



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**TIPIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DEL
AXOCOTL, ATOLE AGRIO DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA,
POR MEDIO DE ARDRA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

KATYA DAFNE GUADARRAMA OROZCO



MÉXICO,

D.F.

ENERO

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: ROSA MARÍA RAMIREZ GAMA
Vocal: MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE
Secretario: ADRIANA GUADALUPE MEJÍA CHÁVEZ
1er. Suplente: BEATRIZ DE GUADALUPE SERRANO LÓPEZ
2do. Suplente: MARTHA GILES GÓMEZ

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 324, Edificio "E", Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química,
UNAM.

Dra. María del Carmen Wachter Rodarte
Asesora

Katya Dafne Guadarrama Orozco
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte, mi asesora de tesis, por aceptarme como su tesista, por confiar en mí, tenerme paciencia y con su profesionalismo darme sabios consejos permitiéndome terminar exitosamente la tesis.

A la Dra. Gloria Ruiz y a la Dra. Maricarmen Quirasco por apoyarme y aconsejarme de la mejor manera como buenas profesoras en la elaboración de mi tesis.

A las M. en C. Sandra Bolaños y Gabriela López porque desde que me conocieron me ayudaron a la realización de mi tesis, con su gran paciencia, profesionalismo y cariño, volviéndose valiosas y excepcionales compañeras de laboratorio.

A la UNAM por aceptarme en esta importante casa de estudios de gran prestigio y darme los conocimientos por medio de mis destacados profesores y permitirme formarme completamente como Química de Alimentos.

DEDICATORIAS

A ti, ¡OH Dios! padre y señor, por amarme como lo haces. Gracias porque por tu inmensa divinidad pude finalizar este trabajo, por permitir la presencia de mi familia y de una muy buena asesora de tesis, por regalarme la oportunidad de terminar una etapa más en mi vida y con ella un exitoso futuro, por mi vida, por permitirme ser yo, con mis virtudes y defectos, pero siempre tu hija y sierva. AMÉN

A mi mamita linda por estar día y noche a mi lado durante toda mi vida, por tenerme siempre en su pensamiento y dedicarme su vida. Hoy mami te dedico mi tesis con todo mi corazón y amor, resultado de tu presencia en mi vida, del apoyo, confianza, paciencia, consejos y amor que me has ofrecido, sin pedir nada a cambio. Te amo, mil gracias mami.

A mi papá por sus importantes e inigualables consejos, apoyo, confianza y amor que me ha ofrecido. Te la dedico por que se que has procurado estar en los momentos importantes de mi vida, por tu presencia y apoyo en las diferentes formas que me lo has dado, te lo agradezco y te amo. Gracias por no dudar de mí.

Gracias por siempre tratar de ser los mejores padres.

A Ingrid, a Iván y a Jessy porque a pesar de los pesados momentos y dificultades que hemos tenido han estado ahí, en el tiempo y espacio necesarios, ayudándome como han podido y de la manera más correcta a su parecer, porque su amor me ha fortalecido y apoyado a sacar mi tesis adelante, porque tuvieron la paciencia, cariño, tiempo y muchas otras cosas, así como otros sentimientos para regalármelos. Gracias porque han creído en mí y en las metas que me he puesto, me han apoyado de una manera que es difícil describir, porque han sabido ser hermanos y de los mejores. Los amo y los necesito para mis logros.

A Jeshua porque ha su corta edad me pudo dar buenos consejos que con amor, me sirvieron para fortalecerme sentimentalmente y salir profesionalmente e individualmente adelante. Gracias por creer en mí.

A mis compañeros y amigos Rocio, Fer, Lupita, Alicia, Damián, Clau, Erikita, Bárbara, Sarah, Vane, Susy, Martha, Jaque e Ydania, porque se detuvieron para regalarme de su tiempo, para escucharme, alentarme y apoyarme en mi carrera, tesis y en mi vida, con la mejor disposición y cariño.

INDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	<i>iii</i>
DEDICATORIAS	<i>iv</i>
ÍNDICE	<i>v</i>
RESUMEN	<i>ix</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Alimentos fermentados tradicionales	3
2.2 Determinación de la microbiota de alimentos fermentados.	4
2.3 Alimentos Fermentados Tradicionales de México	5
2.4 Atoles agrios	8
2.4.1 Axocotl o atole agrio	9
2.4.1.1 Zona de producción	9
2.4.1.2 Proceso de elaboración del Axocotl	10
2.4.1.3 Proceso de nixtamalización para la elaboración de atoles agrios	11
2.5 Bacterias ácido lácticas	12
2.5.1 Importancia de las bacterias ácido lácticas en los alimentos fermentados.	17
2.6 Métodos para la identificación de microorganismos	19
2.7 La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	22
2.8 Enzimas de Restricción	24
2.9 Tipificación de microorganismos	27
2.9.1 Métodos fenotípicos	28
2.9.2 Métodos genotípicos	31
2.10 Sistema API 50CH para la identificación de bacterias lácticas.	38
2.10.1 Principio del API 50 CH	38
2.11 ARDRA	39
3. OBJETIVOS	41

	Página
4. METODOLOGÍA	
4.1 Diagrama de la Metodología de la Investigación	42
4.2 Elaboración del atole agrio o axocotl.	43
4.3 Muestreo de materia prima y del Axocotl	48
4.4 Inoculación de placas de medio de cultivo sólido	49
4.5 Determinación de pH y Temperatura de las muestras	50
4.6 Cuantificación de colonias en placas de medio MRS, MRS-A, VRBGA y ACP	50
4.7 Aislamiento de bacterias lácticas	50
4.8 Purificación de las bacterias lácticas	51
4.8.1 Tinción de Gram	51
4.8.2 Prueba de Catalasa	51
4.9 Conservación de cepas de bacterias lácticas	51
4.10 Extracción de DNA	52
4.11 Comprobación de la calidad de Extracción del ADN.	53
4.12 Cuantificación de DNA obtenido	53
4.13 Amplificación del gen 16S ARNr por la PCR	54
4.14 Purificación del PCR	57
4.15 ARDRA	58
4.16 Elaboración de dendrogramas	60
4.17 Secuenciación del gen rRNA 16S	60
4.18 Fermentación de Carbohidratos	60
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
5.1 Temperatura y pH	63
5.2 Cuentas de bacterias lácticas, bacterias lácticas amilolíticas, enterobacterias y bacterias mesófilas aerobias durante la fermentación.	64
5.3 Aislamiento de las bacterias lácticas	67
5.4 Tipificación de cepas bacterias lácticas por el Método de ARDRA.	75
5.4.1 Extracción de DNA	75
5.4.2 Cuantificación del DNA obtenido	76
5.4.3 Amplificación del gen 16S ARNr mediante la PCR	76
5.4.4 Condiciones de optimización para la reacción de digestión por endonucleasas.	77

	Página	
5.4.5	Análisis del patrón de bandas.	83
5.5	Identificación de cepas	88
5.5.1	Sistema API 50CH para la identificación de bacterias lácticas.	88
5.5.2	Identificación mediante la comparación de secuencias del gen rRNA 16S	90
6.	CONCLUSIONES	94
7.	ANEXOS	96
7.1	MEDIOS DE CULTIVO.	96
7.2	FUNDAMENTO DE LA TINCIÓN DE GRAM	98
7.3	FUNDAMENTO DE LA PRUEBA DE CATALASA	99
7.4	REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN.	99
7.5	REACTIVOS PARA EL GEL DE AGAROSA	99
7.6	PRIMERS.	100
7.7	COMPOSICIÓN DE LA GALERIA DEL API 50CH	101
7.8	COMPOSICIÓN DEL MEDIO API 50CHL	102
8.	BIBLIOGRAFÍA	103



RESUMEN

El Axocotl es una bebida fermentada y tradicional de maíz, conocida como atole de sabor agrio y elaborado por una parte de la comunidad Náhuatl en la Sierra Norte de Puebla. Se consume principalmente en días festivos, pero también como bebida refrescante durante todo el año. El proceso de su elaboración consiste en nixtamalizar el maíz, molerlo y posteriormente con la masa obtenida se prepara el atole. Por otra parte las hojas de una hierba de la región se muelen con cal y con dicha mezcla se cubren las paredes internas de un cántaro de barro. Al cántaro se le añade el atole caliente y el agua de hierba, se tapa y se deja fermentar durante 3 días. Al transcurrir este tiempo se obtiene una bebida ácida, efervescente y con poco contenido de alcohol.

Estudios preliminares han demostrado que el axocotl tiene una microbiota compleja, compuesta por bacterias lácticas y levaduras, la cual es difícil caracterizar por métodos convencionales. El trabajo realizado permitió conocer la diversidad de bacterias lácticas presentes en este alimento fermentado y tipificarlas por medio de un ARDRA (análisis de la restricción del DNA ribosomal amplificado). El tener conocimiento en cuanto a la diversidad de bacterias lácticas permitirá una producción industrial del alimento en condiciones controladas que aseguren su calidad e inocuidad.

Para llegar al objetivo planteado se inicio el trabajo muestreando el atole agrio elaborado con la metodología tradicional de los náhuatls en Cuetzalan, Puebla, a diferentes tiempos durante la fermentación e inoculando medios MRS y MRS almidón, VRBG, ACP, posteriormente se aislaron las colonias cuya morfología y bioquímica es característica de las bacterias lácticas (Gram positivas, catalasa negativas).

Una vez aisladas las cepas se purificaron y posteriormente se clasificaron por medio de una ARDRA, que es una técnica de "huella digital", con el fin de tipificarlas; para lo cual se extrajo el DNA de cada cepa, se amplificó el gen ribosomal 16S por PCR y el producto obtenido se digirió con enzimas de restricción, separando los fragmentos obtenidos mediante una electroforesis convencional en geles de agarosa. Se seleccionaron enzimas con las cuales el perfil de bandas obtenido no fue complejo, el número de bandas era apreciable y se presentaba con poco

tiempo de incubación y pocas unidades de enzima, así como una buena separación entre las bandas.

Para el ARDRA se usaron como enzimas de restricción Bsu RI y Hinf I para digerir los productos de la PCR de las cepas seleccionadas, de manera que se generaron fragmentos cuantificables y distinguibles para la mayoría de las cepas y obtuvo un perfil de restricción único para cada cepa. Así mismo la diferencia en los perfiles de restricción de cada cepa permitió un agrupamiento de ellas en los 2 dendrogramas en 4 grupos principales. Una vez agrupadas, se identificó una cepa representativa de cada grupo por el sistema API.

Para los microorganismos tipificados: *Lacto. para. paracasei 1*, *Pedio. damnosus 2*, *Lacto. plantarum 2*, se considera como fuente de inóculo a el maíz, maíz nixtamalizado y a la hierbas, por haber sido reportados con anterioridad en tales fuentes.

Los cuatro microorganismos identificados con API y la realización del dendrograma con la enzima Bsu RI, permitieron la identificación de alrededor del 70% de las cepas a nivel cepa. Los cuatro microorganismos identificados fermentan la glucosa, pero también disacáridos como es la galactosa, fructuosa, manosa y como es de esperarse la lactosa, por mencionara algunos de los carbohidratos que fermentaron.

La secuenciación del gen 16S ARNr de la cepa #28 permitió confirmar uno de los grupos mas grandes dados en el dendrograma con Bsu RI, resultando la secuencia *Aerococcus viridans*, con un 99% de similitud al ser comparada con la base de datos del programa BLAST. Y se consideró a la hierba dulce o al agua como fuentes de procedencia de dicha cepa.

Ya que *Aerococcus viridans* se relaciona filogenéticamente a *Pedio. damnosus 2*, consideramos, por lo menos a el grupo I del dendrograma de Bsu RI, que las cepas agrupadas son identificadas como *Aerococcus viridans* con un 99%.

El mejor conocimiento sobre la diversidad de bacterias lácticas en este tipo de alimentos fermentados, permite diseñar alimentos iniciadores adecuados y el monitoreo y control sobre el desarrollo y actividad de la población microbiana que se que se pretende actúe en el alimento.

1. INTRODUCCIÓN

Los productos de maíz que se consumen en México son muy variados y en su mayoría se elaboran con maíz nixtamalizado, que aporta un papel determinante en el mejoramiento del valor nutritivo del maíz y en la diversificación de productos derivados. Los atoles representan uno de los muchos productos que pueden elaborarse con masa de maíz nixtamalizado y podrían ser una de las principales fuentes calóricas en la dieta de comunidades indígenas en México.

El atole agrio es un producto fermentado de maíz nixtamalizado, consumido por diversos grupos indígenas en México. En particular, en Cuetzalan, Puebla se consumen tres tipos de atoles fermentados: xokoatol, eloatol y axocot (Valderrama y Ramírez, 1993). El Axocotl es un tipo de atole elaborado con maíz nixtamalizado y fermentado que se consume como bebida refrescante durante festividades o incluso para consumo doméstico en sustitución del agua. Se cuenta con muy poca información o investigación acerca del atole agrio, especialmente de su microbiología o química durante y al final de la elaboración del mismo.

Los alimentos fermentados, especialmente los que se producen de forma tradicional, se obtienen mediante fermentación natural, es decir, no se añaden inóculos sino que actúan los microorganismos naturalmente presentes en el alimento, generalmente están constituidos por microbiotas complejas que son difíciles de describir mediante el uso de métodos convencionales.

Durante el último siglo se ha dependido del aislamiento y cultivo de los microorganismos para su identificación. Esta necesidad ha limitado en gran medida la comprensión de la diversidad microbiana, ya que ahora se sabe que más del 90% de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando las técnicas tradicionales.

Existen diferentes alternativas para la identificación de la microbiota en los alimentos, una de ellas es aislar microorganismos y tipificarlos mediante técnicas basadas en el DNA como el RFLP, el ARDRA, la ribotipificación y el RAPD; la otra alternativa es utilizar métodos que no dependan del cultivo para incluir la detección de microorganismos no cultivables. En dichos métodos se extraen ácidos nucleicos directamente del alimento y a partir de éstos se determina la diversidad microbiana.

El objetivo principal de este trabajo es conocer las bacterias ácido lácticas presentes en el atole agrio, ya que en él participa una microbiota muy compleja, por lo que la investigación incluye el uso de los métodos tradicionales de microbiología, como paso inicial, los cuales se basan en el cultivo de los microorganismo, posteriormente se llevan a cabo procedimientos basados en la extracción del ADN.

Por otra parte en la búsqueda de nuevas formas de alimentación en México, sería de gran utilidad que se tomaran en cuenta la riqueza de los alimentos fermentados de maíz, ya que cuentan con potenciales microorganismos pudiendo ser estos probióticos, conservadores o en algún sentido ayudar al carácter organoléptico de los alimentos. Además de que los alimentos fermentados son una fuente de alimentación y base de la dieta en algunas comunidades indígenas de México.

2. ANTECEDENTES

2.1 Alimentos Fermentados Tradicionales

El desarrollo histórico de la fermentación data de hace unos 8000 años, es conocido de toda la historia de Noé, quien se "paloteaba" con el zumo de uvas. Desde tiempos inmemoriales, los microorganismos mejoraron y descompusieron los alimentos y bebidas destinadas al consumo humano, mucho antes de que se reconociera su existencia. Andando el tiempo, y sin saber todavía qué sucedía a nivel biológico, el hombre antiguo aprendió a fermentar y explotar la acción fermentativa de los microorganismos, en la fabricación de alimentos tales como el queso y la cerveza. Develada en lo esencial la actividad microbiana, los alimentos y bebidas fermentadas constituyen hoy en día un sector muy extenso e importante de la industria alimenticia. Con el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética, es de esperar que se produzcan grandes avances en la calidad y exactitud de la producción microbiológica de alimentos y bebidas.

Los microorganismos tienen un papel importante en el reciclado de la materia orgánica, ya que si éste incluye la producción de ácidos orgánicos como el láctico o el acético o la producción de alcohol etílico o de condiciones altamente alcalinas, los sustratos de los alimentos se pueden conservar y si los sabores, aromas y texturas son aceptables para los consumidores, esta materia orgánica-alimento es un fermentado. Probablemente las fermentaciones empezaron a jugar un papel importante cuando el hombre recolectaba alimentos y usaba recipientes para almacenarlos influyendo a la vez el tipo de fermentaciones que se desarrollaban.

En los alimentos fermentados es esencial el crecimiento y actividad de microorganismos que generan sabores, aromas y texturas aceptables y deseables para los consumidores humanos (Steinkraus, 1993a). Los alimentos fermentados tradicionales se obtienen mediante fermentaciones naturales (en las que no se añaden inóculos sino que actúan los microorganismos naturalmente presentes en el alimento) y están constituidos por microbiotas complejas.

Un problema que generalmente se presenta en las fermentaciones tradicionales es la contaminación por microorganismos sin importancia para la fermentación y que compiten por el mismo sustrato, resultando pérdidas de metabolitos en el producto final, de propiedades

organolépticas, de funcionalidad y/o en la composición del producto (Temmerman, et.al. 2004), por lo que se ha impulsado la producción de alimentos fermentados en condiciones controladas y su calidad dependen del conocimiento y control de la microbiota presente.

El estudio de los alimentos fermentados tradicionales se ha dirigido a mejorar el procesamiento rural, ya que se producen en condiciones poco higiénicas y de manera no controlada, a mantener o expandir el mercado de productos tradicionales de bajo costo y a desarrollar nuevos productos, pues hoy día se prefieren los productos naturales y libres de conservadores. Otra razón del interés de su estudio es la curiosidad científica (Owens, 1993). Se espera que con estos estudios sea posible producirlos en condiciones controladas.

Algunos ejemplos de alimentos fermentados los encontramos en la Tabla 2.1, junto con sus principales características.

Tabla 2.1.1 Alimentos Fermentados Tradicionales

ALIMENTO FERMENTADO TRADICIONAL	LUGARES DE CONSUMO	MATERIA PRIMA PRINCIPAL	CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES
OGI NIGERIANO	Nigeria	Maíz o sorgo o mijo	Bebida de textura lisa sabor agrio con un resabio de yogurt, color -crema para el maíz, café-rojizo para el sorgo, y un gris oscuro par el mijo.
KAMU NIGERIANO	Nigeria	Mijo	Pastel de almidón
MAWE	Benin y Togo	Maíz entero sin cascarilla	Pasta de maíz fermentada
MAHEWU	Sur de Africa(Bantu	Mezcla de la harina de maíz con agua y harina de trigo	Bebida tradicional, agria, popular de maíz, no alcohólica, sabor agrio
OBIOLOR	Nigeria	Malta, sorgo o mijo	Bebida no alcohólica de fermentación ácida
GARI NIGERIANO	Nigeria y Oeste de África	Raíces enteras de Cassava	Alimento granular almidonoso

(Steinkraus,1995)

2.2. Determinación de la microbiota de alimentos fermentados.

Los alimentos fermentados tradicionales contienen microbiotas complejas, que son difíciles de describir mediante el uso de métodos convencionales. Hoy día existen diferentes alternativas para la determinación de su estructura microbiana. Una de ellas es aislar a los microorganismos y tipificarlos mediante técnicas basadas en el ADN, como el RFLP, la ribotipificación, el AFLP, el ARDRA y el RAPD, la otra consiste en la detección de microorganismos no cultivables, en donde

se usan métodos en los que se extraen ácidos nucleicos directamente del alimento y a partir de estos se determina la diversidad microbiana (Díaz y Wachter, 2003) (Figura 2.2.1).

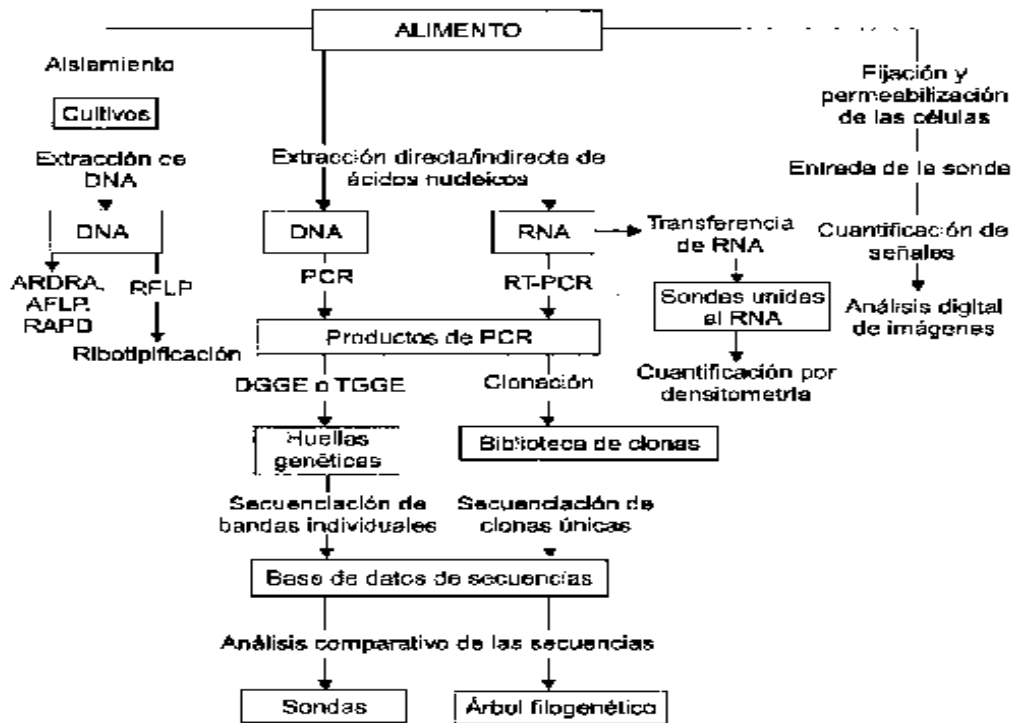


Figura 2.2.1. Evaluación de comunidades microbianas en alimentos fermentados (Díaz y Wachter, 2003)

2.3 Alimentos Fermentados Tradicionales de México

Las bebidas indígenas y los alimentos fermentados han sido de gran importancia en la vida diaria y ceremonial de los numerosos grupos indígenas de México desde la época prehispánica. Son fuente de alimentación y base de la dieta de las comunidades indígenas; la tradición de su consumo ha continuado hasta hoy, jugando un papel vital en la historia de desarrollo del hombre.

Aproximadamente hace un siglo iniciaron investigaciones sobre la química y microbiología de los productos fermentados mexicanos, sobre todo en los últimos 20 años se ha podido apreciar un notorio incremento en investigaciones sobre el tema (Herrera, 1993), pero desafortunadamente aún falta mucho por conocer de los alimentos fermentados indígenas, incluyendo a la salud humana. En la Tabla 2.3.1 se presentan ejemplos de alimentos fermentados tradicionales de México

Tabla 2.3.1. Alimentos Fermentados Tradicionales de México

NOMBRE	DESCRIPCIÓN	ESTADOS DONDE SE CONSUME
AGUA AGRIA	Bebida no embriagante, preparada con maíz molido, mezclado con agua y fermentado	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, D.F., Tlaxcala, Michoacán, Jalisco y Oaxaca
ATOLE (del azteca atl, agua; olli, líquido viscoso)	Bebida no embriagante preparada con masa de maíz o tortillas y mazorcas	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, D.F., Tlaxcala, Michoacán, Jalisco y Oaxaca
ATOLE AGRIO O AXOCOTL	Bebida agria no embriagante de color verdoso, preparada con maíz hecho masa y nixtamalizado, fermentado de 3-4 días	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, D.F., Tlaxcala, Michoacán, Jalisco y Oaxaca
POZOL (del azteca pozolli, espumoso)	Bebida ácida no embriagante, preparada diluyendo en agua la masa fermentada de maíz nixtamalizado.	Tabasco, Chiapas, Yucatán, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Quintana Roo.
SENDECHO	Bebida alcohólica(especie de cerveza) preparada a partir de maíz germinado, secado, molido con "chiles colorados".La harina se mezcla con agua y se forma un atole, que se hierve, se cuele, se enfría y se le añade el fermento (preparado con un sendechó anterior)y se deja fermentar	Estado de México
TEPACHE (del azteca tepiatl, bebida de maíz)	Bebida no alcohólica a partir de granos de maíz criollo tostado y piloncillo, dejándose fermentar en agua	Veracruz, Puebla, guerrero, Oaxaca, Chiapas.
TESGÜINO (del azteca tecuín, latir del corazón)	Bebida alcohólica semejante a la cerveza, espeso y nutritivo, preparada al fermentar atole de maíz germinado, molido y cocido con "catalizadores"(fragmentos de plantas de la región)	Sonora, Chihuahua, Nayarit, Zacatecas y Jalisco
TAMAL AGRIO (del azteca tamalli)	Tamal elaborado con masa fermentada por 20hrs.El xokotamal tiene solo masa y el etixtamal tiene fríjol negro, se envuelven en hojas de maíz y el xokotamal piksa se cocina con fríjol gordo tierno y se envuelve en hojas de moxte	Puebla, Cuetzalan
TORTILLA AGRIA	Se cuece el maíz con cal y se deja toda la noche en candela, ya frío se lava y se muele. La masa reposa medio día y con la masa aceda se hacen tortillas.	Quintana Roo. Yucatán.
PULQUE	Bebida alcohólica, blanca, viscosa que se obtiene por fermentación del aguamiel, que es la savia azucarada de varias especies de magueyes pulqueros del género Agave	D. F., Estado de México, Tlaxcala, Hidalgo, San Luis Potosí, Veracruz, Oaxaca, Puebla, Morelos, Guerrero, Michoacán, Querétaro y Guanajuato.
COLONCHE	Bebida refrescante con bajo contenido alcohólico, elaborado con jugo fermentado de tunas	Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas y San Luis Potosí
BLACHÉ	Bebida con fines medicinales y estimulantes, elaborado con una mezcla fermentada a base de solución de miel de abeja silvestre y corteza de árbol Balché	Sur y sureste de México
TUBA	Bebida alcohólica láctica o acética, que se obtiene por fermentación de la savia de la palmera de coco	Colima y Guerrero
TOKERE	Es una bebida alcohólica elaborada a base de elote macizo o maíz, que hierve en agua con sal y se muele, la masa se coloca en un cedazo, se hierve y se deja fermentar por 15 a 20 días	Michoacán

Ulloa et al. (1987)

Estos alimentos se producen y distribuyen con un bajo costo, generalmente son nutritivos, ofrecen una multitud de sabores y texturas y proveen una alta cantidad de calorías, proteínas, vitaminas y minerales.

Se han aislado una amplia variedad de microorganismos de la fermentación natural del maíz, los cuales incluyen hongos, levaduras, bacterias lácticas y bacterias no lácticas. Siendo las bacterias lácticas el grupo predominante que le confiere las características sensoriales principales al alimento como son el sabor ácido y aroma característicos (Ulloa y Herrera, 1976-1982).

En Mesoamérica el maíz es parte sustancial en la dieta desde hace varios de milenios. La tecnología indígena del maíz ha evolucionado de un estilo artesanal a una industria moderna con procedimientos mecanizados, logrando preservar sus ventajas de gran valor nutricional. Este es el caso del uso del "nixtamal" o masa cocida de maíz, cuya etimología náhuatl (*nixte*=ceniza, *tamalli*=masa cocida) denota su antigüedad y origen. Las máquinas nixtamalizadoras han conservado el cocimiento alcalino que ha sido muy ventajoso, ya que texturiza la masa, aumenta la concentración de calcio, promueve una mejor asimilación de las vitaminas y disminuye la concentración de carbohidratos. Por lo anterior podemos atrevernos a decir que dicha tecnología es, sin lugar a dudas, el mejor tratamiento de un grano de cereal por el cual hay una mejora nutricional.

Otra alternativa para mejorar la calidad de la proteína de maíz es la fermentación láctica, ya que puede transformar parte de la proteína vegetal en biomasa microbiana con alto contenido en lisina y triptófano (Viniegra, 1993).

Los productos de maíz que se consumen en México son variados, la mayoría son a base de maíz nixtamalizado. El efecto de la nixtamalización en el valor nutricional del maíz incluye incremento de la digestibilidad; mejoramiento del balance isoleucina/leucina, lo que a su vez favorece el aprovechamiento de la proteína y liberación de parte de la niacina, que no está disponible inicialmente en el grano (Owens, 1993).

Es importante el estudio de los alimentos fermentados indígenas ya que forman parte de nuestra cultura y es necesario lograr su producción en forma controlada, con calidad constante,

así como su inocuidad. Por otra parte, la industria de alimentos siempre está buscando ideas para desarrollar nuevos productos y así como del yogurt derivaron otros productos, podrían utilizarse los alimentos fermentados indígenas para desarrollar productos novedosos.

2.4. Atoles Agrios

Los atoles preparados con masa o maíz agriado representan uno de tantos productos que se elaboran con masa de maíz nixtamalizada y podrían ser una de las principales fuentes calóricas en la dieta de comunidades indígenas en México. Tienen la virtud de conservarse en buen estado durante más días, esto es importante sobretodo cuando no se cuenta con otros medios para conservar los alimentos. Su elaboración se basa en recetas que han sido transferidas por generación y en su proceso de fermentación intervienen microorganismos, principalmente levaduras y bacterias, que la mayoría de las veces producen, por medio de enzimas, cambios favorables en el producto final, como la variación en la textura, el aroma y el sabor, aumentos en el tiempo de almacenamiento y mejoramiento de las proteínas nutritivas, debido al aumento de proteínas y vitaminas (Ulloa, et. al. 1989).

La masa agria que constituye a los atoles sufre una fermentación láctica, es decir, los azúcares del maíz se convierten en ácido láctico por efecto enzimático de los microorganismos, lo que ayuda a conservar el alimento, ya que evita el desarrollo de microorganismos patógenos o que provoquen la descomposición del mismo, además es posible que mejore la calidad de las proteínas, pues la masa microbiana, que bajo condiciones óptimas puede ser muy significativa, representa una fuente de proteínas, vitaminas y otros nutrientes de alta calidad. (Bonfil, 1982).

En Cuetzalan, Puebla se consumen tres tipos de atoles fermentados: xokoatol, eloatol y axocotl (Valderrama y Ramírez, 1993).

El **xokoatol** se elabora con maíz martajado en metate, al que se coloca en una olla durante una noche cerca del fogón (aproximadamente 15horas). Esta pasa fermentada se repasa en el metate y se agrega a una olla que contiene atole de masa, enseguida, la mezcla se endulza con piloncillo, se calienta y se mueve constantemente hasta que espese. Este atole se toma frío o tibio en cualquier día, pero sobre todo en la semana santa. En ocasiones se llega a servir acompañado de totopoch, barritas de masa con panela rayada que semejan lengüetas. El sabor del xokoatol es agrídulce parecido al del tamarindo.

El atole de maíz tierno fermentado, **eloatol**, sólo se prepara en el tiempo en que aparecen los primeros elotes de la milpa. Para prepararlo, se muele en metate el maíz tierno, después se pone en una olla, se bate a mano y se cuele. Para fermentar este maíz se deja en la olla junto al fogón medio día, luego se le agrega panela y se cuece hasta quedar espeso. El maíz tierno también se usa para hacer tortillas elotaxkal.

2.4.1 Axocotl o atole agrio.

El atole agrio o **Axocotl** (palabra náhuatl), es una bebida tradicional refrescante, de fermentación ácida no alcohólica, a base de maíz nixtamalizado, consumido por diversos grupos indígenas en México, durante festividades e incluso en sustitución del agua. Su fermentación es natural, es decir, no se agrega inóculo, sino que se deja actuar la microbiota natural para llevar a cabo la fermentación. Se cuenta con muy poca información acerca del atole agrio, especialmente de su microbiología o química, durante y al final de la elaboración del mismo.

El maíz, fundamento de la cultura mesoamericana, se aprovecha de muchas maneras, entre las que está el atole agrio axocotl. Debido a su importancia material, el maíz constituye un pilar del pensamiento mítico de los náhuatl y un objeto ritual por excelencia.

2.4.1.1 Zona de producción

Los estados en donde se consume el atole agrio, además de Puebla, son San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, D.F., Guerrero, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco y Oaxaca (Figura 2.4.1.1.1).

El Axocotl se consume en la sierra norte de Puebla y en este estudio se analizó el elaborado en Cuetzalan. El Municipio de Cuetzalan, Puebla se localiza en la porción centro oriental del país, sobre la Sierra Norte de Puebla, colinda con el municipio de Jonotla, Ayotoxco, Tlalauquitepec y Zoquiapan (Figura 2.4.1.1.2), es un paisaje serrano, con una diversidad de climas y vegetación. Se ha declarado como ciudad típica, monumental y pueblo mágico. Cuetzalan significa manojo de plumas rojas con puntas azules que dan el fonema náhuatl de "Quetzalli" (Lugar de Quetzales).



Figura 2.4.1.1.1. Estados en donde se consume el Atole Agrio

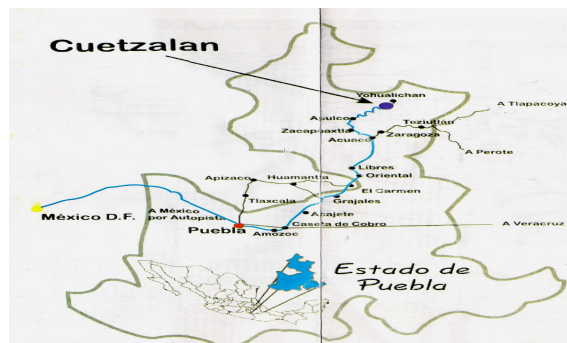


Figura 2.4.1.1.2. Mapa de Cuetzalan, Puebla.

Los alimentos más importantes en la dieta de los náhuatl de Cuetzalan son los mismos de sus ancestros antes de la llegada de los españoles, los preparados a base de maíz, así además de comer el maíz en la tortilla existe la costumbre de tomar atoles y algunas aguas a base de maíz seco, tostado, germinado y fermentado. En los últimos años ha venido tomándose con más frecuencia por lo refrescante de su sabor.

El 4 de octubre (Feria del café y del Hupilil) y el 30 de noviembre (Día de San Andrés), así como en otras celebraciones, se produce el atole agrio entre la comunidad náhuatl.

2.4.1.2. Proceso de elaboración del Axocotl

El atole o agua agria, axokot, es de color verdoso debido a que el fermentado de maíz se mezcla con una hierba conocida como axokoxiuit "la hierba del axokot", o tsopelikxiuit "hierba

dulce" (*Lippia dulcis*), la cual le da un sabor dulce al preparado. Se prepara en un cántaro de boca ancha que solo se destina a este fin, axokokomit. Para hacer el axokot primero se cocina el atole de masa y la hierba antes descrita se muele con un poco de cal y se unta en el interior del cántaro. Luego, se vierte el atole de masa en el cántaro y agua hirviendo, se colocan brazas ardiendo en la boca del cántaro para evitar el "mal de ojo". Para lograr un buen fermentado se tapa el cántaro con hojas verdes de plátano y se coloca éste sobre una cama de hojas secas y costales que también llegan a cubrir los costados hasta lograr una cubierta térmica. Algunas familias cubren el cántaro con las enaguas de lana negra de quien prepara el axokot, ya que así "agarra" más sabor el fermentado. Requiere de unas 72hrs de fermentación, si al probarlo sabe muy agrio le añaden un poco de cal, si le falta dulce le agregan hierba dulce tsopekxiuit (Valderrama y Ramírez, 1993).

2.4.1.3. Proceso de nixtamalización para la elaboración de atoles agrios

La palabra náhuatl xokok es para designar cualquier producto agrio o ácido, por lo que se usa como raíz para nombrar los productos sometidos a nixtamalización: xokoatol, axokot, xokoktamal. La nixtamalización del maíz es un paso importante para la presencia de los microorganismos en la fermentación ácido láctica. El nixtamal, producto de la nixtamalización, se logra con el cocimiento del grano del maíz en agua de cal durante un lapso, el cual es determinado a partir de la consistencia del grano. Cuando el maíz está en su punto de nixkon es porque se pela y está listo para ser lavado y escurrido. El nixtamal se lava en una bandeja de barro, kaxajpas, para quitar la cal y la cubierta exterior del grano que se ha desprendido con el cocimiento. Esta "cáscara" de maíz es indigesta y da mal sabor, por lo que este procedimiento no sólo la elimina, sino que también transforma algunos compuestos químicos, como las proteínas o la niacina, en nutrientes más asequibles para el consumo humano. Finalmente para obtener la masa o tixti se somete al nixtamal a un proceso de molienda. El modo mesoamericano consiste en emplear el metate, que ahora ha sido sustituido parcialmente por el molino manual o el molido por una máquina. La masa de maíz sirve de base para el atole agrio. Durante la cocción del atole de masa, debe moverse, ya que una de las propiedades del nixtamal es volverse gelatinoso y pegarse en el fondo de la olla. El atole se puede tomar solo o en frío como refresco, sin dulce es buen remedio para la "cruda" xokomiki o también, para las personas que tienen "el estómago caliente".

2.5. Bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas o de fermentación láctica (LAB) son responsables de la fermentación de una gran cantidad de alimentos. Son de gran valor para la industria de los alimentos por sus propiedades fermentativas y promotoras de la salud, lo que hace que su identificación a nivel de especie se haya convertido en un parámetro importante en la tecnología, ecología y salud (Daeschel, et.al., 1987).

Su larga historia en la salud humana y animal las refiere al status de GRAS (Generalmente Reconocidas como Saludables). Los beneficios potenciales en la salud de ciertas especies hacen que se usen como probióticos (Fuller, 1989) y combinando esto con una variedad de características metabólicas interesantes que tienen, su rango de aplicación es bastante amplio, esto depende de las características específicas de las cepas (propiedades metabólicas, forma de crecimiento, resistencia a procesos industriales vida de anaquel, etc.) (Temmerman, et.al., 2004).

Son un grupo heterogéneo de bacterias formado por cocos y bacilos Gram +, carecen de la capacidad de biosíntesis del grupo hemo, por lo que son catalasa (enzima que destruye el H₂O₂) negativas, algunas son capaces de tomar grupos hemo externos para formar una enzima denominada pseudocatalasa, sobre todo en cultivos de baja concentración de azúcar (Rodas, et.al., 2003). Son no esporuladas, generalmente inmóviles y su contenido de G+C es menor del 50% (Holzapfel, et. al. 2001). Se ha estimado el tamaño de su genoma entre 1750 a 2500kb (Le Bourgeois, et.al. 1989). Tienen la capacidad de producir ácido láctico como producto principal o único de la fermentación de azúcares, son bacterias mesófilas o termófilas y dejan de multiplicarse activamente debajo de 8-10°C.

Tienen una limitada capacidad biosintética, por lo que requieren factores de crecimiento complejos (vitaminas del grupo B, purinas, pirimidinas y aminoácidos). Tienen posibilidades anabólicas muy limitadas, lo que reduce el rendimiento de su crecimiento. Como carecen de porfirinas y citocromos (compuestos porfirínicos) no realizan fosforilación por transporte de electrones, sino que obtienen energía por fosforilación a nivel sustrato, produciendo energía solo por la fermentación de azúcares.

En cuanto a los nutrientes para su crecimiento, requieren de una fuente de carbono para extraer la energía necesaria para su metabolismo (los hidratos de carbono, tales como almidón

y azúcares), así como del nitrógeno, el fósforo y el azufre, los cuales se incorporan a las moléculas estructurales y funcionales de la célula. Los medios de cultivo para estas bacterias generalmente deben contener nitrógeno bajo la forma de nitrógeno proteico (extracto de levadura), los otros dos elementos importantes se incluyen como sales de fosfato y sulfato, respectivamente y por último de una serie de micronutrientes (vitaminas, hierro, cobalto, cobre, zinc, etc.) (Mönckeberg, 1988)

Son microorganismos anaerobios facultativos o aerotolerantes, es decir, que pueden desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. La tolerancia al oxígeno puede lograrse porque acumulan gran cantidad de Mn^{2+} , que es cofactor de la superóxido dismutasa. La mayoría de las BAL obtienen energía sólo del metabolismo de azúcares y compuestos fermentables, por ello generalmente su hábitat se asocia a la microbiota normal de la superficie de material vegetal, de alimentos ricos en azúcares y al tracto naseo-faríngeo y gastrointestinal en animales y humanos.

Las BAL toleran bien las concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias, por lo que pueden desplazarlas de los hábitats que colonizan (Ribéreau-Gayon et al., 2000).

Las bacterias lácticas carecen de Ciclo de Krebs funcional, en ciertos casos pueden usar azúcares para formar polímeros extracelulares de dextrano. Las bacterias del género *Leuconostoc* son productoras de dextrano cuando crecen utilizando como fuente de carbono azúcares de bajo peso molecular.

Una notable diferencia entre las LAB es la naturaleza de los productos formados durante la fermentación de los azúcares (Tabla 3.5.1). Se clasifican en:

a) Homofermentativa / Homoláctica: usa la vía de Embden-Meyerhoff, en donde:

$Glucosa + 2 ADP + 2 Pi \rightarrow 2 \text{ lactato} + 2 ATP$ y se da una producción final exclusiva de ácido láctico. *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, y *Lactobacillus* son microorganismos que llevan a cabo este tipo de fermentación, para lo cual poseen la Fructosa 1,6-bifosfatasa y la Fosfato aldolasa. En este tipo de fermentación no se produce CO_2

b) Heterofermentativa / Heteroláctica: usa la vía de las Pentosas, en donde:

Glucosa + ADP + Pi → lactato + etanol + CO₂ + ATP y la producción de ácido láctico además de otros productos formados por otras vías como el acetato, formato y glicerol. *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son ejemplos de microorganismos que llevan a cabo este tipo de fermentación y no poseen la Fructuosa 1,6-bifosfatasa, ni la Fosfato aldolasa, pero sí la Fosfocetosa (Thompson y Gentry-Weeks, 1994).

Las diferencias en los productos de la fermentación están entonces determinadas por la presencia o ausencia de la enzima aldolasa, una de las enzimas clave en la glucólisis (Madigan, et.al., 2000). En ambas vías metabólicas, el piruvato es un intermediario común y puede tener varios destinos, como la síntesis de compuestos aromáticos (diacetilo o acetoína) o la de ácido acético (Thomas et al., 1979).

Tabla 2.5.1. Principales productos de la fermentación por ciertas bacterias lácticas

ORGANISMO	VIA FERMENTATIVA	PRINCIPALES PRODUCTOS DE LA FERMENTACION ^a
<i>Lactococcus</i>	Homofermentativa	4 lactatos
<i>Streptococcus</i>	Homofermentativa	2 o 4 lactatos
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentativa	2 o 4 lactatos
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentativa	2 lactato + 2 etanol + 2 CO ₂

^aMoles por molécula fermentada de lactosa.

Las bacterias heterofermentativas son más importantes que las homofermentativas en la producción de sabor porque producen diacetilo, que da aroma al alimento.

Existe un grupo de lactobacilos que poseen una fosfocetolasa inducible por pentosas, la cual les permite transformar las pentosas en ácido láctico y etanol/ácido acético, mientras que las hexosas producen únicamente ácido láctico por vía homoláctica. Este grupo de lactobacilos tiene un metabolismo heterofermentativo facultativo (Ribéreau-Gayon et al., 2000).

Los aminoácidos libres, resultantes de la proteólisis pueden ser catabolizados por las LAB a importantes componentes del sabor, tales como aldehídos, ácidos, alcoholes, ésteres y tioles.

Los ácidos grasos libres son precursores de metilcetonas, alcoholes, lactanos y esteres, además de ser importantes componentes del sabor. Se ha detectado también la actividad de esterasa y lipasa intracelulares en *Lc. Lactis* (Ribéreau-Gayon et al., 2000).

Los diferentes géneros de bacterias lácticas se han definido a partir de su morfología celular, agrupamiento y el tipo de metabolismo fermentativo (Tabla 2.5.2).

Tabla 2.5.2. Clasificación de Bacterias Lácticas

MORFOLOGÍA Y AGRUPAMIENTO	TIPO DE METABOLISMO FERMENTATIVO	EJEMPLOS
COCOS EN CADENA	HOMOFERMENTATIVO	<i>Streptococcus</i>
		<i>Enterococcus</i>
	HETEROFERMENTATIVO	<i>Lactococcus</i>
		<i>Leuconostoc</i>
COCOS EN TETRADAS	HOMOFERMENTATIVO	<i>Pediococcus</i>
BACILOS	HOMO O HETEROFERMENTATIVO	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>

(Czerniczyniec, A, et al. 2000)

En la figura 2.5.1 se muestra por medio de un árbol filogenético las principales líneas de descendencia entre las bacterias, basado en un análisis comparativo de las secuencias del gen 16S rARN. (Klaenhammer, et.al., 2002)

Las bacterias lácticas incluyen a los géneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* (figura 2.5.2), *Leuconostoc* (Figura 2.5.3), *Lactococcus* (Figura 2.5.4), *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* (Figura 2.5.5), *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella* (Figura 2.5.6) (Klaenhammer, et.al., 2002 y Stiles, et.al. 1997).

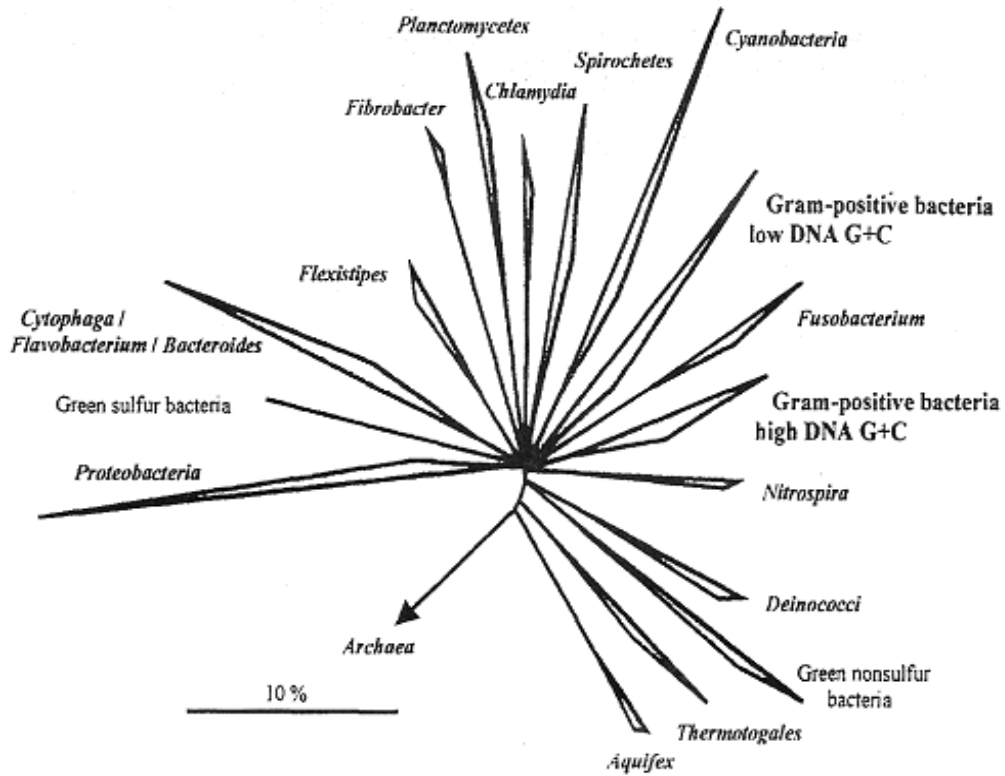


Figura 2.5.1. Líneas de descendencia entre las bacterias

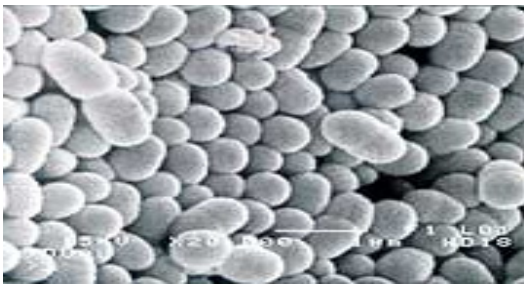


Figura 2.5.2. *Lactococcus sp.*
(Bruno, et.al. 2004).



Figura 2.5.3. *Lactobacillus sp.*
(Canal 1999).

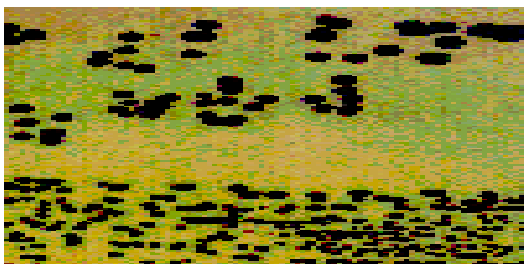


Figura 2.5.4. *L. Plantarum A6*
(Brizuela, et al. ,1998).

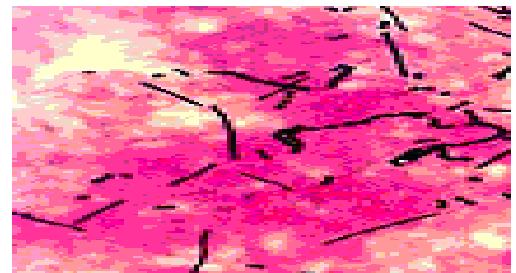


Figura 2.5.5. *Streptococcus sp.*
(Pardo, 2003).

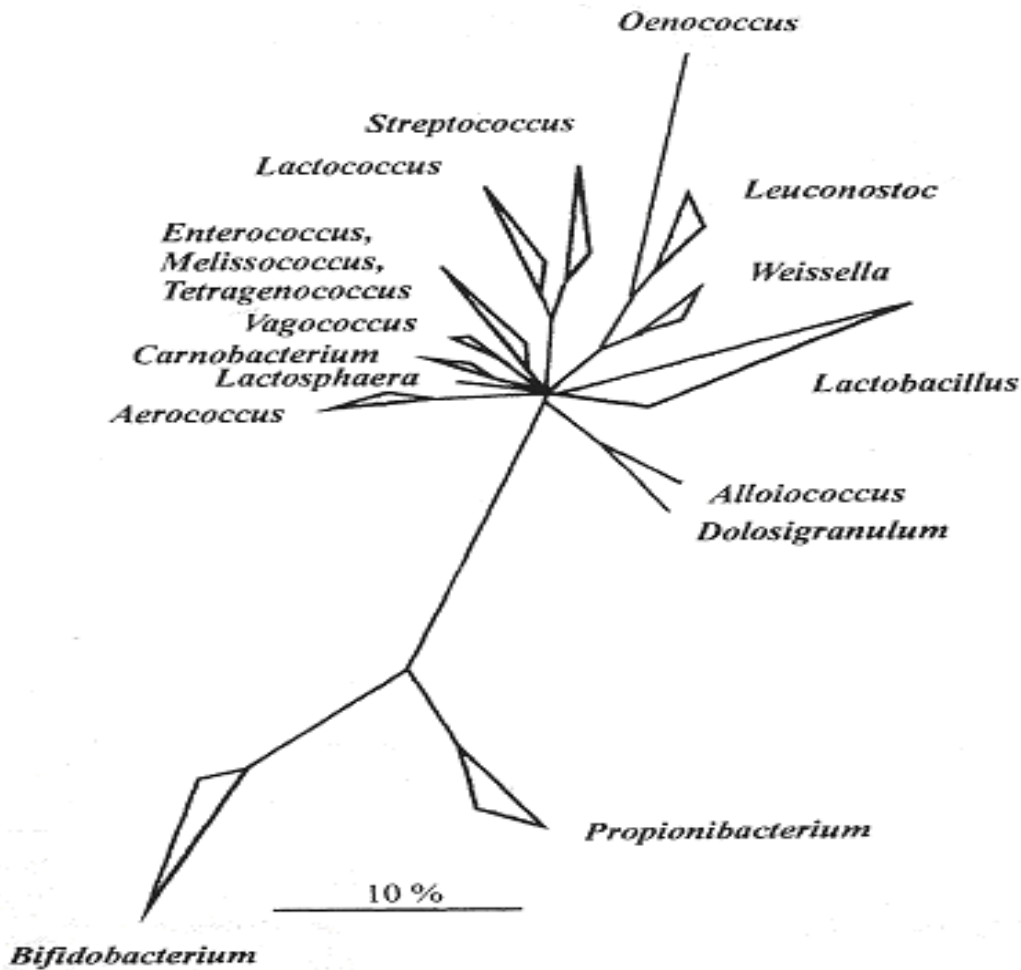


Figura 2.5.6. Principales géneros filogenéticos de bacterias ácido lácticas y su relación con bacterias gram + de bajo (parte de arriba) y alto (parte de abajo) % mol de G+C en el DNA.

2.5.1 Importancia de las bacterias ácido lácticas en los alimentos fermentados.

Las BAL al fermentar los alimentos permiten aprovechar los recursos de bajo valor comercial, ampliar el periodo de utilidad del producto, mejorar su calidad nutricional e impartir sabores y aromas. Son las características del alimento a fermentar las que determinan los microorganismos que van a actuar en la fermentación. La presencia de azúcares simples dará lugar a una fermentación por bacterias lácticas, éstas modificarán el ambiente impidiendo el crecimiento de otros microorganismos.

Los cambios registrados en los últimos años en el perfil de los consumidores y en sus hábitos alimenticios, exigen alimentos más sanos y naturales y se hace necesario que las industrias alimenticias se adapten a nuevos desafíos. Sería de gran importancia que estas industrias

fueran capaces de impulsar el desarrollo de nuevos productos alimenticios fortificados y enriquecidos, que tengan efectos benéficos sobre el organismo y eviten diversas enfermedades.

El consumo de algunas bacterias lácticas, como parte de la dieta permite el restablecimiento y mantenimiento de la microbiota intestinal, además su ingestión parece ser beneficiosa por el aporte vitamínico que suponen, facilitan la digestión de la lactosa y controlan otras poblaciones intestinales. Los alimentos complementados con BAL ayudan a la buena digestión, al fortalecimiento del sistema inmune, a la reducción del nivel de colesterol en la sangre, así como a una mayor tolerancia a la lactosa y en general, un mejoramiento de la salud. Estos alimentos son denominados probióticos, pues contienen microorganismos benéficos activos (EUFIC, 2000).

En este contexto, las BAL cumplen un papel protagónico por sus efectos benéficos para el cuerpo como la protección contra bacterias patógenas, la regulación del sistema inmunológico y la estabilidad en la mucosa intestinal. Para que una bacteria pueda ser utilizada como un agente probiótico es necesario que sea estable ante los ácidos biliares, posea adherencia a las células del intestino y sea capaz de multiplicarse en el tracto intestinal humano.

La acción de las BAL sobre los alimentos originan modificaciones graduales, que controladas y dirigidas por el hombre, dan como resultados una diversidad de productos alimenticios, farmacéuticos, bebidas, vitaminas, antibióticos y muchos otros de gran utilidad.

Las bacterias lácticas junto con otros microorganismos han sido parte de cultivos mixtos naturales. Se ha estudiado a los alimentos fermentados con el fin de diseñar los cultivos iniciadores para diversos alimentos humanos o animales tales como productos lácteos (quesos, mantequilla, yogurt, leches ácidas, etc), vegetales fermentados (encurtidos, aceitunas, etc), embutidos, panes ácidos, encurtidos y ensilados (Canal,1999).

Los cultivos iniciadores de bacterias lácticas tienen un papel relevante en los campos de lechería, producción de vinos, procesamiento de carnes y derivados ensilados, aplicaciones farmacéuticas y prevención de la salud humana y animal, entre otros.

El antagonismo láctico es la actividad de las bacterias lácticas por la que matan o inhiben el crecimiento de otras bacterias estrechamente relacionadas con ellas. Este efecto puede existir, incluso, entre bacterias de la misma especie. Sus causas son:

a. Producción de bacteriocinas, que son antibióticos peptídicos de síntesis ribosomal producidos por distintos tipos de bacterias, suelen tener un espectro de acción muy reducido, normalmente son plasmídicas, aunque hay cromosómicas, algunas son termorresistentes y otras termosensibles; algunas poseen antibióticos modificados (ej. los «lantibióticos», que tiene el aminoácido modificado Lantionina), se pueden usar directamente como aditivo alimentario (caso de la Nisina) o indirectamente (cuando son producidas por las LAB que intervienen en la producción de un alimento). Para usarse como conservantes no deben afectar la flora intestinal, ni inactivarse por componentes del alimento, no debe inducir la aparición de formas resistentes, ni usarse en medicina ni en veterinaria. La bacteriocina más usada es la nisina producida por *Lactococcus lactis* sp. *lactis.*, es un lantibiótico termoestable que cumple las condiciones anteriores (Fraizer, 1978).

b. Producción de ácidos láctico y acético, que son ácidos orgánicos de cadena corta, muy tóxicos para los microorganismos porque atraviesan la membrana bacteriana en la forma no ionizada y se acumulan en la forma ionizada en el interior (Fraizer, 1978).

c. Producción de peróxidos. Ciertas cepas de bacterias lácticas son capaces de tomar oxígeno para formar peróxidos mediante flavoproteína-oxidasa o mediante peroxidasa. El H₂O₂ producido y liberado al medio resulta extremadamente tóxico para otras bacterias que comparten el hábitat (Fraizer, 1978).

2.6 Métodos para la identificación de microorganismos

A partir de la década pasada, la comunidad científica ha puesto especial atención a la correcta identificación de bacterias usadas en el consumo humano (Hamilton, et.al. 1999). Son requisitos primarios en la industria criterios inequívocos y métodos fiables para la identificación y caracterización de cepas microbianas, así como en otros campos en donde se aplica la microbiología.

La mayoría de las bacterias aun se desconocen, es así que nuestro conocimiento acerca de la ecología bacteriana es pobre y las expectativas acerca de especies especializadas con nuevas funciones enzimáticas y nuevos productos son altas. La identificación de dichas bacterias es un campo creciente de interés en la microbiología (Busse, et.al. 1996).

La identificación y clasificación bacteriana había representado un área poco interesante dentro de la microbiología y su realización se basaba fundamentalmente en pruebas fenotípicas clásicas o tradicionales. Los trabajos realizados por Carl R. Woese en los 70's, empleando la molécula de rRNA para estudiar la filogenia de los procariontes, promovieron un gran desarrollo en lo que a la taxonomía bacteriana se refiere. Recientemente se usa una combinación de las pruebas tradicionales y de las técnicas de biología molecular como la PCR, permitiendo una caracterización y tipificación más precisa, a la vez de un mejor conocimiento de las especies (Jones, et.al. 1997). El empleo de las técnicas moleculares basadas en la utilización del ARNr o en los genes que la codifican (rRNA) revolucionaron la visión taxonómica y filogenética de los de todos los seres vivos (Vanadame et.al. 1996). El empleo de la información genotípica y fenotípica en una forma aislada para la identificación y/o caracterización de un grupo determinado, ha generado en algunos casos resultados que difieren al comparar ambos tipos de información (Hames y Vogel, 1995). Hoy día, la taxonomía bacteriana emplea diferentes tipos de información: genotípica o la derivada de ácidos nucleicos (ADN y RNA) y la fenotípica o la derivada de proteínas y sus funciones, marcadores quimiotaxonómicos y un amplio rango de características expresadas (Vandamme et.al. 1996).

Una alternativa para la determinación de la estructura microbiana de sistemas complejos, como los alimentos fermentados es aislar a los microorganismos y tipificarlos. Otra es utilizar métodos que no dependen del cultivo, en los que se extraen ácidos nucleicos directamente del alimento (Díaz y Wachter, 2003).

Actualmente se reconoce la importancia del estudio de los microorganismos de una forma más completa en la que no solo puedan identificarse a los microorganismos cultivables o no, sino también en la que se llegue a comprender las interacciones que existen entre ellos, es decir, considerando el ecosistema completo, ya que el crecimiento, la sobrevivencia y la actividad de cualquier especie, pueden estar determinados por la presencia de otras especies (Díaz y Wachter, 2003). Para ello se han desarrollado las técnicas genotípicas más que las fenotípicas.

Están disponibles un extenso rango de técnicas de identificación, cada una de las cuales tiene distinto poder discriminativo, reproducibilidad y carga de trabajo (Tabla 2.6.1).

Tabla 2.6.1. Técnicas usadas para la identificación de LAB

TECNICA	PRINCIPIO	CARGA TRABAJO	PODER DISCRIMINATIVO	REPRODUCIBILIDAD
MÉTODOS FENOTÍPICOS				
Análisis Morfológico (Macroscópico y microscópico)	Morfología de las colonias, color de las colonias cuerpos fructíferos, micelios Morfología de la célula, tamaño de la célula, motilidad, tipo de flagelaron, materiales de reserva, tinción de garm, tinción de ac. grasos	B	Genero o menos	M
Análisis Fisiológico	Características de crecimiento y pruebas simples: Rango de temperatura , rango de pH, tolerancia de sales	M	Genero o menos	B
Caracterización Bioquímica	Patrones de asimilación y fermentación (API, BIOLOG,..): Fuente de carbono usada, oxidación y fermentación de carbohidratos, perfil enzimático	B	Genero a especie	M
Perfil proteínico	Dodecil Sulfato de Sodio: Electroforesis de proteínas celulares en gel de poliacrilamida	A	Especie	A
Serología	Aglutinación, Inmunodifusión	B	Genero a especie	M
Quimiotaxonomía	Ácidos grasos, lípidos polares, ácidos micolicos, composición de lipopolisacaridos,, PAGE de lipopolisacáridos, diaminoácidos de la pared celular, composición de aminoácidos en la pared celular, azucres y pigmentos celulares	B	Genero a especie	M
MÉTODOS GENOTÍPICOS				
Primers específicos	PCR con primers de grupos específicos	B	Dependiendo del primer	A
Secuenciación	Determinación de secuencias de genes(16S rDNA)	A	Genero a especie	A
RFLP	Análisis de restricción del DNA con enzimas	M	Especie a cepa	A
RAPD-PCR	Acción de primers al azar en PCR	B	Especie a cepa	B
AFLP	Combinación de una restricción del DNA con enzimas y de la PCR	A	Especie a cepa	A
PFGE	Análisis de la restricción con enzimas y electroforesis en gel de campo pulsado	A	Cepa	A
Ribotipificación	Análisis de la restricción con enzimas y sondas de detección de oligonucleótidos	A	Especie a cepa	A
Pruebas de Hibridación	Hibridación del DNA usando sondas de marcado.	A	Genero a especie	A

B: Bajo, M: Moderado, A: Alto
(Temmerman, 2004, Busse, et.al. 1996)

Los conceptos ecológicos permiten un control de microorganismos indeseables y uso de los deseables para la producción de alimentos y bebidas fermentadas, así como con función probiótica.

La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y las enzimas de restricción son muy usadas en los nuevos métodos de identificación de microorganismos.

2.7 La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

En 1986, un investigador norteamericano, K. Mullis, desarrolló una técnica que permite, a partir de una muestra muy pequeña de DNA, obtener millones de copias de DNA *in vitro*, en unas pocas horas y sin necesidad de usar células vivas (Riley, 2004). Esta técnica, llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), puede amplificar directamente un gen o fragmento de DNA o indirectamente un RNA sin necesidad de una purificación previa de la muestra original.

La PCR permite la amplificación selectiva de segmentos específicos de ácidos nucleicos a través del uso de primers de oligonucleótidos bajo condiciones de reacción controladas.

En la PCR una polimerasa termoestable de DNA, frecuentemente es la enzima Taq proveniente de *Thermus aquaticus*, es usada para amplificar selectivamente secuencias de DNA de interés.

Para la realización práctica, se precisa la mezcla de reacción de los siguientes reactivos:

- a) Los cuatro dNTP's, (desoxirribonucleótidos trifosfato –dATP, dGTP, dCTP y dTTP–) en exceso como sustratos para la síntesis de DNA y para ser reconocidos por la polimerasa deben acompañarse de Mg^{2+} .
- b) Dos oligonucleótidos de cadena sencilla, generalmente sintéticos, de 18 a 30 nucleótidos, que servirán de cebadores. Sus secuencias han de ser complementarias a los dos extremos 3' de la región que se desea amplificar. Por esta razón es indispensable conocer la secuencia de los dos extremos de la región que se desea amplificar
- c) Una DNA polimerasa termoestable (Taq) que le permita actuar en ciclos sucesivos sin inactivarse. La replicación a altas temperaturas contribuye a mejorar la especificidad y

rendimiento del proceso. La más usada se llama Taq polimerasa por proceder de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*.

d) El templado con la secuencia de DNA que se quiere amplificar

La mezcla de reacción se somete a una sucesión de ciclos (generalmente de 20 a 40) para conseguir una enorme amplificación del número de moléculas que contienen la secuencia de interés. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de DNA molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble. Cada ciclo de PCR consta de tres etapas (Figura 4.5.1.1):

1. Desnaturalización.- la temperatura de 68-97°C, de 30-120 min debe ser mayor a la temperatura de fusión de la región de DNA que se quiere amplificar, permitiendo que este calentamiento breve separe las dos hebras del DNA y de hebras sencillas
2. Alineamiento, anillamiento.- es cuando se alinean el cebador con la cadena simple llamada templado. El cebador se escoge de acuerdo con la región que se vaya a amplificar. La temperatura que se selecciona para esta etapa oscila entre los 37-65°C de 10-120 seg, el enfriamiento rápido permite la hibridación de las hebras sencillas de DNA con los oligonucleótidos cebadores o primers tras la desnaturalización. A mayor tiempo de alineamiento es probable que se presente un mayor porcentaje de amplificación inespecífica. A mayor temperatura de alineamiento es probable que disminuyan las amplificaciones inespecíficas.
3. Elongación (o replicación).- En esta etapa se une la Taq polimerasa a cada uno de los cebadores que se han pegado a cada uno de sus extremos respectivos de cada una de las cadenas simples de DNA y permite que se sintetice la cadena de DNA complementaria a partir del extremo 3'. La temperatura es de 72°C. Es la etapa de amplificación en la que la Taq polimerasa termoestable elonga los cebadores empleado como molde ambas hebras originales.
4. La replicación transcurre en el sentido 5' → 3' a partir del extremo 3'-OH de cada cebador, empleando los 4 dNTP's hasta que termine la lectura del molde o hasta comenzar una nueva etapa de desnaturalización.

Además de las tres etapas de cada ciclo, comúnmente se añade una etapa previa y una final al conjunto de todos los ciclos. La etapa previa, a elevada temperatura, sirve básicamente para inactivar proteasas y nucleasas de la muestra, así como para asegurar la desnaturalización completa del DNA especialmente si éste es de gran tamaño o posee regiones muy

compactadas. La etapa final, por su parte consiste en una prolongación de la última elongación para permitir que se completen todos los fragmentos. Los productos de PCR amplificados pueden ser examinados en un gel de agarosa

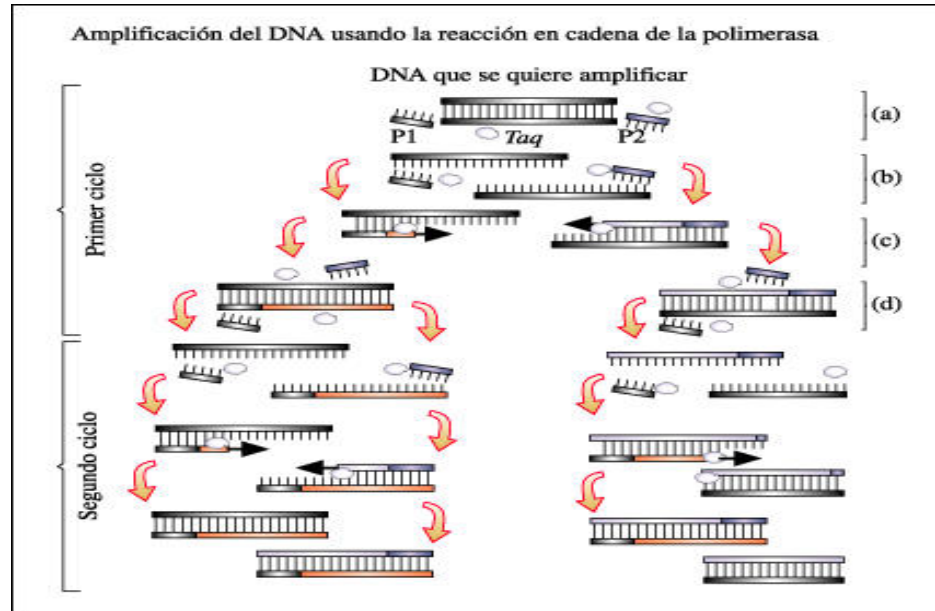


Figura 2.7.1. Reacción en cadena de la polimerasa (Brock, T.D. et.al. 1993).

2.8. Enzimas de restricción

Una enzima de restricción tiene la capacidad de cortar el ADN en un sitio específico, ya que cada enzima de restricción reconoce una secuencia de nucleótidos específica y característica. Las endonucleasas específicas cortan el ADN en diferentes longitudes, dependiendo del número y posiciones de secuencias de reconocimiento individuales. Debido a que los genomas de las bacterias varían ampliamente en la composición de las bases (25-72%G+C) que lo componen, la distribución de tamaños de los fragmentos producidos por la digestión con una enzima de restricción varía considerablemente. Los fragmentos generados por la digestión con una enzima de restricción se separan de acuerdo al tamaño por electroforesis en gel de agarosa para dar un patrón de bandas. Los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción son en la mayoría de los casos de 4 o 6 nucleótidos ordenados de manera específica y simétrica. El intervalo de longitud de los fragmentos será diferente para diferentes enzimas de restricción; una enzima cuya secuencia de reconocimiento es de seis bases generará menos fragmentos que la que reconoce 4 bases, pero en promedio más largos (Jones, 1997).

Mediante el uso de la electroforesis convencional se logra separar fragmentos cuya longitud cae en un intervalo de 100 a 20 000 bases, sin embargo, empleando la electroforesis de campo pulsante se logra separar fragmentos más largos (>9000 kb) (Owen, 1989).

Una simple alteración a un nucleótido puede crear o destruir un sitio de restricción, las mutaciones causan la variación en el número de sitios. La variación entre las posiciones individuales de los sitios de corte y la longitud de DNA entre ellas, resulta en los fragmentos de restricción de diferente tamaño. Cuando el DNA digerido se corre en el gel de agarosa los fragmentos largos estarán más cercanos al polo positivo y los más pequeños en el polo negativo.

El número de fragmentos restringidos de DNA o de amplicones resultantes de la PCR se reducen con la selección de enzimas de restricción, por ejemplo las de corte raro reconocen una combinación específica de 6 a 8 bases, el uso de estas enzimas se conoce como análisis de los fragmentos de restricción de baja frecuencia, los fragmentos son pocos y de gran tamaño, por lo que utiliza electroforesis de campo pulsado (Schneegurt, et.al. 1998).

El tamaño del genoma típico de la mayoría de los DNA's procarióticos está entre 800 y 8000kb originando cerca de la 6×10^6 bases de longitud, el genoma de las bacterias lácticas esta estimado entre 1750 y 2500kb dependiendo del género y especie. Cada cepa exhibe un patrón único de restricción, sin embargo el porcentaje de co-migración de los fragmentos de 2 cepas estrechamente relacionadas es cerca del 80% y de a 20-40% cuando no se relacionan en especie (Le Bourgeois, et.al. 1989).

Las endonucleasas de restricción del tipo II reconocen secuencias cortas de la doble cadena de ADN y la cortan en sitios específicos que contengan las secuencias de reconocimiento o estén adyacentes a las mismas. Hasta ahora, se han aislado más de 600 endonucleasas de restricción del tipo II. Algunas endonucleasas de restricción del tipo II actúan situando el corte en el sitio de reconocimiento, produciendo extremos romos o pegajosos¹ (Figura 4.5.1.2). Por ejemplo, BamHI genera extremos pegajosos o cohesivos, porque corta asimétricamente, su secuencia de

¹ Resultado de una secuencia palindrómica, en la que la secuencia de reconocimiento al leerse en la misma dirección (5'→3'), las dos cadenas complementarias son idénticas.

reconocimiento es 5' G| GATCC 3' / 3' CCTAG| G 5'; DraI genera extremos romos rasurados o lisos, porque corta simétricamente y su secuencia de corte es 5' TTT| AAA 3'/ 3' AAA| TTT 5'.

Las endonucleasas de restricción con la misma secuencia en el sitio de reconocimiento se llaman izoismómeros (Tabla 4.5.1.1). Los isómeros pueden o no cortar el ADN idénticamente para producir el mismo extremo. Inversamente, 2 o mas endonucleasas de restricción que reconocen secuencias idénticas o diferentes podrían generar fragmentos de ADN's idénticos, se dice que producen extremos compatibles. Por Ejemplo Bgl II reconoce una secuencia de 6 nucleótidos diferente a BamHI, pero genera extremos pegajosos compatibles con los de BamHI, Bgl II corta en: 5' A| GATCT 3' /3' TCTAG| A 5'.

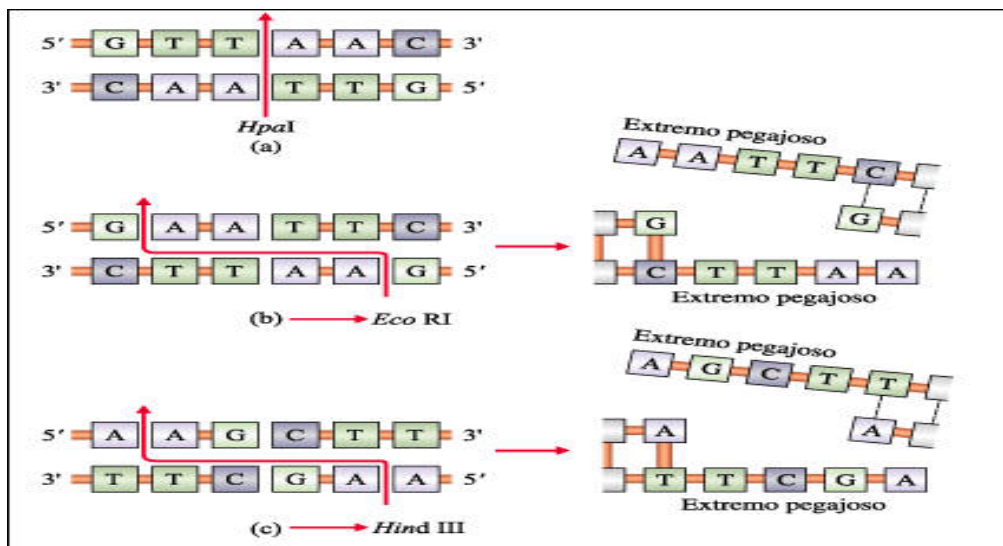


Figura 2.8.1. Enzimas de restricción (Curtis y Barnes, 2001)

Tabla 2.8.1. Enzimas de restricción y algunas de sus características.

Nombre	Secuencia de reconocimiento ^a	Temp. de Reacción ^b	Temp. de Inactivación ^b	Izoismómeros	Comentarios
HaeIII	GG CC	37	90	BshI, BspKI, PalI	Muy estable; activa a 70°C
HinfI	G ANTC	37	80		Actividad estelar.

^aSecuencia de reconocimiento de nucleótidos de 5' a 3', la línea vertical indica el lugar de corte; N indica cualquier nucleótido.

^bLa temperatura de reacción es a la cual debe de llevarse a cabo la digestión del producto de PCR. La temperatura de inactivación es aquella a la que la enzima se inactiva a los 1min de estar a dicha temperatura en incubación. La temperatura esta dada en (°C). (Bloch y Grossmann, 1995)

La digestión de una muestra de ADN con una sencilla endonucleasa de restricción, incluye la incubación de la enzima con el ADN en las condiciones de reacción adecuadas. Las cantidades de enzima, ADN, de buffer, concentraciones iónicas, así como de temperatura y duración de la reacción varían de acuerdo a la aplicación específica.

En principio, 1U de endonucleasa de restricción digiere completamente 1µg de ADN en 1hr usando las condiciones de reacción recomendadas.

Las endonucleasas de restricción, generalmente se encuentran en organismos procariotes y son importantes por la degradación que hacen al ADN extraño. Los organismos que producen las enzimas de restricción tienen protegido su genoma por la metilación en la secuencia de reconocimiento de nucleótidos existente en la endonucleasa.

La pureza del ADN se relaciona con la eficiencia de la restricción de la endonucleasa, siendo uno de los parámetros más dependientes de la restricción. Así a una mayor impureza disminuye la eficiencia de la restricción y para evitar esta disminución se usa un mayor volumen de enzima en la mezcla de reacción (10-20 U de enzima por µg de ADN). A la vez que se aumenta el volumen de reacción se diluyen los inhibidores potenciales y se incrementa el tiempo de incubación.

Para el análisis de los fragmentos que se generan de ADN o de productos de PCR se usa la electroforesis en geles de agarosa.

2.9. Tipificación de microorganismos

La tipificación es un proceso para la caracterización de los microorganismos, ésta se realiza con base en su morfología, pruebas bioquímicas o secuencia genómica. Tiene el fin de diferenciar las cepas bacterianas pertenecientes a una misma especie. La esencia del uso de estos métodos es la de ser capaz de comparar aislamientos y agrupar cepas con idénticos resultados en un mismo grupo. Cuando dos aislamientos estudiados dan resultados diferentes según uno o más métodos de tipificación, en general puede concluirse que derivan de diferentes líneas clonales. Sin embargo, para poder ubicar distintos aislamientos en una misma línea clonal se requieren resultados coincidentes en más de un método de tipificación.

Los métodos de tipificación deben cumplir tres requisitos esenciales:

- 1) Poder de tipificación (ser capaces de catalogar cualquier aislamiento en un tipo determinado)
- 2) Poder discriminatorio (ser capaces de discriminar entre aislamientos no relacionados)
- 3) Reproducibilidad (ser capaces de brindar resultados reproducibles entre diferentes ensayos y estables para una cepa dada obtenida de diferentes orígenes).

A la hora de evaluar un método de tipificación, además de considerar estos requisitos, se considera también la sencillez de realización y de interpretación de resultados. (Van Belkum, et.al. 2001)

Los métodos para tipificar se pueden clasificar en fenotípicos y genotípicos

2.9.1 Métodos fenotípicos

Los **métodos fenotípicos** comprenden todo aquello que no está directamente relacionado con el DNA o RNA, es la información derivada del fenotipo² y se basan en la detección de fenotipos o características que expresa un organismo (Figura 2.9.1.1).

Durante el último siglo se ha dependido del aislamiento y cultivo de los microorganismos para su identificación. Estos métodos de identificación constituyen la base de las descripciones formales taxonómicas desde familia, género, especie y subespecies. Las características fenotípicas clásicas de las bacterias comprenden su morfología, fisiología y bioquímica. Individualmente muchas de estas características han sido consideradas irrelevantes, pero consideradas en conjunto dan información descriptiva valiosa para reconocer los taxa.

² Fenotipo de microorganismo: conjunto de propiedades celulares observables, como morfología, propiedades fisiológicas y la estructura de sus componentes celulares.

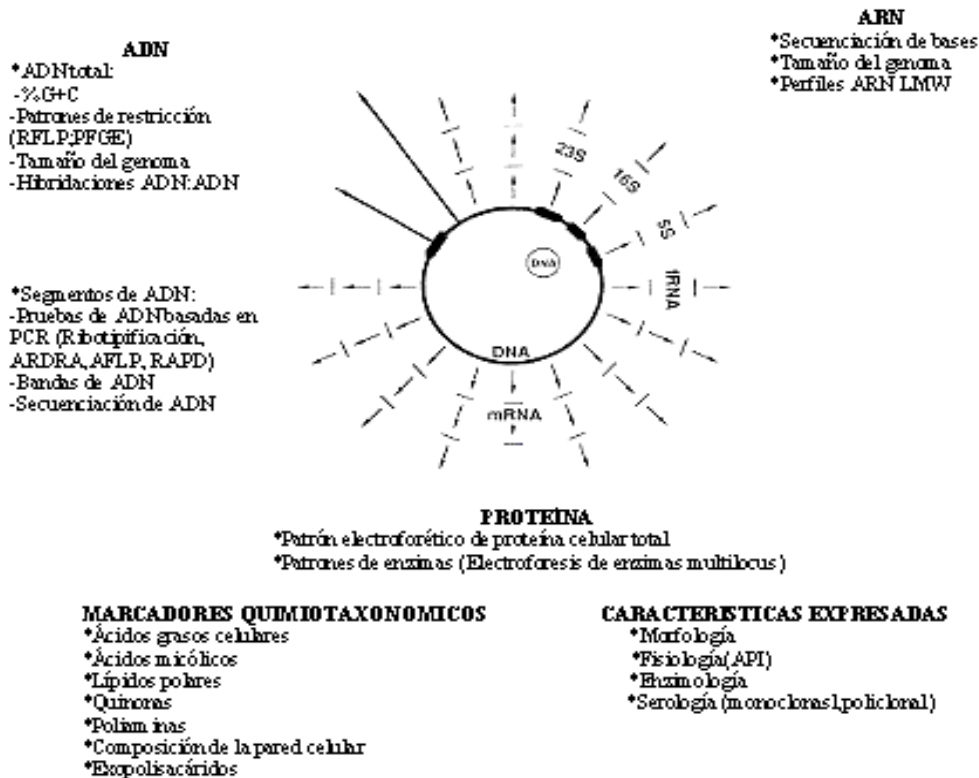


Figura 2.9.1.1. Información fenotípica (Romero, T. 2000).

Dentro de las técnicas fenotípicas se encuentra la tipificación por:

- **Crecimiento y características morfológicas.**- basadas en las propiedades de crecimiento en un medio sólido o líquido (color, textura y forma de las colonias) o al ser teñidas (tinción de gram). Estas técnicas no son lo suficientemente específicas para clasificar a los microorganismos en especies, sin embargo siguen siendo una herramienta útil.
- **Características bioquímicas.**- basadas en la actividad metabólica de los organismos. Las cepas se identifican por una serie de pruebas bioquímicas y se clasifican en biotipos. El poder de discriminación de la biotipificación depende del número de pruebas bioquímicas aplicadas. Han sido automatizadas para disminuir costos y tiempo. La principal desventaja es que las pruebas bioquímicas son susceptibles a las condiciones de crecimiento, por ello la información que se genera muchas veces no es reproducible. Sistemas de huella digital fenotípica miniaturizados y automatizados han sido introducidos reemplazando a los clásicos análisis fenotípicos, ya que dan resultados reproducibles obtenidos en condiciones estandarizadas, están basados en caracteres

nutricionales y bioquímicos de los microorganismos. El procedimiento de estos sistemas incluye la comparación de un gran número de propiedades fenotípicas de un organismo con las mismas de otros considerados como referencia y el grado de similitud respecto a las cepas tipo es calculado con programas de cómputo. Los sistemas API (bioMèrieux), Enterotubo II y Tubo Oxi-Ferm (Becton Dickinson Microbial Systems), Sistema Pasco MIC/ID (Difco Laboratories), Sistema Biolog (Biolog, Inc.), Sistema MicroID (General Diagnostic, Div., Warner Lambert Co.), Sistema Vitek entre otros, son ejemplos de sistemas comercialmente validos de identificación miniaturizados. Estos sistemas son fáciles de llevar a cabo y los resultados son obtenidos en corto tiempo, son prácticos de usar en la identificación de cepas bacterianas cuando se hacen investigaciones dentro de un contexto quimiotaxonómico y molecular (Busse, et.al. 1996).

- **Características serológicas.-** basadas en las diferencias de los determinantes antigénicos de los organismos que pertenecen a la misma especie que son reconocidas por los anticuerpos de los mamíferos. Los determinantes antigénicos pueden ser proteínas, polisacáridos y lipopolisacáridos. La mayor limitante es que diferentes cepas de la misma especie o de diferentes especies pueden presentar reacciones cruzadas, lo que genera falsos positivos. Además algunas cepas no expresan antígenos en la superficie del organismo, por lo que no son serotipificables. Los ensayos son sencillos pero a veces requieren muchos sueros para una bacteria, lo cual los vuelve costosos.
- **Características funcionales o fisiológicas.-** se basan en la diferencia de respuesta a manipulaciones específicas a las que son sometidas las células. Estas incluyen la diferencia de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos o a la lisis de bacteriófagos, la inhibición del crecimiento por bacteriocinas, la toxicidad y la expresión metabólica de enzimas.
- **Otros métodos de tipificación no basados en ácidos nucleicos.-** incluyen la tipificación basada en proteínas como la electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto celular completo o de las proteínas de membrana; el análisis por cromatografía de líquidos o gases, de carbohidratos, ácidos grasos, lipopolisacáridos. (Riley, 2004).

La aplicación de técnicas moleculares permite detectar grupos filogenéticos con base en las secuencias de ADN y en los genes. En el caso de los alimentos, las técnicas moleculares nos permiten tener datos confiables sobre la diversidad e identificación taxonómica de los microorganismos del alimento, datos cuantitativos que describan los cambios en la población microbiana durante la producción, el impacto de factores intrínsecos, extrínsecos sobre el crecimiento, sobrevivencia y actividad en los microorganismos, lo que a su vez permite el producir los alimentos en condiciones controladas y asegurar su calidad (Díaz y Wachter, 2003).

2.9.2. Métodos genotípicos

Los **métodos genotípicos** se basan en la información derivada de los ácidos nucleicos (DNA y RNA), es decir en el análisis del contenido de ácidos nucleicos o en el polimorfismo de la secuencia de los genes entre las diferentes cepas. Estos permiten distinguir microorganismos a nivel de especie y de cepa (Figura 2.9.2.1). Clásicamente, estas subdivisiones eran realizadas por medio de pruebas bioquímicas o serológicas, por su susceptibilidad a antibióticos, por bacteriocinas o fagos, etc., ahora con el desarrollo de técnicas basadas en caracteres genotípicos, se han generado una gran gama de métodos de tipificación basados directamente en el ADN. Idealmente, estas técnicas son universalmente aplicables, reproducibles, fáciles, altamente discriminatorias y han reemplazado en muchos laboratorios, a las técnicas clásicas. (Maslow, et.al. 1993; Tenover et.al 1995). Dentro de estos métodos se encuentran el análisis de plásmidos, ribotipos, RAPD, ARDRA y AFLP (Schneegurt, et.al., 1998). Como consecuencia del progreso tecnológico, dominan actualmente los estudios modernos taxonómicos, pero sobre todo por la búsqueda de las relaciones naturales entre los microorganismos. Una de las ventajas es que son menos susceptibles a las condiciones de crecimiento o a las manipulaciones de laboratorio a las que son sometidos los microorganismos en estudio. Por lo general se usan 1 de los 3 procedimientos analíticos siguientes: hibridación, electroforesis en gel y/o secuenciación de ácidos nucleicos. Lo anterior permite el uso de equipo común y reactivos estándares en la implementación de varios sistemas.

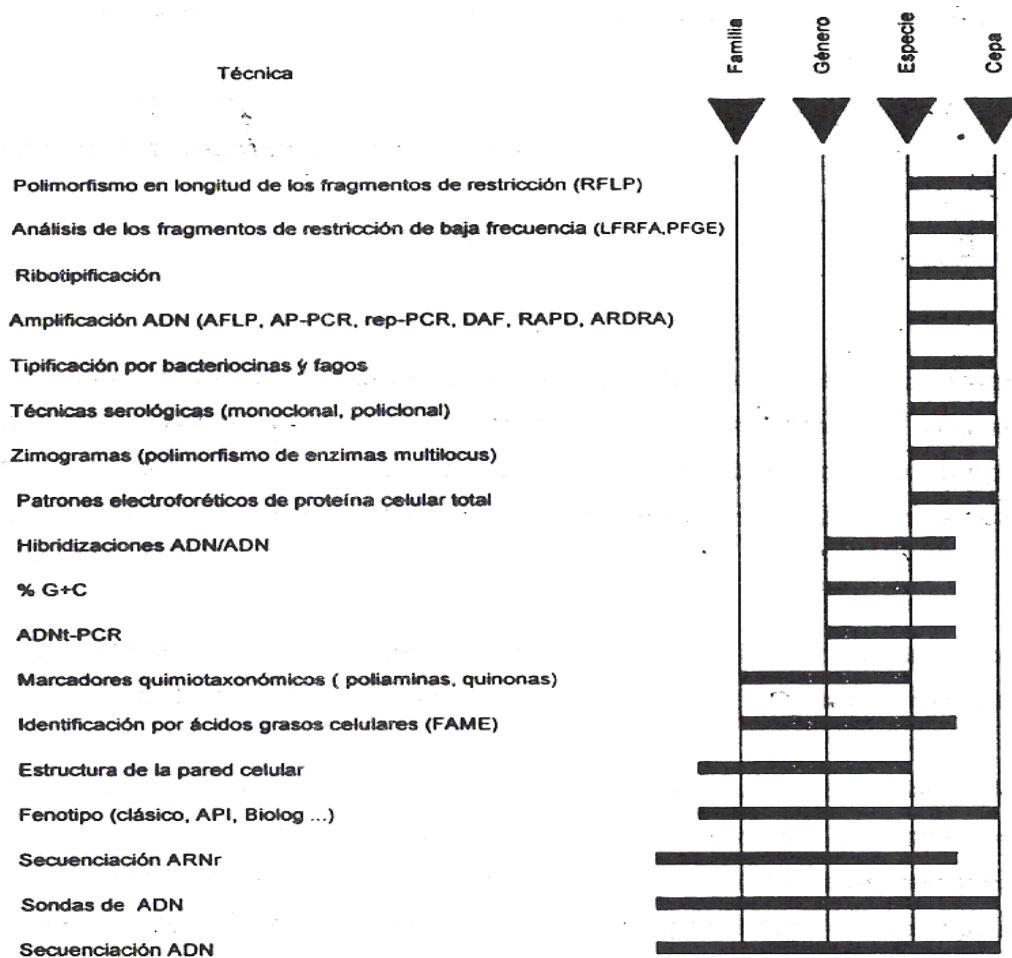


Figura 2.9.2.1.1. Resolución taxonómica de algunas de las técnicas más empleadas en la clasificación bacteriana (Vandamme, 1996)

Los sistemas de tipificación genotípica del ADN se dividen en los siguientes grupos:

- ❖ **Sistemas basados en elementos del DNA extracromosomal.** En las bacterias el principal elemento extracromosomal utilizado para tipificar a nivel cepa son los plásmidos³. La tipificación basada en el análisis de plásmidos utiliza la electroforesis y es un análisis de la microdiversidad, ya que se analizan cambios ocurridos en una parte del genoma. Se basan en las diferencias de peso molecular y número de los plásmidos que una bacteria contiene. Cada cepa puede representarse mediante un perfil o "huella digital" por el número y peso molecular de sus plásmidos. Esta fue una de las primeras

³ Plásmido: DNA circular unido por enlace covalente característico de las bacterias que contiene genes que pueden codificar resistencia a un antibiótico.

técnicas moleculares⁴ de tipificación. Una limitante es depender de la presencia de al menos un plásmido, de hecho, el poder de discriminación depende del número de plásmidos que contenga una cepa. A pesar de que el número de plásmidos de una cepa tiende a ser constante, algunas cepas a veces los pierden durante un almacenamiento prolongado, lo cual afecta la reproducibilidad del método. Como no todas las cepas de LAB tienen plásmidos, este método no es aplicable universalmente. Sobre todo, los plásmidos pueden adquirirse o perderse durante eventos de transferencia horizontales del gen.

❖ **Sistemas basados en el genoma.** Se basan en tres características del genoma:

✦ ***Diferencias posibles en los sitios de reconocimiento para una endonucleasa entre dos o más alelos:*** El análisis de restricción por endonucleasas (RFLP o REA) consiste en la digestión del DNA genómico total extraído de una cepa, por enzimas de restricción (endonucleasas), generándose fragmentos de DNA de diferente peso molecular. A la comparación de los fragmentos mediante una electroforesis en gel de agarosa, se le llama análisis de restricción por endonucleasas (REA) o bien, análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Las endonucleasas cortan al DNA en los sitios de reconocimiento, generando patrones de bandas muy complejos que no pueden ser interpretados fácilmente. Sin embargo, se desarrollaron ciertas técnicas para resolver este inconveniente:

↳ La ribotipificación combina la digestión de la restricción enzimática con la detección de fragmentos resultantes dados con sondas de rADN. Su poder discriminatorio se basa en el número y tipo de enzimas de restricción y sondas usadas. Se usa rRNA como sonda, el cual permite variar la secuencia y el marcado, por ejemplo rRNA 16S o 23S o ambos, con o sin región libre conservada de rRNA. También las secuencias de ADN correspondientes al factor Tu de elongación, de la proteína S12 ribosomal y proteínas flagelares han sido usadas como sondas. Los complejos patrones de ADN generados después de la digestión con

⁴ Técnica molecular se refiere a la basada en el material genético de una célula para caracterizarla (Riley, 2004)

enzimas de restricción se transfieren a una membrana y luego se hibridan con sondas marcadas, que nos revelan los fragmentos hibridados (Schneegurt, et.al., 1998).

- ✦ La hibridación por Southern Blot facilita la detección de fragmentos de DNA de interés entre cientos generados durante una digestión del genoma completo de un organismo. Consiste en transferir los fragmentos de restricción que han sido separados en un gel de agarosa a un pedazo de nitrocelulosa o bien a una membrana de nylon que se expone luego a una sonda de DNA marcada con una molécula que permita la detección visual de los fragmentos de DNA.

- ✦ Las endonucleasas de corte raro con las que se obtienen fragmentos grandes de ADN, que luego pueden ser analizados en una electroforesis de campo pulsado (PFGE)⁵, facilitando de esta manera la interpretación de los patrones de bandas generados por RFLP.

- ✦ ***Diferencias o similitudes de las secuencias del genoma completo.*** Gracias a la automatización de la secuenciación del ADN se generó una nueva disciplina llamada "genómica comparativa", sus aplicaciones están en el campo de la taxonomía y la filogenética. Se puede aplicar a bacterias u otros organismos para los cuales más de una cepa ha sido secuenciada por completo.

- ✦ ***Patrones de hibridación.*** La hibridación de DNA-DNA provee un alto poder de resolución y cuando los resultados dan aproximadamente del 70% de relación DNA-DNA con 5°C o menos de diferencia a la temperatura de fusión, se considera que las cepas son de la misma especie (Temmerman, et.al. 2004). Las técnicas de sondeo están basadas en la hibridación de secuencias de oligonucleótidos específicas de ADN bacteriano diseñadas y sintetizadas; estas sondas unidas a marcadores radioactivos o fluorescentes permiten la detección visual del objetivo después de la hibridación bajo condiciones controladas. La

⁵ PFGE Electroforesis en gel de campo pulsado. La orientación del campo eléctrico que se aplica a la matriz de agarosa se cambia periódicamente para que los fragmentos lineales de DNA se acomoden en el "camino" que presenta menor resistencia lo cual les permite la migración en el gel. (Gordillo, M.E., et.al. (1993)

especificidad de la sonda es altamente dependiente de la secuencia, a la vez la hibridación y las condiciones de lavado también son muy severas y críticas. La desventaja de los métodos basados en sondas es su alta carga de trabajo, además de que el uso de cebadores y de sondas restringe el número de aplicaciones posibles en las bacterias. La comparación de microarreglos se basa en los patrones de hibridación generados por miles de pequeñas piezas de DNA (sondas) cuya secuencia es conocida y que se encuentran acomodadas en una membrana de nitrocelulosa. Los microarreglos son usados para diferenciar cepas mediante la identificación de las variaciones genéticas de una sola base en un gen de interés, para la obtención de patrones de la expresión genética basados en la composición de mRNA y para el análisis de los patrones de hibridación total, ya sea genotípicos o de expresión. (Riley, 2004)

- ❖ **Sistemas basados en ensayos de PCR.** La tipificación de microorganismos por huellas digitales incluye las técnicas basadas en la PCR que no requieren un biblioteca de clonas y en el principio de la diversidad resultado de las secuencias amplificadas. Esta diversidad se observa en la migración de las secuencias amplificadas en una electroforesis con geles de agarosa o de poliacrilamida. Tal migración depende del tamaño (ARDRA, t-RFLP, RAPD) y de los fragmentos generados.

Los siguientes métodos de tipificación están basados en la extracción del DNA genómico o la PCR y permiten distinguir a los microorganismos a nivel de especie y de cepa

- ❖ **RFLP.-** Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. La técnica consiste en extraer el DNA genómico total de cada cepa y posteriormente digerirlo con enzimas de restricción, generándose fragmentos de diferentes tamaños de ADN, los cuales son separados y visualizados por una electroforesis en gel de agarosa, estableciéndose el polimorfismo de longitud de los mismos (Jichan, et.al., 2003). Los patrones de bandas que se obtienen son muy complejos y difíciles de analizar y comparar debido a la gran cantidad de fragmentos generados, más tienen buena reproducibilidad. El número de fragmentos puede ser reducido con la selección de enzimas de restricción de corte raro (sitio de reconocimiento de 6 a 8 bases) y la técnica se denomina análisis de los

fragmentos de restricción de baja frecuencia, que es dependiente a las técnicas de electroforesis especiales como la de campo pulsado (Schneegurt, et.al., 1998). El RFLP comúnmente se utiliza para estudiar el polimorfismo de regiones particulares. Para una Ribotipificación se transfieren los fragmentos a una membrana y se hibridan con una sonda de rRNA marcada y se visualizan los fragmentos hibridados, que se pueden comparar con cepas de referencia (Díaz y Wachter, 2003) (Figura 2.9.2.1)

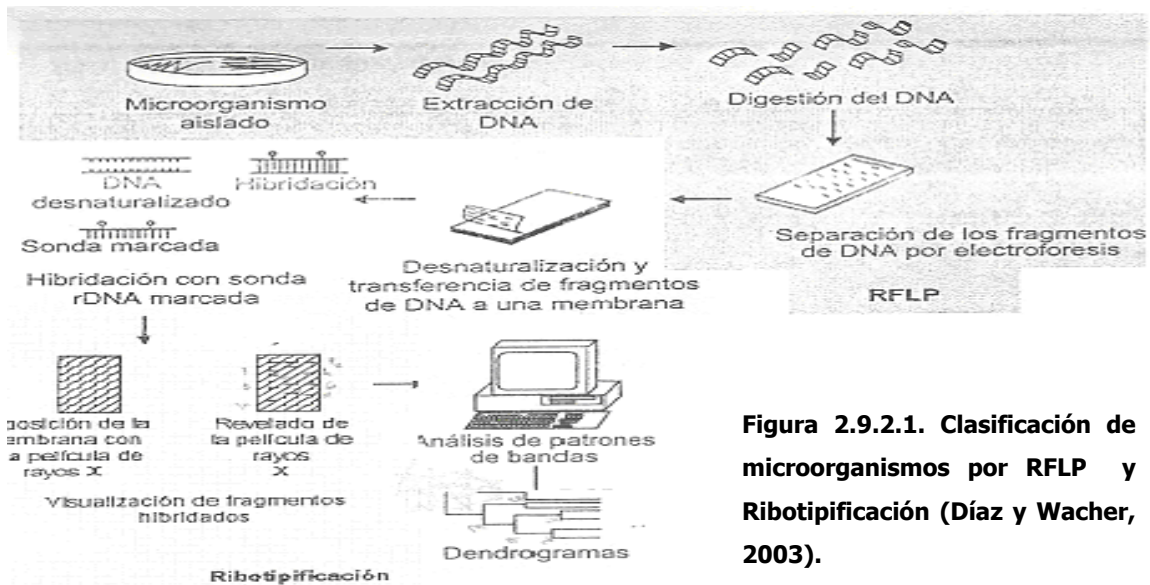


Figura 2.9.2.1. Clasificación de microorganismos por RFLP y Ribotipificación (Díaz y Wachter, 2003).

- ❖ **RAPD o AP-PCR (PCR cebado arbitrariamente).**- Análisis del DNA polimórfico amplificado aleatoriamente o al azar. Es un método rápido y sencillo en el que se amplifica al azar regiones del DNA extraído con cebadores arbitrarios, de baja exigencia en la PCR y cortos (Busse, et.al. 1996), por lo que es necesario contar con información sobre secuencias específicas del microorganismo a tipificar, además las condiciones de amplificación son poco exigentes (Temmerman et.al. 2004). Después de su separación electroforética en geles de agarosa se obtienen patrones simples de bandas (huellas digitales) que corresponden a fragmentos de DNA de diferentes tamaños. La grandiosa flexibilidad en la selección de primers, los cuales no se dirigen a una secuencia específica, permiten diferenciar microorganismos a nivel especie (Gelsomino, et.al. 2002). Su limitante es la poca reproducibilidad debido a la sensibilidad de la misma a las condiciones en que se lleve a cabo la reacción. Es el más utilizado para el análisis de colecciones microbianas aisladas de alimentos fermentados (Moschetti, G., et.al. 1998). (Figura 2.9.2.2).

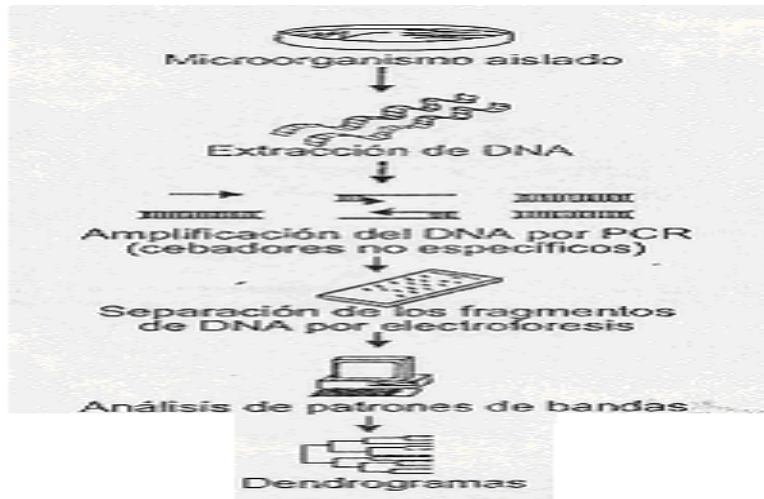


Figura 2.9.2.2. Análisis del DNA polimórfico amplificado aleatoriamente o al azar (Díaz y Wachter, 2003).

- ❖ **AFLP.-** Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados. Es una combinación de PCR y el uso de enzimas de restricción. Se basa en la amplificación por PCR de fragmentos de restricción de DNA genómico. Se realiza en 3 etapas: i) Restricción del DNA y ligamiento de los adaptadores. La restricción es con 2 enzimas que dan fragmentos de DNA con 2 diferentes extremos pegajosos o una combinación al azar. A éstos se ligan adaptadores, oligonucleótidos cortos, que actúan como sitios de alineamiento de los cebadores. ii) Amplificación selectiva de algunos fragmentos de restricción. Se usan 2 cebadores diferentes con la misma secuencia que los cebadores más varias bases contiguas al sitio de restricción. Las condiciones para amplificar solo los fragmentos en los que las extensiones del cebador coinciden con los nucleótidos adyacentes del sitio de restricción son estrictas y se obtienen de 30 o 40 fragmentos amplificados, algunos de los cuales son de un grupo específico, en tanto que otros son cepas específicas (Schneegurt, et.al., 1998). iii) Separación de los fragmentos por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida. Generalmente se obtienen de 50 a 100 bandas (Vos, 1995). Tiene buena reproducibilidad debido a las condiciones estrictas de alineamiento.

- ❖ **PFGE (Geles de electroforesis en campos pulsados)** emplea campos de electroforesis alternados para permitir la separación de fragmentos largos de DNA obtenidos de la restricción de digeridos con enzimas de corte raro. Se lleva a cabo primeramente la extracción del DNA cromosomal intacto, lo cual consume mucho

tiempo. Esta técnica por basarse en el DNA genómico total tiene un poder discriminativo superior, con una diferenciación excelente de subespecies para un número grande de microorganismos (McCartney, 2002).

- ❖ **ARDRA.** Análisis de Restricción de DNA Ribosomal Amplificado. En la sección 2.11 se explica con mayor detalle.

2.10. SISTEMA API 50CH PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LACTICAS.

El API 50 CH es un sistema estandarizado que permite realizar el estudio de fermentación de los 49 azúcares de la galería API 50 CH considerados como ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos. El API 50 CH se utiliza en combinación del medio API 50 CHL para la identificación de los lactobacilos y microorganismos próximos filogenéticamente.

2.10.1. Principio del API 50 CH

La galería de API 50 CH esta compuesta por 50 microtubos, cada uno con una cantidad definida de sustrato deshidratado, que permite el estudio de la fermentación del sustrato, perteneciente a la familia de los hidratos de carbono y derivados (heterósidos, polialcoholes, ácidos urónicos). Las bacterias se cultivan en el medio API 50CH y con esta suspensión se inoculan y rehidratan los sustratos de ensayo de fermentación, cuando ésta se lleva a cabo, se produce un cambio de color en el tubo, debido al catabolismo de los glúcidos, dando lugar a la producción de ácido en anaerobiosis revelada por el indicador de pH del medio elegido. El primer tubo sin principio activo sirve como testigo negativo.

COMPOSICION DE LA GALERIA				
BANDA 0-9 tubo / sustrato	BANDA 10-19 tubo / sustrato	BANDA 20-29 tubo / sustrato	BANDA 30-39 tubo / sustrato	BANDA 40-49 tubo / sustrato
0 CONTROL	10 GALactosa	20 α-Metil-D-Manósido	30 MELibiosa	40 D TURanosa
1 GLIcerol	11 GLUcosa	21 α-Metil-D-Glucósido	31 SACarosa	41 D LIXosa
2 ERitritol	12 FRUctosa	22 N-Acetil-Glucosamina	32 TREalosa	42 D TAGatosa
3 D ARAbinosa	13 MaNosa	23 AMigdalina	33 INUlina	43 D FUCosa
4 L ARAbinosa	14 SorBosa	24 ARButina	34 MeLeZitosa	44 L FUCosa
5 RiBosa	15 RAmnosa	25 ESCulina	35 RAFinosa	45 D ARabitoL
6 D XiLosa	16 DULcitol	26 SALicina	36 AIMIDón	46 L ARabitoL
7 L XiLosa	17 INOsitol	27 CELobiosa	37 GLUcóGeno	47 GlucoNaTo
8 ADOnitol	18 MANitol	28 MALtosa	38 XiLITol	48 2-Keto-Gluconato
9 β Metil-D-Xilosido	19 SORbitol	29 LACtosa	39 GENtiobiosa	49 5-Keto-Gluconato

Figura 2.10.1.1 Composición de la galería del Sistema API 50CH

2.11. ARDRA.

Sus siglas significan Análisis de Restricción de DNA Ribosomal Amplificado, es también uno de los métodos genotípicos que requiere del aislamiento y cultivo de los microorganismos y de colonias puras de las cepas (Jichan, et.al., 2002). Se basa en la comparación de ADN ribosomal de las cepas, para lo cual se obtiene el rADN mediante amplificación de las secuencias del gen 16S de rADN por PCR usando cebadores universales y el producto se digiere con enzimas de restricción, los fragmentos obtenidos se separan en geles de agarosa o poliacrilamida (Jones, et.al. 1997). En el gel de electroforesis, cada cepa exhibe un patrón de restricción único o "huella digital", sin embargo el porcentaje de migración de los fragmentos de 2 cepas relacionadas estrechamente es cerca del 80% y disminuye a 20-40% cuando los patrones son de 2 cepas no relacionadas en especie o que proviene de diferentes especies (Le Bourgeois, et.al., 1989). Existe actualmente un banco de datos del tamaño de los fragmentos generados por la restricción del gen 16s rADN de un gran número de especies bacterianas con determinadas enzimas de restricción (Nazaret, 2000). Por otra parte, para identificar a los microorganismos, es común incluir en el análisis cepas de referencia o identificar cepas representativas de cada grupo para la comparación de secuencias del gen ribosomal 16S (Figura 2.11.1) o identificar cepas de cada uno de los grupos generados (Vaneechoutte, et.al. 1995).

Es un método rápido, seguro, barato, de fácil interpretación, confiable (Chenoll 2003; Cabrera y Herraéz, 2001), que da patrones de bandas reproducibles, comparables (Satokary, 2003) y con alto poder discriminatorio para la identificación y discriminación de diferentes especies de bacterias lácticas (Dvorskaa, 2003), pero es importante la selección adecuada de la enzima de restricción para obtener una resolución óptima (Schneegurt, et.al., 1998).

Los problemas técnicos siguen siendo una limitante, como por ejemplo los problemas inherentes de la electroforesis. La resolución para diferenciar las bandas no siempre puede ser la óptima, especialmente para fragmentos de alto peso molecular. Aún es difícil concluir que técnica de huellas digitales nos dará una mejor sensibilidad o resolución en un determinado problema pues esto parece depender del tipo de comunidad bacteriana y del tipo de marcador molecular (taxonómico, funcional o al azar) que se empleé.

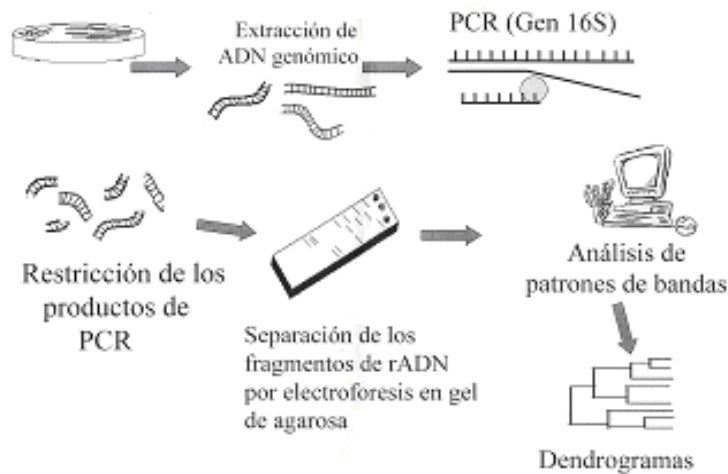


Figura 2.11.1 Análisis de Restricción de DNA Ribosomal Amplificado

El atole agrio (Axocotl) que se produce mediante una fermentación natural no ha sido estudiado desde el punto de vista microbiológico y presenta diferencias con respecto a otros atoles, ya que se le adicionan hierbas. Es un atole agrio, por lo que se supone ocurre una fermentación láctica y alcohólica. Para comprender los eventos que ocurren durante la fermentación es necesario responder primero la pregunta ¿cuáles son los microorganismos que se encuentran en el alimento?. Considerando la posible fermentación láctica en dicha bebida, es de interés determinar qué bacterias lácticas se encuentran durante la fermentación del atole.

2. OBJETIVOS

I. Objetivo general

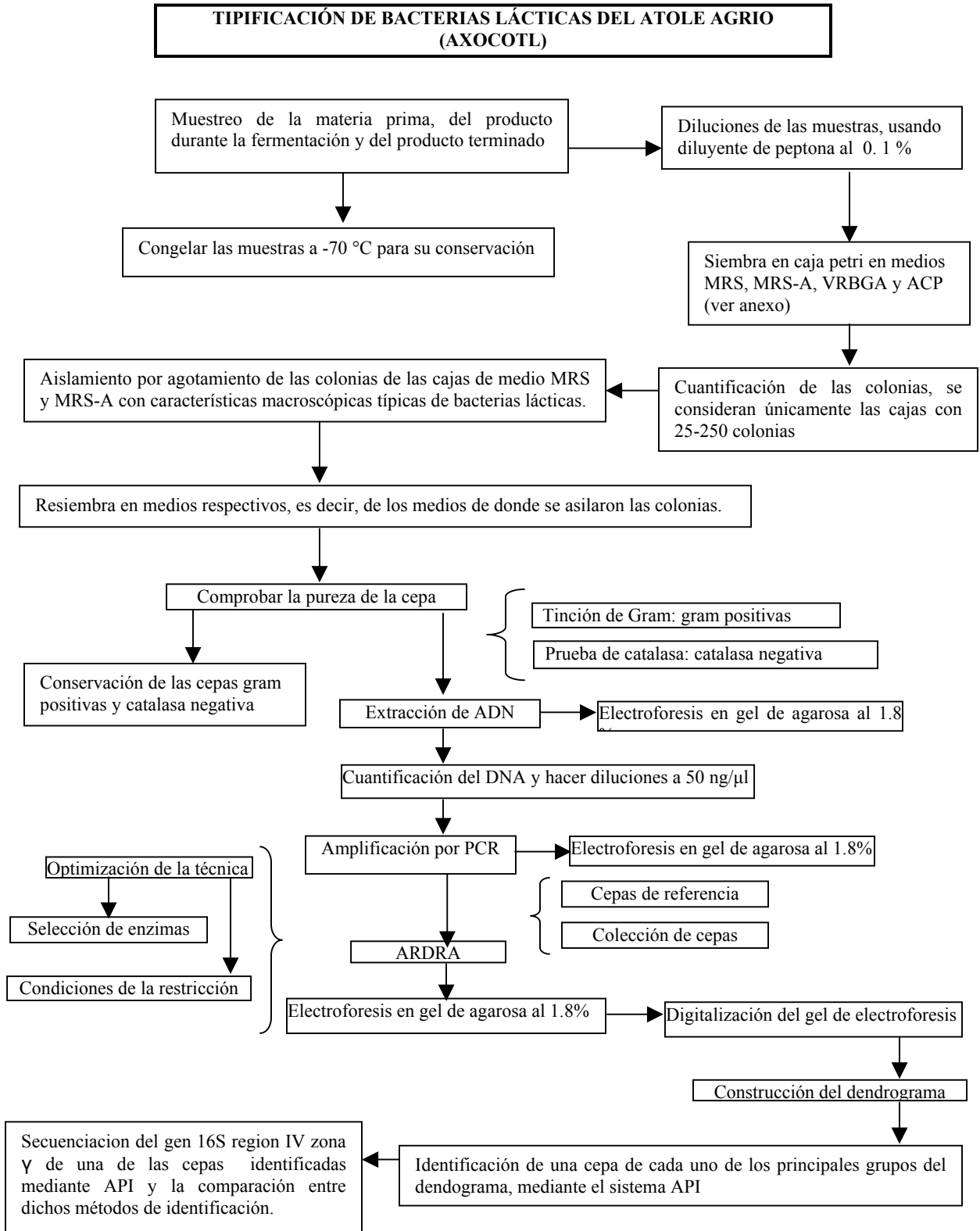
Tipificar las bacterias lácticas aisladas del Axocotl, atole agrio de la Sierra Norte de Puebla.

II. Objetivos específicos

- Cuantificar las bacterias lácticas en el medio MRS-A y MRS; enterobacterias en VRBGA y mesófilos aerobios en ACP.
- Aislar y purificar las bacterias lácticas de los medios inoculados: MRS almidón, MRS, VRBG y ACP.
- Determinar y optimizar las condiciones del ARDRA
- Identificar mediante su patrón de fermentación de carbohidratos, usando un Kit de API, un organismo representativo de cada grupo según la tipificación realizada con ARDRA
- Identificar mediante comparación de secuencias del gen r DNA 16S, uno de los organismos a los que se realizó el API.

4. METODOLOGÍA

Diagrama 4.1: Metodología de la Investigación.



4.2 Elaboración del atole agrio o axocotl.

Se tomaron muestras de atole agrio (Axocotl) elaborado por personas náhuatl del pueblo de San Andrés en Cuetzalan, Puebla. (Figura 4.2.1)



Figura 4.2.1. Pueblo de San Andrés en Cuetzalan Puebla

Para la elaboración del atole agrio, previamente se curó un cántaro de barro sin barniz (de uso exclusivo par la elaboración del Axocotl) con agua de cal (en una concentración de aprox. 40 %) (Figura 4.2.2), la manera de hacerlo fue moviendo el cántaro con el agua de cal en el interior, impregnando así las paredes interiores del cántaro con dicho líquido y posteriormente se colocó cerca del fuego.



Figura 4.2.2. Cántaro de barro usado para el Axocotl

Por otro lado, se lavaron los granos de maíz amarillo o de bolita con agua, de manera que ésta cubría a los granos y llegaba arriba de éstos unos 10 u 11 cm. Se dejó reposar unos minutos y se procede a retirar todo lo que flota, que es el maíz picado, podrido y cascarillas. Otro método es vaciar el maíz en un canasto sostenido a cierta altura de otro canasto que se encuentra mas abajo; mientas el maíz cae se sopla con un sombrero o con un cartón y de esta manera se separa la cascarilla. Posteriormente si es necesario separa manualmente los granos dañados.

A continuación se nixtamalizaron los granos de maíz, lo que consistió en la cocción de los granos en agua con cal hasta lograr la separación del hollejo o cascarilla del grano. Con tal fin los granos de maíz limpios se cuecen durante 60 a 120 min en agua de cal (aprox. al 40 %p/v), el nivel del agua se debe encontrar 10 cm arriba de los granos (Figura 4.2.3).



Figura 4.2.3. Maíz Nixtamalizado

Posteriormente los granos de maíz se dejaron remojando en la misma agua por 1-2 días, lo que determina que los granos se esponjen y separen del pericarpio. El pH alcalino que se da por la nixtamalización, el calor de la cocción y el tiempo de reposo en el agua de cocción provocan en el grano de maíz el incremento de humedad de 48 % a 51 %, así como la remoción del pericarpio. A continuación, a fin de eliminar la cal y el hollejo se lavó el maíz y a la vez se descascarilló con suavidad para no dañar el grano (el endospermo). Para ello se coloca el maíz en recipientes con perforaciones, se agrega agua y se frota los granos con las manos, hasta que el agua de lavado sea transparente. Otra técnica es agregar agua al nixtamal contenido en una cubeta sin perforaciones, frotar los granos y transferirlos manualmente a otra cubeta con agua limpia y así sucesivamente hasta que el agua de lavado sea transparente. Si no se llevará a cabo el lavado después del cocido con agua de cal, el grano de maíz se impregna de cal y adquiere una tonalidad verde-azulosa y un sabor picante. Una vez que esto sucede ni el lavado más exhaustivo eliminaría el defecto. Durante la nixtamalización el maíz debe adquirir un color amarillo que debe ser eliminado con el lavado. Finalmente para evitar que el nixtamal se secará mientras era molido se dejó remojando en la última agua de lavado alrededor de 12 h. Posteriormente 2 kg de nixtamal fueron molidos en metate (Figura 4.2.4) y se adicionó al agua hirviendo (20 L); se dejó hervir por 20 min o hasta que espesó, moviendo constantemente para evitar que se pegará el maíz a la olla (Figura 4.2.5 y 4.2.6).

Para la elaboración del atole agrio se utiliza la llamada hierbadulce o hierba para atole agrio o Axocotlchihuitl, nombre con el que es bien conocido entre la comunidad náhuatl que lo prepara, y significa "planta para el axocotl" (Figura 4.2.7). Es fácil confundir esta hierba con otra que le es semejante, pero se diferencian en su flor, ya que la que se utiliza para el axocotl tiene la flor morada y en la otra las flores son blancas. El nombre científico de la hierbadulce es *Limpia dulciss*. Los náhuatls consideran que ésta hierba tiene un efecto medicinal, por lo que la usan para curar infecciones en el riñón y en el tratamiento contra la diabetes.



Figura 4.2.4. Elaboración de la masa para el atole a partir de maíz nixtamalizado



Figura 4.2.5. Hervido de la masa de maíz nixtamalizado



Figura 4.2.6. Aspecto del atole al hervir en la olla



Figura 4.2.7. Hierbadulce

Las hojas de la hierbadulce se molieron en el metate, se agregó cal (aproximadamente 20 g de cal por cada 100 g de hierba) y se mezclaron perfectamente hasta obtener una pasta consistente y homogénea (Figura 4.2.8). La hierbadulce da una nota de sabor agridulce al atole y los náhuatls consideran que al untar la pasta de hierba se impide que el atole se filtre por las paredes del cántaro. Se disolvió un poco de pasta (5 g aprox.) en 250 ml de agua, obteniendo una solución espesa que se untó en las paredes internas del cántaro curado y se dejó impregnar alrededor de 30 min. Después se le adicionó al cántaro curado y untado con la pasta de hierba 1L de agua. Se tapó y se dejó reposar por 10 min. A continuación, al cántaro, el cual se mantiene sobre mantas para no estar en contacto con el suelo por estar húmedo y frío, se le adicionó el atole de maíz hervido (Figura 4.2.9) y 500 ml de agua de hierba (aproximadamente por

cada 80g de pasta de hierbadulce se adicionan 20 ml de agua), poniéndole al último brasas (carbón hirviendo) que cubrían la boca del cántaro. Los náhuatl explicaron que las brasas son para que se siga cociendo el atole, mantener el calor, ayudar al desarrollo del sabor durante la fermentación del atole agrio y para evitar el "mal de ojo" (Figura 4.2.10). El cántaro se tapó con hojas de plátano (Figura 4.2.11) y éstas se amarraron con hoja de maíz y se selló perfectamente a fin de evitar el ingreso de aire. Por último el cántaro se cubrió con mantas para mantener la temperatura y no se movió durante toda la fermentación (Figura 4.2.12)



Figura 4.2.8. Elaboración de la pasta de hierba dulce



Figura 4.2.9. Vaciado del atole recién hervido en el cántaro



Figura 4.2.10. Brasas de carbón cubriendo la boca del cántaro



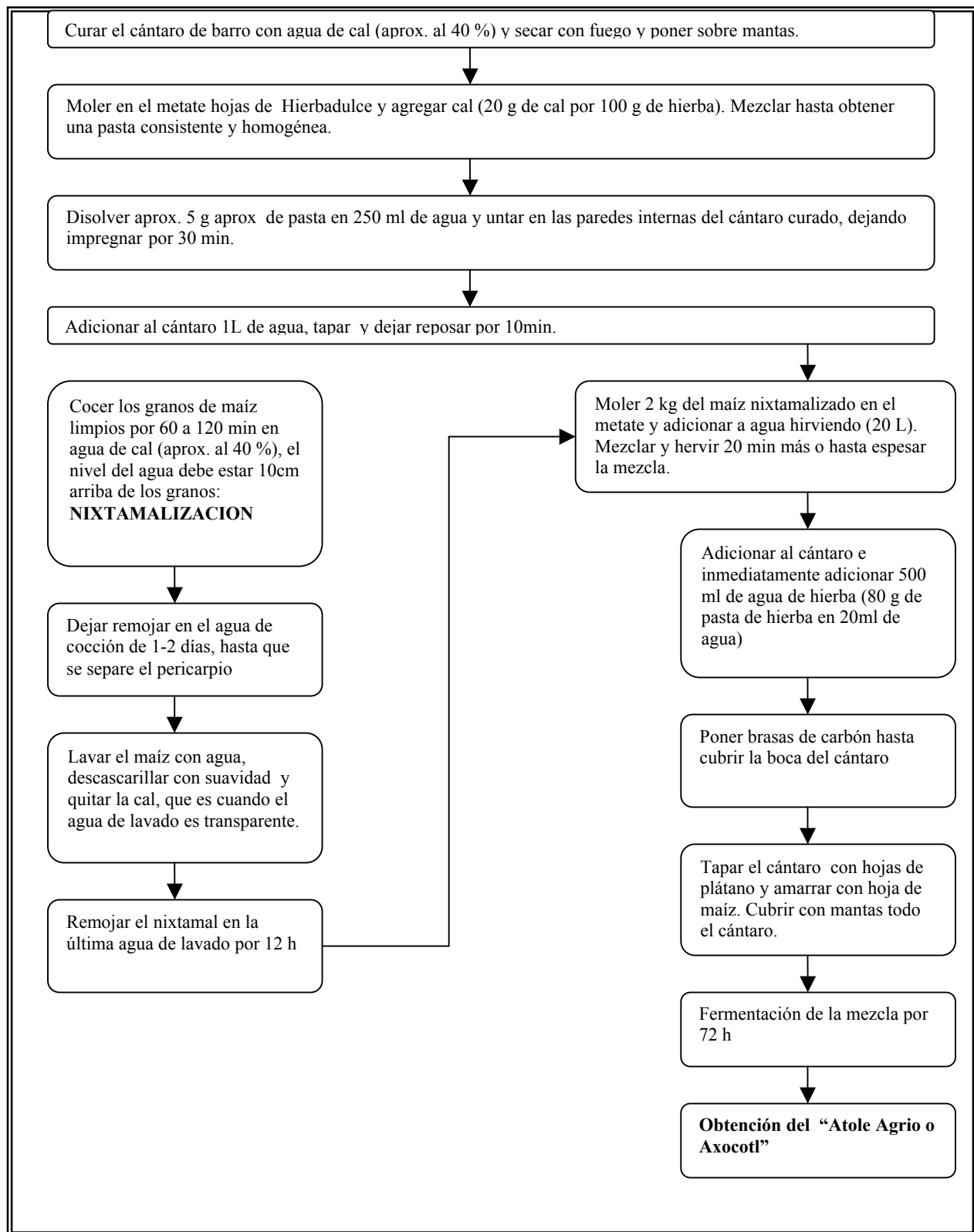
Figura 4.2.11. Cántaro cubierto con hojas de plátano



Figura 4.2.12. Condiciones de fermentación del axocotl

En el diagrama 4.2.1 se ejemplifica el proceso de elaboración del atole agrio o axocotl efectuado por los náhuatl de Cuetzalan.

Diagrama 4.2.1 Elaboración tradicional del axocotl o atole agrio por los náhuatl



4.3 Muestreo de materia prima y del axocotl

Se muestreó la materia prima usada para la elaboración del Axocotl (pasta de hierba, nixtamal molido, agua, atole recién hervido) y los 3 atoles agrios preparados, tomando 100 g o 100ml de cada muestra según fuera sólida o líquida respectivamente y depositando en bolsas y envases de plástico con capacidad de 100ml.

Se realizaron 3 fermentaciones paralelas de atole agrio. Dos de las fermentaciones se muestrearon sólo al final (72 hr), es decir una vez que estaban listos los atoles agrios o axocotls para su consumo, éstos se marcaron como M2 y M3. El tercer atole agrio se muestreó a 7 distintos tiempos de fermentación y se etiquetó como "1" (Figura 4.3.1 y 4.3.2), para su muestro se le adaptó al cántaro un sifón.



Figura 4.3.1. Axocotl



Figura 4.3.2. Atole Agrio "A" (izq.) "M2" (der.)

En el caso del atole "1" se vació al cántaro de barro, se tapó y se colocó un sifón de plástico para facilitar la toma de muestras y al instante se procedió a muestrear (t_0) (Figura 4.3.3): se les midió el pH con un potenciómetro (Jenway) y con tiras de papel pH, la temperatura con un termómetro de hasta 100 °C (Figura 4.3.4), se hicieron diluciones de las muestras en agua peptonada y se inocularon medios sólidos (MRS, MRS-A, ACP y VRBGA) .



Figura 4.3.3. Cántaro con el grifo



Figura 4.3.4. Medición de Temperatura

4.4 Inoculación de placas de medio de cultivo sólido

De cada muestra se tomó 0.5 ml o 0.5 g y se diluyó en 4.5 ml de agua peptonada al 0.1 %. Se prepararon series de diluciones decimales y se inocularon cajas petri tomando 0.5ml de cada dilución en el medio sólido adecuado, se extendió el inóculo con una varilla de vidrio en medio MRS-A (Oxoid) para cuantificar bacterias lácticas amilolíticas, en MRS (Oxoid) para bacterias lácticas, en VRBGA (Becton Dickinson) para enterobacterias y en ACP (Oxoid) para mesófilos aerobios. Del agua y de la pasta de hierba, sólo se inocularon medios de VRBGA y ACP (Figura 4.4.1 y 4.4.2). Posteriormente todas las cajas petri se incubaron a 30 °C de 18-24 h (Incubadora VWR 1550,VWR Scientific Inc.).



Figura 4.4.1. Dilución de las muestras.



Figura 4.4.2. Plaqueo de las cajas.

La cantidad de muestra restante se congeló a -4 °C y una vez terminado el muestreo se transportaron las muestras por medio de una hielera al laboratorio L-324 Ed. E de la Fac. Química y se almacenaron a -70 °C para su conservación.

La tabla 4.4.1 nos muestra el número de diluciones hechas a cada muestra para inocular los medios sólidos (MRS, MRS-A, VRBGA, ACP).

Tabla 4.4.1. Diluciones de las muestras

Dilución/Muestra	10 ⁰ c	10 ⁻¹ d	10 ⁻² e	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Agua		+	+	+				
Pasta de Hierba		+	+	+				
Nixtamal		+	+	+				
Atole recién hervido ^a	++	++	++					
Tiempo 0 ^b	++	++	++					
Tiempo 1 (3hrs)	++	++	++					
Tiempo 2 (6hrs)	++	++	++					
Tiempo 3 (9hrs)	++	++	++	++				
Tiempo 4 (11hrs)	++	++	++	++				
Tiempo 5 (24hrs)	++	++	++	++				
Tiempo 6 (34hrs)	++	++	++	++				
Tiempo 7 (48hrs)	++	++	++	++				
M2 (72hrs)	++	++	++	++	++	++	++	+
M3 (72hrs)	++	++	++	++	++	++	++	+

^aAntes de servirse al cántaro, en la olla de calentamiento

^bAl servir el atole al cántaro

^c10⁰es la muestra sin diluir

^d10⁻¹ es cuando se diluyo 0.5 ml o 0.5 g de muestra en 4.5 ml de agua peptonada al 1 %.

^eCada + significa el numero de plaques realizados para dicha dilución.

4.5 Determinación de pH y Temperatura de las muestras

Se midieron la temperatura (°C) y el pH (usando tiras de papel pH y potenciómetro) de cada muestra. El potenciómetro se calibró con buffer pH 7 (solución de fosfatos de sodio y potasio) y con buffer pH 4 (solución de ftalato ácido de potasio)

4.6 Cuantificación de colonias en placas de medio MRS, MRS-A, VRBGA y ACP

Se cuantificó el número de colonias presentes en cada placa inoculada que tuvieran entre 25-250 colonias y se calcularon las UFC/ml o g de muestra.

4.7 Aislamiento de bacterias lácticas

De cada caja petri con los medios MRS-A, MRS VRBGA y ACP que tenía entre 25 y 250 colonias, se seleccionaron aquellas colonias que mostraban una morfología macroscópica y microscópica típica de bacterias lácticas (colonias pequeñas, de color blanco, gram positivas, catalasa

negativas); éstas se aislaron por agotamiento: resemebrándose hasta 2 veces en el medio de cultivo del que provenían, incubándose de 18-24 h a 30°C.

Las cepas aisladas se describieron microscópicamente considerando las siguientes características coloniales: forma, tamaño, color, borde, elevación y textura

4.8 Purificación de las bacterias lácticas

Para asegurar la pureza e identidad fenotípica, como bacterias lácticas, de las colonias aisladas, se determinó el gram y se realizó la prueba de la catalasa.

4.8.1. Tinción de Gram

Debido a que la morfología del gram puede cambiar con el tiempo y medio de cultivo, entre otros aspectos, se cuidaron éstos parámetros, siendo para todas las cepas el medio de resiembra el inicial o el de procedencia y el tiempo de incubación de 18-24 h a 30 °C. La tinción de gram para las bacterias ácido lácticas da un resultado positivo y se realizó de acuerdo con Harrigan y McCance (1998).

4.8.2. Prueba de Catalasa

Esta prueba se toma como positiva con la efervescencia del peróxido de hidrogeno (Cappuccino,1983). Las bacterias lácticas son catalasa negativas.

Para esta prueba:

- 1.- Colocar una gota de agua en un portaobjetos limpio.
- 2.- Colocar una asada del cultivo a probar sobre la gota de agua y hacer una suspensión
- 3.- Agregar 1 o 2 gotas de H₂O₂ al 3%

En una prueba positiva se forman inmediatamente burbujas bien visibles (desprendimiento de O₂), al contrario de la negativa (Mac Faddin, 1980).

4.9 Conservación de cepas de bacterias lácticas

Una vez confirmada la pureza de las colonias aisladas, después de una observación meticulosa de la morfología macroscópica, microscópica de las colonias y de la realización de la prueba de catalasa, con lo que se identificaron fenotípicamente como bacterias ácido lácticas, se procedió a su conservación en glicerol al 80% y 20% de Caldo APT a -74 °C, para lo cual se pusieron a crecer las cepas en medio sólido y posteriormente en condiciones asépticas (Campana de flujo

laminar, Veco) con una asada se inocularon por duplicado viales con 3ml Caldo APT (Difco Laboratories) de 18-24 h a 30°C. Al observar crecimiento en los viales (turbidez en el medio y precipitación de las células al fondo del vial), se tomó 0.75 ml del caldo APT inoculado y se transfirieron a un vial de plástico con 0.75 ml de glicerol al 80 %, se agitaron los viales y se almacenaron a -74 °C. Para su reactivación se toma un 10 % del volumen total de medio a inocular, de la cepa en glicerol.

4.10 Extracción de DNA

Para extraer el DNA a partir de cepas puras se empleó el procedimiento modificado de Lawson et al., 1989, en el cual se incubaba una muestra de biomasa bacteriana con diferentes enzimas con el fin de eliminar otros componentes celulares. La metodología se describe brevemente a continuación:

1. Colocar 500 µl de buffer TES en tubos eppendorf de 1.5 ml estériles. Con asa estéril tomar y resuspender una muestra de biomasa bacteriana de los cultivos en placa de MRS del tamaño de un arroz aproximadamente.
2. Adicionar 20 µl de lisozima¹ (20 µg/µl), agitar vigorosamente con la mano. Incubar en un baño a 37°C de 15 a 60 min., hasta que se visualice viscosidad
3. Adicionar 8 µl de pronasa² (20 µg/µl) y 8 µl de RNA'asa³ (20µg/µl), agitar vigorosamente con la manos e incubar en un baño a 65 °C por 1h.
4. Adicionar 120 µl de SDS⁴ (10 %), agitar en un vortex por 5 seg e incubar en baño maría a 65°C por 10 minutos.
5. Dejar enfriar y adicionar 600 µl de fenol-cloroformo (SIGMA ALDRICH) (25:24), agitar vigorosamente con la mano hasta formar una emulsión blanca y centrifugar 10 min. en microcentrífuga (Hermle) a 14 000 rpm.
6. Extrae la primera fase y colocarla en un tubo eppendorf nuevo, adicionar etanol absoluto frío en un volumen similar al extraído y mezclar suavemente.
7. Centrifugar 10min a 10,000 rpm
8. Retirar el sobrenadante con cuidado y dejar secar
9. Resuspender el pellet en 50 µl de agua desionizada estéril, dejar hidratar y almacenar a -20°C.

¹ Ayuda a romper la pared celular

² Degrada las proteínas

³ Digiere RNA

⁴ Es desnaturalizante

4.11 Comprobación de la calidad de Extracción del ADN.

Para dicha comprobación se hizo una electroforesis convencional en geles de agarosa (Agarosa Ultra pura Invitrogen™-Life Technologies) a una concentración de 1.8 %p/v.

Se usó como marcador de peso molecular de ADN el marcador de λ DNA (100bp ADN Ladder, Gibco BRL). Se corrieron las muestras en un equipo de electroforesis convencional – campo constante⁵, (Fuente de Poder: POWER PAC 300, BIORAD, USA., No. de Serie 282BR21653. Cámara de Electroforesis: Pharmacia Biotech GNA011, Ámsterdam Biosciences AB, Sweden, No. de Serie 18-2400-02). Los amortiguadores usados fueron TAE 2x con azul de Bromofenol, como amortiguador de carga y como amortiguador de la cámara TBE 1x. Las condiciones para la electroforesis fueron: 85volts por 35 min. Al termino de la electroforesis se tiñó el gel en una solución de Bromuro de Etidio (0.5 μ l/ml (Bio-Rad) y se digitalizó la imagen en un Fluor S- Multimager (Bio-Rad), apreciándose una banda de aproximadamente 18873 kb que corresponde al DNA genómico (se empleó un marcador de peso molecular⁶).

En la figura 4.11.1 se muestra la cámara de electroforesis usada, en donde el DNA corre del ánodo al cátodo, por tener carga negativa.



Figura 4.11.1 Equipo de electroforesis

4.12 Cuantificación de DNA obtenido

Con el fin de cuantificar el DNA obtenido y determinar el grado de pureza de la extracción, así como para tener condiciones estandarizadas y/o semejantes en la concentración de DNA que se va amplificar por la PCR (la concentración de DNA a usar debe ser de 50 ng/ μ l), se cuantificó el DNA por el método descrito por Sambrook et.al. (1989), en donde se midió la absorbancia de

⁵ Fuente de poder: BIO RAD Power Pac 300, Cámara de electroforésis: Pharmacia Biotech, GNA 100. Max 300V, 200 Watt.

⁶ 100bp DNA Ladder, Gibco BRL

cada muestra en un espectrofotómetro⁷ a dos longitudes de onda (260 y 280 nm). La lectura a 260 nm permite el cálculo de la [ADN] o [ARN] en la muestra. Y la lectura a 280nm permite calcular la cantidad de proteína presente en la muestra y por lo tanto la pureza del producto.

Una DO de 1 corresponde aproximadamente a 50 ng/μl para la doble cadena de DNA, 40 ng/μl para una cadena simple de DNA o RNA y aproximadamente 20 ng/μl para una simple cadena de oligonucleótidos. Por otra parte, la relación entre las lecturas de DO260/DO280 proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Preparaciones puras de DNA y RNA tienen un valor de DO260/ DO280 =1.8-2.0, respectivamente

Si estuviera contaminado con proteína o fenol, la relación de DO260/DO280 sería significativamente más baja que el valor dado arriba y la cuantificación exacta de la cantidad de ácido nucleico no sería posible. Si la relación DO260/DO280 fuera más alta del valor dado arriba entonces se tendría que diluir hasta tener un valor menor de 2 para tener la concentración exacta, esto sucede cuando la DO a 280 nm es mayor que 1.

$$1A = 50 \text{ ng}/\mu\text{l} = 50 \text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$$

$$[\text{STOCK}] = \text{Absorbancia a } 260 \text{ nm} * 5^a * 50\text{ng}/\mu\text{l} * \text{factor de dilución}^b = \text{ng}/\mu\text{l}$$

a = paso de la celda reducida a 1/5 parte de lo real.

b = ejemplo: 50 μl /2 μl, si se tomaron 2 μl de DNA y se diluyeron en 48 μl de agua destilada estéril

$$[\text{Muestra o Dilución}] = A * 5^a * 50 \text{ ng}/\mu\text{l} = \text{ng}/\mu\text{l}$$

4.13 Amplificación del gen 16S ARNr por la PCR

Se realizó la amplificación del gen 16s ribosomal, porque es el más caracterizado para bacterias ácido lácticas, es universal y tiene regiones conservadas.

Para la amplificación del gen de ARNr 16S de las cepas en estudio por la PCR se utilizaron los primers pA y pH, los cuales permitieron la amplificación casi completa del gen, amplificando alrededor de 1527 pb. En la tabla 4.13.1 se muestra las secuencias de los primers usados

⁷UV- Visible Agilent 8453E

Tabla 4.13.1: Secuencias de los primers usados para la amplificación del gen ribosomal de bacterias.

Primer	Secuencia (5' → 3')	Posición	Orientación
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	9-28	Reverse
pH	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	1540-1521	Foward
3 ¹	GTTGCGCTCGTTGCGGGACT	1109-1090	Foward
anti-γ	CTCCTACGGGAGGCAGCAGT	339-358	Reverse

¹Usado para la secuenciación del gen ARNr 16S región VI con primer anti-γ

El PCR se llevó a cabo en un Termociclador (Biometra, T-PERSONAL) (Figura 4.13.1).



Figura 4.13.1 Termociclador para la PCR

Los reactivos y su concentración utilizados en la PCR para amplificar el gen ribosomal 16S de bacterias lácticas, para una reacción de 50µl de volumen final, se muestran en la tabla 4.13.2

Tabla 4.13.2 Reactivos para la PCR para un volumen final de 50µl

Master mix

Reactivo	Por tubo (volumen final de 50µl)	Para 15 tubos (volumen final de 50µl)
Buffer de PCR [10x]	5µl	75µl
MgCl ₂ [25mM]	5µl	75µl
dNTP's [0.2mM] ¹	1µl	15µl
Primer pA[20ng/µl] ²	0.5µl	7.5µl
Primer pH[20ng/µl] ²	0.5µl	7.5µl
Agua desionizaa estéril	32µl	480µl

Posteriormente a cada uno de los 15 tubos se les agrega

Master mix	44µl
Templado o DNA [~50ng/ µl]	5µl
Taq polimerasa [1U/µl] ³	1µl
TOTAL	50µl

¹Desoxinucleotidos trifosfatos de Invitrogen-Life Technologies

²IDT Integrated DNA Technologies

³Invitrogen-Life Technologies

El programa que se siguió para la PCR fue: 1 ciclo de predesnaturalización o desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, anillamiento a 56 °C por 30 seg y un tiempo de elongación de 60 seg a 72 °C, con 1 ciclo final de elongación de 5 min a 72 °C. Por último 1 ciclo a 4 °C por tiempo indefinido. Al terminar la reacción el tubo de reacción se almacena a 4 °C, para luego ser digerido por endonucleasas de restricción (Rodas, et.al. 2003).

La figura 4.13.2 muestra los primers que se tenían que usar para obtener la secuencia casi completa del gen

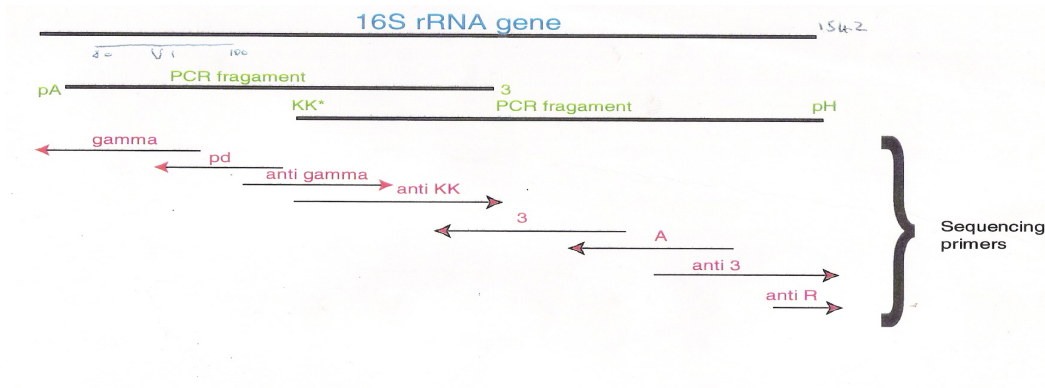


Figura 4.13.2. Primers usados para la secuenciación del gen 16S rRNA

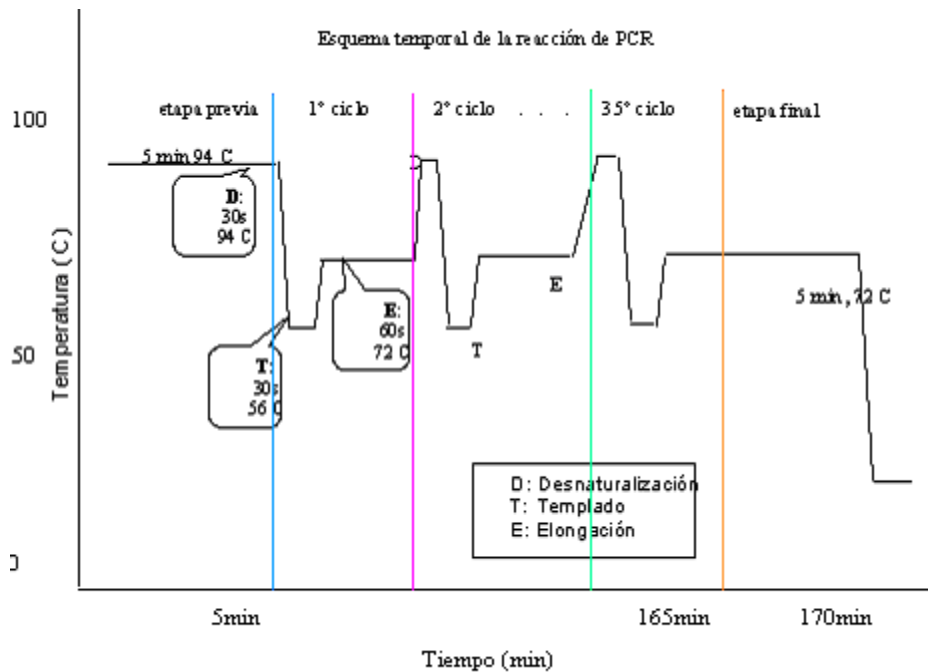


Figura 4.13.3. Esquema temporal de la reacción

La figura 4.13.3 muestra un esquema temporal de la reacción de PCR llevada a cabo.

Para comprobar la amplificación del gen RNAr 16S se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1.8 % p/v a 85 V por 35 min en un buffer TBE 1x, posteriormente se tiñó con bromuro de etidio, observado en un transiluminador y digitalizando la imagen en el *Fluor S-Multimager, BIO RAD*.

4.14 Purificación del PCR

Para la secuenciación es necesario tener productos de PCR puros, por lo que se usó el Kit de limpieza de QUIAGEN con lo que se eliminan residuos de $MgSO_4$, primers y dNTP'S y otros que no son parte del producto de PCR.

Con tal fin se realizó el siguiente procedimiento:

- En un tubo eppendorf de 1.5 ml adicionar 500 µl de Buffer PB
- Agregar el producto de la PCR y mezclar suavemente de arriba a bajo.
- Transferir al tubo de columna y centrifugar a 13000 rpm por 1min
- Descartar el sobrenadante

Agregar 750 µl de amortiguador PE (adicionando previamente el EtOH)

Centrifugar a 13000 rpm por 1min

Tirar el sobrenadante y centrifugar a 13000 rpm por 1 min

Transferir la columna del tubo a un eppendorf de 1.5 ml con la asita cortada

Adicionar 45 µl de amortiguador PB a los productos de PCR muy buenos o 30 µl para los productos no tan buenos. Se consideran buenos productos de PCR aquellos que en el gel de agarosa en la electroforesis muestran una banda intensa y ancha.

Dejar reposar durante 1 min

Centrifugar 1min a 13000 rpm

Remover la columna del tubo eppendorf y taparlo

Almacenar a - 20 °C

4.15 ARDRA

La técnica de ARDRA, se basa en el principio de digerir el producto de la PCR con endonucleasas de restricción a fin de obtener un perfil de bandas para dicho producto de PCR.

Para el análisis de la restricción del DNA ribosomal amplificado (ARDRA) primero se buscaron las condiciones de trabajo, para lo cual se consideró: el tipo de enzimas de restricción a usar, las condiciones de uso de estas, la concentración de cada reactivo para la restricción, la posible purificación del producto de PCR y el tiempo de incubación para la restricción con las endonucleasas, a fin de obtener el perfil que permitiera la diferenciación entre las cepas, en especial a nivel género, aunque es más deseable a nivel especie. La selección de las enzimas empleadas para la restricción de los fragmentos del ADN amplificado, se basó en una revisión exhaustiva de las enzimas que han sido empleadas por otros autores para el estudio de poblaciones de bacterias lácticas. (Aznar et.al. 2003, Duerden et.al. 2001 y Rodas et.al. 2003).

Se probaron las enzimas disponibles en el laboratorio con cepas elegidas como representativas de cada uno de los grupos de bacterias lácticas más importantes que se han encontrado en el pozol: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Weissella confusa*, *Streptococcus infantarius* y *Leuconostoc citreum*. (Ampe, F., et.al. 1999).

Se consideró usar enzimas de corte raro, pero de acuerdo con la secuencia de bases de las cepas de referencia del gen 16S el perfil de bandas resultaría muy escaso y el análisis de

bandas poco discriminatorio. Se seleccionaron entonces enzimas de restricción con una secuencia de corte de 4-6pb y/o que dicha secuencia tuviera una N (cualquier base nitrogenada), con el fin de obtener un número grande de bandas en la restricción. Considerando lo anterior, se seleccionaron *Sau 3A*, *BsuRI* y *Hinf I*.

Tabla 4.15.1. Enzimas de restricción usadas.

ENZIMA	MARCA	SECUENCIA DEL SITIO DE CORTE	DEFINICION DE UNIDAD	UNIDADES POR MICROLITRO
<i>Sau 3A</i>	Boehringer	GATC	1U digiere 1µg de DNA en 25 µl de buffer de reacción en 1hr a 37 °C	4U/ µl
<i>BsuRI</i>	Fermentas. Life-Sciences	GG CC	1U digiere 1µg de DNA en 50 µl de buffer de reacción en 1hr a 37 °C	10U/ µl
<i>Hinf I</i>	Gibco BRL	G ANTC	1U digiere 1µg de DNA en 50µl de buffer de reacción en 1hr a 37 °C	10U/ µl

Para encontrar las condiciones de reacción (tiempos de incubación para la digestión, temperatura de preparación de la mezcla de reacción, concentraciones de los reactivos (para la PCR y de endonucleasa)) y la estandarización de éstas, se usaron las cepas de referencia.

Después de la restricción, los fragmentos obtenidos se corrieron en una electroforesis convencional en gel de agarosa al 1.8 % en amortiguador TBE 1x, usando una cámara de electroforesis de campo constante a 55volts, 400mA, durante 120min, posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µl/ml) por 10 min.

Tratando de optimizar la digestión se digirieron 7.5 µl del producto de PCR de *S. infantarius* con 2.5 U de enzima *BsuRI*, variando el tiempo de incubación, dejándose a 37 °C por 3, 5, 7 y 10 h.

Después se variaron las condiciones de electroforesis a campo constante: el voltaje se llevó de 40 a 60volts, el tiempo de migración se probó de 60min hasta 120min, a una concentración del buffer TBE de 0.5x y de 1x, así como también se varió las concentración de los geles de agarosa (0.8,1.3,1.8,2.5 %p/v) .

Las condiciones de electroforesis influyen en la separación de las bandas obtenidas. La concentración del gel de agarosa es uno de los principales factores que intervienen en la correcta separación de las bandas generadas durante la digestión del fragmento de ADN amplificado,

4.16 Elaboración de dendrogramas

Una vez digitalizados los geles de agarosa en el Fluor-S, que mostraban el perfil de bandas de cada cepa, se construyó una matriz basada en la presencia o ausencia de las bandas únicas para cada enzima y posteriormente se estimó la distancia entre las cepas mediante el programa Treecon for Windows (Van de Peer y Wachter, 1994), el cual estimó la distancia empleando el modelo matemático de Nei y Li (1979). Se utilizó el método UPGMA (por sus siglas en inglés Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) para construir el dendrograma genotípico de las bacterias lácticas aisladas del Axocotl, por cada una de las endonucleasas usadas.

4.17 Secuenciación del gen rRNA 16S

Una vez que se obtuvieron los dendrogramas se seleccionó una de las cepas y se mandó a secuenciar la región IV de su gen 16S rRNA en el Instituto de Fisiología, UNAM (20 µl del producto de PCR del gen 16S rRNA para el que se utilizaron los primers pA y 3*) usando el primer de secuenciación γ (20pmol/µl).

Posteriormente la secuencia obtenida se introdujo en el programa BLAST, que es una base de datos que permite conocer el % de identificación del microorganismo por comparación con otros microorganismos y así conocer la especie y/o cepa aislada. El software muestra una serie de microorganismos que presentan una secuencia semejante a la introducida y se selecciona el microorganismo que tenga la secuencia con un % de similitud o semejanza más próximo al 100%.

4.18 Fermentación de Carbohidratos

Se seleccionaron 4 cepas representativas (incluyendo la secuenciada) de cada grupo de los dendrogramas y que como característica adicional estuvieran en distintos grupos en cada uno de los dendrogramas.

La fermentación de carbohidratos para dichas cepas, se determinó empleando el sistema API 50CH de BioMérieux. Se adicionó una suspensión bacteriana a un total de 49 pozos cada uno con un carbohidrato diferente y teniendo además un pozo control (Manual API 50 CH BioMérieux y Manual API 50 CHL Médium BioMérieux).

Se modificó el método con respecto a las especificaciones del proveedor, sustituyendo la obtención de microorganismos a partir de cajas con medio sólido, por microorganismos obtenidos a partir de una fermentación en medio líquido con la finalidad de garantizar una cantidad suficiente de microorganismos para la fermentación de los azúcares (Villegas,1995). El método se detalla en la figura 4.18.1

La capacidad de fermentar dichos azúcares se determinó por el cambio de color del indicador púrpura de bromocresol, como resultado del grado de la producción de ácidos, el indicador vira a amarillo.

Posteriormente se alimentaron los datos de fermentación de carbohidratos en el programa APILAB (Bio-mérieux). El programa proporciona: porcentaje de identificación del taxón, calidad de identificación (excelente, muy buena, buena, baja, aceptable, dudosa y no válida), prueba de t-student, perfil de carbohidratos, pruebas en contra y pruebas complementarias, siendo los 3 primeros puntos los considerados y mostrados, con fines prácticos en este proyecto.

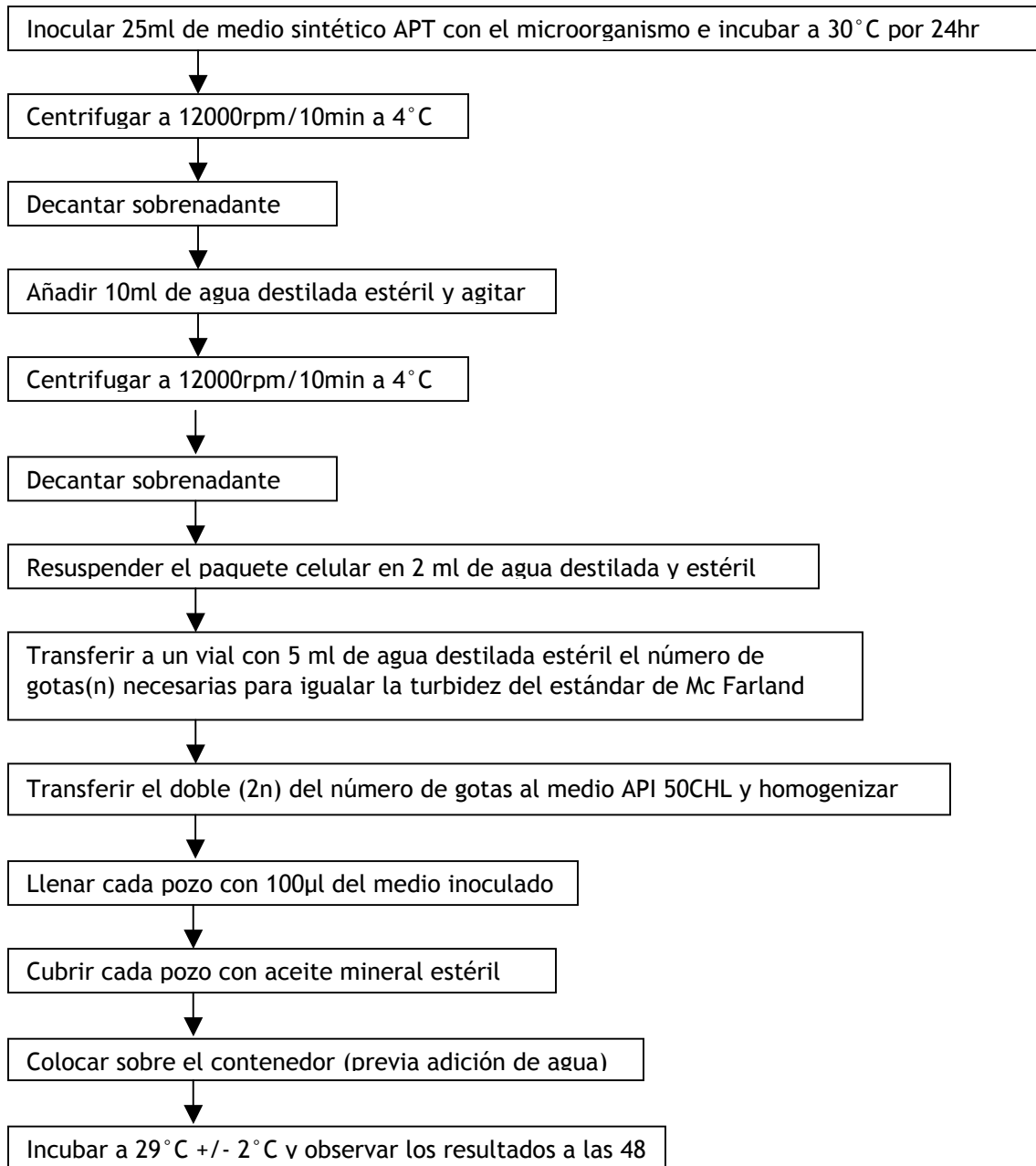


Figura 4.18.1 Fermentación de carbohidratos mediante el sistema API 50 CH

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Temperatura y pH

Se determinó la temperatura y pH de las 3 fermentaciones paralelas de atole agrio realizadas. Los atoles agrios M2 y M3 solo se muestrearon sólo al final (a las 72 hr), manteniendo los cántaros tapados y sin algún tipo de movimiento de los mismos o agitación del atole, durante toda la fermentación. El atole 1 se muestreo a 7 distintos tiempos de fermentación.

Tabla 5.1.1. Temperatura y pH de las muestras de atole agrio durante su fermentación

Muestra	Temperatura (°C)	pH (papel pH)	pH con potenciómetro
Atole recién hervido ^a	100	6.5	8
Tiempo 0 ^b	97	8.5	9.56
Tiempo 1 (3hrs)	45	8.5	8.9
Tiempo 2 (6hrs)	43	8.5	8.9
Tiempo 3 (9hrs)	38	9.5	9.57
Tiempo 4 (11hrs)	37	9	9.45
Tiempo 5 (24hrs)	24	8.5	8.5
Tiempo 6 (34hrs)	26	8	8.71
Tiempo 7 (48hrs)	28	7.5	7.5
M2 (72hrs)	28	4.5	4.31
M3 (72hrs)	29	4.5	4.36

^aAntes de servirse al cántaro, en la olla de calentamiento

^bAl servir el atole al cántaro

Como se muestra en la Tabla 5.1.1, la temperatura del atole 1 recién vertido en el cántaro fue de 97°C y descendió lentamente, hasta las 24 hr y después se equilibró con la temperatura ambiente. Es posible que el atole en los cántaros que no se abrieron, la temperatura haya permanecido más alta durante más tiempo.

El pH se mantuvo en valores altos, cercanos a 9, llegando a 7.5 hasta las 48 h. En cambio, los atoles que se mantuvieron sin entrada de aire (M2 y M3) la acidificación fue más intensa. El valor alcalino inicial se atribuye a la adición de la pasta de hierbadulce con cal y a la nixtamalización del maíz. Los resultados obtenidos indican que la entrada de aire al cántaro por la acción del sifón, interfirió en la adecuada fermentación del atole y la acidificación del mismo. En tanto los atoles M2 y M3 si se acidificaron. Por ejemplo en el caso del pozol, de los tamales fermentados y de otros

atoles fermentados como el xokoatol o eloatol, se debe dejar fermentar la masa, pasta o el atole en el tiempo y manera indicada, sin mover, amasar o agitar, para que se lleve a cabo la fermentación, y llegar al grado de acidez y pH esperados. En el caso del pozol el pH inicial es de 6.8 y el final de 3.9, después de que se dejó fermentar la masa de pozol envuelta en hojas de plátano de 4-5 días y a veces hasta 2 semanas, sin haber amasado y/o provocado la entrada de aire (Flores, 1996).

5.2 Cuentas de bacterias lácticas, bacterias lácticas amilolíticas, enterobacterias y bacterias mesófilas aerobias durante las fermentaciones.

La tabla 5.2.1 muestra los valores de LOG₁₀ UFC/ml, para cada una de las muestras en placas de MRS-A, MRS, VRBGA y ACP.

Tabla 5.2.1. Concentración de bacterias lácticas, bacterias lácticas en medio MRS-A, de enterobacterias y de mesófilas aerobias no lácticas.

Muestra	LOG ₁₀ UFC/ml de bacterias lácticas en medio MRS-A	LOG ₁₀ UFC/ml de bacterias lácticas en medio MRS	LOG ₁₀ UFC/ml de mesófilas aerobias no lácticas en medio ACP	LOG ₁₀ UFC/ml de enterobacterias en medio VRBGA
Nixtamal	4.44	3.64	3.01	2.78
Agua	-	-	2.85	2.10
Atole recién hervido ^a	-	-	-	2.49
Tiempo 0 ^b	-	-	-	3.08
Tiempo 1 (3hrs)	-	-	3.47	1.96
Tiempo 2 (6hrs)	-	-	3.55	2.27
Tiempo 5 (24hrs)	2.46	-	2.62	
Tiempo 6 (34hrs)	3.54	2.90	3.2	2.23
Tiempo 7 (48hrs)	4.03	3.78	3.36	2.48
M2 (72hrs)	3.71	5.70	-	2.58
M3 (72hrs)	3.69	5.73	-	2.58

^aAntes de servir en el cántaro de fermentación

^bAl servir en el cántaro de fermentación

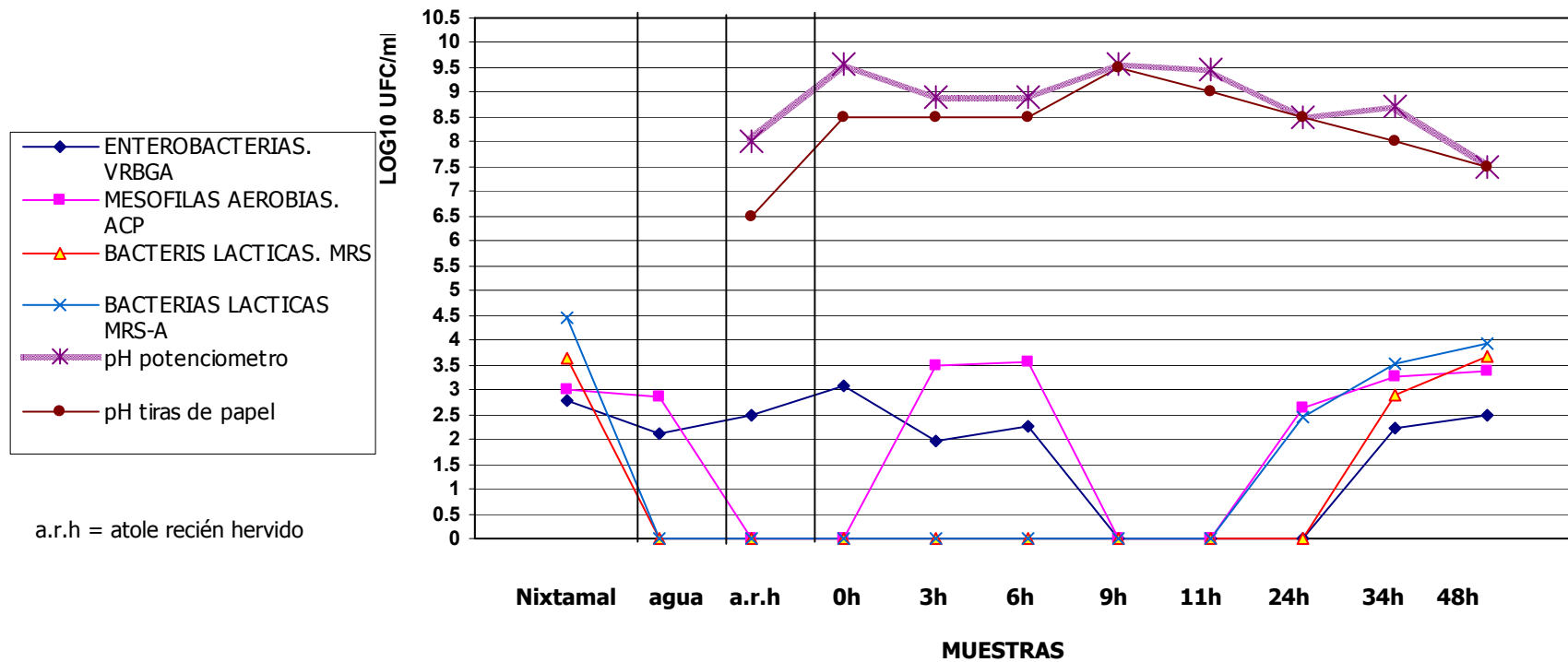


FIGURA 6.2.1. CUENTA DE BACTERIAS LÁCTICAS, BACTERIAS LACTICAS EN MEDIO MRS-A, ENTEROBACTERIAS Y BACTERIAS MESOFILAS AEROBIAS NO LÁCTICAS DURANTE EL PROCESO DE ELABORACION DEL AXOCOTL Y DURANTE LA FERMENTACION

En el nixtamal se detectaron cuentas de enterobacterias, de mesófilas aerobias no lácticas y de bacterias lácticas (tanto en medio MRS-A como en medio MRS). La cuenta de BAL en el nixtamal fue alta y predominante sobre las otras bacterias, lo que coincide con lo reportado por Steinkraus (1993b).

En el agua únicamente se detectaron mesófilas aerobias no lácticas y enterobacterias. En el atole recién hervido detectamos a las enterobacterias en un pH de 8.0 (potenciómetro), lo que sugiere que este grupo resistió las altas temperaturas a diferencia de las otras bacterias que parecen haber muerto durante la ebullición del atole. Es así que cualquier grupo que se presente posteriormente en la fermentación, además de las enterobacterias, tuvo como fuente de inóculo el cántaro de barro. La pasta de hierba se adicionó después del atole recién hervido, pero no hubo ningún grupo de microorganismos detectable en el plaqueo de esta materia prima, por lo que no se considera fuente de microorganismos después del hervido del atole.

A las 0 h de fermentación y un pH básico (9.5 potenciómetro), sólo se detectaron enterobacterias, que disminuyeron lentamente al igual que el pH (8.9). A las 3 h, se detectaron cuentas de mesófilas aerobias no lácticas por encima de la cuenta de enterobacterias, los 2 grupos de microorganismos continuaron aumentando de manera lenta hasta las 6 h, manteniéndose el pH a 8.9. Después de las 6 h, el pH aumentó a 9.5 y las enterobacterias y mesófilas aerobias no lácticas disminuyeron, desapareciendo a las 9 h, en tanto que el pH se mantuvo constante hasta las 11 h.

A las 24 h, conforme disminuía más el pH (8.5) se detectó la presencia de bacterias lácticas en medio MRS-A y de mesófilas aerobias no lácticas, misma que fue muy cercana entre sí (Log₁₀ 2.46 UFC/ml y Log₁₀ 2.62 UFC/ml, respectivamente). Es posible que la presencia de BAL en MRS-A haya sido antes de la presencia de BAL en medio MRS porque proporcionan los carbohidratos para la degradación.

A las 34 h, el pH continuó disminuyendo y las cuentas de bacterias lácticas en medio MRS-A y de mesófilas aerobias no lácticas continuaron aumentando, por otra parte se detectaron cuentas de BAL en medio MRS y de enterobacterias. A las 48 h conforme continuó el descenso de pH (7.5), las cuentas de todas las bacterias en estudio

continuaron aumentando, sobretodo y de manera muy notable la de bacterias lácticas en MRS (Log₁₀ 3.78 UFC/ml).

A las 72 h ya no se muestreo el atole 1, debido a que el pH no disminuyó como se esperaba (de 6 o menor) y se muestreo el atole M2 y M3, cuya cuenta de bacterias fue bastante cercana entre sí. La cuenta de BAL en medio MRS (Log₁₀ ≈5.7 UFC/ml) fue superior respecto de las otras bacterias; las cuentas de BAL en medio MRS-A y de enterobacterias fueron muy cercanas a las del atole 1 a las 34 h y no se detectó presencia de mesófilas aerobias no lácticas.

Al comparar los resultados de los 3 atoles se observa claramente que la entrada de aire al cántaro (atole 1) favoreció durante las primeras horas el desarrollo de bacterias mesófilas aerobias y de enterobacterias, en tanto que las bacterias lácticas aparecieron hasta las 24 y 36 h, por lo que no se produjo la acidificación esperada y a la vez no se registró la eliminación de bacterias mesófilas no lácticas que se observó en los atoles M2 y M3, mismos en los se registró el mejor número de BAL y la mayor acidificación, lo que indica que las condiciones anaeróbicas son esenciales para que se lleve a cabo este proceso. Estos resultados coinciden con lo reportado para el pozol, tamales y otros atoles fermentados (Flores, 1996)

5.3 Aislamiento de las bacterias lácticas

Se comprobó la pureza de cada cepa macro y microscópicamente.

De las colonias que se aislaron de MRS-A ninguna presentó halo de actividad amilolítica después de la incubación a 30 °C ni después de almacenarlas a 4°C, durante 1 día.

Como resultado de las observaciones macroscópicas, microscópicas, de las propiedades morfológicas y pruebas bioquímicas se obtuvieron un total de 114 cepas gram + y catalasa (-).

En la tabla 5.3.1 se registra, la clave de cada cepa purificada.

Simbología usada para la asignación de clave a las cepas:

A= Aislamiento a partir del medio de cultivo MRS-A

MM= Maíz nixtamalizado

M2= Atole M-2

t5, t6 o t7= Tiempo de muestro en el atole 1

10Ex = Dilución empleada, en donde x = 0,1,...7

Cyz= Colonia, en donde y= a número de colonia aislada del mismo medio y z= número de la resiembra.

TABLA 5.3.1 CEPAS DE BACTERIAS LACTICAS AISLADAS Y PURIFICADAS DEL AXOCOTL

CLAVE	NUMERO	FUENTE	TIEMPO MUESTREO	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA	MORFOLOGIA MACROSCÓPICA					
					FORMA	TAMAÑO	COLOR	BORDE	ELEVACION	TEXTURA
AMM10E-1 C.2	1	NIXTAMAL	N/A	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	AMARILLA	ENTERO.	CONVEXA.	BUTIROSA
AMM10E-1 C.10	4	NIXTAMAL	N/A	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
AMM10E-2 C.1	5	NIXTAMAL	N/A	Cocos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	G	AMARILLO	ENTERO.	CONVEXA.	BUTIROSA
AMM10E-2 C.4	6	NIXTAMAL	N/A	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	SUAVE
AMM10E-2 C.14	8	NIXTAMAL	N/A	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	SECA
AMM10E-2 C.16	9	NIXTAMAL	N/A	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	SECA
AMM10E-2 C.17	10	NIXTAMAL	N/A	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	AMARILLO-TRANSP	ENTERO.	CONVEXA.	SUAVE
AMM10E-2 C.19	11	NIXTAMAL	N/A	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	AMARILLO	ENTERO.	CONVEXA.	SECA
AMM10E-2 C.20	12	NIXTAMAL	N/A	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	SECA
AMM10E-3 C.4	14	NIXTAMAL	N/A	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
At610E0 C.8	19	ATOLE 1	34hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA
At610E0 C.8a	21	ATOLE 1	34hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA
AM310E-3 C.2	27	ATOLE M-3	72hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA TRANSP	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
At710E0 C.1	28	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	CONVEXA.	SUAVE
At710E0 C.4a	29	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA	ENTERO.	CONVEXA.	SUAVE
At710E0 C.4c	31	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA	ENTERO.	CONVEXA.	SUAVE
At710E0 C.6a	33	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA	ENTERO.	CONVEXA.	SUAVE
At710E0 C.6b	34	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA	ENTERO.	CONVEXA.	SUAVE
At710E0 C.6c	35	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA	ENTERO.	CONVEXA.	SUAVE
At710E0 C.7	36	ATOLE 1	48hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA	ENTERO.	CONVEXA.	SUAVE
At710E0 C.8	37	ATOLE 1	48hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	AMARILLO	ENTERO.	CONVEXA.	SUAVE
At710E0 C.8	38	ATOLE 1	48hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	AMARILLO.	ENTERO.	CONVEXA	SUAVE
At710E-1 C.2	39	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	SECA
At710E-1 C.3	40	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
At710E-1 C.1D	41	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA-BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	SECA

N/A = NO APLICA PARA EL NIXTAMAL

P=PEQUEÑA (0≤1mm), M=MEDIANA (1.1≤2mm), G=GRANDE (2.1≤3mm)

CONTINUACION DE LA TABLA 5.3.1

CLAVE	NUMERO	FUENTE	TIEMPO MUESTREO	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	MORFOLOGIA MACROSCÓPICA					
					FORMA	TAMAÑO	COLOR	BORDE	ELEVACION	TEXTURA
At710E-1 C.2D	42	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA-BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	SECA
At710E-1 C.4D	44	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA-BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	SECA
At710E-1 C.5D	45	ATOLE 1	48hrs	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA-BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	SECA
At710E-2 C.6D	54	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	CONVEXA.	BUTIROSA
At710E-2 C.7D	55	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	CONVEXA.	BUTIROSA
At710E-2 C.1	56	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	BUTIROSA
MM10E-1 C.1a	57	NIXTAMAL	N/A	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	BUTIROSA
MM10E-1 C.2a	59	NIXTAMAL	N/A	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	BUTIROSA
MM10E-1 C.2b	60	NIXTAMAL	N/A	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	BUTIROSA
MM10E-1 C.4a	61	NIXTAMAL	N/A	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	BUTIROSA
MM10E-1 C.4c	63	NIXTAMAL	N/A	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	BUTIROSA
MM10E-1 C.7D	64	NIXTAMAL	N/A	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
MM10E-1 C.7a	65	NIXTAMAL	N/A	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
MM10E-1 C.7ba	66	NIXTAMAL	N/A	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
MM10E-1 C.7bb	67	NIXTAMAL	N/A	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
MM10E-1 C.7bc	68	NIXTAMAL	N/A	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
MM10E-1 C.7bd	69	NIXTAMAL	N/A	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
MM10E-1 C.7c	70	NIXTAMAL	N/A	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
MM10E-1 C.7e	71	NIXTAMAL	N/A	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
MM10E-1 C.7f	72	NIXTAMAL	N/A	Diplococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
MM10E-1 C.7g	73	NIXTAMAL	N/A	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
MM10E-1 C.6b	74	NIXTAMAL	N/A	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
MM10E-2 C.2	76	NIXTAMAL	N/A	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
MM10E-2 C.3	77	NIXTAMAL	N/A	Estreptococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA
MM10E-2 C.3	78	NIXTAMAL	N/A	Estreptococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA

N/A = NO APLICA PARA EL NIXTAMAL

P=PEQUEÑA (0≤1mm), M=MEDIANA (1.1≤2mm), G=GRANDE (2.1≤3mm)

CONTINUACION DE LA TABLA 5.3.1

CLAVE	NUMERO	FUENTE	TIEMPO MUESTREO	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	MORFOLOGIA MACROSCÓPICA					
					FORMA	TAMAÑO	COLOR	BORDE	ELEVACION	TEXTURA
MM10E-3 C.2	80	NIXTAMAL	N/A	Diplococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA
M210E0 C.2	82	ATOLE M-2	72hrs	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA
M210E-3 C.2	83	ATOLE M-2	72hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA
M310E-4 C.1	84	ATOLE M-3	72hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA
M310E-5 C.2	86	ATOLE M-3	72hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA
t610E0 C.1	88	ATOLE 1	34hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E0 C.1D	89	ATOLE 1	34hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E0 C.2	90	ATOLE 1	34hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E0 C.2D	91	ATOLE 1	34hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E0 C.3	92	ATOLE 1	34hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E0 C.3D	93	ATOLE 1	34hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E0 C.4	94	ATOLE 1	34hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E0 C.4D	95	ATOLE 1	34hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E0 C.5a	96	ATOLE 1	34hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E0 C.5b	97	ATOLE 1	34hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E0 C.5c	98	ATOLE 1	34hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E-1 C.1aD	99	ATOLE 1	34hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E-1 C.1a	100	ATOLE 1	34hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E-1 C.1bb	101	ATOLE 1	34hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E-1 C.1b	102	ATOLE 1	34hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E-1 C.1ca	103	ATOLE 1	34hrs	Diplococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E-1 C.1cb	104	ATOLE 1	34hrs	Diplococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E-1 C.1cc	105	ATOLE 1	34hrs	Diplococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E-1 C.2a	106	ATOLE 1	34hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E-1 C.2D	107	ATOLE 1	34hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA

N/A = NO APLICA PARA EL NIXTAMAL

P=PEQUEÑA (0≤1mm), M=MEDIANA (1.1≤2mm), G=GRANDE (2.1≤3mm)

CONTINUACION DE LA TABLA 5.3.1

CLAVE	NUMERO	FUENTE	TIEMPO MUESTREO	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	MORFOLOGIA MACROSCÓPICA					
					FORMA	TAMAÑO	COLOR	BORDE	ELEVACION	TEXTURA
t610E-1 C.2D	108	ATOLE 1	34hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E-1 C.2bD	109	ATOLE 1	34hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E-1 C.2ca	110	ATOLE 1	34hrs	Diplococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E-1 C.2cb	111	ATOLE 1	34hrs	Diplococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E-1 C.2cc	112	ATOLE 1	34hrs	Diplococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E-1 C.3D	113	ATOLE 1	34hrs	Diplococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E0 C.1	114	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA
t710E0 C.2	115	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA
t710E0 C.3	116	ATOLE 1	48hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA
t710E0 C.4	117	ATOLE 1	48hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA
t710E0 C.5	121	ATOLE 1	48hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA
t710E-1 C.1a	122	ATOLE 1	48hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-1 C.1b	123	ATOLE 1	48hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-1 C.1c	124	ATOLE 1	48hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-1 C.2	125	ATOLE 1	48hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-1 C.3	126	ATOLE 1	48hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-1 C.4	127	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-2 C.1D	128	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-2 C.1a	129	ATOLE 1	48hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-2 C.1b	130	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-2 C.1c	131	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-2 C.2a	132	ATOLE 1	48hrs	Diplococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-2 C.2aD	133	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-2 C.2aD	134	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-2 C.2bD	135	ATOLE 1	48hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA

N/A = NO APLICA PARA EL NIXTAMAL

P=PEQUEÑA (0≤1mm), M=MEDIANA (1.1≤2mm), G=GRANDE (2.1≤3mm)

CONTINUACION DE LA TABLA 5.3.1

CLAVE	NUMERO	FUENTE	TIEMPO MUESTREO	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	MORFOLOGIA MACROSCÓPICA					
					FORMA	TAMAÑO	COLOR	BORDE	ELEVACION	TEXTURA
t710E-2 C.2cD	137	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-2 C.2cD	138	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-2 C.3bbD	139	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t710E-2 C.3bcD	140	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
MM10E-1 C.7d	141	NIXTAMAL	N/A	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
At710E0 C.9D	142	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	SUAVE
M210E-5 C.1D	143	ATOLE M-2	72hrs	Estreptobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA
t710E-1 C.3D	144	ATOLE 1	48hrs	Pediococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	BLANCA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
At610E-3 C.1	145	ATOLE 1	34hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
At610E-3 C.1	146	ATOLE 1	34hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E0 C.5aD	147	ATOLE 1	34hrs	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
t610E-1 C.2cD	148	ATOLE 1	34hrs	Diplococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	CREMA.	ENTERO.	ELEVADA.	CREMOSA
AMM10E-3 C.5	149	NIXTAMAL	N/A	Estafilococos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	M	CREMA-BLANCA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA
At510E-1 C.1	151	ATOLE 1	24hrs	Cocobacilos	PUNTIFORME-CIRCULAR.	P	AMARILLA.	ENTERO.	CONVEXA.	CREMOSA

N/A = NO APLICA PARA EL NIXTAMAL

P=PEQUEÑA (0≤1mm), M=MEDIANA (1.1≤2mm), G=GRANDE (2.1≤3mm)

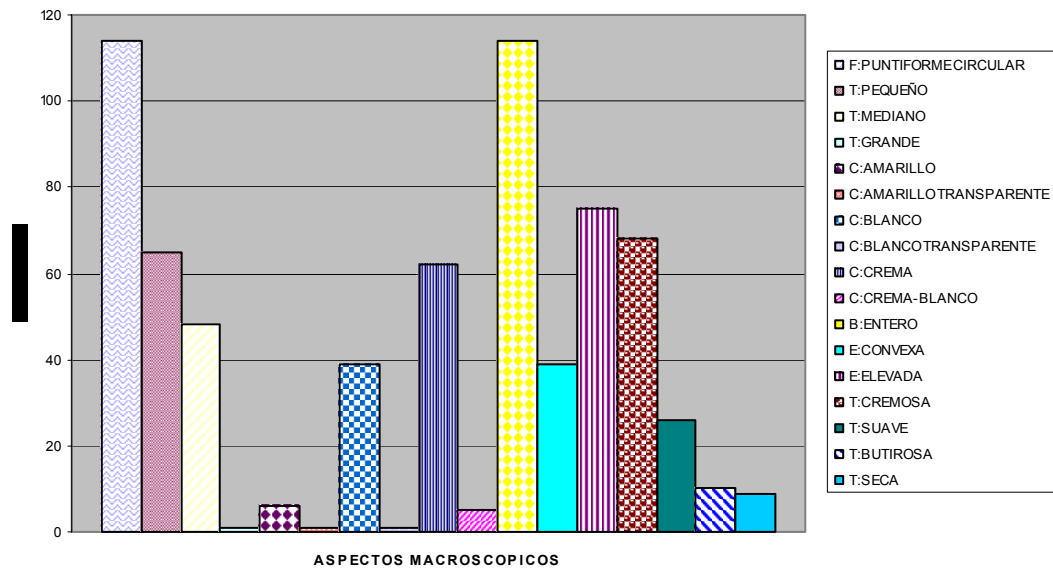


FIGURA 5.3.1 FRECUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS COLONIALES OBSERVADAS EN LAS CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS ENCONTRADAS EN EL AXOCOTL

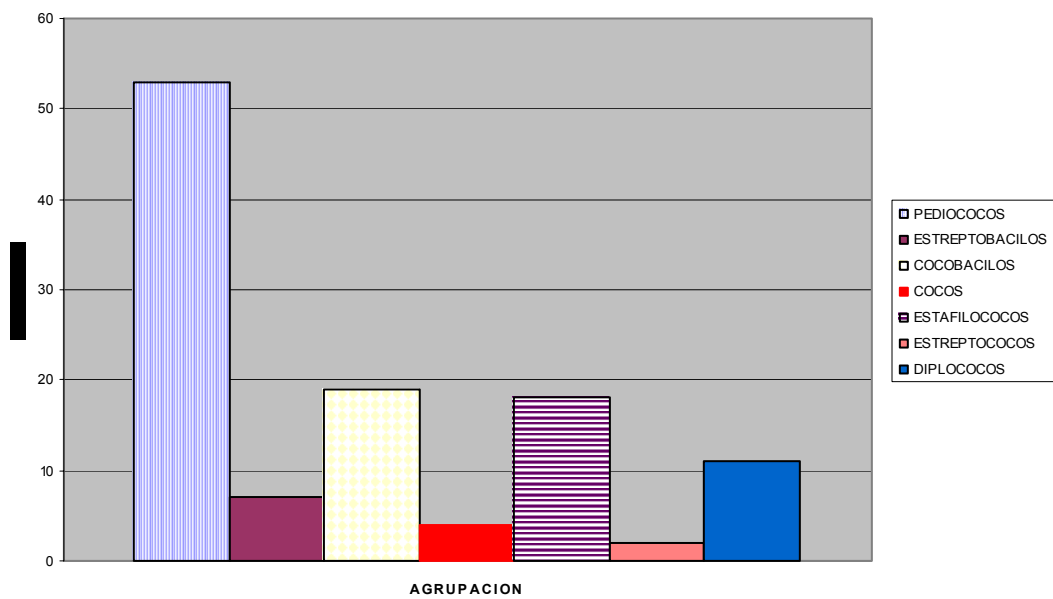


FIGURA 5.3.2 FRECUENCIA DE LA PRESENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS COLONIALES MACROSCÓPICAS DE LAS CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS ENCONTRADAS EN EL AXOCOTL

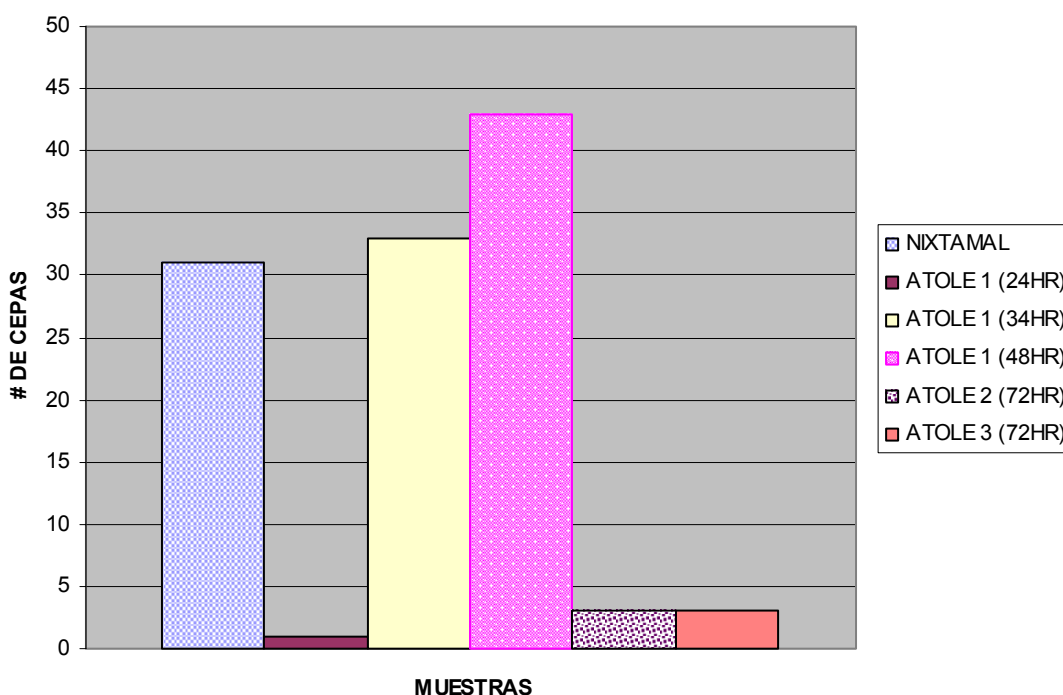


FIGURA 5.3.3 PROPORCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS ENCONTRADAS A DIFERENTES TIEMPOS DE FERMENTACIÓN.

En las figuras 5.3.2 y 5.3.3 se presentan los resultados obtenidos de la identificación fenotípica (morfología microscópica, macroscópica, tinción de gram y prueba de catalasa). La mayoría de las cepas aisladas presentaron colonias puntiforme-circular, superficie elevada, de tamaño pequeño ($0 \leq 1$), de color entre blanco y crema, de borde entero y con una textura más bien cremosa; microscópicamente la mayoría eran pediococos, continuando en cantidad los estreptobacilos y cocobacilos y en menor proporción los estreptococos. La mayoría de las cepas de bacterias lácticas aisladas fueron del atole 1 a 48 y 34 h de fermentación y del nixtamal.

5.4 Tipificación de cepas bacterias lácticas por el Método de ARDRA.

5.4.1 Extracción del DNA

En la Figura 5.4.1 se muestran los resultados de extracción de DNA de las primeras 9 cepas

MM 1 4 5 6 8 9 10 11 12



Figura 5.4.1. Gel de agarosa al 1.8 % en el que se muestra el DNA extraído de las primeras 9 cepas de bacterias lácticas. MM = marcador de peso molecular λ DNA (100bp DNA Ladder, Gibco BRL). Se cargaron 2 μ l en cada pocillo de las muestras de DNA de las cepas. Se corrió la electroforesis a 85 v por 35 min.

También se hizo la extracción de cepas consideradas como de referencia (*S.infantarius*, *W. confusa*, *Lc. citreum*, *Lb. plantarum*), ya que posteriormente se usaron para la optimización del ARDRA

5.4.2 Cuantificación de DNA obtenido

Se obtuvieron valores de DO260/ DO280 con un promedio de 0.6036, por lo que se considera aceptable, ya que una pureza de DNA \approx 1.8 o muy cercana es considerado como DNA puro (Sambrook et.al. 1989). Con base en estos resultados se hicieron diluciones para obtener 50ng/ μ l de DNA y usarse en la PCR, estandarizando de esta manera la concentración para todas las muestras para la PCR.

5.4.3 Amplificación del gen 16S ARNr mediante la PCR

Mediante el uso de los primers pA y pH se amplificó aproximadamente un \sim 98% del gen 16S ARNr de las cepas bajo estudio y de las de referencia, es decir alrededor de 1527pb. Lewin (2001) reporta que el gen completo tiene una secuencia con 1542pb.

En la figura 5.4.3.1 se muestra el producto de PCR de la cepa # 1 el que tiene aproximadamente 1527pb.

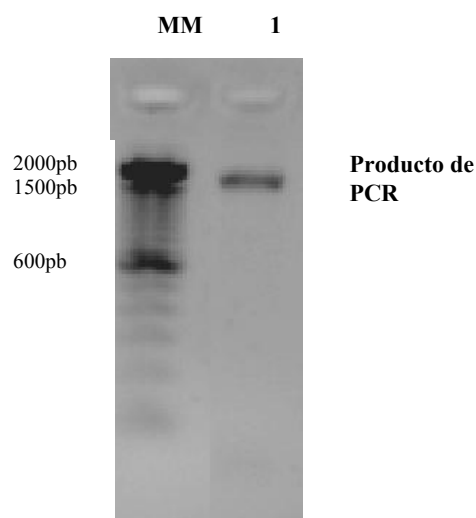


Figura 5.4.3.1 Gel de agarosa al 1.8% que muestra el producto de PCR de la cepa # 1 con ~1531pb. MM = marcador de peso molecular λ DNA (100bp DNA Ladder, Gibco BRL). Se cargaron 2 μ l de producto de PCR en el pocillo. Se corrió la electroforesis a 85 v por 35 min.

A pesar de que la concentración de DNA para la PCR fue estandarizado con 50ng/ μ l, la cantidad de PCR obtenido no fue la misma en todos los casos, ya que en algunas cepas se obtuvieron bandas más fuertes que en otras, lo que corrobora que la reacción de PCR no es cuantitativa.

5.4.4 Condiciones de optimización para la reacción de digestión por endonucleasas.

No se obtuvo la digestión de los productos de PCR usando las condiciones del proveedor con respecto a la concentración del amortiguador de la enzima, de las unidades de enzima de restricción y del tiempo de digestión a una cierta temperatura, la cual nunca se varió para evitar la desnaturalización de la enzima. Tampoco se obtuvo la reacción de digestión cuando se purificó el producto de PCR con el Kit de limpieza de QUIAGEN PCR. Al hacer la reacción en frío, únicamente con *BsuRI*, no cambio la situación, pero aún así se continuó preparando la reacción en frío.

Se varió el volumen de PCR para una cierta cantidad de enzima (Tabla 5.4.4.1)

Tabla 5.4.4.2. Variación del volumen de PCR en el ARDRA

Unidades de enzima de restricción <i>BsuRI</i>	Microlitros del producto de PCR
2.5 U	0.62 μ l
2.5 U	2.5 μ l
2.5 U	3.5 μ l

No ocurrió digestión en ninguno de los casos. Es así que se varió el tiempo de incubación; cada uno de los casos de la tabla 6.4.3.2 se dejó en incubación por 3 h y 5 h a 37 °C y únicamente hubo digestión en el tercer caso, a las 5 h, pero de manera incompleta. Con lo anterior se supo que era necesario agregar un mayor volumen (μl) del producto de PCR por unidades de enzima, ya que más de 1 unidad de enzima por μl de PCR inhibía la digestión y que además por lo menos tenía que estar 5 h en incubación. Entonces se varió el volumen del producto de PCR para una misma cantidad de unidades de enzima y se dejó en incubación por 5 h a 37°C (Tabla 5.4.4.3)

Tabla 5.4.4.3. Variación del volumen del producto de PCR en la digestión del mismo.

Unidades de enzima de restricción <i>BsuRI</i>	Microlitros del producto de PCR
2.5 U	7.5 μl
2.5 U	10 μl

Con un volumen de 7.5 μl del producto de PCR y con 2.5 U de enzima se obtuvo la digestión completa del producto de PCR (Figura 5.4.4.1)

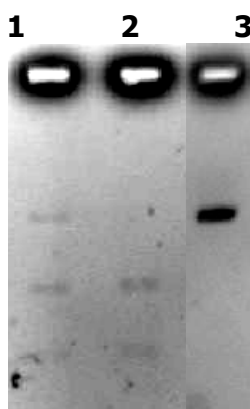


Figura 5.4.4.1. Incubación por 5 h de los productos de PCR's digeridos con *BsuRI*. Carril 1: reacción con 10 μl del producto de PCR de *S. infantarius*, Carril 2: reacción con 7 μl del producto de PCR de *S. infantarius*, Carril 3: Producto de PCR de *S. infantarius*.

Se determinó que la concentración del producto de PCR en la reacción de digestión y las unidades de enzima en dicha reacción influyen en la cantidad y calidad de las bandas y por tanto en el perfil de bandas obtenido, ya que una mejor calidad en la intensidad de las bandas permite cuantificar y comparar las bandas obtenidas con el marcador de peso molecular de DNA (λ DNA (100bp DNA Ladder, Gibco BRL)).

El tiempo óptimo de incubación para la digestión fueron 5 h, ya que a las 3 h no se alcanzaba la total digestión, las 5 h y 7 h de incubación las bandas eran las mismas en cuanto a intensidad y número; a las 10 h algunas de las bandas disminuían su intensidad (Figura 5.4.4.2).

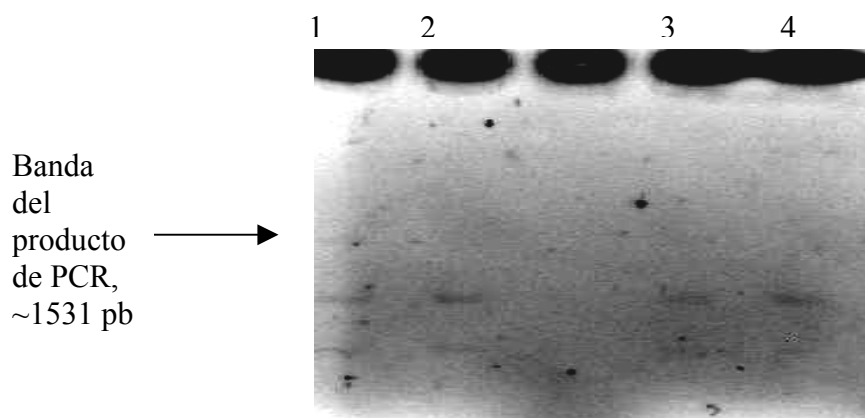


Figura 5.4.4.2. Digestión de 7.5 µl del producto de PCR de *S. infantarius* con 2.5 U de enzima *BsuRI*. Carril 1: 3 h de incubación, Carril 2: 5 h de incubación, Carril 3: 7 h de incubación, Carril 4: 10 h de incubación.

Las condiciones anteriores se probaron con un producto de PCR purificado usando el Kit de limpieza de QUIAGEN PCR y no se detectaron diferencias, por lo que se decidió trabajar con los productos sin purificar para el ARDRA.

Las mejores condiciones de reacción fueron, para un volumen final de reacción de restricción de 50µl fueron:

- i) 2.5U de enzima para 7.5µl de producto de PCR (Tabla 6.4.4.4).
- ii) La reacción se hace en condiciones de esterilidad y en frío.
- iii) Se centrifugan los microtubos a 5rpm por 3 s con la finalidad de mezclar los reactivos.
- iv) Incubar a 37°C por 5 h

Tabla 5.4.4.4. Mezcla de reacción para la digestión de los productos de PCR por endonucleasas

Reactivos	Volumen de los reactivos
PCR	7.5 µl
Enzima BsuRI	0.25µl= 2.5U
H ₂ O d.e.f.	3.5 µl
Amortiguador de enzima 10x	1.5 µl
Total de reacción	15 µl

d.e.f.= destilada, estéril y filtrada

El producto de PCR digerido con la endonucleasa dio un perfil de bandas o de fragmentos en un gel agarosa al 1.8% a través de una electroforesis convencional en amortiguador TBE 1x, usando una cámara de electroforesis de campo constante.

La optimización de la electroforesis en calidad y cantidad de las bandas, tiempo y costos de reacción fue cargando en el pocillo del gel de agarosa 5 µl de producto de PCR digerido con 2 µl de amortiguador TBE 1x y 2 µl de amortiguador de carga, se usó un marcador de peso molecular (λ DNA (100bp DNA Ladder, Gibco BRL)) y se corrió a 55volts durante 120min. Posteriormente se tiñó el gel de agarosa con Bromuro de Etidio (0.5 µl/ml) por 10 min.

Las figuras 5.4.4.3 y 5.4.4.4 muestran los geles de agarosa al 1.8% de la electroforesis convencional de los productos de digestión de los productos de PCR, al usar las enzimas de restricción *Sau 3A*, *BsuRI* y *Hinf I*. Las imágenes se digitalizaron con el equipo Fluor-S (FS Multimager, BIORAD, USA). Los perfiles obtenidos permitieron seleccionar a *BsuRI* y *Hinf I* para usarse posteriormente en el ARDRA de las cepas bajo estudio, ya que de las 3 enzimas probadas, fueron las que generaron un mayor número de fragmentos visibles y cuantificables en los geles de agarosa al 1.8% con las cepas de referencia.

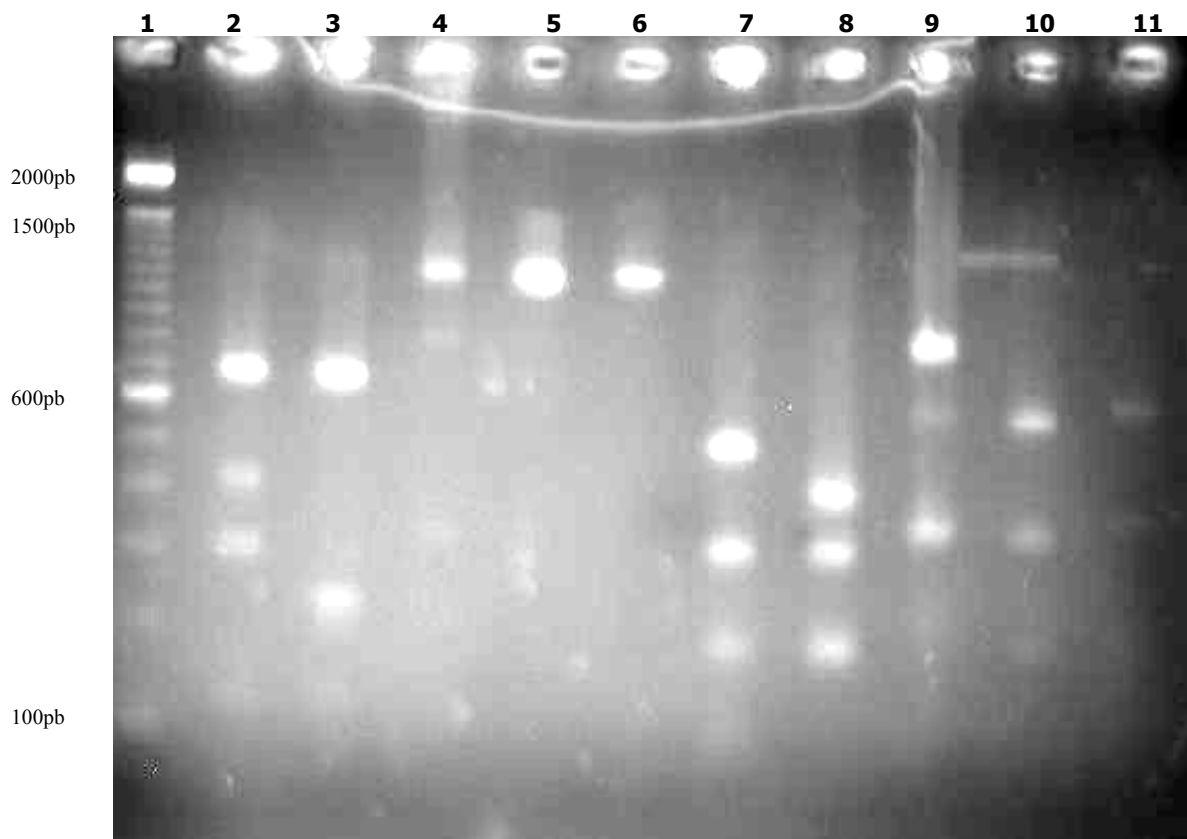


Figura 5.4.4.3. Perfil de bandas en gel de agarosa al 1.8% de los productos de PCR de las cepas de referencia al digerirse con *Sau 3A* y *BsuRI*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular λ DNA (100bp DNA Ladder, Gibco BRL)), Carril 2: *S. infantarius* con *Sau 3A*, Carril 3: *L. lactis* con *Sau 3A*, Carril 4: *W. confusa* con *Sau 3A*, Carril 5: *L.citreum* con *Sau 3A*, Carril 6: *Lb.plantarum* con *Sau 3A*, Carril 7: *S. infantarius* con *BsuRI*, Carril 8: *L. lactis* con *BsuRI*, Carril 9: *W. confusa* con *BsuRI*, Carril 10: *L.citreum* con *BsuRI*, Carril 11: *Lb.plantarum* con *BsuRI*

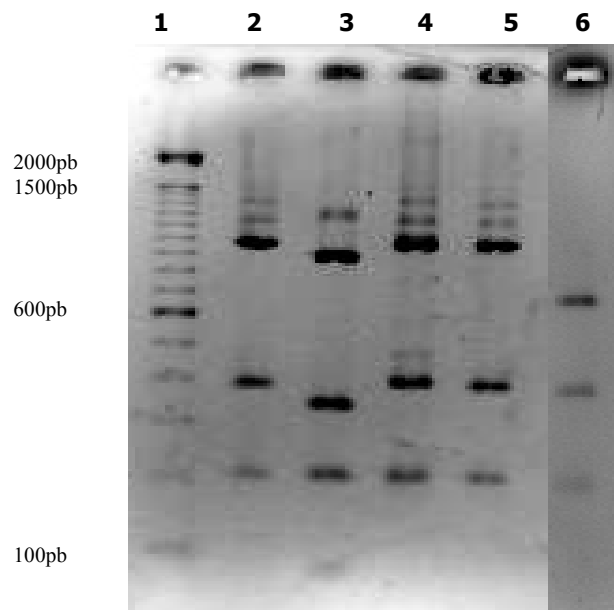


Figura 5.4.4.4 Perfil de bandas en gel de agarosa al 1.8 % del producto de PCR de las cepas de referencia al digerir con la enzima de restricción *Hinf I*. Carriles 1: Marcador de peso molecular (λ DNA, 100bp DNA Ladder, Gibco BRL), Carril 2: *L. citreum*, Carril 3: *S. infantarius*, Carril 4: *W. confusa*, Carril 5: *Lb. plantarum* Carril 6 *L. lactis*

Posteriormente se hizo el ARDRA y se obtuvo el perfil de bandas para cada una de las 114 cepas bajo estudio, usando las mismas condiciones y enzimas en las cepas de referencia (Ejemplo: Figura 5.4.4.5), siendo perfiles con un número de fragmentos visibles, cuantificables y distinguibles entre las cepa.

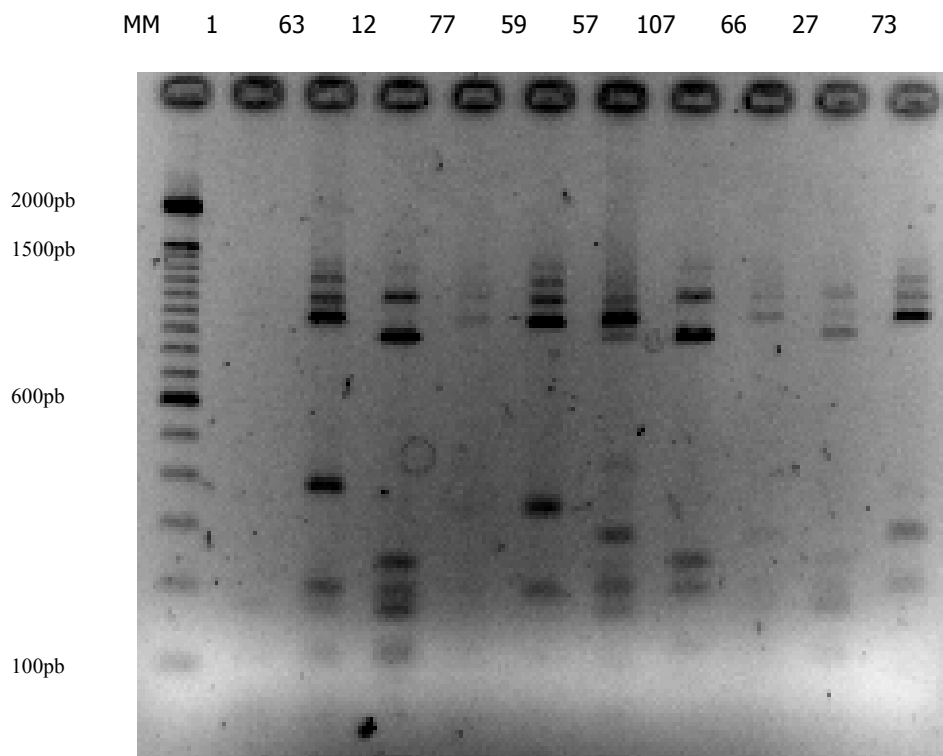


Figura 5.4.4.5 Perfil de bandas en gel de agarosa al 1.8 % de las bajo estudio al digerir con la enzima de restricción *HinfI*. MM=Marcador de peso molecular (λ DNA, 100bp DNA Ladder, Gibco BRL). Cada número es la clave de identificación la cepa.

Con esta técnica (ARDRA) se pudo obtener una alta diferenciación entre las cepas de bacterias lácticas aisladas, ya que mostraban de 3 a 7 fragmentos en su perfil de bandas.

5.4.5. Análisis del patrón de bandas.

En las figuras 5.4.5.1 y 5.4.5.2 se muestran los perfiles de restricción generados por la acción de las endonucleasas (*Hinf I* y *Bsu RI*) de las 114 cepas de bacterias lácticas aisladas del atole agrio, así como los dendrogramas obtenidos. En la figura 5.4.5.1 (*Bsu RI*) se muestra que alrededor de un 30% de las cepas se relaciona entre sí con un porcentaje de diferencia del 50%. En la Figura 5.4.5.2 (*Hinf I*) se observa que un poco más del 50% de las cepas muestra un porcentaje de diferencia menor del 50%. La diferencia topológica entre ambos dendrogramas es notoria y considerable. En el caso de *BsuRI*, se distinguen 5 grupos, mientras que con *Hinf I* se obtuvieron 3.

Al comparar los agrupamientos obtenidos con ambas enzimas, se calculó el porcentaje de cepas de cada cluster obtenido con *Bsu RI* que se encontró en cada cluster obtenido con la

enzima *Hinf I* y viceversa (Tablas 5.4.5.1). Se observa que la mayor parte (69.44%) de las cepas del grupo I de *Hinf I* esta presente en el grupo I de *Bsu RI* y viceversa (28.4%). El grupo I de *Hinf I* alberga a la mayoría de las cepas de dicho dendrograma, por lo que sus cepas se reparten no sólo en el grupo I de *Bsu RI* sino en todos los demás grupos, siendo el mayor porcentaje en todos, sobretodo en el III y en el V (86.2 y 85.71%, respectivamente). El mayor porcentaje del grupo II de *Bsu RI* (48%) se agrupó en el grupo II de *Hinf I* y el grupo III se agrupó en el III de *Hinf I* (36.36%).

Con la endonucleasa *Bsu RI* se generó un mayor número de cortes o bandas por cepa, lo cual permitió diferenciar de mejor manera las cepas que en el caso de los obtenidos con *Hinf I*.

Tabla 5.4.5.1 Porcentaje de cepas de cada uno de los principales clusters del dendrograma de la endonucleasa Hinf I presente en cada cluster del dendrograma de la endonucleasa Bsu RI y viceversa.

Porcentaje de cepas del cluster de <i>Bsu RI</i> (a) presente en <i>Hinf I</i> (b).	Porcentaje de cepas del cluster de <i>Hinf I</i> (b) presente en <i>Bsu RI</i> (a).
I de a en I de b = 28.40	I de b en I de a = 69.44
II de a en I de b = 18.18	II de b en I de a = 25
III de a en I de b = 26.13	III de b en I de a = 5.55
IV de a en I de b = 6.81	
V de a en I de b = 6.81	
I de a en II de b = 36	I de b en II de a = 51.61
II de a en II de b = 48	II de b en II de a = 38.70
III de a en II de b = 0	III de b en II de a = 9.67
IV de a en II de b = 12	
V de a en II de b = 4	
I de a en III de b = 18.18	I de b en III de a = 86.20
II de a en III de b = 27.27	II de b en III de a = 0
III de a en III de b = 36.36	III de b en III de a = 13.79
IV de a en III de b = 18.18	
V de a en III de b = 0	
	I de b en IV de a = 54.54
	II de b en IV de a = 27.27
	III de b en IV de a = 18.18
	I de b en V de a = 85.71
	II de b en V de a = 14.28
	III de b en V de a = 0

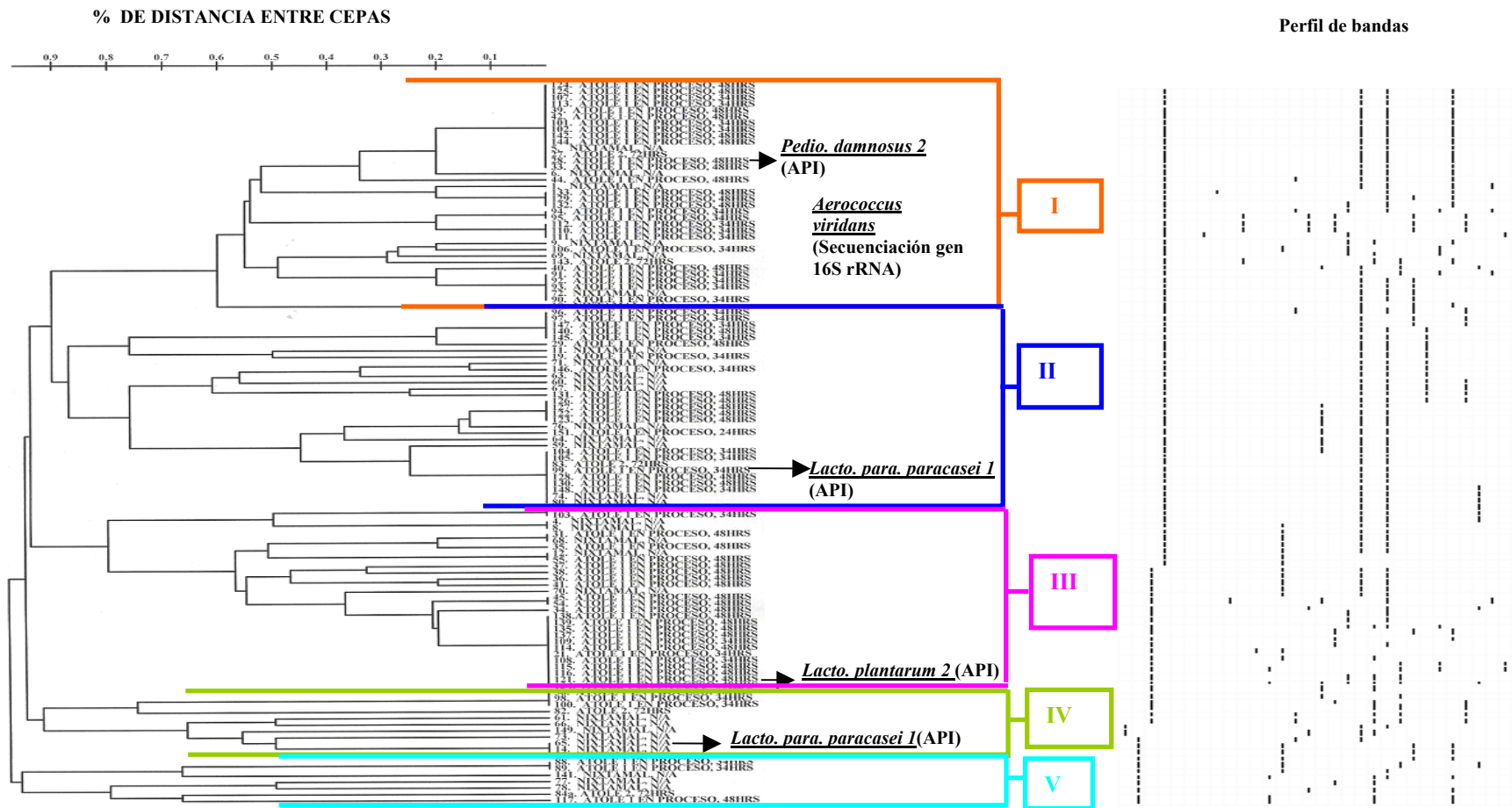


Figura 5.4.5.1. Dendrograma genotípico de la colección de cepas de bacterias lácticas del Axocotl digeridas con *BsuRI* que muestra la diferencia entre los perfiles de bandas. Programa Treecon for Windows (Van de Peer y Wachter, 1994), la distancia se estimó empleando el modelo matemático de Nei y Li (1979). Se utilizó el método UPGMA para el agrupamiento.

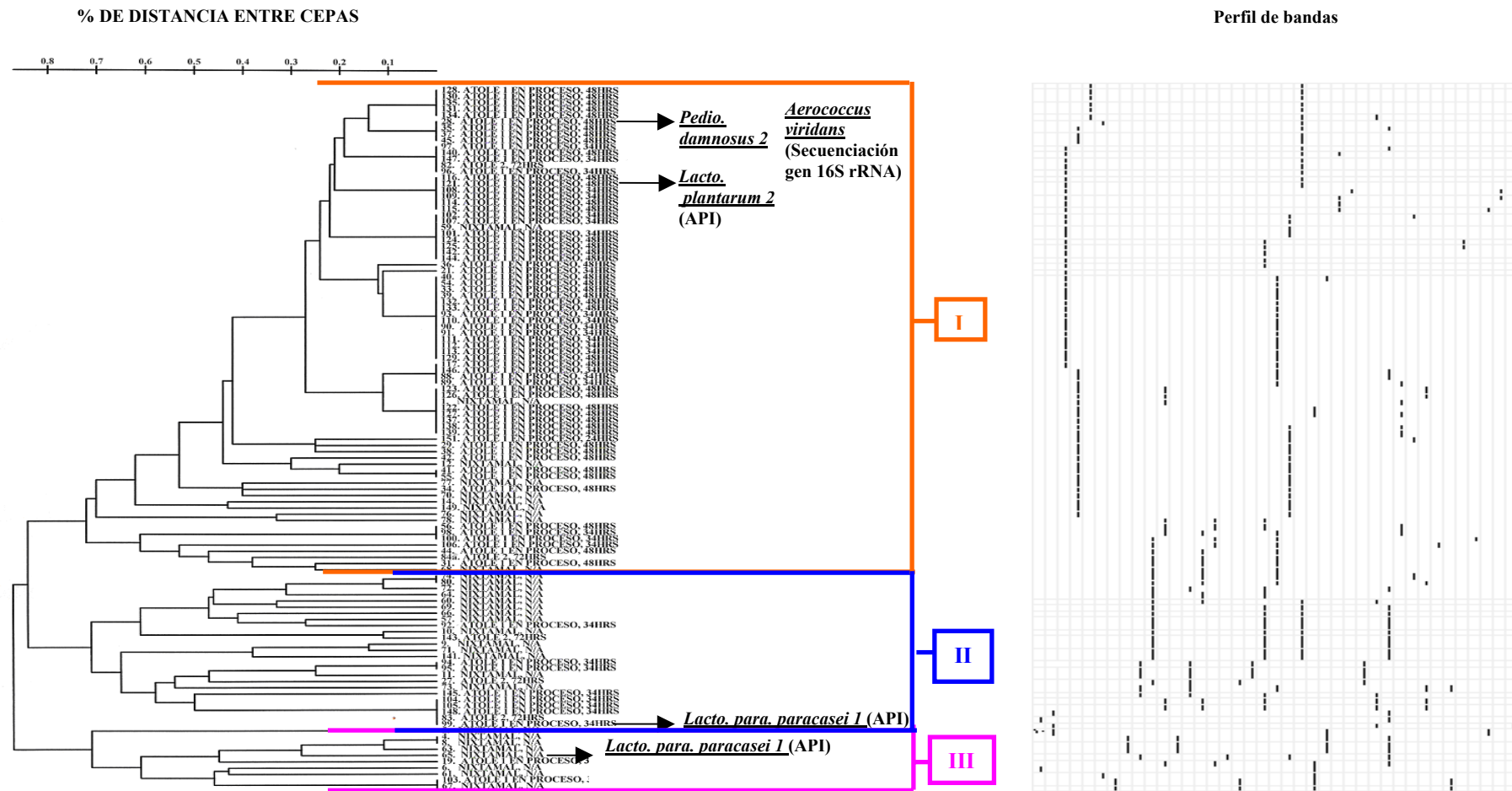


Figura 5.4.5.2. Dendrograma genotípico de la colección de cepas de bacterias lácticas del Axocotl digeridas con *Hinf I* que muestra la diferencia entre los perfiles de bandas. Programa Treecon for Windows (Van de Peer y Wachter, 1994), la distancia se estimó empleando el modelo matemático de Nei y Li (1979). Se utilizó el método UPGMA para el agrupamiento.

5.5. Identificación de cepas

5.5.1 Sistema API 50CH para la identificación de bacterias lácticas.

Los perfiles de fermentación de las 4 cepas seleccionadas (65, 99, 28 y 121) se muestran en la figura 5.5.1.1 y tabla 5.5.1.1.

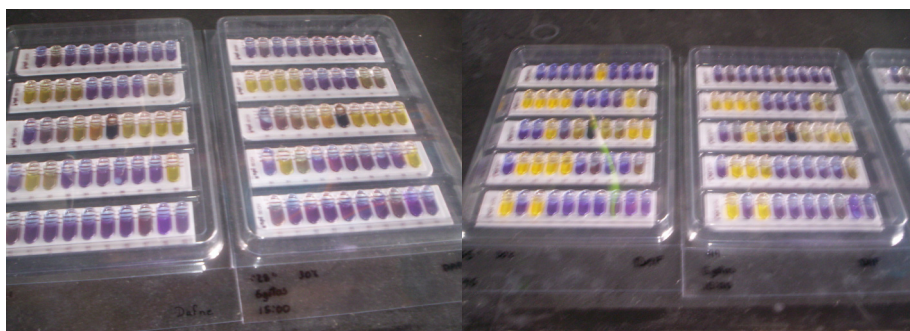


Figura 5.5.1.1. Perfil de Fermentación de carbohidratos mediante el sistema API 50CH de algunos de los microorganismos bajo estudio

Tabla 5.5.1.1. Perfil de fermentación de carbohidratos mediante el Sistema API 50CH a las 48 h de incubación.

TUBO DE ENSAYE	CEPAS			
	65	99	28	121
0	(-)	(-)	(-)	(-)
1	(-)	(+)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(-)	(-)
5	(+)	(+)	(-)	(-)
6	(-)	(-)	(-)	(-)
7	(-)	(-)	(-)	(-)
8	(-)	(-)	(-)	(-)
9	(-)	(-)	(-)	(-)
10	(+)	(+)	(+)	(+)
11	(+)	(+)	(+)	(+)
12	(+)	(+)	(+)	(+)
13	(+)	(+)	(+)	(+)
14	(-)	(-)	(-)	(-)
15	(-)	(-)	(-)	(-)
16	(-)	(-)	(-)	(-)
17	(-)	(-)	(-)	(-)
18	(+)	(+)	(-)	(+)
19	(+)	(+)	(-)	(+)
20	(-)	(-)	(-)	(-)

Continuación de la Tabla 5.5.1.1. Perfil de fermentación de carbohidratos mediante el Sistema API 50CH a las 48 h de incubación.

CEPAS				
TUBO DE ENSAYE	65	99	28	121
21	(-)	(+)	(-)	(-)
22	(+)	(+)	(-)	(-)
23	(+)	(+)	(-)	(+)
24	(+)	(+)	(+)	(+)
25	(+)	(+)	(+)	(+)
26	(+)	(+)	(+)	(+)
27	(+)	(+)	(+)	(+)
28	(+)	(+)	(+)	(+)
29	(+)	(+)	(+)	(+)
30	(-)	(-)	(-)	(-)
31	(+)	(+)	(-)	(+)
32	(+)	(+)	(-)	(-)
33	(+)	(+)	(-)	(-)
34	(+)	(-)	(-)	(-)
35	(-)	(-)	(-)	(-)
36	(+)	(-)	(-)	(-)
37	(-)	(-)	(-)	(-)
38	(-)	(-)	(-)	(-)
39	(+)	(+)	(+)	(+)
40	(+)	(+)	(-)	(-)
41	(-)	(-)	(-)	(-)
42	(+)	(+)	(-)	(-)
43	(-)	(-)	(-)	(-)
44	(-)	(-)	(-)	(-)
45	(-)	(-)	(-)	(-)
46	(-)	(-)	(-)	(-)
47	(+)	(+)	(-)	(-)
48	(-)	(-)	(-)	(-)
49	(-)	(-)	(-)	(-)

Las 4 cepas identificadas por API 50CH fermentaron la glucosa (11), fructosa (12), manosa (13) y también fermentaron disacáridos como galactosa (10), celobiosa (27), maltosa (28) y lactosa (29), que son carbohidratos sencillos para la obtención de energía para su crecimiento y como nutrientes. También fermentaron la gentiobiosa (39), la cual se constituye de unidades de glucosa; pentosas como lixosa (41) y otros glucósidos como la arbutina (24), esculina citrato férrica (25), salicina (26). Las 4 cepas coincidieron en que el único polialcohol asimilado por las 4 fue el arabitól en sus 2 configuraciones D (45) y L (46). La mayoría de los restantes polialcoholes no fueron asimilados.

En la tabla 5.5.1.2 se muestran los resultados obtenidos al introducir los datos de fermentación de carbohidratos en el programa APILAB (Bio-Mérieux).

Tabla 5.5.1.2 Microorganismos identificados mediante el programa APILAB (Bio-Mérieux)

CEPA	PERFIL DE IDENTIFICACIÓN	MICROORGANISMO	% IDENTIFICACIÓN	T
65	DUDOSO	<i>Lacto. para. paracasei 1</i>	99.4	0.65
99	EXCELENTE	Lacto. para. paracasei 1	99.9	0.78
28	ACEPTABLE	<i>Pedio. damnosus 2</i>	84.7	0.68
121	DUDOSO	<i>Lacto. plantarum 2</i>	94.9	0.57

Los microorganismos identificados han sido reportados como microbiota común del maíz (Busse, 1996; Chenoll, 2003), del maíz nixtamalizado (Ampe, 1999; Díaz 2003) y de hierbas (Chenoll, 2003; Duerden 2001), por lo que se asume que la materia prima empleada constituye la fuente de inóculo de las cepas aisladas del Axocotl.

5.5.2 Identificación mediante la comparación de secuencias del gen rRNA 16S

Debido a que la cepa 28 representa el grupo de bacterias que predominó durante la fermentación, se procedió a utilizarla para su identificación mediante la secuenciación de la región hipervariable V1 del gen rRNA 16S. Como resultado de la comparación de la secuencia de la cepa con las de la base de datos del programa BLAST, el pariente más cercano fue *Aerococcus viridans*, con un 99% de similitud. Dicho microorganismo se encuentra en hierbas y en aguas (Orvin, et.al. 1967; Hammand y Dirar, 1982); se caracteriza por su morfología cocoide, gram positivo, catalasa negativo, oxidasa negativo, fermenta azúcares, no móvil y con una fuerte tendencia a formar tétradas (Rodas, et.al., 2003). Con base en las fuentes de origen reportadas en la literatura se considera que la presencia de *Aerococcus viridans* en el Axocotl tiene como fuente de procedencia la hierba dulce o el agua.

Esta bacteria al igual que *S. infantarius* aislada del pozol ha sido reportada como patógena (Biarç, et.al. 2004), por lo que se recomienda determinar si las cepas aisladas de estos alimentos poseen factores de virulencia.

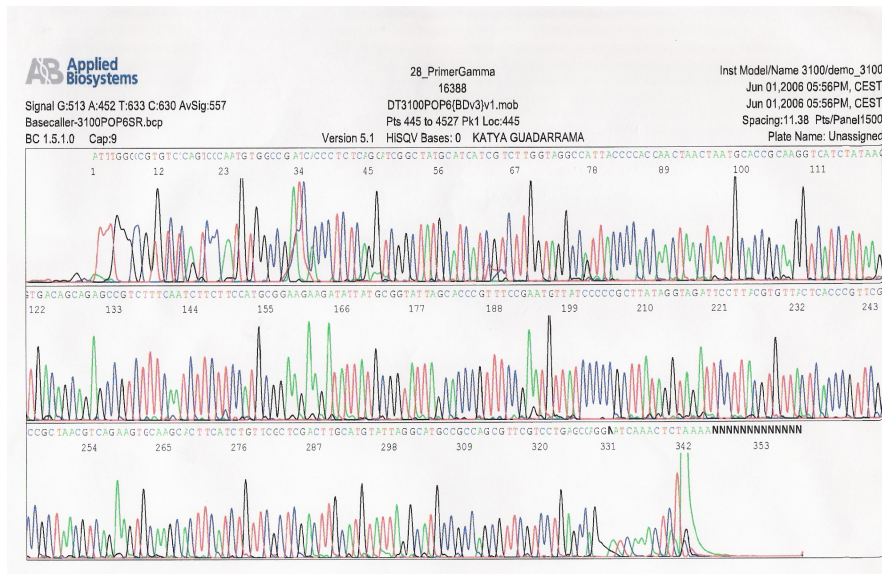


Figura 5.5.2.1 Gráfico de secuenciación del gen 16S rRNA de la cepa 28 (bacteria láctica)

En la figura 5.4.5.1, para *Bsu RI* se obtuvieron 5 grupos, que tienen de un 5% a un 10% de similitud entre sí, mientras que con *Hinf I* se agruparon en 3 grupos teniendo habiendo de 15 a 30% de similitud entre ellos. En el caso de *Bsu RI*, en los grupos IV y V predominan las cepas aisladas del nixtamal y en los demás se encuentran cepas aisladas del proceso y algunas del nixtamal. Esto indica que de todas las cepas aisladas del nixtamal, solamente algunas (las que se agrupan con las cepas aisladas del proceso) predominan durante el proceso. De acuerdo con estos resultados, en el nixtamal tienden a predominar *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus plantarum* y durante el proceso predominan un tipo diferente de *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus damnosus* (o *Aerococcus viridans*). Seguramente estos microorganismos cuentan con ventajas ecológicas para desarrollarse en el sustrato.

En el caso de *BsuRI*, el grupo V, no identificado por el sistema API, es posible que pertenezca a *Lactobacillus plantarum*, ya que el 85.71% de las cepas que forman parte de dicho grupo provienen del grupo I del dendrograma de *Hinf I*, en el cual se identificaron cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus damnosus*, relacionando dicha identificación y considerando que este grupo en el dendrograma de *Bsu RI* tiene menos del 5% de similitud con el grupo I y más del 10% con el grupo III de *Hinf I*, se identifica al grupo V como cepas de *Lactobacillus plantarum*.

Para el dendrograma de *Hinf I* la mayoría de las cepas aisladas del nixtamal se encuentran en los grupos II y III y en el grupo I se encuentran la mayoría de las cepas aisladas durante el proceso. El grupo I corresponde a *Pediococcus damnosus* (o *Aerococcus viridans*), aunque la cepa, identificada como *Lactobacillus plantarum* según las pruebas API, se agrupa también en este grupo.

Nuevamente se encuentra que en un alimento elaborado a base de nixtamal, tiende a predominar *Pediococcus damnosus* (*Aerococcus viridans*), que no es un microorganismo que se haya reportado como predominante en fermentaciones de maíz. Durante la fermentación del nixtamal para la obtención del pozol predomina *Streptococcus bovis* (*infantarius*), en tanto que *L. plantarum* se ha reportado como predominante en fermentaciones (africanas) de maíz no nixtamalizado y también se han detectado bacterias de los géneros *Pediococcus* y *Aerococcus* (Ampe, et. al. 1999; Bolaños, 2004; Díaz, et. al. 2003).

Del atole M3 no se aisló ninguna cepa, del atole M2 se aislaron 6 cepas, de las cuales 5 se agruparon en el grupo II y III del dendrograma de *Hinf I* y una en el grupo I. Para el dendrograma de *Bsu RI*, 2 se agruparon en el grupo I y una en cada uno de los otros grupos. Al comparar los 2 dendrogramas, se supone que dichas cepas vienen del nixtamal, ya que se agruparon donde predominaban las del nixtamal. El hecho de que se agrupen con las cepas aisladas del atole 1 indica que en esa fermentación participaron el mismo tipo de bacterias.

Aunque el nixtamal es el sustrato para la fermentación del pozol y axocotl, el primero se fermenta en forma sólida, mientras que en el caso del axocotl se prepara un atole con el nixtamal y es lo que se deja fermentar. La fermentación del pozol ocurre a temperatura ambiente (entre 30 y 37°C), mientras que durante las primeras horas de la fermentación del axocotl la temperatura es elevada (inicia a 97°C y a las 3 h disminuye a 45°C). Por lo que se esperaba que estas bacterias fueran termodúricas, capaces de resistir las temperaturas elevadas del inicio del proceso, pero capaces de desarrollarse a temperatura ambiente (que se alcanza a las 24 h de proceso). Es posible también que las condiciones de la fermentación del axocotl sean más anaeróbicas que las del pozol. Será importante determinar si existen diferencias fisiológicas entre las cepas aisladas en cada uno de estos alimentos.

Resulta evidente que el ARDRA reveló una marcada heterogeneidad genética entre las cepas aisladas del axokotl, entendiéndose en este caso como heterogeneidad genética las variaciones que existen entre la secuencia de nucleótidos del gen. La técnica fue de utilidad para agrupar los aislados, lo cual permitió por una parte simplificar la identificación (se identificó una bacteria de cada grupo), y por otra contar con datos sobre las bacterias que se encontraban a diferentes tiempos de la fermentación

6. CONCLUSIONES

Este trabajo constituye una primera aproximación de un estudio sobre las bacterias lácticas presentes en el axocotl, atole agrio de la Sierra Norte de Puebla.

1. La fermentación del axocotl se desarrolla:

- A temperaturas altas (43°C a 97°C) durante las primeras dos horas y disminuye gradualmente hasta alcanzar los 28°C a las 72 h de fermentación.
- El valor inicial de pH es alto (9.6) y desciende hasta 4.3 después de 72 h si la fermentación se lleva a cabo en un recipiente cerrado.
- Para que ocurra la acidificación del atole, el recipiente debe mantenerse cerrado. Esto indica que las condiciones deben ser anaerobias o microaerófilas.
- Si el atole se acidifica (fermentaciones M2 y M3), a las 72 h no se detectan ya las bacterias mesófilas no lácticas; sin embargo en las mismas condiciones de pH (4.3) se encontraron enterobacterias ($2.6 \log_{10}$ ufc/ml), lo cual sugiere que son resistentes a la acidez.

2. Se caracterizaron las bacterias lácticas aisladas de la bebida usando un enfoque polifásico:

- Las mejores condiciones para la reacción de restricción usada en el método ARDRA para tipificar las 114 cepas aisladas del axocotl fueron, para el gen completo 16S rRNA (que se amplificó usando los primers pA y pH): Temperatura de incubación de 37°C durante 5h, con 5U de enzima y 15 µl de producto de PCR.
- Con la endonucleasa *Bsu RI* se generó un mayor número de cortes o bandas, una mejor distribución de los fragmentos y con mayor nitidez en comparación con Hinf I, lo que permitió una mejor agrupación de las cepas y la obtención de un dendrograma con grupos o clusters mejor definidos.
- Las bacterias lácticas aisladas se clasificaron en 5 grupos, de acuerdo con los patrones obtenidos al usar la enzima *Bsu RI*. En los grupos IV y V se encontraron la mayoría de las cepas aisladas de la materia prima (nixtamal), mientras que en los demás se agruparon las cepas aisladas durante el proceso, junto con algunas aisladas del nixtamal. Esto indica que durante la fermentación se seleccionan algunas de las cepas presentes en la materia prima.

-
- Con la enzima *Hinf I* no se obtuvieron patrones de restricción claros. Las bacterias se clasificaron en 3 grupos, diferentes de los obtenidos con *Bsu RI*; sin embargo las bacterias del nixtamal se agruparon en los grupos II y III y las del proceso de fermentación del atole 1 en el grupo I, corroborando la conclusión anterior.
 - Las bacterias aisladas de las fermentaciones M2 y M3 se agruparon con las de la fermentación 1, indicando que son del mismo tipo.

3. Identificación de cepas seleccionadas:

- De acuerdo con la identificación bioquímica (sistema API), las cepas se identificaron como *Lactobacillus paracasei*, que se encontró en el nixtamal y durante el proceso de fermentación, *Lactobacillus plantarum*, que se encontró en el nixtamal y *Pediococcus damnosus*, que predomina durante la fermentación.
- Mediante la comparación de la secuencia parcial del gen rRNA 16S de la cepa identificada como *Pediococcus damnosus*, éste se identificó como *Aerococcus viridans*, que ha sido detectada en otra fermentación de nixtamal (pozol).
- Estos resultados concuerdan con la idea de que en el maíz nixtamalizado predominan bacterias lácticas diferentes de las que se han reportado para alimentos fermentados de maíz no nixtamalizado.
- Los patrones de fermentación de carbohidratos obtenidos para las 4 cepas identificadas por el sistema API 50CH, reflejan su adaptación al hábitat en el que se desarrollan, ya que todas fermentaron glucosa, fructosa, maltosa, celobiosa, carbohidratos presentes en el nixtamal.

Las bacterias lácticas aisladas del atole agrio muestran semejanzas con las aisladas de alimentos fermentados a partir de nixtamal (el pozol); sin embargo su diversidad es menor, posiblemente debido a las condiciones más extremas durante la fermentación (temperatura alta y pH alto).

7. ANEXOS

7.1 MEDIOS DE CULTIVO

7.1.1 AGAR MRS (OXOID)

Fórmula típica (g/L)

Peptona universal.....	10,0 g.
Extracto de carne.....	5,0 g.
Extracto de Levadura.....	5,0 g.
D (+) glucosa.....	20,0 g.
Di-potasio hidrógeno fosfato.....	2,0 g.
Tween 80.....	1,0 g.
Di-amonio hidrógeno citrato.....	2,0 g.
Acetato de sodio.....	5,0 g.
Sulfato de magnesio.....	0,1 g.
Sulfato de Manganeso.....	0,05 g.

pH = 6,5 ± 0,1

Suspender 62g en 1L de H₂O destilada, mezclar y calentar con agitación constante y hervir 1min para disolver completamente. Esterilizar a 121°C por 15 min.

Es para bacterias lácticas ya que es rico en carbohidratos, los cuales son su principal fuente de carbono y energía.

7.1.2 CALDO APT (DIFCO LABORATORIES)

Fórmula típica (g/L)

Extracto de levadura bacteriológica.....	7.500g
Triptona bacteriológica.....	12.500g
Dextrosa bacteriológica.....	10.000g
Citrato de Sodio.....	5.000g
Tiamina Hidroclorada.....	0.001g
Cloruro de Sodio.....	5.000g
Fosfato dipotasico.....	5.000g
Cloruro de Manganeso.....	0.140g
Sulfato de Magnesio.....	0.800g
Sulfato ferroso.....	0.040g
Complejo monooleato de sorbitan.....	0.200g

pH final de 6.7 ± 0.2 a 25°C

Suspender 46.2g del medio de cultivo para un 1L de H₂O destilada, mezclar y calentar con agitación constante y hervir 1min para disolver completamente. Esterilizar a 121°C por 15 min. Es para reactivar a las bacterias que han

estado en congelación, reactivándolas porque es un medio rico en nutrientes y con alta actividad acuosa (A_w). Es un medio para cultivar *Lactobacillus viridescens*, usado en ensayos de tiamina; para cultivar heterofermentativas lactobacilos y otros microorganismos que requieren alto contenido de tiamina, por ser auxótrofos.

7.1.3 AGAR MRS-A (DE MAN, ROGOSA Y SHARPE) (OXOID)

Fórmula típica (g/L)

Peptona pancreática de caseína.....	10.000g
Extracto de carne.....	5.000g
Extracto de Levadura.....	5.000g
Almidón.....	20.000g
Citrato diamoniacal.....	2.170g
Acetato de sodio.....	5.000g
Fosfato dipotasico.....	2.620g
Agar bacteriologico.....	15.000g
Sulfato de magnesio 5H ₂ O.....	0.207g
Sulfato de Manganeso.....	0.056g

pH = 6.8 ± 0,1

Suspender 62g en 1L de H₂O destilada, mezclar y calentar con agitación constante y hervir 1min para disolver completamente. Esterilizar a 121°C por 15 min. Es un medio de cultivo recomendado para bacterias lácticas ya que es rico en carbohidratos, los cuales son su principal fuente de alimentación y energía.

7.1.4 AGAR BILIS ROJO VIOLETA CON MUG (BECTON DICKINSON)

Formula típica (g/L)

Digestivo pancreático de gelatina.....	7.000g
Extracto de Levadura.....	3.000g
Mezcla de sales biliares.....	1.500g
Lactosa.....	2.170g
Cloruro de sodio.....	5.000g
Fosfato dipotasico.....	2.620g
Agar bacteriologico.....	15.000g
Cristal Violeta.....	0.002g
Rojo Neutro.....	0.030g
MUG.....	0.100g

pH = 7.4 ± 0,2

Suspender 41.6g en 1L de H₂O destilada, mezclar y calentar con agitación constante y hervir 1min para disolver completamente. Esterilizar a 121°C por 15 min. Se usa para aislar y diferenciar *E. coli*.

7.1.5 AGAR CUENTA EN PLACA (OXOID)

Fórmula típica (g/L)

Extracto de levadura.....2.5g

Triptona.....5.0g

Dextrosa.....1.0g

Agar.....9.0g

pH aprox.7.0

Suspender 17.5g en 1L de H₂O destilada, mezclar y calentar con agitación constante y hervir 1min para disolver completamente. Esterilizar a 121°C por 15 min. Es un medio de cultivo recomendado para el recuento de bacterias aeróbicas en aguas, aguas residuales, productos lácteos y otros alimentos. También es recomendado como medio general para determinar poblaciones microbianas.

7.1.6 AGUA PEPTONADA 0.1%

Fórmula típica (%p/p)

Nitrógeno total.....14.0g

Nitrógeno aminito.....2.6g

Cloruro Sódico.....1.6g

pH (solución al 1%).....6.3

Suspender 0.1g en 100mL de H₂O destilada, mezclar y esterilizar a 121°C por 15 min. Es un medio usado como diluyente y para enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario.

7.2 FUNDAMENTOS DE LA TINCIÓN DE GRAM

Se basa en la estructura y en la composición de la pared celular, lo que determina que algunas bacterias retengan el primer colorante (cristal violeta), en tanto que otras lo pierdan, lo que les permite reaccionar con el colorante de contraste (la safranina). Es así que el fundamento de la tinción de gram es que las gram + presentan una pared celular relativamente gruesa (25-30 nm), con un mayor contenido de peptidoglucanos (20-80 %) y con numerosos enlaces transversales entre las cadenas de N-acetil-murámico y N-acetil-glucosamida. En este grupo bacteriano, el decolorante deshidrata y reduce la permeabilidad de la pared, por lo que al ser tratados con alcohol-cetona no pierden el complejo cristal violeta-yodo. En tanto, que en las bacterias gram (-), la pared celular es más delgada (10-15 nm) y contienen pocos peptidoglucanos (5-10 %) con pocos enlaces transversales; estas bacterias además presentan una capa externa constituida por lipopolisacáridos, abriendo los poros y facilitando la salida del

complejo cristal violeta-yodo y la decoloración, por lo que las bacterias se tornan invisibles y reaccionan con la safranina.

7.3 FUNDAMENTO DE LA PRUEBA DE CATALASA

Se basa en el principio químico de la actividad de la enzima catalasa, presente sólo en algunas bacterias; dicha enzima descompone el H₂O₂ en agua y oxígeno gaseoso.

7.4 REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

LISOZIMA (20µg/µl): Disolver 0.2g de lisozima en 10ml H₂O desionizada, estéril y filtrada

PRONASA (20mG/ml):

*Tris-HCl 10mM: A un matraz aforado de 250ml adicionar 1.25ml de NaCl 2M y 0.3025g de Tris, el pH debe ser de 7.5.

*Disolver 0.2g de Pronasa en 10ml de Tris-HCl 10mM, incubar 1hr a 37°C y almacenar a -20°C

RNASA (20µg/µl): Disolver 0.2g de la enzima en 10ml H₂O desionizada, estéril y filtrada

Amortiguador TES (100ml) : Tris 0.605g, EDTA 0.5M 1ml, NaCl 0.2922g, pH=8. Aforar a 100ml

SDS (10%): Disolver 10g de SDS en 100ml H₂O desionizada, estéril y filtrada

EDTA 0.5M: Disolver 93.06g en 500ml de agua destilada, ajustando a pH=8 con NaOH

7.5 REACTIVOS PARA EL GEL DE AGAROSA

Agarosa ULTRA PURA Invitrogen™-Life Technologies

Amortiguador TBE (TRIS BORATO EDTA) 10X: Tris 34g, Ácido Bórico 27.7g, EDTA 20ml [0.5M] disolver en 500ml y llevar a un pH de 8

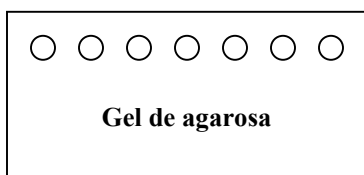
Amortiguador TBE (TRIS BORATO EDTA) 1X: Disolver 100ml de TBE 10X en 900ml de Agua Destilada.

Para hacer un gel de agarosa al 1.8%:

-Gel chico (7 pocillos): 0.54g en 30ml de Buffer TBE 1X

-Gel grande (11 pocillos): 0.81g en 45ml de Buffer TBE 1X

Se calienta por 45 segundos o hasta que burbujea la solución de agarosa.



Cada gota que se va a insertar en el pocillo del gel de agarosa debe contener:
2µl de Amortiguador TBE 1X
2µl de Amortiguador de carga
2µl de la muestra (DNA, producto de PCR o producto de ARDRA, según sea el caso)

Amortiguador de carga (1ml): 500µl Glicerol al 50%, 40µl Buffer TAE 2X, 0.0025g Azul de Bromofenol y aforar a 1ml con Agua destilada.

Glicerol al 50%: Disolver 12.5ml de glicerol al 100% en 25ml de Agua destilada.

Amortiguador TAE 50X: Tris 2M (242g), Ácido Acético 1M (57.1ml), EDTA 0.5M pH8 (100ml), H₂O destilada (1L)

Amortiguador TAE 1X: Disolver 1ml de TAE 50x en 25ml de H₂O destilada

7.6 PRIMERS

PRIMER pA: PM: 6,149g/mol, nmoles: 64.8

$64.8\text{nmol} \times 6,149\text{ng/nmol} = 398,455.2\text{ng}$ $398,455.2\text{ng}/100\mu\text{l} = 3,984.552\text{ng}/\mu\text{l}$

$C_2 = (3,984.552\text{ng}/\mu\text{l} \times 10\mu\text{l})/200\mu\text{l} = 199.227\text{ng}/\mu\text{l} \approx 200\text{ng}/\mu\text{l}$

PRIMER pH: PM: 6,177 g/mol, nmoles: 49.91

$49.91\text{nmol} \times 6,177\text{ng/nmol} = 308,294.07\text{ng}$ $308,294.07\text{ng}/100\mu\text{l} = 3,082.94\text{ng}/\mu\text{l}$

$C_2 = (3,082.94\text{ng}/\mu\text{l} \times 6.48\mu\text{l})/100\mu\text{l} = 199.77\text{ng}/\mu\text{l} \approx 200\text{ng}/\mu\text{l}$

PRIMER 3*

PRIMER γ 20pmo/µl

7.5 COMPOSICIÓN DE LA GALERÍA PARA API 50CH

La composición de la galería API 50CH puede verse a continuación en la relación de ensayos.

Tabla 7.5.1.1 Composición de la galería

TUBO	ENSAYO	COMPONENTE ACTIVO	CANTIDAD(mg/tubo)
0		TESTIGO	-
1	GLY	GLICEROL	1.64
2	ERY	ERITRITOL	1.44
3	DARA	D-ARABINOSA	1.4
4	LARA	L-ARABINOSA	1.4
5	RIB	D-RIBOSA	1.4
6	DXYL	D-XILOSA	1.4
7	LXYL	L-XILOSA	1.4
8	ADO	D-ADONITOL	1.36
9	MDX	METIL-Bd-XILOPIRANOSIDA	1.28
10	GAL	D-GALACTOSA	1.4
11	GLU	D-GLUCOSA	1.56
12	FRU	D-FRUCTUOSA	1.4
13	MNE	D-MANOSA	1.4
14	SBE	L-SORBOSA	1.4
15	RHA	L-RAMNOSA	1.36
16	DUL	DULCITOL	1.36
17	INO	INOSITOL	1.4
18	MAN	D-MANITOL	1.36
19	SOR	D-SORBITOL	1.36
20	MDM	METIL-αD-MANOPIRANOSIDA	1.28
21	MDG	METIL-αD-GLUCOPIRANOSIDA	1.28
22	NAG	N-ACETILGLUCOSAMIDA	1.28
23	AMY	AMIGDALINA	1.08
24	ARB	ARBUTINA	1.08
25	ESC	ESFULINA CITRATO FÉRRICO	1.16 0.152
26	SAL	SALICINA	1.04
27	CEL	D-CELOBIOSA	1.32
28	MAL	D-MALTOSA	1.4
29	LAC	D-LACTOSA (ORIGEN BOVINO)	1.4
30	MEL	D-MELIBIOSA	1.32
31	SAC	D-SACAROSA	1.32
32	TRE	D-TREHALOSA	1.32
33	INU	INULINA	1.28
34	MLZ	D-MELEZITOSA	1.32

Continuación de la Tabla 7.5.1.1 Composición de la galería

35	RAF	D-RAFINOSA	1.56
36	AMD	ALMIDON	1.28
37	GLYG	GLICOGENO	1.28
38	XLT	XLITOL	1.4
39	GEN	GENTIOBIOSA	0.5
40	TUR	D-TURANOSA	1.32
41	LYX	D-LIXOSA	1.4
42	TAG	D-TAGATOSA	1.4
43	DFUC	D-FUCOSA	1.28
44	LFUC	L-FUCOSA	1.28
45	DARL	D-ARABITOL	1.4
46	LARL	L-ARABITOL	1.4
47	GNT	GLUCONATO POTÁSICO	1.84
48	2KG	2-CETOGLUCONATO POTÁSICO	2.12
49	5KG	5-CETOGLUCONATO POTÁSICO	1.8

Las galerías se conservan a 2-8°C hasta la fecha límite de utilización indicada en el envase.

7.6 COMPOSICIÓN DEL MEDIO API 50CHL

Para 10ml de volumen:

POLIPEPTONA (ORIGEN BOVINO/PORCINO)	10 g
EXTRACTO DE LEVADURA	5 g
TWEEN 80	1 ml
FOSFATO DIPOTÁSICO	2 g
ACETATO SÓDICO	5 g
CITRATO DIAMÓNICO	2 g
SULFATO DE MAGNESIO	0.2 g
SULFATO DE MANGANESO	0.05 g
PÚRPURA DE BROMOCRESOL	0.17 g
AGUA DESMINERALIZADA	1000 ml
pH 6.7-7.1	

8. BIBLIOGRAFIA

- 1.** Ampe, F., Omar, N. B., Moizan, C., Wachter, C. y Guyot, J.P. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(12): 5464-5473
- 2.** Aznar, R., Chenoll E., y MacIán M.C. (2003). Identification of *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* by rADN-based techniques. *System Appl. Microbiol*, 26(1):546-556.
- 3.** Biarc, J., Nguyen, S.I., Pini, A., Gossé, F., Richert, S., Thiersé, D., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Raul, F., Klein, J.P., y Schöller-Guinard, M. (2004). Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S.bovis*). *Carcinogenesis*, 25(8) pp. 1477-1484
- 4.** Bloch, K.D. y Grossmann B. (1995). Current Protocol Restriction. *Current Protocols in Molecular Biology* 3.1.1-31.21
- 5.** Bolaños, S. (2004). Variabilidad en la microbiota de diferentes muestras de pozol, determinada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM, México, pág. 95
- 6.** Bonfil, G. (1982). El maíz, fundamento de la cultura popular mexicana. Museo Nac. de Culturas Populares. Folleto. SEP, México.
- 7.** Brizuela, M.A., Serrano, P. y Pérez, Y. (1998). Evaluación preliminar de cepas de bacterias ácido lácticas para su uso en la obtención de "probióticos". *Lab. Acta.*10(2): 55-58.
- 8.** Brock, T.D. et.al. (1993). *Microbiología*. Prentice Hall Hispnoamericana S.A., 6ª edición, pag. 956
- 9.** Bruno, V. (2004). Bioquímica de la acidificación por las bacterias ácido lácticas (LAB) 3era parte. FEPALE. Producción, Aplicación y Acción de los Cultivos Lácticos, Número 34.
- 10.** Busse, H., Denner, E.B.M., Lubitz, W. (1996). Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology* 47, 3-38.
- 11.** Canal, S. (1999). Aislamiento y caracterización de elementos extra-cromosomales en "starters" de bacterias lácticas utilizados comercialmente. *ACE Revista de Enología, Ciencia y Tecnología*, pp. 43-48

-
- 12.** Capuchino, J.G. (1983). Microbiology a laboratory manual. Addison-Wesley Publishing Company, New York, pp. 87-96
 - 13.** Cabrera L. y Herraez A., (2001). Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Madrid, Harcourt. Ed. Harcourt, D.L. Madrid, páginas 162,289.
 - 14.** Chenoll, E., (2003). Identification of *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* by rDNA-based Techniques. System. Appl. Microbiol. 26: 546-556
 - 15.** Curtis H. y Barnes S., (2001). Biología. Editorial Médica Panamericana, México, 6ta. edición, pág. 1496
 - 16.** Czerniczyniec, A. y Fiorenzo, C. (2003). Bacterias Lácticas. Metabolismo y aplicación a la Industria Láctea. Revista mexicana de ingeniería química VOL. 2, 57-62
 - 17.** Daeschel M.A., Andersson, R. E. y Fleming, H. P. (1987). Microbial ecology of fermenting plants materials. FEMS Microbiology Reviews 46, 357-367.
 - 18.** Díaz, G. y Wachter, C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. Revista Latinoamericana de Microbiología. 45:1-2, pp. 30-40
 - 19.** Díaz, G., Guyot, J.P., Ruiz-Teran F., Morlon-Guyot, J. y Wachter, C. (2003). Microbial and Physiological Characterization of weakly amilolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a mexican fermented maiz beverage. Appl. Environ. Microbiol., 69:8, pp. 4367-4374
 - 20.** Duerden B.I., Hall V. y Lewis-Evans T. (2001). Identification of *Actinomyces*, *Propionibacteria*, *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* by amplified 16S rADN restriction analysis, *Anaerobe*, 7(1): 55-57
 - 21.** Dvorska, L., Bull, T.J., Bartos, M., Matlova, L., Svastova, P., Weston, R.T., Kintr, J., Parmova, I., Van Soolingen, D. y Pavlik, I. (2003). A standardized restriction fragment length polymorphism (RFLP)method for typing *Mycobacterium avium* isolates links IS901 with virulence for birds. Journal of Microbiological Methods. 55: 11 – 27
 - 22.** EUFIC. Food Today. (2000). Las Bacterias Ácido-Lácticas y su Uso en la Alimentación N° 18, pp. 18
 - 23.** Flores, Teresa, M., (1996). Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México, páginas15-23.
 - 24.** Fraizer, W. C (1978). Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia, S.A. 3era edición. España, Zaragoza, pp. 512 y 643

-
- 25.** Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378
 - 26.** Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, Condon, S., y Swings, J., (2002). Source of Enterococci in a Farmhouse Raw-Milk Cheese. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 68:7, 3560-3565.
 - 27.** Gordillo, M.E., et.al. (1993). Typing pf group *B. streptococci*: comparison of pulsed field gel electrophoresis and conventional electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1430-1434.
 - 28.** Hames, W.P. y Vogel,R.F. (1995). The genus *Lactobacillus*. En: The genera of lactic acid bacteria. The lactic acid bacteria. Wood, B.J.B. y Holzapfel. Vol.2. Blackie Academic and Professional, Glasgow, Scotland, pp 19-54.
 - 29.** Hamilton-Miller, J., Shah S. y Winkler J. T. , (1999). Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health Nutrition*, 2,223-229
 - 30.** Hammand, Z.H. y Dirar, H.A. (1982). Microbiological examination of sebeel water. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (6):1238-1243
 - 31.** Harrigan W.F. y McCance M. (1998). *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Academy Press, Londres, pp. 312-316
 - 32.** Herrera, T. (1993). Semblanza del estudio de las bebidas y de los alimentos fermentados mexicanos. En *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. Wachter, Carmen y Lappe, Patricia. UNAM, C.U. México, D.F.
 - 33.** Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. y Schillinger, U. (2001), Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 365S-373S
 - 34.** Jichan, J., Bongjoon, K., Jongho, L., Jeongho K., Gajin J. y Hongui, H. (2002). Identification of *Weissella* species by the genus-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Letters* 212, 29-34.
 - 35.** Jichan J., Bongjoon K., Jongho L. y Hongui H. (2003). A rapid method for identification of typical *Leuconostoc* species by 16S rDNA PCR-RFLP analysis. *Journal of Microbiological Methods* 55, 295– 302
 - 36.** Jones, N., Ougham, H. y Thomas H. (1997). Markers and mapping: we are all genetics now. *New Phytol*, 137, 165-177.
 - 37.** Klaenhammer, T. E. Altermann, F. Arigoni, A. Bolotin, F. Breidt, J. Broadbent, R. Cano, S. Chaillou, J. Deutscher, M. Gasson, M. van de Guchte, J. Guzzo, A. Hartke, T. Hawkins, P.

Hols, R. Hutkins, M. Kleerebezem, J. Kok, O. Kuipers, M. Lubbers, E. Maguin, L. McKay, D. Mills, A. Nauta, R. Overbeek, H. Pel, D. Pridmore, M. Saier, D. van Sinderen, A. Sorokin, J. Steele, D. O'Sullivan, W. de Vos, B. Weimer, M. Zagorec, y R. Siezen, (2002). Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek. International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82,29-58.

38. Lawson, P.A., Llop-Perez, M., Hutson, R.A., Hippe, H. y Collins, M.D. (1989). Towards a phylogeny of the clostridia based on 16S rRNA sequences. *FEMS. Microbiology Letters*. 113(1): 87-92.

39. Le Bourgeois, P. M. Mata y P. Ritzenthaler (1989). Genome comparison of *Lactococcus* strain by pulsed field gel electrophoresis *FEMS Microbiology Letters*, 59,65-70

40. Lewin, B. (2001). *Genes VII*. Marban. España, Madrid, pp. 140

41. Madigan, M.T, J.M. Martinko y T.D. Brock, (2006). *Microbial Evolution and Systematics*. Brock Biology of Microorganisms, 11a ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J, pp.432-442.

42. Manual API 50 CH BioMériux. BioMériux, S.A. Ref 50 300. 07945F-XL-2002/11. Francia

43. Manual API 50 CHL Médium BioMériux. BioMériux, S.A. Ref 50 410. 07486E-ES-2002/11. Francia

44. Maslow, J.N., Mulligan, M.E y Arbeit, R.D. (1993). Molecular epidemiology application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect. Dis.* 17, 153-164.

45. McCartney,A.L. (2002). Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88 (Suppl. 1) 529-537.

46. Mac Faddin, J. F., (1980). *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, pp. 45-190

47. Mönckeberg, F. (1988). *Producción microbiana industrial. Fermentación. La Revolución de la Bioingeniería*. Editorial Mediterráneo.

48. Moschetti, G., et.al. (1998). Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal Applied Microbiology*, 85, 25-36.

49. Nazaret, S., Ranjard, L., Poly, F. (2000). Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res. Microbiol.* 151(1): 167–177.

50. Nei, M. y Li, W. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (10), 5269-5273.

-
- 51.** Orvin, M.J., Graham, W.F. y McCarty I.E. (1967). Spherical Lactic Acid-producing bacteria of Southern-grown raw and processed vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 15(6):1303-1308
- 52.** Owen, R.J. (1989). Chromosomal DNA fingerprinting – a new method of species and strain identification applicable to microbial pathogens. *J. Med. Microbiol.* Vol. 30, 89-99
- 53.** Owens, J. D. (1993). Alimentos fermentados tradicionales: generalidades y perspectivas. En *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. Wachter, Ma. Del Carmen y Lappe, Patricia. UNAM, C.U. México, D.F., pp. 17-19
- 54.** Pardo, I. (2003). Metabolismo de sustratos del mosto y vino por bacterias lácticas y sus implicaciones en la calidad del vino. *ACE. Revista de Enología, Ciencia y Tecnología*.
- 55.** Riley, L. (2004). *Molecular epidemiology of infectious diseases. Principles and practices*. Edit. Asm. Press, Washington D.C., pp. 30-83.
- 56.** Ribéreau-Gayon P., Dubordieu D., Donèche, B. y Lonvaud, A. (2000). *The microbiology of wine and vinifications. Handbook of Enology. Vol. 1: John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England.*
- 57.** Romero, T. (2000). Tipificación de las cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas del pozol por medio del análisis de perfiles de restricción. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México., pp. 3-6, 9,15-17, 33,36
- 58.** Rodas, A.M., Ferrer, S. y Pardo I. (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of Lactic Acid Bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and applied microbiology*, 26 (3): 412- 422
- 59.** Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, New York, 2a edición, pág. 3.
- 60.** Satokary, R.M. (2003). Molecular Approaches for the detection and identification of Bifidobacteria and Lactobacilli in human gastrointestinal tract. *System. Appl. Microbiol.*, 26,572-584.
- 61.** Schneegurt, M. A., Kulpa Jr. Y Charles F. (1998). The application of molecular techniques in environmental biotechnology for monitoring microbial systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 27, 73-79
- 62.** Steinkraus, K. H. (1993a). *Microbios, alimentos y el hombre. Alimentos Fermentados Indígenas de México*. Wachter, Ma. Del Carmen y Lappe, Patricia. UNAM, C.U. México, D.F. páginas 1-4

-
- 63.** Steinkraus, K. H. (1993b). Alimentos fermentados del mundo. Alimentos Fermentados Indígenas de México. Wachter, Ma. Del Carmen y Lappe, Patricia. UNAM, C.U. México, D.F. páginas 5-15
- 64.** Steinkraus, K. H. (1995) Handbook of Indigenous Fermented Foods. CRC Press. 2ª ed., pp 211-265
- 65.** Stiles, M.E. y Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36 (1): 1-29
- 66.** Temmerman, R., Huys, G. y Swings, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science and Technology*, 15,348-359.
- 67.** Tenover, F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E. y Persing D.H. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233-2239.
- 68.** Thomas, T.D., Ellwood D.C y Longyear V.M. (1979). Change from homo to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. *Journal Bacteriology*. 138,109-117.
- 69.** Thompson, J. y Gentry-Weeks C.R. (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. En : *Bactéries Lactiques*. Editorial Roissart H. Luquet F.M., Lorica, Francia, Vol I, 239-290.
- 70.** Ulloa M. y Herrera T., (1976-1982.) Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche y tepache. *Anales del Instituto de Biología, UNAM*, 47-53. Serie botánica, 145-163.
- 71.** Ulloa M. Herrera, T. y P. Lappe (1987). Fermentaciones tradicionales indígenas d México. *Serie de Investigaciones Sociales*, No. 16. Instituto Nacional Indigenista, México, pág. 13-20.
- 72.** Ulloa, M. y Lappe, P. (1989). Estudios étnicos, microbianos y químicos del tesgüino tarahumara. *Publicación especial. Instituto de Biología. UNAM*, pág. 9.
- 73.** Ulrike Lyhs et.al., (2001). *Lactobacillus alimentarius*: a specific spoilage organism in marinated herring *International Journal of Food Microbiology* 64, 355–360.
- 74.** Valderrama, P. y Ramírez, C. (1993). Alimentos de maíz y fermentados en Cuetzalan, Puebla. pp. 63-67. *Alimentos fermentados indígenas de México*. Wachter, M. del C. y Lappe, P. UNAM, C.U. México, D.F.

-
- 75.** Vandamme, P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. y Swings J., (1996). Polyphasic taxonomy a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*. Vol. 60, pág. 407
- 76.** Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., Vos, P., Claeys, G. y Verschraegen, G. (1995). Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J. Clin. Microbiol.* 33, 11– 15.
- 77.** Van de Peer, Y. y De Wachter, R. (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 10, 569-570.
- 78.** Van Belkum A., Struelens M., De Visser A., Verbrugh H. y Tibayrenc M. (2001). Rol of Genomic Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics and Microbial Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3):547-560.
- 79.** Villegas J. (1995). Estrategias para la obtención de una cepa hiperproductora de exopolisacáridos en bacterias lácticas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. pág. 50
- 80.** Viniegra, G. (1993). Oportunidades para las fermentaciones indígenas de maíz. *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. Wachter, Ma. Del Carmen y Lappe, Patricia. UNAM, C.U. México, D.F., páginas 29-33
- 81.** Vos, P. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. Vol. 23, No. 21, 4407-4414