se aprecia una mayor asociación entre los diferentes perfiles de las muestras de los distintos productores a la descrita en la masa recién molida y al tiempo cero de la fermentación, indicando que a partir de las 24 horas de fermentación, es posible el inicio de la estructuración de una microbiota en el pozol.

d. 4 Fermentación a las 48 horas

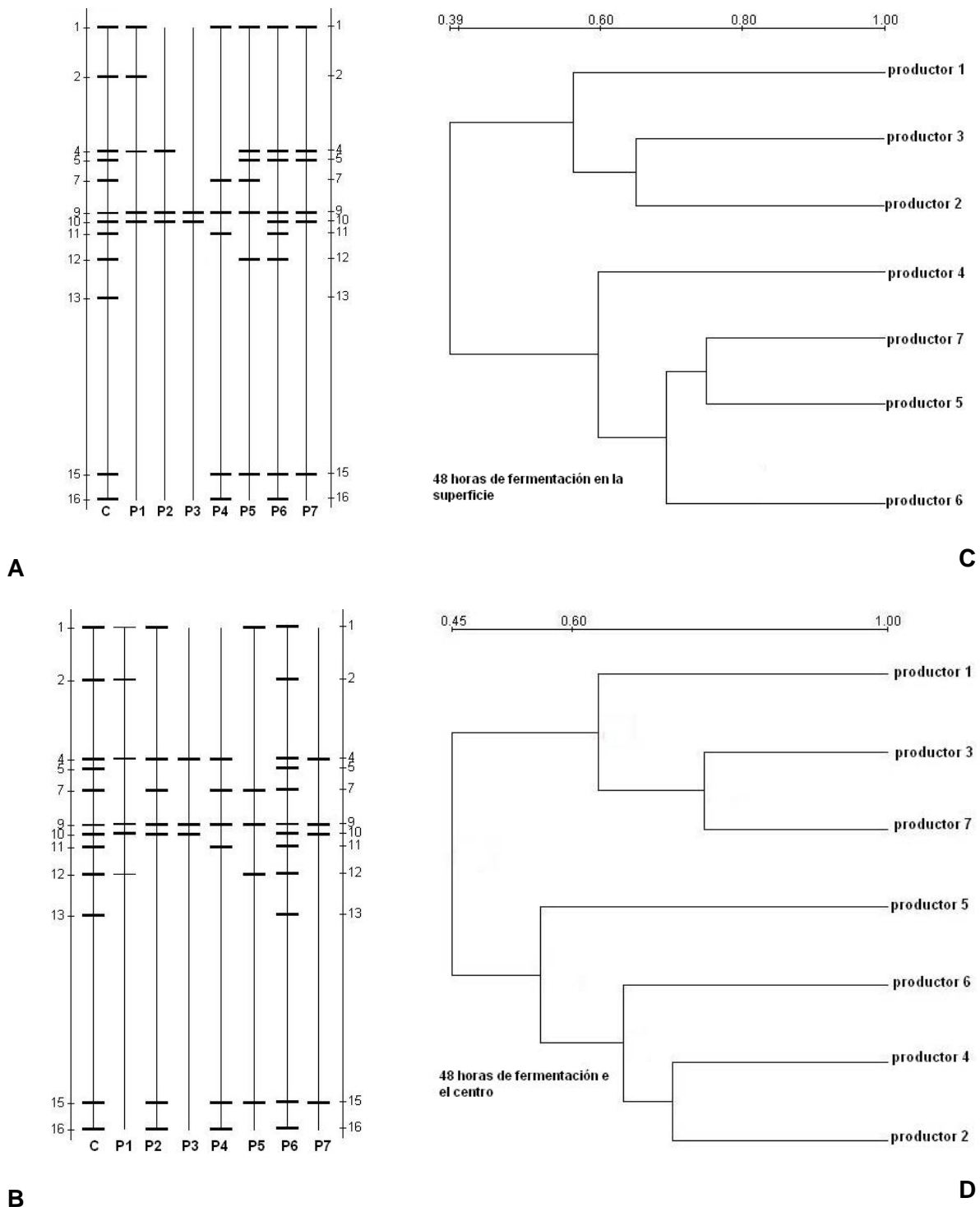


Figura 7.17. A y B Digitalización del patrón de bandas obtenido por PCR-DGGE para las 48 horas de fermentación en la superficie y centro de la bola de pozol respectivamente. **C y D** Dendrogramas construidos a partir del método UPGMA para las muestras de pozol a las 48 horas

de la fermentación, de los patrones de bandas del pozol obtenidas a partir del coeficiente de similitud de Dice.

Las bandas y la agrupación de las mismas a las 48 horas de fermentación se presentan en la figura 7.17. En este caso vemos un claro establecimiento de *S. infantarius*, *W. confusa*, *Leuc. lactis*, *Lb. fermentum* y *Leuc. mesenteroides subsp mesenteroides* en el centro y la superficie de la bola de pozol, así mismo la detección de *Lb. plantarum* se hace evidente en los productores en donde fueron detectados estos microorganismos dando lugar a una microbiota más estructurada. Por el contrario en el centro de la bola comienza a disminuir la detección de *E. faecium* o bien ya no es detectada entre los diversos productores. Es posible apreciar bandas aisladas que aparecen entre los diferentes productores que quizás en etapas posteriores de la fermentación comienzan a encontrar condiciones más favorables para su desarrollo.

Respecto a su agrupación, los resultados obtenidos para la superficie son semejantes a los encontrados por Bolaños en 2004, sin embargo para el centro de la bola de pozol existen varias diferencias respecto al tipo de agrupación encontrada.

En el caso de la superficie los perfiles electroforéticos de las muestras de los productores 1 y 3 siguen permaneciendo cercanos aunque pierden su agrupación pues la muestra del productor 3 se agrupa ahora con el perfil de la muestra del productor 2. Así mismo el perfil electroforético de la muestra del productor 1 sigue sin mantener agrupación cercana con muestras de algún otro productor aun cuando mantiene su cercanía con la muestra del productor 2. Los perfiles electroforéticos de las muestras de los productores 5 y 7 se agrupan y también mantienen su cercanía como lo hicieron a las 24 horas de fermentación y éstos a su vez forman un grupo con la muestra del productor 6 quien permanecía agrupado en el tiempo de fermentación anterior al perfil electroforéticos de la muestra del productor 5.

En el centro, la agrupación sigue siendo distinta respecto a la superficie; el perfil de la muestra del productor 1 pierde su agrupación con la muestra del productor 2 (descrita a las 24 horas de fermentación) y forma un grupo con las muestras de los productores 3 y 7 cuya agrupación también es nueva y es básicamente debida a que en ambos casos el índice de riqueza disminuyó y mantuvo especies de microorganismos similares en ambos productores. El perfil electroforético de la muestra del productor 5 aún cuando sigue permaneciendo cercano a las muestras de los productores 6 y 7 pierde su agrupación sin

formar parte de ningún grupo. Por otro lado se forma un grupo entre las muestras de los productores 2 y 4 que forman un grupo mas con la muestra del productor 6.

En ambos casos nuevamente aumenta la agrupación entre los diversos productores con respecto a las agrupaciones descritas en tiempos anteriores de fermentación posiblemente debido a un mejor establecimiento de la microbiota específica del pozol.

d. 5 Fermentación a las 72 horas de fermentación

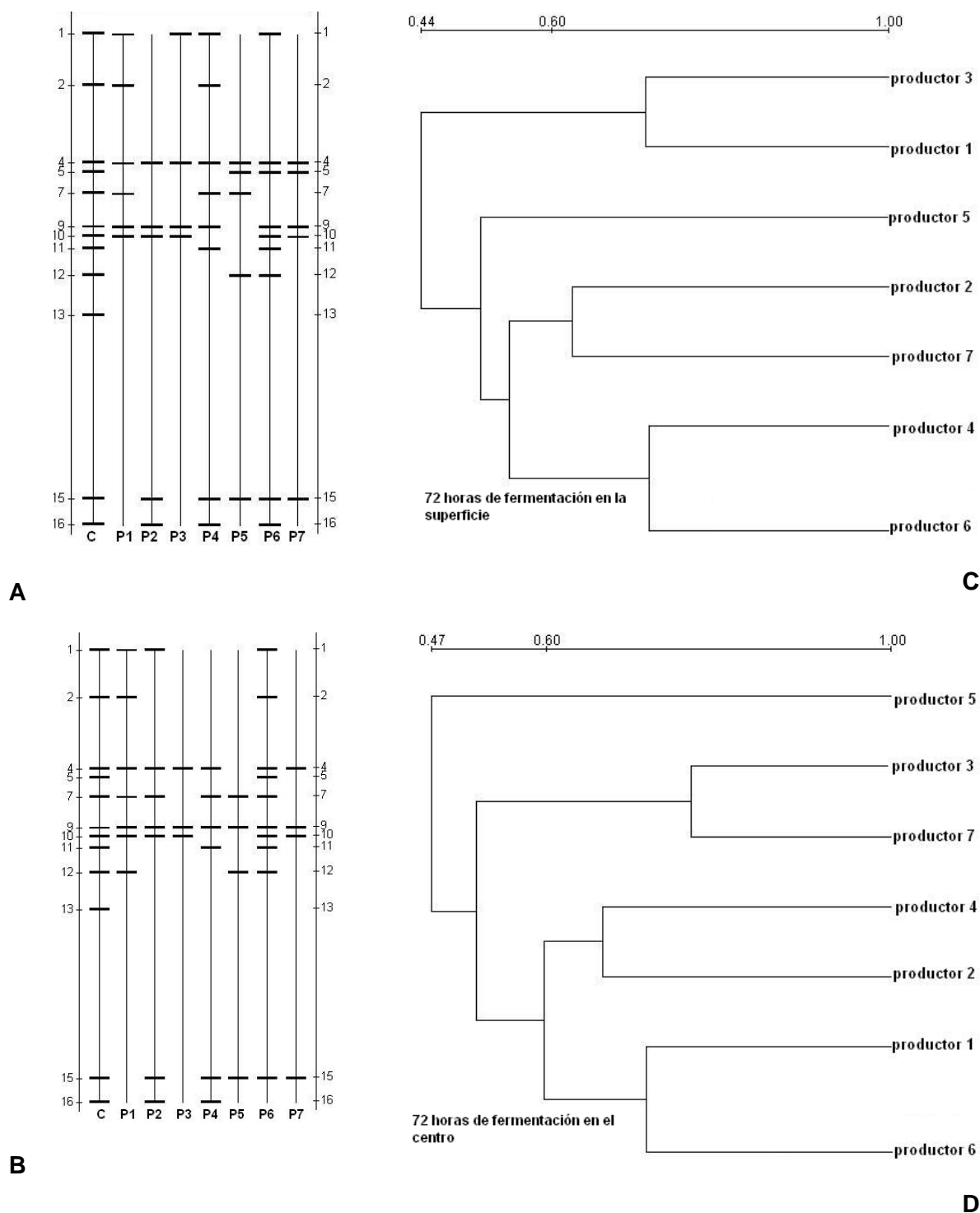


Figura 7.18. A y B Digitalización del patrón de bandas obtenido por PCR-DGGE para las 72 horas de fermentación en la superficie y centro de la bola de pozo respectivamente. **C y D** Dendrogramas construidos a partir del método UPGMA para las muestras de pozo a las 72 horas de la fermentación, de los patrones de bandas del pozo obtenidas a partir del coeficiente de similitud de Dice.

La figura 7.18 describe bandas y la agrupación de las mismas a las 72 horas de fermentación.

El establecimiento de las especies microbianas encontradas a este tiempo de fermentación mantiene el patrón descrito para las 48 horas de fermentación, indicando entonces que a partir de este tiempo la microbiota se establece de manera que se mantiene durante el resto de la fermentación, al menos hasta 72 horas.

Respecto a la agrupación los resultados obtenidos son semejantes a los encontrados por Bolaños, 2003 tanto en centro como en la superficie de la bola de pozol. El hecho de haber encontrado similitudes respecto a estos resultados es importante pues indica que el estudio de la ecología microbiana en un producto con microbiota compleja como el pozol con 16S rDNA respecto al *rpoB* aún cuando puede haber variaciones respecto al tipo de especies encontradas, los géneros y las agrupaciones se mantuvieron en la mayoría de los casos.

Para este tiempo de fermentación en la superficie de la bola de pozol, se aprecia que los perfiles electroforéticos de las muestras de los productores 1 y 3 forman un grupo, siendo que mantenían una cercanía aunque no agrupación a las 48 horas de la fermentación. Así mismo los perfiles de las muestras de los productores 5 y 7 siguen manteniendo una cercanía, sin embargo se desagruparon, agrupándose ahora la muestra del productor 7 con la muestra del productor 2. Y la muestra del productor 4 forma ahora un grupo con el perfil electroforético de la muestra del productor 6 perdiendo su cercanía con la muestra del productor 2.

En el centro de la bola, la muestra del productor 5 sigue sin agruparse, aunque mantienen su cercanía con las muestras de los productores 3 y 7 quienes a su vez siguen formando un grupo. Los perfiles electroforéticos de las muestras de los productores 2 y 4 también mantienen su agrupación y siguen cercanos a la muestra del productor 6, el cual forma ahora un grupo con la muestra del productor 1 siendo que ambos no se encontraban agrupados a las 48 horas de fermentación.

Se puede apreciar entonces que a medida que aumenta el tiempo de fermentación, las diferencias en la agrupación entre un productor y otro disminuyen y los perfiles

electroforéticos comienzan a agruparse más y las especies microbianas comienzan a permanecer a partir de las 48 horas de fermentación. Sin embargo, también existen especies microbianas que sólo logran mantener su agrupación en etapas tempranas de la fermentación, lo que puede significar que el establecimiento de la flora microbiana es dinámico, de tal modo que existen especies que encuentran mejores condiciones para su establecimiento en etapas tempranas de la fermentación del mismo modo que otras especies logran establecerse hasta el final de la misma. Además de existir especies que se encuentran en un solo productor o bien en un solo tiempo de la fermentación, sobre todo en etapas posteriores al inicio de la fermentación, lo que sin duda dan lugar a una mayor diversidad entre productores.

Respecto a las diferencias entre el centro y la superficie, es posible apreciar que las agrupaciones pueden llegar a ser completamente distintas, lo que da lugar a suponer que las condiciones fisicoquímicas en ambos espacios es distinto lo que da lugar a un distinto establecimiento de la microbiota.

Considerando el origen de los distintos productores, se hubiera esperado que productores como el 4 y el 7 no se agruparan, pues venían además de ser productores distintos el origen de la masa también lo era, sin embargo aún cuando en etapas iniciales de la fermentación muestran distinta o ninguna agrupación. Esto también ocurre en aquellos productores donde el origen de la masa era el mismo, a partir de las 48 horas de la fermentación logran alguna agrupación con otros productores. Esto indica entonces que el pozol aún cuando ciertamente presenta una microbiota amplia después de cierto tiempo de iniciada la fermentación, se logra el establecimiento de una microbiota básica que permite la obtención de un producto con características sensoriales características. Es decir no importa que microorganismos se encuentren al inicio de la fermentación después de un tiempo de fermentación tienden a predominar los mismos como son *S. infantarius*, *W. confusa*, *Leuc. lactis* y en algunos casos *Lb. plantarum*.

E. Análisis de índices ecológicos

Los índices de diversidad y dominancia son índices matemáticos que han sido empleados para lograr describir la riqueza y distribución de especies en una comunidad, que ayudan junto con el análisis de patrones de bandas y dendrogramas a describir el conjunto de poblaciones que pueden estar presentes en una comunidad microbiana. (Pielou, 1975)

Dos índices han sido aplicados a estudios de diversidad, tales son el índice de diversidad de Shannon-Weaver y el índice de dominancia de Simpson descritos en 1949 y 1963 respectivamente y han sido introducidos al estudio de comunidades microbianas, lo cual ha permitido el estudio de éstas.

A continuación se describen en promedio los resultados obtenidos para los diferentes tiempos de fermentación tanto en la superficie de la bola como en el centro.

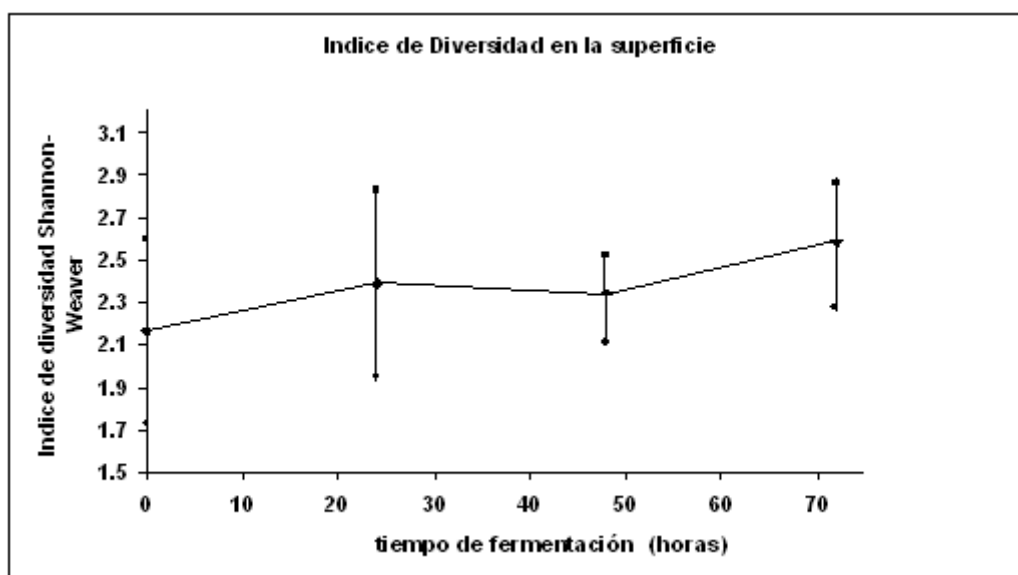


Figura 7.19. Promedios de diversidad de bacterias detectadas en la superficie de las muestras de pozol de diferentes productores a diferentes tiempos de fermentación.

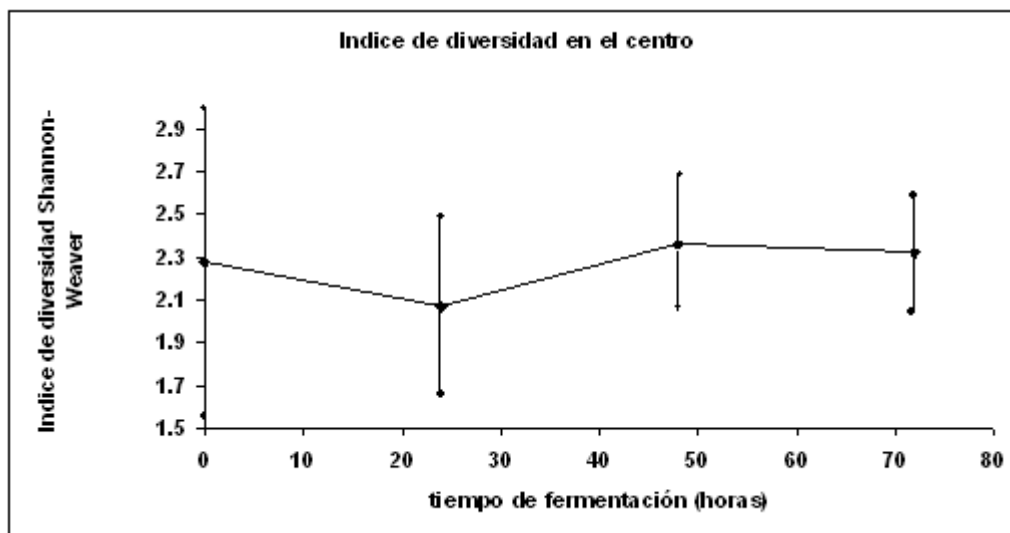


Figura 7.20. Promedios de diversidad de bacterias detectadas en el centro de las muestras de pozol de diferente productores a diferentes tiempos de fermentación.

El índice de diversidad determinado para el centro y superficie de la bola de pozol se muestra en las figuras 7.19 y 7.20. Es importante mencionar que se analiza la tendencia de la gráfica, pues con los valores de desviación estándar obtenidos no hay diferencia significativa entre los distintos puntos de las curvas, sobre todo en etapas iniciales de la fermentación.

En el caso de la superficie se aprecia un aumento de la diversidad hasta las 24 horas de la fermentación, manteniéndose después constante hasta las 48 horas de la misma, para lograr un aumento a las 72 horas. Sin embargo en el centro de la bola de pozol, se observa una disminución en la diversidad de las cero a las 24 horas de la fermentación y aún cuando vuelve a aumentar se obtienen resultados semejantes para el tiempo cero y de 72 horas de fermentación, lo que indica una débil variación de la diversidad durante el proceso de fermentación. Esto concuerda con los resultados analizados anteriormente ya que como se describió, en la superficie de la bola existió más variación, respecto al número de microorganismos presentes y sus agrupaciones lo que refleja una mayor diversidad. Por el contrario en el centro el establecimiento de especies microbianas se logra en etapas tempranas de la fermentación lo que da lugar a una mejor agrupación y a una diversidad menor indicando entonces que al haber menor diversidad los microorganismos dominantes logran establecerse mejor en el centro que en la superficie

de la bola de pozol. Esto confirma que los sistemas muestreados son distintos lo que da lugar también a una diversidad microbiana distinta.

Ahora se muestran los resultados obtenidos para la dominancia, estos se muestran en las figuras 7.21 y 7.22.

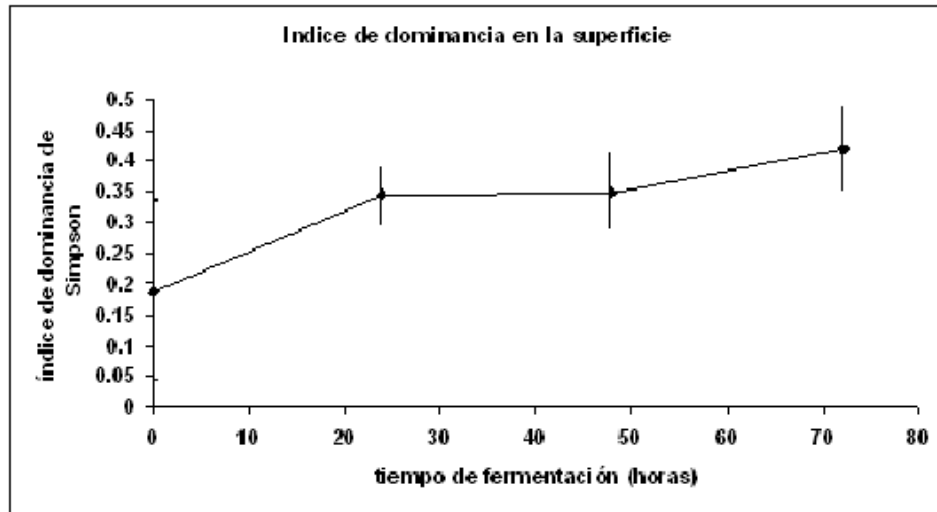


Figura 7.21. Promedios de dominancia de bacterias detectadas en la superficie de las muestras de pozol de diferente productores a diferentes tiempos de fermentación.

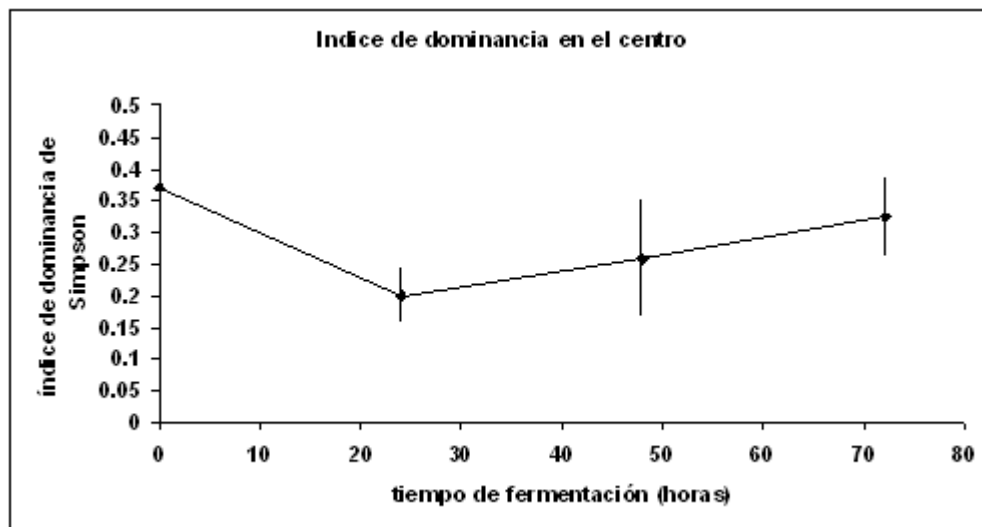


Figura 7.22. Promedios de dominancia de bacterias detectadas en el centro de las muestras de pozol de diferente productores a diferentes tiempos de fermentación.

Respecto a este índice en la superficie del pozol se encuentra un aumento de la dominancia a medida que transcurre la fermentación, encontrando que permanece constante entre las 24 y 48 horas. En realidad se esperaba que la tendencia fuera una marcada disminución debido a que la diversidad aumentó con respecto al tiempo. Esto se esperaba pues los valores de dominancia y diversidad son inversamente proporcionales. Los valores encontrados pueden deberse a que hay grandes variaciones de diversidad entre los diferentes productores y que algunos de ellos puedan producir estas variaciones.

Ahora bien respecto al centro también hay un aumento en la dominancia que sí se corrobora con un valor relativamente reducido de la diversidad. Esto puede indicar que a medida que avanza el proceso de fermentación la definición de una microbiota dada en el centro es posible y que ciertos microorganismos comienzan a ser más dominantes.

En general los valores obtenidos en ambos índices son muy semejantes a los obtenidos en estudios anteriores para el pozol (Ampe, 2000., Bolaños, 2004) y otros alimentos fermentados (Ampe, 2000).

CAPITULO 8. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se derivaron tanto de la implementación de la técnica como del análisis de muestras de pozol en este trabajo se mencionan a continuación:

- ✓ Las condiciones de la reacción de PCR reportadas por Dahllöf et al. 2000, permitieron la amplificación adecuada del fragmento del gen *rpoB* en bacterias lácticas de pozol. Esto permitió posteriormente su aplicación a la técnica DGGE.
- ✓ El fragmento del gen *rpoB* está representado por una sola banda, característica de cada microorganismo en los geles obtenidos por DGGE; sin embargo presentó bandas múltiples para *S. infantarius*; sin embargo se presentó siempre el mismo número de bandas y esto facilitó su consideración durante el análisis de muestras.
- ✓ Bajo condiciones más astringentes de alineamiento en la reacción de PCR, se evitó la aparición de más de una banda en *S. infantarius*, pero no se logró la amplificación de otros microorganismos de importancia, como *Lb. plantarum*.
- ✓ Aún cuando se detectó la existencia de amplificación preferencial de *S. infantarius* con respecto a otros microorganismos, como *W. confusa*, se observó la presencia de éste como un organismo dominante durante toda la fermentación.
- ✓ Las condiciones de electroforesis permitieron la separación de la mayoría de las bandas de las distintas especies de bacterias lácticas aisladas del pozol. Aun en estas condiciones se observó co-migración de las bandas de *S. infantarius* y *Lact. lactis* así como de *Lb. plantarum* y *Lb. pentosus*; sin embargo cuando se cortaron, amplificaron y secuenciaron estas bandas de los patrones de las muestras del pozol se encontró que correspondían a un solo microorganismo.
- ✓ Al principio del proceso de fermentación *E. faecium* y la banda 2 (que no fue posible identificar), predominan en la superficie de las bolas de pozol.
- ✓ *S. infantarius*, *Leuc. lactis*. y *W. confusa*, predominan durante la fermentación de todas las muestras. Se detectaron desde la masa recién molida, por lo que se

sugiere que pueden establecerse exitosamente durante toda la fermentación. Estos podrían entonces ser considerados como la microbiota básica en el proceso de fermentación del pozol y podrían ser los responsables de las características sensoriales y fisicoquímicas características de este alimento.

- ✓ *Lb. plantarum* y *Lb. fermentum*, así como *Leuc. mesenteroides subsp. mesenteroides*, se detectaron en la mayoría de las muestras a partir de las 48 horas y hasta las 72 horas de la fermentación. Esto sugiere que encuentran mejores condiciones para su establecimiento al final de la fermentación, cuando podrían ser considerados como parte de su microbiota básica.
- ✓ *Leuc. citreum* y *Lact. raffinolactis* no se detectaron en ningún caso en la masa recién molida; sin embargo en algunos casos se encontraron en etapas posteriores y entonces logran un rápido establecimiento el resto del proceso de fermentación. Es posible que su presencia dependa de que se introduzcan en las etapas posteriores a la molienda.
- ✓ Existe una mayor diversidad en la superficie de la bola, lo que limita la dominancia de algún microorganismo-
- ✓ Existe una menor diversidad en el centro de la bola, dando lugar a una mayor dominancia y establecimiento de especies involucradas en el proceso de fermentación del pozol.
- ✓ Los índices de riqueza y diversidad obtenidos demuestran que existe una gran variabilidad en la composición microbiológica de las diferentes muestras de pozol. Sin embargo, existe el desarrollo de una microbiota básica y los microorganismos que varían entre los diferentes productores representarían variabilidad microbiológica existente en el pozol.

El empleo del gen *rpoB* como herramienta en la aplicación de la técnica PCR-DGGE en muestras de pozol, en general, presentó ventajas sobre el del gen 16S rDNA, pues permitió una mejor asignación de bandas para la identificación de microorganismos. Esto permitió seguir el desarrollo de cada uno de los microorganismos durante el proceso de fermentación y de esta manera estudiar la diversidad microbiana en este alimento. En conclusión: existe una gran variabilidad entre la composición microbiológica del pozol proveniente de un productor y otro, pero se encuentra un grupo de microorganismos que tienden a predominar durante la fermentación, que se consideraron como la microbiota básica. Ésta está constituida por *S. infantarius*, *W. confusa* y *Lact. lactis*, presentes durante toda la fermentación, así como *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum* y *Leuc. mesenteroides subsp. mesenteroides* al final de ésta.

.

CAPITULO 9. BIBLIOGRAFIA

A. Chien., D. B. Edgar., y J. M. Trela., **(1976)**. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. of Bacteriol.* 127 (3): 1550–1557.

Achemchem, F., Martínez-Bueno, M., Abrini, J., Valdivia. E., Maqueda. M., (**2005**) *Enterococcus faecium* F58, bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jbe, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *J. of Appl. Microbiol.* 99:141-151.

Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts, Watson., *Biología Molecular de la Célula.*, 3a. edición., Editoriales Omega., Barcelona, España., pp. 340-341., 2002.

Ampe, F., ben Omar, N., Guyot, J., **(1999)**. Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: application to pozol, a Mexican lactic acid fermented maize dough. *J. Appl. Microbiol.* 87: 131-141.

Ampe, F., Miambi, E., **(2000)**. Cluster analysis, richness and biodiversity indexes derive from denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints of bacterial communities demonstrate that traditional maize fermentations are driven by the transformation process. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 91-97.

Ampe, F., Sirvent, A., Zakhia, N., **(2001)**. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. *Int. J. Food Microbiol.* 65: 45-54.

Ben Omar, N., Ampe, F., **(2000)**. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough producing production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3664-3673.

Bolaños, N. S., Variabilidad en a microbiota de diferentes muestras de pozol, determinada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Tesis UNAM, Maestría., Mayo, 2004.

Cañas, A., Barzana, E., Owens, J., Wachter, C., **(1993)**. La elaboración de pozol en Los Altos de Chiapas., *Ciencia*. 44: 219-229.

Cilia V., Lafay, B., Christen, R., **(1996)** . Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analices at the species level. *Mol. Boil. Evol.* 13:451-461.

Cocolin, L., Bison, L.F., Mills, D.A., **(2000)**. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* 189: 81-87.

Cocolin, L., Rantsiou, K., Iaccumin, L., Cantoni, C., Comi, G., **(2002)**. Direct identification in food samples of *Listeria* spp. And *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6273-6282.

Collins, M. D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., Wallbanks, S., **(1993)**. Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weisella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 75:535-603.

Coenye, T., Vandamme, P., **(2003)**. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiol. Lett.* 228: 45-49.

Cravioto, R., Cravioto, G., Massieu, G., Guzmán, J., **(1995)**. El pozol, forma indígena de consumir el maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta. *Ciencia*, 15: 27-30.

Daba, H., Pandian. S., Gosselin, J.F., Simard, J.F., Huang, J. Lecroix, C., **(1991)** Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3450-3455.

Dahllöf, I., Baillie, H., Kjelleberg, S., **(2000)**. *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA Gene intraspecies heterogeneity. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 3376-3380.

Díaz-Ruiz, G., Guyot, J. Ruiz-Teran, F., Guyot, J. M., Wachter, C., **(2003)**. Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a mexican fermented maize beverage. *Appl. Env. Microbiol.* 69: 4367-4374.

Ercolini, D., Moschetti, g., Blaiotta, G., Coppola, S., **(2001a)**. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of important lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Curr. Microbiol.* 42: 199-202.

Ercolini, D., Moschetti, g., Blaiotta, G., Coppola, S., **(2001b)**. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of Natural Whey Cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of “culture dependent” and “culture independent” approaches. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 610-617.

Ercolini, Danilo., **(2004)**. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Meth.* 56: 297-314.

Escalante, A., Wachter, C., Farrés, A., **(2001)**. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 21-31.

Faria, da Mota, F., Aparecida, G.E., Paiva, E., Seldin, L., **(2005)**. Assesment of the diversity of *Paenibacillus* species in environmental samples by a novel *rpoB*-based PCR-DGGE method. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 317-328.

Farrelly, V., Rainey, F., Stackebrandt, E.,**(1995)**. Effect of Genome Size and *rrn* Gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2798-2801.

Figuroa, C., Dávila, A.M., Pourquié, J., **(1997)** Original proprieties of ropy strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from the sour cassava starch fermentation. *J. Appl. Microbiol.*, 82: 68-72.

Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapel, W.H., **(2003)** Enterococci in foods- a conundrum for food safety., *Int. J. of Food. Microbiol.* 88:105-122.

Friedrich, V. W., Göbel, U. B., Stackebrandt. E., **(1997)** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-base rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 21:213-229.

García, Quintero, Lopez-Munguia. Alimentos y Bebidas fermentados tradicionales. En: *Biología Alimentaria.*, 1ª. edición., Limusa., pp. 313-345., 1999.

Giacomazzi, S., Leroi, F., Henaff, C. L., Joffraud, J. J., **(2004)**. *rpoB*-PCR amplified gene and temporal temperature gradient gel electrophoresis: a rapid tool to analyse bacterial strains representative of cold-smoked salmon microflora. *Lett. In Appl. Microbiol.* 38: 130-134.

Herrera, T., Ulloa, M., **(1975)**. Antagonismo del pozol y de *Agrobacterium azotophilum* sobre diversas especies de bacterias y hongos, algunas patógenas del hombre. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 17: 143-147.

Keller, M., Zengler, K., **(2004)**., Tapping into microbial diversity. *Nature Rev.*, 2: 141-150.

Kim, K.S., Ko, K.S., Chang, M-W., Hahn, T.W., Hong, S.K., Kook, Y-H., **(2003)**. Use of *rpoB* sequences for phylogenetic study of *Mycoplasma* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 226: 299-305.

Kirk, J. L., Beaudette, L.A., Hart, M, Moutoglis, P, Klironomos, J.N, Lee, H, Trevors, J., **(2004)**. Methods of studying soil microbial diversity., *J. Microbiol Meth.* 58: 169-188.

Ko, K. S., Hong, S-K., Lee, K-H., Park, M-Y., Miyamoto, H., Kook, Y-H., **(2003)**. Detection and identification of *Legionella pneumophila* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the RNA polymerase gen (*rpoB*). *J. Microbiol. Meth.* 54: 325-337.

Lee, J.S., Heo, G.Y., Lee, J.W., Oh. Y.J., Park, J.A., Park, Y.H., Pyun, Y.R., Ahn, J. Seog. **(2005)**. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. of Food Microbiol.* 102:143-150.

Lewin, Benjamin., Transcripción, En: Genes VII., Oxford University Press., USA., pp. 239-240., 2001.

Miambi, E., Guyot, J. P., Ampe, F., **(2003)**. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 82: 111-120.

Mollet, C., Drancourt, M., Raoult, D., **(1997)**. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. 26: 1005-1011.

Mollet, C., Drancourt, M., Raoult, D., **(1998)**. Determination of *Coxiella burnetii rpoB* sequence and its use for phylogenetic analysis. *Gene.* 207: 97-103.

Montgomery, Douglas C., Experimentos con un solo factor: Análisis de Varianza. En: Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica. 1ª. edición. México, D.F., pp 13-81. 1991.

Muyzer, G., Smalla, K., **(1998)**, Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek.* 73: 127-141.

Nuraida, L., Wachter, C., Owens, J., **(1995)**. Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 567-571.

Pace, N. R., **(1997)**. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science.* 276: 734-740.

Pielou, E. C., Ecological diversity, 1a. edición., John Wiley & Sons. New. York, pp. 165.

Pintado, J., Guyot, J.P., Ampe, F., **(2003)**. Múltiple competitive PCR-DGGE as a tool for quantifying and profiling defined mixed cultures of lactic acid bacteria during production of probiotics from complex polysaccharides. *J. of Appl. Microbiol.*, 95:921-933.

Rantsiou, K., Comi, G., Cocolin, L., **(2004)**. The *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamics during food fermentations. *Food Microbiol.* 21: 481-487.

Reinsenbah, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S., Pace, N.R., **(1992)**. Differential amplification of rRNA genes by Polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 3417-3418

Renesto, P., Gautheret, D., Drancourt, M., Raoult, D., **(2000)**. Determination of the *rpoB* gene sequences of *Bartonella henselae* and *Bartonella Quintana* for phylogenic analysis. *Res. Microbiol.* 151: 831-836.

Rio, D., Etude de la production, de la distribution et de la consommation du pozol dans le sud-est du Mexique, (Villa Hermosa Tabasco). Tesis, Université du Montpellier. Marzo, 1999.

Rivera, N.A., Efecto de la acción de microorganismos amilolíticos en la fermentación del pozol. Tesis. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México., pp. 62. 2001.

Rosalind, A., The polymerase chain reaction. The technique and its applications. R.G. Lones Company., Austin. 1994.

Sainz, T., Wachter, C., Espinoza, J., Centurión, D., Navarro, A., Molina, A., Inzunza, A., Cravioto, A., Eslava, C., **(2001)**. Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 169-176.

Sanni, A, Morlon-Guyot, J., Guyot, J.P., **(2002)** New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* 72:53-62.

Schleifer, K.H., Ludwig, W., **(1995)**. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System. Appl. Microbiol.* 18:461-467.

Shaw, B.g., Harding, C.D., **(1989)**. *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. *International Journal of systematic Bacteriology* 39: 217-233.

Shannon C., Weaver, W., The mathematical theory of communication, 5a ed. Urbana University of Illinois Press, Chicago. 1963.

Sigler, W.V., Miniaci, C., Zeyer, J., **(2004)**. Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. *J. Microbiol. Meth.* 57: 17-22.

Simpson, E. H., **(1949)**. Measurement of diversity. *Nature.*, 163:688

Stiles, M. E., Holzapel, W.H., **(1997)**. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. of Food Microbiol.* 36:1-29.

Suzuki, M.T., Giovannoni, S.J., **(1996)**. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:625-630.

Ulloa, M., Herrera, T., Lappe, P., **(1987)**. Pozol. En: Fermentaciones tradicionales indígenas de México. Instituto Nacional Indigenista. 16: 13-20.

Wacher, C., Cañas, A., Barzana, E., Lappe, P., Ulloa, M., Owens, J., **(2000)**. Microbiology of indian and mestizo pozol fermentations. *Food Microbiol.* 17: 251-256.

Wacher, C., Cañas, A., Cook, E., Barzana, E., Owens, J., **(1993)**. Sources of microorganisms in pozol a traditional Mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9: 269-274.

Woese, C.R., **(1987)**. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.

Wood, B. J. B., Holzapel, W.H., Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria, En: The genera of Lactic Acid Bacteria. 1a. edición. Blackie Academic & Professional., pp7-18., 1995

Yousif ,N.M.K., Dawyndt. Pi. Et al. **(2005)**. Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from “Hussuwa”, an African fermented sorghum product. *J. of Appl. Microbiol.* 98:216-224.

Zanoni, 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.

CAPITULO 10. ANEXO

Anexo A.1

Cepas puras para la construcción del patrón de bandas en los geles de DGGE. (Bolaños 2004.)

Cepas	Identificación con API 50CH	Calidad de la identificación	Porcentaje de la identificación	Resultados de la secuenciación.	% de identidad (comparación de secuencias)
Lilis 3	<i>Lact. raffinolactis</i>	Dudosa	45.6	<i>Lb. plantarum</i>	99
Tap 5	<i>Lb. plantarum</i>	Excelente	99.9	<i>Lb. plantarum</i>	100
Lilis 14	<i>Lb. crispatus</i>	Excelente	99.9	<i>Lb. plantarum</i>	99
Lilis 44	<i>Lact. plantarum</i>	Excelente	99.9	<i>Lb. plantarum</i>	100
Lilis 32	<i>Lact. raffinolactis</i>	Excelente	99.9	<i>Lact. raffinolactis</i>	92.4
Snc 15	<i>Lact. lactis lactis</i>	Excelente	99.5	<i>Lact. lactis</i>	100
Snc 25	<i>Lact. raffinolactis</i>	Muy Buena	91.3	<i>Lact. lactis</i>	99
Snc 23	<i>Leuc. mesenteroides</i>	dudosa	58.2	<i>Lact. lactis</i>	99
Amil 47	<i>Lact. raffinolactis</i>	Dudosa	96.9	<i>S. infantarius</i>	93
Snc 22	<i>Lact. lactis lactis</i>	Dudosa	60.8	<i>Leuc. citreum</i>	99.6
Snc 28	<i>Lact. raffinolactis</i>	Dudosa	99.8	<i>Leuc. citreum</i>	100
Lilis 42	<i>Lb. plantarum</i>	Dudosa	99.9	<i>Leuc. citreum</i>	99
Amil 30	<i>Leuc. citreum</i>	Dudosa	83.6	<i>Leuc. citreum</i>	99
Lilis 9	<i>Lact. raffinolactis</i>	Dudosa	99.9	<i>W. confusa</i>	99
Lilis 17	<i>Lb. pentosus</i>	Excelente	73.9	<i>W. confusa</i>	100
Lilis 19	<i>Lb. plantarum</i>	Aceptable	95.2	<i>W. confusa</i>	99
Lilis 20	<i>Lb. coprophilus</i>	Excelente	99.9	<i>W. confusa</i>	99
Snc 40	<i>Lb. coprophilus</i>	Dudosa	39.2	<i>W. confusa</i>	100
Snc 45	<i>Lb. fermentum</i>	Buena	52.7	<i>W. confusa</i>	99
Tap 50	<i>Lact. raffinolactis</i>	Buena	53	<i>Leuc. argentum</i>	99
Lilis 39	<i>Leuc. citreum</i>	excelente	99.9	<i>Lb. pentosus</i>	99.6
25124	--	--	--	<i>S. infantarius</i>	99

Anexo A.2

Preparación del medio MRS

- a. caldo MRS OXOID cat CM359

Por instrucciones del proveedor, se pesan 52 g del medio y se agregaron 1000mL, se disolvió por agitación y se esterilizó.

- b. agar MRS OXOID CAT cm361

Por instrucciones del proveedor , se pesaron 62 g del medio y se resuspendieron en 1000 mL, se disolvió por agitación y calentamiento y se esterilizó, posteriormente se dejó enfriar hasta aproximadamente 50°C y se vertió en cajas petri estériles hasta su posterior utilización.

Anexo B

Soluciones para la extracción de DNA

- a. amortiguador TES pH=8

La solución debe contener los siguientes reactivos

Reactivo	concentración	Preparación de 200 mL
Tris <small>SIGMA trisma ® Base cat T1503</small>	0.05M	1.513 g
EDTA <small>JT. Baker cat 8193-01</small>	0.005 M	1 mL de EDTA 0.5M pH=8
NaCl <small>JT. Baker cat 3624-01</small>	0.05 M	0.2922 g

- b. SDS Sigma cat L-4390

Se pesaron 10 g y se disolvieron en 100 mL de agua estéril, la solución se preparó bajo condiciones de esterilidad.

Anexo C

Electroforesis en geles de agarosa para cuantificación de DNA y productos de PCR

Se pesaron 0.81 g de agarosa (Boehringer Mannheim cat 13889991) y se agregaron 45 mL de amortiguador TBE 1X, se introdujeron al horno de microondas por 1 minuto, la mezcla se deja enfriar hasta aproximadamente 50°C y se vierte en un acrílico y se introduce un peine para la formación de los pozos donde posteriormente se cargarían las muestras.

Una vez gelificado, se cargaron 2 µL de muestra mezclados con 2 µL de amortiguador TBE 1X y 2 µL de azul de bromofenol, el gel se colocó sobre una cámara de electroforesis (Pharmacia Biotech GNA 100) y se recubrió completamente con amortiguador TBE, posteriormente, se conectó a una fuente de poder (BIORAD) y se aplicó un voltaje de 65V por un periodo de 1 hora, al término de este tiempo, el gel se reveló con bromuro de etidio (5 µg/µL) y el gel se observó a través de un equipo Fluor-S (BIORAD).

La preparación del amortiguador TBE es la siguiente

Amortiguador	Reactivos p/1000 mL
TBE 10 X	68 g TRIS 55.4 g ácido bórico (sigma B6768-500G)
TBE 1X	40 mL EDTA 0.5 M pH=8 100 mL amortiguador TBE10X

ANEXO D

Soluciones y procedimiento para la elaboración de geles de gradiente desnaturizante

Amortiguador TAE 50X y 1X

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Tris base	242 g	2M
Ácido acético glacial	57.1 mL	1M
(JT. Baker 9507-02) EDTA 0.5 M pH=8	100 mL	50 mM
Agua destilada	c.b.p 1000 mL	-

Para la preparación del amortiguador TAE 1X se mezclaron 140 mL del amortiguador TAE 50 X y se agregó agua destilada para alcanzar un volumen final de 7 litros.

Se mezcló perfectamente y se sometió a esterilización de 20 a 30 minutos y se almacenó a temperatura ambiente.

Solución acrilamida/Bis 40%

Reactivo	Cantidad
Acrilamida <small>Böehringer Mannheim cat 1871757</small>	38.93g
Bisacrilamida <small>Sigma M-7279</small>	1.07g
Agua destilada	c.b.p 100 mL

La solución se filtró por un filtro 0.45 μ m y se desgasificó por vacío, se almacenó a 4°C

Soluciones de desnaturalizantes para geles de acrilamida al 8%

Reactivos	20 % de desnaturalización	30 % de desnaturalización	60 % de desnaturalización	70 % de desnaturalización
Acrilamida/Bis (40%) amortiguador TAE 50X	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL
Formamida (desionizada)	8 mL	12 mL	24 mL	28 mL
<small>Sigma F9037</small> Urea	8.4 g	12.6 g	25.2 g	29.4 g
<small>Roche cat 1685-899</small> Agua destilada	c.b.p 100 mL	c.b.p 100 mL	c.b.p 100 mL	c.b.p 100 mL

Las soluciones se filtraron a través de un filtro 0.45 μm y se desgasificaron a por vacío, y se almacenaron a 10°C.

Para la elaboración de los geles se colocaron 20 mL de las solución desnaturalizantes en un tubo al cual se le adicionaron 50 μL de persulfato (0.5g/mL) y 10 μL de TEMED para iniciar la polimerización del gel, se mezclaron. Por separado se introdujeron las dos respectivas soluciones desnaturalizantes en jeringas las cuales son montadas en un equipo que mezcla las soluciones en el momento de verterlas al artefacto que sostendrá el gel creándose así un gradiente de desnaturalización, se dejaron polimerizar por 1 hora y se cargaron las muestras con azul de bromofenol en una relación (1:2) muestra:azul de bromofenol. El gel posteriormente se introdujo en una cámara de electroforesis y se cubrió con amortiguador TAE (1X). Se montó después el equipo que modula la temperatura al cual es posible conectar la fuente de poder para la aplicación del voltaje.

ANEXO E

Tinción con plata de los geles de gradiente desnaturalizante.

Se utilizó el kit DNA Silver Staining de Amersham Biosciences, Plus One^(TM) cat 17-6000-30 para tinción de ADN en geles de poliacrilamida.

Los pasos son los siguientes:

- a. Se introdujo el gel en una solución ácido sulfónico benceno; 3% (p/v) en 24% de etanol por un periodo de 30 minutos hasta 12 horas.
- b. Después se intercambió esta solución por 25 mL de una solución de nitrato de plata 1%(p/v) y ácido sulfónico benceno 0.35% (p/v) y 100 mL de agua por 30 minutos.
- c. Se lavó el gel con aproximadamente 125 mL de agua destilada
- d. Se agregó una solución reveladora que contenía 25 mL carbonato de sodio, 12.5%, 125 μ L de formaldehído 37% y 125 μ L 2% de tiosulfato de sodio 2% y 100 mL de agua, hasta la aparición de bandas (aproximadamente 10 minutos)
- e. Se retiró la solución anterior y se agregó una solución de 25 mL que contenía ácido acético 5%, acetato de sodio 25% y glicerol 25% y 100 mL de agua por un periodo de al menos 30 minutos y hasta 12 horas.

ANEXO F

Preparación de medios de cultivo para la transformación

Medio Luria-Bertani (LB)

1% de triptona (Oxoid cat. L42)

0.5% de extracto de levadura (Oxoid L21)

1% de cloruro de sodio (JT. Baker cat 8193-01)

pH=7

Se pesaron 1 g de triptona, 0.5 g de extracto de levadura y 1 g de cloruro de sodio y se agregaron 100 mL de agua, (para preparar agar LB se agregó además 15g/L de agar bacteriológico), el medio se esterilizó y se dejó enfriar hasta alcanzar aproximadamente 50°C y se agregó el antibiótico para alcanzar una concentración final de 50 µg/mL de ampicilina o Kanamicina. Para el caso del agar, se vertieron 20 mL del medio en cajas estériles y e el caso del caldo se introdujeron 3 mL en tubos de ensayo estériles.

ANEXO G

Constituyentes de los amortiguadores del Kit QUIAGEN

a. Amortiguador P1 (resuspensión)

50 mM Tris-Cl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNAasa

b. amortiguador P2 (lisis)

200 mM NaOH, 1% SDS

c. Amoriguador P3 (neutralización)

3 M acetato de potasio, pH 5.5

d. amortiguador QBT (equilibrio de columnas)

750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7, 15% isopropanol, 0.15 % triton X-100 ®

e. Amortiguador QC (lavado)

1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7, 15% isopropanol.

f. amortiguador QF (elusión)

1.25 M NaCl, 50 mM Tris, pH 8.5, 15% isopropanol.

Se resuspendieron 3 mL del cultivo en 0.3 mL de amortiguador P1 y se centrifugaron a 14000 r.p.m a temperatura ambiente por 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo y se recentrifugó por 10 minutos más hasta observar un sobrenadante translúcido, posteriormente se adicionaron 0.3 mL de amortiguador P2 , se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Después se adicionaron 0.3 mL de amortiguador P3 se mezcló y se incubó en hielo por 5 minutos para precipitar el DNA. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 14000 r.p.m y se removió el sobrenadante, el cual se introdujo en una columna QUIAGEN-tip 20 previamente equilibrada con 1 mL de amortiguador QBT, se lavó la columna con amortiguador QC 4 veces y se eluyó el DNA con 0.8 mL de amortiguador QF, finalmente se precipitó el DNA con 0.56 mL de isopropanol y se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos y se decantó el sobrenadante, se lavó el DNA con 1 mL de etanol frío al 70% se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el etanol cuidadosamente, se dejó secar y se adicionaron 25 µL de agua desionizada estéril. Para comprobar la presencia de los plásmidos se realizó una electroforesis en gel de azarosa al 1% utilizando una corriente de 100 V durante 1 hora (Ver anexo C).

ANEXO H

Matrices de similitud a diferentes tiempos de fermentación

En todos los casos se muestra el porcentaje de similitud entre los distintos productores obtenidas a partir de los coeficientes de similitud de Dice.

a. Masa recién molida

		1	2	3	4	5	6	7
patron	1	100.0	51.5	47.3	47.1	46.9	42.7	36.7
productor 2	2	51.5	100.0	39.1	41.4	62.5	83.8	45.6
productor 7	3	47.3	39.1	100.0	98.0	52.4	47.5	84.9
productor 6	4	47.1	41.4	98.0	100.0	52.0	50.1	85.9
productor 5	5	46.9	62.5	52.4	52.0	100.0	49.9	57.8
productor 4	6	42.7	83.8	47.5	50.1	49.9	100.0	56.4
productor 3	7	36.7	45.6	84.9	85.9	57.8	56.4	100.0

b. cero horas de fermentación

	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1	100.0	62.7	60.8	57.5	52.6	47.1	38.3	22.6	1	100.0	62.9	57.3	50.4	43.7	42.8	35.8	31.7
2	62.7	100.0	65.1	40.3	67.1	59.5	42.4	27.2	2	62.9	100.0	75.2	64.2	54.2	40.1	45.6	57.7
3	60.8	65.1	100.0	54.0	77.8	62.5	60.5	50.0	3	57.3	75.2	100.0	57.2	31.0	55.4	60.8	50.9
4	57.5	40.3	54.0	100.0	39.8	55.2	47.0	41.3	4	50.4	64.2	57.2	100.0	37.2	45.9	44.7	56.9
5	52.6	67.1	77.8	39.8	100.0	39.4	64.9	48.6	5	43.7	54.2	31.0	37.2	100.0	41.7	18.1	46.6
6	47.1	59.5	62.5	55.2	39.4	100.0	42.7	25.7	6	42.8	40.1	55.4	45.9	41.7	100.0	59.3	46.2
7	38.3	42.4	60.5	47.0	64.9	42.7	100.0	54.7	7	35.8	45.6	60.8	44.7	18.1	59.3	100.0	49.8
8	22.6	27.2	50.0	41.3	48.6	25.7	54.7	100.0	8	31.7	57.7	50.9	56.9	46.6	46.2	49.8	100.0

1. patrón, 2. productor 6, 3. productor 2, 4. productor 4,
5. productor 1, 6. productor 7, 7. productor 3, 8. productor 5

centro

1. patrón, 2. productor 6, 3. productor 7, 4. productor 1, 5. productor
4, 6. productor 5, 7. productor 2, 8. productor 3

superficie

c. 24 horas de fermentación.

	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1	100.0	70.3	61.8	54.8	53.1	49.9	37.8	33.4	1	100.0	62.5	61.7	51.5	48.2	45.7	42.5	19.3
2	70.3	100.0	73.4	65.1	64.4	74.1	58.8	37.6	2	62.5	100.0	64.5	68.5	57.8	58.4	57.6	28.2
3	61.8	73.4	100.0	55.5	68.4	85.6	65.3	67.2	3	61.7	64.5	100.0	65.0	45.1	47.0	30.9	21.7
4	54.8	65.1	55.5	100.0	39.1	56.2	47.2	27.5	4	51.5	68.5	65.0	100.0	43.1	42.1	44.3	0.0
5	53.1	64.4	68.4	39.1	100.0	57.0	46.2	70.3	5	48.2	57.8	45.1	43.1	100.0	76.9	48.5	48.7
6	49.9	74.1	85.6	56.2	57.0	100.0	67.2	53.0	6	45.7	58.4	47.0	42.1	76.9	100.0	74.5	41.6
7	37.8	58.8	65.3	47.2	46.2	67.2	100.0	62.3	7	42.5	57.6	30.9	44.3	48.5	74.5	100.0	0.0
8	33.4	37.6	67.2	27.5	70.3	53.0	62.3	100.0	8	19.3	28.2	21.7	0.0	48.7	41.6	0.0	100.0

1. patrón, 2. productor 6, 3. productor 2, 4. productor 7
5. productor 4, 6. productor 1, 7. productor 3, 8. productor 5

centro

superficie

d. 48 horas de fermentación.

	1	2	3	4	5	6	7		1	2	3	4	5	6	7	8
1	100.0	69.3	63.5	52.5	48.8	45.2	38.4	1	100.0	83.1	66.7	63.1	61.4	49.0	36.3	27.3
2	69.3	100.0	72.7	65.3	48.5	68.6	58.4	2	83.1	100.0	71.7	66.8	77.1	49.4	44.7	37.4
3	63.5	72.7	100.0	49.9	26.2	59.9	40.7	3	66.7	71.7	100.0	58.4	75.0	45.4	31.9	22.9
4	52.5	65.3	49.9	100.0	30.2	46.2	25.6	4	63.1	66.8	58.4	100.0	50.7	34.0	17.6	22.1
5	48.8	48.5	26.2	30.2	100.0	55.3	71.2	5	61.4	77.1	75.0	50.7	100.0	64.0	54.3	45.9
6	45.2	68.6	59.9	46.2	55.3	100.0	76.8	6	49.0	49.4	45.4	34.0	64.0	100.0	54.1	58.3
7	38.4	58.4	40.7	25.6	71.2	76.8	100.0	7	36.3	44.7	31.9	17.6	54.3	54.1	100.0	65.0
8								8	27.3	37.4	22.9	22.1	45.9	58.3	65.0	100.0

1. patrón, 2. productor 2, 3. productor 4, 4. productor 5
5. productor 1, 6. productor 7, 7. productor 3

centro

superficie

e. 72 horas de fermentación

	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1	100.0	87.3	68.1	65.4	63.2	44.7	43.7	38.8	1	100.0	79.7	75.1	57.1	55.2	52.4	49.2	46.5
2	87.3	100.0	75.1	64.1	59.8	54.7	56.6	47.9	2	79.7	100.0	68.1	55.9	44.2	66.7	60.0	56.1
3	68.1	75.1	100.0	62.8	43.5	51.8	44.6	61.7	3	75.1	68.1	100.0	47.5	56.0	46.5	54.6	44.6
4	65.4	64.1	62.8	100.0	66.6	65.7	49.7	54.5	4	57.1	55.9	47.5	100.0	23.0	61.6	35.3	20.8
5	63.2	59.8	43.5	66.6	100.0	58.7	54.5	40.3	5	55.2	44.2	56.0	23.0	100.0	44.0	37.6	71.1
6	44.7	54.7	51.8	65.7	58.7	100.0	51.1	76.8	6	52.4	66.7	46.5	61.6	44.0	100.0	62.4	55.3
7	43.7	56.6	44.6	49.7	54.5	51.1	100.0	26.5	7	49.2	60.0	54.6	35.3	37.6	62.4	100.0	50.0
8	38.8	47.9	61.7	54.5	40.3	76.8	26.5	100.0	8	46.5	56.1	44.6	20.8	71.1	55.3	50.0	100.0

1. patrón, 2. productor 6, 3. productor 1, 4. productor 2
5. productor 4, 6. productor 7, 7. productor 5, 8. productor 3

centro

superficie