



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE
BACTERIAS LÁCTICAS DEL PULQUE CON
CAPACIDAD PROBIÓTICA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

ITZIA CAMPOS QUINTANA



MÉXICO, D.F.

2010



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:

Profesora: Olga del Carmen Velázquez Madrazo.

Vocal:

Profesora: María del Pilar Granada Macías.

Secretario:

Profesor: José Adelfo Escalante Lozada.

1er suplente:

Profesor: Alejandro Camacho Cruz

2º suplente:

Profesora: Gloria Díaz Ruiz

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Cepario del Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos.

ASESOR DEL TEMA

SUPERVISOR TÉCNICO

Dr. José Adelfo Escalante Lozada.

QFB. Martha Giles-Gómez.

SUSTENTANTE

Itzia Campos Quintana

El presente trabajo contó con el apoyo económico de los proyectos:

PAPIIT IN224110-2, PAPIME PE203410 Y PAPIME PE20560

AGRADECIMIENTOS

A mi *alma mater*, la UNAM, quien me acogió durante 8 años de mi vida y ha sido gran pilar de mi crecimiento humano, cultural y profesional.

A la profesora Martha Giles-Gómez y al Dr. Adelfo Escalante Lozada, quienes depositaron en mí su confianza, paciencia y conocimientos para llevar a cabo este proyecto, del cuál obtuve grandes enseñanzas y maravillosas experiencias.

A la maestra Olga del Carmen Velázquez y Ma. Del Pilar Granada quienes dedicaron de su tiempo para llevar a cabo la revisión de este trabajo.

Al profesor Alejandro Camacho, la profesora Antonieta Silva y Laura Ramírez, por estar siempre en la mejor disposición para orientarme.

A mi compañera, amiga y “equipa” Ireri, quien químicamente hablando, ha sido mi resonancia en todo momento.

A mis amigos de carrera con quien compartí cansancio, desvelos, sonrisas, fiestas y porque no, una que otra tarea: Bety, Mariel Calderón, Ania, Alexis, Cinthia, Zaine, Dennis, Diana y Mariel Soto.

DEDICATORIAS

Agradezco infinitamente a mi familia por estar a mi lado y dejarme compartir con ellos este acelerado y dinámico mundo de la química.

Dedico este trabajo a:

Mi mamá, Ma. Asunción Quintana:

Por tener siempre un abrazo lleno de ternura y cariño, por compartir su experiencia y brindarme sus consejos para no caer en el camino, así como para tomar las decisiones acertadamente.

Mi papá, Alfonso E. Campos:

Por ser mi primer acercamiento al interesante universo de la ciencia, por depositar su confianza en mí y ser un ejemplo de dedicación.

Mi hermana Liz:

Por mostrarme su dualidad de hermana y amiga, por ser un ejemplo de profesionalista y fortaleza.

Mi hermana Gari:

Quien con esa alegría y “chispa” que la caracterizan hizo los momentos difíciles amenos.

ÍNDICE

A.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
B.	ÍNDICE DE TABLAS.....	10
1.	RESUMEN.....	11
2.	INTRODUCCIÓN.....	13
3.	GENERALIDADES.....	16
3.1	PULQUE.....	16
3.1.1	MICROBIOLOGÍA.....	18
3.2	PROBIÓTICOS.....	19
3.2.1	DEFINICIÓN DE PROBIÓTICOS.....	19
3.2.2	CARÁCTERÍSTICAS DE LOS PROBIÓTICOS.....	20
3.2.3	ANTIMICROBIANOS GENERADOS POR PROBIÓTICOS.....	25
3.3	MICROORGANISMOS CONSIDERADOS COMO PROBIÓTICOS..	29
4.	JUSTIFICACIÓN.....	33
5.	HIPÓTESIS.....	33
6.	OBJETIVOS.....	34
6.1	OBJETIVO GENERAL.....	34
6.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
7.	MATERIAL Y METODOLOGÍA.....	35
7.1	FERMENTACIÓN	35
7.2	MEDICIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS.....	35
7.3	CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	36

7.4	PURIFICACIÓN DE AISLADOS, TINCIÓN DE GRAM Y PRUEBA DE LA CATALASA.....	37
7.5	AISLAMIENTO DE UNA CEPA PROBIÓTICA COMERCIAL.....	38
7.6	CONSERVACIÓN DE CEPAS.....	38
7.6.1	CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO.....	38
7.6.2	CONSERVACIÓN A MEDIANO PLAZO.....	39
7.6.3	ACTIVACIÓN.....	39
7.7	EVALUACIÓN DE LA SOBREVIVENCIA EN PRESENCIA DE SALES BILIARES Y CONDICIONES DE ACIDEZ.....	40
7.7.1	PRESELECCIÓN DE CEPAS RESISTENTES A MEDIO ÁCIDO.....	40
7.7.2	CUANTIFICACIÓN DE CEPAS RESISTENTES A MEDIO ÁCIDO...	40
7.8	IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS RESISTENTES AL RETO ÁCIDO/SALES BILIARES.....	41
7.8.1	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR POR ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ADNr 16S.....	41
7.8.1.1	EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSOMAL.....	41
7.8.1.2	AMPLIFICACIÓN DEL ADNr 16S POR PCR.....	42
7.8.1.3	ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE ADNr 16S AMPLIFICADO (ARDRA).....	43
7.8.1.4	SECUENCIACIÓN.....	44
7.8.2	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.....	46
7.9	RETOS MICROBIANOS.....	47

8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
8.1	FERMENTACIÓN.....	49
8.2	PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS.....	50
8.3	CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE LA FERMENTACIÓN.....	50
8.4	CARACTERÍSTICAS MORFOCOLONIALES Y PRUEBA DE LA CATALASA.....	51
8.5	SOBREVIVENCIA A CONDICIONES DE ACIDEZ Y SALES BILIARES.....	52
8.6	IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS.....	55
8.6.1	EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSOMAL.....	55
8.6.2	AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS ADNr 16S.....	56
8.6.3	ARDRA.....	57
8.7	IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA POR EL SISTEMA API 50CH.....	63
8.8	RETOS MICROBIANOS.....	67
9.	CONCLUSIONES.....	76
10.	PERSPECTIVAS.....	77
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	78
12.	APÉNDICE.....	85

A. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Mecanismos de acción de los probióticos.....	23
FIGURA 2.	Antimicrobianos generados vía homofermentativa.....	27
FIGURA 3.	Antimicrobianos generados vía heterofermentativa.....	28
FIGURA 4.	Árbol filogenético de bacterias lácticas basado en la secuencia de su ADNr 16S.....	32
FIGURA 5.	Metodología de cuantificación de bacterias lácticas.....	36
FIGURA 6.	Sistema de fermentación del pulque bajo condiciones de laboratorio.....	49
FIGURA 7.	ADN cromosomal.....	55
FIGURA 8.	Amplificación por PCR.....	56
FIGURA 9.	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% del ARDRA con enzima <i>Sau 3A1</i>	57
FIGURA 10.	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% del ARDRA con enzima <i>Hae III</i>	58
FIGURA 11.	Árbol filogenético por Neighbor - Joining de aislados del pulque únicos con potencial probiótico.....	62
FIGURA 12.	Patrón de fermentación de la galería API 50CH.....	63
FIGURA 13.	Reto antimicrobiano contra <i>Escherichia coli</i> EPEC 2348/69.....	68
FIGURA 14.	Reto antimicrobiano contra <i>Listeria monocytogenes</i>	69
FIGURA 15.	Reto antimicrobiano contra <i>Salmonella enterica enterica</i> Typhi ATCC9992.....	70

FIGURA 16. Reto antimicrobiano contra *Salmonella enterica enterica*

Typhimurium ATCC14028..... 71

B. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Beneficios asociados a especies de bacterias consideradas como probióticos.....	24
TABLA 2.	Reclasificación del género <i>Lactobacillus</i>	31
TABLA 3.	Medición de parámetros fisicoquímicos.....	50
TABLA 4.	Cuantificación del inóculo y del seguimiento de la fermentación.....	51
TABLA 5.	Características morfológicas y sobrevivencia de cepas de bacterias lácticas a condiciones de acidez y sales biliares.....	54
TABLA 6.	Tipos únicos aislados.....	59
TABLA 7.	Identidad de aislados únicos con base en el análisis de la secuencia completa del ADNr 16S en la base de datos no redundante del NCBI por medio del programa BLAST.....	60
TABLA 8.	Identificación bioquímica de tipos ARDRA únicos por el sistema API 50CH.....	64
TABLA 9.	Identidad de los tipos ARDRA únicos determinada por análisis de secuencias de ARNr 16S y por el sistema API 50CH.....	65
TABLA 10.	Sobrevivência a pH 3.5 + 0.3% SB a 37°C y análisis cualitativo del efecto antimicrobiano de aislados de bacterias lácticas del pulque.....	75

1. RESUMEN

El pulque es una bebida alcohólica (4-7° G.L) no destilada obtenida de la fermentación de la savia del maguey (aguamiel). El proceso de fermentación se lleva a cabo de manera tradicional en tinacales de forma espontánea; sin embargo, para acelerar el proceso, al aguamiel se le puede adicionar una porción de pulque previamente fermentado (semilla). El tiempo de fermentación varía desde unas cuantas horas, un día completo o toda la noche dependiendo del productor y la región geográfica en donde se elabore. Los principales criterios para determinar que la fermentación ha llegado a su fin, son el grado de viscosidad generada y/o su contenido de alcohol.

Estudios previos, han demostrado la presencia de bacterias entre las que destacan las bacterias lácticas heterofermentativas *Leuconostoc citreum*, *L. mesenteroides* y *L. kimchi* en el aguamiel, mientras que en el pulque se presentan bacterias lácticas heterofermentativas *L. mesenteroides* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, y dentro de las homofermentativas, *Lactobacillus acidophilus*, siendo éste último grupo el detectado con mayor abundancia (Escalante *et al.*, 2008). Diversas cepas de *L. acidophilus*, han sido reportadas con propiedades probióticas, sin embargo, es preciso corroborar que las cepas presentes en este alimento posean esta capacidad. En el presente trabajo se realizó la evaluación “*in vitro*” del potencial probiótico de 240 cepas aisladas de 3 diferentes muestras de procedentes de la fermentación del pulque, evaluando su resistencia a

condiciones de acidez (pH 3.5), sales biliares (0.3%): y su capacidad antimicrobiana contra los microorganismos patógenos *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica enterica* Typhi y *Salmonella enterica enterica* Typhimurium.

De las 240 cepas aisladas, 13 fueron resistentes a las condiciones de pH 3.5 y 0.3% de sales biliares. Su tipificación mediante el análisis de restricción de ADNr16S (ARDRA) permitió detectar 5 grupos genéticos únicos, que fueron identificados bacterias lácticas del género *Leuconostoc* mediante un análisis bioquímico utilizando el sistema API50CH de bioMérieux y por el análisis de la secuencia del ADNr 16S. Los resultados obtenidos del presente trabajo, demuestran la presencia de bacterias lácticas con potencial probiótico en el pulque.

INTRODUCCIÓN

El pulque es una bebida tradicional mexicana fermentada, de naturaleza alcohólica, no destilada. Para su elaboración, la savia (aguamiel) recién colectada de diversas especies de magueyes “pulqueros” (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*, principalmente), es utilizada como materia prima para el desarrollo de la fermentación. Esta bebida es producida principalmente en los estados de Querétaro, Michoacán, Hidalgo, Tlaxcala, Estado de México, Morelos y las zonas rurales del Distrito Federal. Los principales criterios para determinar que la fermentación ha llegado a su fin, son el grado de viscosidad generada o su contenido de alcohol. En sentido estricto, la fermentación tradicional no se detiene ya que no se aplica ningún tratamiento que inhiba el crecimiento microbiano. El pulque así producido es distribuido para su consumo en forma natural o mezclado con algunas frutas, vegetales, semillas, etc., y sin la adición de conservadores (Sánchez-Marroquín and Hope, 1953). La producción tradicional del pulque se desarrolla en condiciones no asépticas, de tal forma que en el proceso de fermentación están involucrados aquéllos microorganismos naturalmente asociados al aguamiel durante su acumulación en el maguey, además de los microorganismos provenientes del pulque previamente fermentado que se utiliza para inocular el aguamiel y los que son incorporados al proceso como resultado de la manipulación por parte del productor durante la colecta y transporte del aguamiel o durante la fermentación en el tinacal.

El pulque se puede considerar desde el punto de vista microbiológico como un ambiente naturalmente enriquecido en el cual se presentan tres procesos

fermentativos en los que participan diferentes grupos microbianos: una fermentación alcohólica desarrollada por levaduras de género *Saccharomyces* y la α -proteobacteria *Zymomonas mobilis*; una fermentación viscosa en la que se producen polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa por bacterias lácticas de género *Leuconostoc*, principalmente por *L. mesenteroides*; y una fermentación ácida, en la que se producen: ácido láctico por diferentes bacterias ácido lácticas, incluyendo a *L. mesenteroides*; y ácido acético, por bacterias ácido acéticas. Diversos estudios sobre la microbiología del pulque señalan a *Saccharomyces* sp., *Z. mobilis* y a *L. mesenteroides*, como aquéllos microorganismos esenciales para la fermentación (Sánchez-Marroquín and Hope, 1953; García-Garibay y López-Mungía, 1993).

Las causas principales que favorecen el consumo de pulque son: su naturaleza alcohólica asociada a su consumo tradicional sobre otras bebidas embriagantes y su uso como complemento para la dieta diaria de grandes grupos de población, particularmente de bajos recursos económicos. Tradicionalmente se le han asociado al pulque diversas cualidades medicinales y nutricionales desde épocas prehispánicas, entre las que destaca la prevención de trastornos gastrointestinales (García-Garibay y López-Munguía, 1993). Sin embargo, existen diversas evidencias que proponen una correlación entre niveles elevados de consumo de pulque con una alta incidencia de muerte por cirrosis hepática en aquellos Estados productores de esta bebida. (Narro *et al.*, 1998).

Se han llevado a cabo estudios en los que se analizó la diversidad bacteriana presente en muestras de pulque de distintas ubicaciones geográficas y el seguimiento de una fermentación en condiciones de laboratorio por medio de

técnicas microbiológicas dependientes de cultivo y por técnicas moleculares no dependientes de cultivo. Los resultados indicaron la presencia de bacterias lácticas no reportadas previamente para esta bebida, entre las que destacan las bacterias lácticas heterofermentativas *Leuconostoc citreum* y *L. kimchi* en el aguamiel; las bacterias lácticas homofermentativas del género *Lactobacillus acidophilus*, las heterofermentativas, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* además de la ya identificada *L. mesenteroides* en el pulque (Escalante *et al.*, 2004; 2008). Algunas cepas de bacterias lácticas del género *L. acidophilus* han sido reportadas como bacterias con capacidades probióticas (Pfeiler y Klaenhammer, 2007).

Los probióticos se consideran como suplementos microbianos vivos de naturaleza alimenticia, los cuales aportan al consumidor beneficios a su estado de salud al modular el balance de la microbiota intestinal y de la respuesta inmune; disminución de actividades enzimáticas no deseadas e incremento del contenido de ácidos grasos en heces fecales; mejoramiento de la constipación; disminución de síntomas de dermatitis atópica en niños; reducción, prevención o tratamiento de varias enfermedades diarreicas y posibles efectos positivos sobre cáncer de vejiga y cáncer cervical. Estos beneficios no son propios de todas las especies de bacterias probióticas sino que son específicos para cada cepa y especie (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002; Pfeiler and Klaenhammer, 2007).

3. GENERALIDADES

3.1 PULQUE

El pulque es una bebida alcohólica (4-7° G.L) obtenida de la fermentación de aguamiel (savia del maguey), el cual es un líquido azucarado, incoloro, con cierto olor herbáceo, y sabor dulce agradable; siendo los principales magueyes productores de éste: *Agave salmiana*, *A. mapisaga*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. hookeri*, *A. americana* (García-Garibay y López-Munguía, 1993).

La obtención del aguamiel se inicia con la castración del maguey, de manera que el “capador” (operario) se aproxime al cogollo de la planta y así corte algunas pencas que se encuentren cerca de éste para facilitar la extracción completa del embrión del tallo floral. Concluida la capazón, el maguey se deja “orear” con el propósito de que el tallo de la planta así como las hojas centrales alcancen su máximo desarrollo y el mayor contenido de azúcar. El estado de añejamiento, según los agricultores se identifica por la aparición de ciertas manchas en las hojas de la planta, en seguida, se procede a la “picazón” cuya operación tiene por objetivo abrir en el tallo del maguey la cavidad en que habrá de acumularse el aguamiel, y por otra parte, producir en la planta la lesión necesaria para que el aguamiel fluya. El maguey se deja así durante varios días y posteriormente viene la “raspa”, operación que inicia la producción de aguamiel. Se limpia la boca del “cajete”, se extrae la raspadura que quedó dentro de él al efectuarse la “picazón” y se raspan las paredes de la cavidad para abrir las bocas de los vasos por donde el

aguamiel fluye. Después de uno ó dos días de esta operación, el maguey empieza a “soltar” el aguamiel.

La recolección del aguamiel se hace diariamente por la mañana y por la tarde, en el verano se realiza de manera continua para evitar que se diluya por la lluvia. Cada vez que se “levanta” el aguamiel se efectúa la raspa para mantener abiertos los vasos y asegurar con esto su acumulación. Para llevar a cabo la recolección, el utensilio que se ocupa es una pipeta de succión “acocote” que es una especie de calabaza alargada, perforada en sus dos extremos, a la que se adapta frecuentemente una boquilla de cuerno en la perforación más estrecha. La extremidad más angosta se introduce en el líquido acumulado en la “taza” y por la otra el “tlachiquero”, succiona con la boca para hacer el vacío y provocar la ascensión del líquido; el aguamiel succionado, es vertido en castañas o bolsas de cuero de animal para ser transportadas al tinacal.

En las operaciones de la raspa, la recolección y el transporte, se encuentran deficiencias de higiene se debe tanto a la forma de de mantener la materia prima descubierta así como por el empleo de utensilios de difícil aseo y construcción rudimentaria. También existe posibilidad de contaminación del aguamiel por el contacto humano en el curso de las tareas de recolección, en el acarreo del aguamiel y en la elaboración de la bebida (Loyola, 1956). El proceso de fermentación se inicia desde que el aguamiel se va acumulando en la cavidad abierta del tallo del maguey y se continúa de manera tradicional en tinacales. El proceso de fermentación puede ser acelerado al mezclarse con la “semilla”, la cual corresponde a una fracción de aguamiel previamente fermentado de manera natural.

Uno de los parámetros utilizados para detener el proceso de fermentación es la producción de viscosidad debido a la síntesis de exopolisacáridos principalmente por *Leuconostoc mesenteroides*, así como la concentración de alcohol, producida durante la fermentación alcohólica por levaduras y la bacteria *Zymomonas mobilis* (Escalante *et al.*, 2004).

3.1.1 MICROBIOLOGÍA

Se ha encontrado que la diversidad bacteriana en el aguamiel está compuesta en gran parte por bacterias ácido lácticas tales como: *Leuconostoc mesenteroides*, *L. kimchi* y *L. citreum* (Escalante *et al.*, 2008), siendo *L. mesenteroides* reportada previamente en el pulque (Sánchez-Marroquín and Hope, 1953; García-Garibay y López Munguía, 1993); mientras que *L. kimchi*, *L. citreum* y *Lactococcus lactis* que se encuentra en menor proporción, son bacterias que se han reportado por primera vez. Además en el aguamiel también se encontró a *Erwinia rhapontici*, *Enterobacter* sp., y *Acinetobacter radioresistens*, los cuales son atribuidos a contaminación del aguamiel por acumulación de éstos en el maguey, así como por su extracción y manejo en condiciones poco higiénicas (Escalante *et al.*, 2008).

Leuconostoc mesenteroides lleva a cabo la fermentación de azúcares; siendo para el caso del pulque sacarosa, glucosa y fructosa para producir CO₂, D(-) ácido láctico, glucanos y fructanos a partir de la sacarosa (Carr *et al.*, 2002).

En la primera etapa de la fermentación, se ha detectado microbiota perteneciente al grupo de bacterias lácticas homofermentativas: *Lactobacillus acidophilus*; además de *Zymomonas mobilis* y *Acetobacter malorum*, los cuales han sido

resultado de la adición del pulque previamente fermentado (Escalante *et al.*, 2008); *Zymomonas mobilis* ha sido reportada como la bacteria responsable de la producción de etanol (Sánchez-Marroquín and Hope, 1953; Favela, 1993; García-Garibay y López-Mungía, 1993).

A las 3 horas de fermentación, la diversidad bacteriana está compuesta por *Lactobacillus* sp., *L. mesenteroides*, *Enterococcus agglomerans*, *Z. mobilis*, *A. malorum*, *A. radioresistens*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, y en menor proporción *L. citreum* (Escalante *et al.*, 2008).

Al final del proceso de fermentación, la comunidad bacteriana se encuentra compuesta por microorganismos homofermentativos, tales como *L. acidophilus*, siendo este de importancia por encontrarse en concentración significativa (alrededor del 88% del total de los microorganismos detectados), además de encontrarse *Lactobacillus* sp. y un grupo heterofermentativo dentro de los cuales se encuentran *L. mesenteroides*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, así como *A. malorum* (Escalante *et al.*, 2008).

3.3 PROBIÓTICOS

3.3.1 DEFINICIÓN DE PROBIÓTICO

A principios del siglo XX, con la observación de Ellie Metchnikoff sobre la buena salud que gozaban los campesinos búlgaros, los cuales consumían grandes cantidades de yogurt, surge el interés científico por las bacterias como agentes protectores frente a diversas enfermedades; surgiendo la hipótesis de que el

consumo de alimentos ricos en bacterias lácticas eliminaba bacterias formadoras de toxinas, además de balancear la flora intestinal, mantener una buena salud y con ello aumentar la expectativa de vida (Alvarez and Oberhelman, 2001).

Lilly y Stillwell (1965), utilizan el término de probiótico, para describir a ciertas sustancias (antibióticos) producidas por microorganismos en cierta fase de su crecimiento y que tienen la característica de inhibir el crecimiento de otros microorganismos (Lilly y Stillwell, 1965). Fuller (1989), propone la definición de probiótico en la que se define como “cualquier suplemento alimenticio vivo que beneficia al huésped mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal”. Desde entonces, la definición de probiótico ha ido evolucionando de manera que hoy se puede definir como: “microorganismos vivos, principalmente bacterias solas o en cultivos mixtos, que tras ser ingeridos en cantidades suficientes (10^6 UFC/g de producto) tienen un efecto benéfico sobre la salud del consumidor, además de mejorar el equilibrio microbiano del intestino” (Donohue *et al.*, 1998; Shah, 2000).

3.2.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS PROBIÓTICOS

Los requisitos funcionales de un probiótico deben ser establecidos usando métodos *in vitro* y posteriormente, los resultados de estos estudios deben ser reflejados en estudios humanos controlados (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002). A continuación se enuncian los aspectos que debe cumplir un probiótico:

a) Tolerancia al pH ácido y jugo gástrico humano: Las cepas consideradas como probióticos, deben sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal, conservar la integridad de las células epiteliales que las contienen, así como mantener sus

propiedades de adhesión a éstas y mantener su actividad metabólica (Ouwehand *et al.*, 1999).

b) Tolerancia a la bilis: Se sabe que la bilis puede dañar la membrana celular de las bacterias así como a su ADN y proteínas; aquéllos microorganismos que logran tolerar el jugo biliar, puede deberse a que las sales biliares contenidas en éste son hidrolizadas mediante enzimas (Pfeiler and Klaenhammer, 2007).

c) Adherencia a las superficies epiteliales: Las cepas probióticas al presentar adherencia, les permite colonizar esta superficie y como consecuencia producir efecto de inmunomodulación y prevención de la adherencia de microorganismos patógenos, es decir, exclusión competitiva (Fuller 1989, Ouwehand *et al.*, 1999).

d) Inmunoestimulación: Aún no se logrado elucidar el mecanismo por el cual las bacterias probióticas han de llevar a cabo ésta respuesta; pero se han llevado a cabo estudios “*in vitro*” acerca de la capacidad de las células mucosas inmunocompetentes de discernir entre señales emitidas por diferentes tipos de bacterias, y se han encontrado al menos 2 patrones distintos de respuesta innata a las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, y en este último grupo se observan grandes diferencias entre especies (Zaldívar, 2002).

Por otro lado, el tejido linfático asociado a las mucosas del tracto gastrointestinal (GALT), es el órgano en donde los antígenos de los alimentos, las bacterias benéficas o patógenas así como otras sustancias exógenas tienen el primer contacto con el sistema inmune (Havenaar and Huis, 1992; Isolauri *et al.*, 1998), por lo anterior, se puede plantear la hipótesis acerca del mecanismo, siendo ésta que los microorganismos se adhieran a la mucosa linfática del tracto

gastrointestinal y así estimular a las células inmunocompetentes las cuales pueden favorecer la producción o supresión de otras células y con ello estimular la diferenciación linfática (Saarela *et al.*, 2000).

En 1983 se introduce el término translocación, que es: “el paso de bacterias viables a través del tracto gastrointestinal a los nódulos linfomesentéricos y posiblemente a otros órganos”, por este mecanismo, las células benéficas presentes en el intestino, pueden translocarse al bazo que es el centro de actividad inmune y así estimular la fagocitosis de células patógenas (Havenaar and Huis, 1992).

e) Actividad antagonica contra patógenos: este parámetro va a estar dado por la competencia entre bacterias probióticas y patógenas, en primer lugar por el espacio físico ocupado por los probióticos debido a su capacidad de adherencia a las células epiteliales; además, de que las primeras estarán compitiendo por sustratos fermentables, además de carbohidratos no digeribles proteínas y lípidos y en consecuencia la producción de metabolitos que pudieran inhibir el crecimiento de bacterias patógenas (Commane *et al.*, 2005).

f) Antimutagénico y anticancerígeno: reducción de la actividad enzimática como nitroreductasas, azoreductasas y glucoronidasas en heces fecales.

En resumen, los probióticos para generar un buen estado de salud del individuo, llevan a cabo mecanismos entre los que destacan la competencia contra patógenos por nutrientes y espacio físico; la producción de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno y ácido láctico por lo que se reduce el pH; producción de anticuerpos además de la capacidad de llevar a cabo la disminución en las actividades

enzimáticas de la β -glucuronidasa y la β -glucosidasa asociadas con la síntesis de procarcinógenos (Amores *et al.*, 2004) (Figura 1).

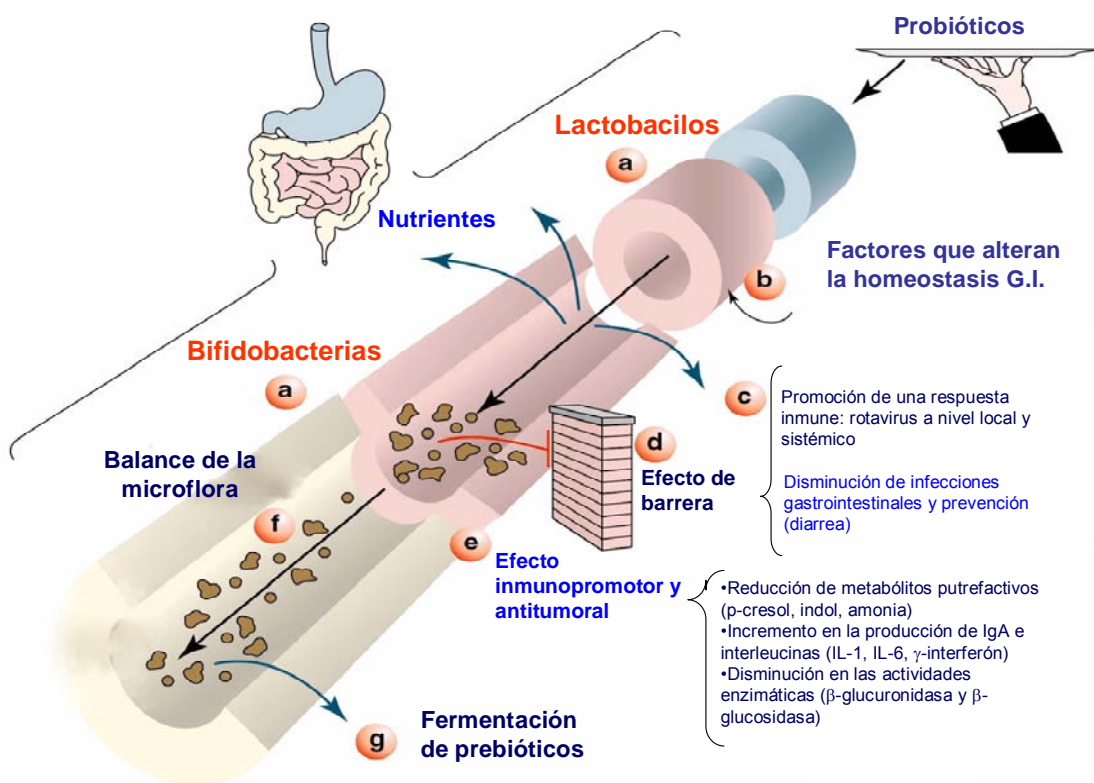


Figura 1. Mecanismo de acción de los probióticos

En la siguiente tabla se mencionan los beneficios que se le han atribuido a las bacterias probióticas de mayor relevancia.

Tabla 1. Beneficios asociados a especies de bacterias consideradas como probióticas

Especie de bacteria probiótica	Beneficios asociados
<i>L. casei</i> Shirota	Reducción de actividad enzimática fecal. Reducción de cáncer cervical y de vejiga.
<i>L. acidophilus</i>	Regulación de la respuesta inmunitaria. Mejora la digestión de la lactosa. Reducción de infecciones vaginales.
<i>L. rhamnosus</i> GG.	Producción de sustancias antimicrobianas. Prevención de colonización por microorganismos patógenos. Regulación de la respuesta inmunitaria (disminuye duración de diarrea por rotavirus). Reducción de actividad enzimática fecal. Reducción de infecciones vaginales.
<i>L. plantarum</i>	Prevención de colonización por microorganismos patógenos.
<i>Bifidobacterium</i> sp.	Regulación de la respuesta inmunitaria. Disminución de actividad enzimática asociada a la síntesis de procarcinógenos. Mejora la digestión de la lactosa.
<i>L. bulgaricus</i>	Mejora la digestión de la lactosa. Disminuye duración de diarrea causada por rotavirus.
<i>L. reuteri</i>	Disminuye duración de diarrea causada por rotavirus.

(Ouweland *et al.*, 1999; Amores *et al.*, 2004).

3.2.3 ANTIMICROBIANOS GENERADOS POR PROBIÓTICOS

Como productos finales de la fermentación de los carbohidratos disponibles, resultan moléculas orgánicas de bajo peso molecular que poseen actividad antimicrobiana, siendo los más comunes el ácido láctico, el ácido acético y el ácido propiónico. Existen otros antimicrobianos que son generados a partir de otros mecanismos como el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas (Figura 2 y 3) (Ouwehand, 1998).

El ácido láctico se forma a partir de la fermentación de las hexosas a partir de la vía Embden-Meyerhoff o glucólisis para las bacterias homofermentativas, mientras que para las heterofermentativas es a través de la ruta 6-fosfogluconato/fosfocetolasa, además de generarse CO₂ y etanol. El diacetilo, (2,3-butanodiona), es producido teniendo como precursor al piruvato.

En presencia de oxígeno, las bacterias ácido lácticas pueden generar peróxido de hidrógeno mediante la auto oxidación de flavoproteínas, NADH oxidasa o la enzima superóxido dismutasa.

Las bacteriocinas, péptidos biológicamente activos que tienen propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora, y que también se ha encontrado que su acción bactericida con cepas distanciadas filogenéticamente de las cepas productoras (Sablon *et al.*, 2000), son sintetizadas en los ribosomas a partir de transcritos procedentes de la expresión del gen estructural correspondiente. Son traducidos como péptidos inactivos con

una extensión amino terminal de 24 a 30 residuos para los lantibióticos, mientras que para las bacteriocinas no lantibióticas es de 18 a 24 residuos. La secreción de las bacteriocinas a través de la membrana citoplasmática se encuentra mediada por la actividad de transportadores específicos de tipo ABC (Klaenhammer, 1988; Muñoz-Rojas, 2008).

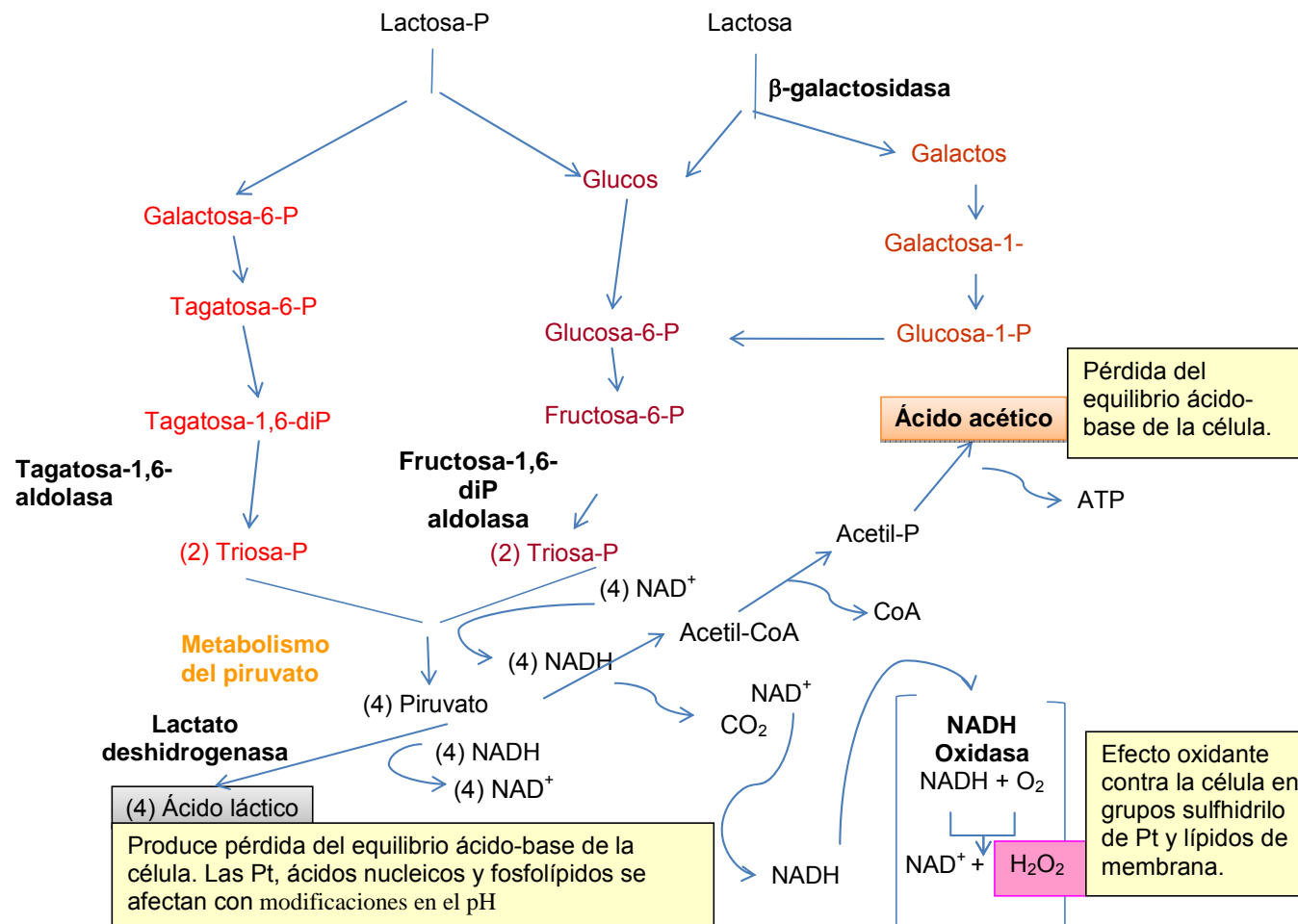


Figura 2. Antimicrobianos generados vía homofermentativa.

(Doores, 1993; Ouwehand et al., 1998).

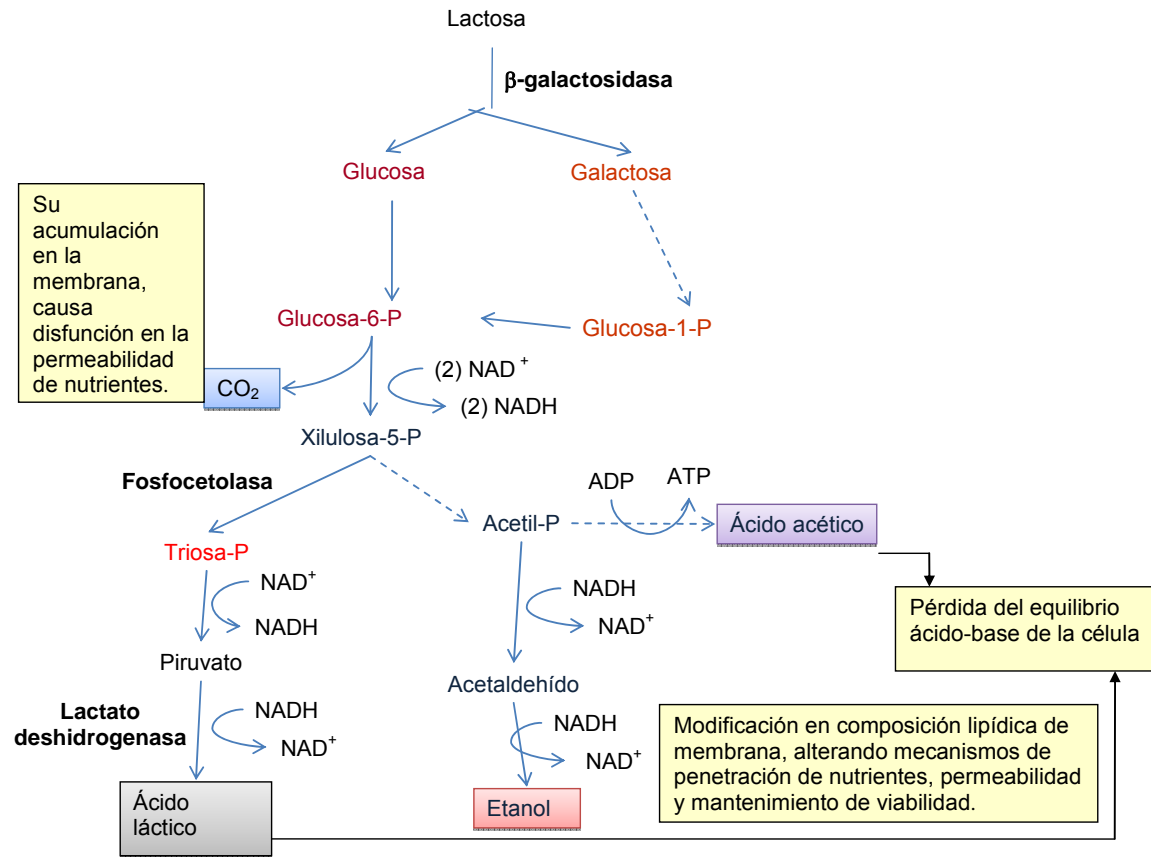


Figura 3 . Antimicrobianos generados vía heterofermentativa.

(Doores, 1993; Ouwehand et al., 1998).

3.3 MICROORGANISMOS CONSIDERADOS COMO PROBIÓTICOS

Dentro de los microorganismos más utilizados y mejor conocidos con efecto probiótico, se encuentran los pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Los beneficios de los probióticos sobre la salud humana han ganado en los últimos años gran atención por parte de los consumidores, situación que se ha reflejado en el desarrollo de nuevos productos probióticos comerciales, lo que a su vez ha llevado a diferentes grupos de investigación a analizar mediante enfoques de biología de sistemas a las especies usadas comercialmente a buscar nuevas especies de bacterias con capacidades probióticas (Mattila-Sandholm, *et al.*, 2002; Preflier and Klaenhammer, 2007).

Las bacterias ácido lácticas comprende a un grupo de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, generalmente catalasa negativo, de morfología cocoide o bacilar, cuyo principal metabolito producido es el ácido láctico formado a partir de la fermentación de carbohidratos (Schleifer *et al.*, 1995; Donohue *et al.*, 1998). La clasificación de los géneros de bacterias lácticas se basa en su morfología, el crecimiento a diversas temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la capacidad de crecer en altas concentraciones de sal y la tolerancia a medios ácidos o alcalinos. Fisiológicamente se diferencian dos grupos según los productos finales de la fermentación que generan a partir de carbohidratos siendo homofermentativos, los que producen solamente ácido láctico por la vía Embden-Meyerhoff (glicólisis), mientras que los que pertenecen al grupo de las

heterofermentativas, además de ácido láctico, producen etanol y CO₂ a través de la vía de la 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (Axelsson, 1998).

Desde el punto de vista taxonómico, constituyen un grupo que se encuentra en la división de las bacterias Gram-positivas con un bajo porcentaje de G+C en la composición de su ADN. Sin embargo, hay bacterias que presentan un alto contenido en G+C como *Propionibacterium* y *Brevibacterium* (Figura 4) (Schleifer *et al.*, 1995).

Basándose en la secuencia de su ADNr 16S, Collins, propone una división para las bacterias del género *Lactobacillus* en 3 grupos (Tabla 2) (Schleifer *et al.*, 1995).

Las bifidobacterias son microorganismos que se habitan la región colónica del intestino humano desde su nacimiento. Ciertos factores como la dieta, tratamientos antibióticos, stress, edad avanzada, etc., pueden alterar la concentración de los mismos. Debido a que algunas especies del género *Bifidobacterium* presentan ciertas cualidades como: síntesis de ácidos orgánicos (ácido láctico y acético), bacteriocinas y algunos antibióticos, además de tener las características de adherencia a las superficies epiteliales, contribuir a una menor incidencia epidemiológica de alergias, mejorar la digestión poseer efectos antihipercolesterolemiantes, entre otros (Ballongue, 1992). Diferentes especies de estos microorganismos se han caracterizado como microorganismos probióticos y han sido incorporados a alimentos funcionales y así mantener un equilibrio cuando las edades o alguna circunstancia antes mencionada cause una disminución de éstas.

Tabla 2. Reclasificación del género *Lactobacillus*.

Grupo filogenético	Grupo fermentativo 1 Homofermentativos obligados	Grupo fermentativo 2 Heterofermentativos obligados	Grupo fermentativo 3 Heterofermentativos obligados
Grupo <i>Delbruekii</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. amylophylus</i> , <i>L. orispatus</i> , <i>L. delbruecki</i> subsp. <i>delbruekii</i> , <i>bulgaricus</i> y <i>lactis</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. gasserii</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. jnson</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. kefirgrantum</i>	<i>Lactobacillus acetotolerans</i> , <i>L. hamsterii</i>	
Grupo <i>Lactobacillus casei</i> - <i>Pediococcus</i>	<i>L. aviarius</i> subsp. <i>araffinosus</i> y <i>aviarius</i> , <i>L. farcimins</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. salivarius</i> subsp. <i>salicinus</i> y <i>salivarius</i> , <i>L. sharpae</i> , <i>Pediococcus</i> <i>damnosus</i> , <i>P. dextranicum</i> , <i>P. parculus</i>	<i>Lactobacillus agilis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. bifermentas</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> y <i>torquens</i> , <i>L.</i> <i>curvatus</i> , <i>L. graminis</i> , <i>L. homohiochii</i> , <i>L. intestinalis</i> , <i>L. murinus</i> , <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> y <i>tolerans</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. sake</i> (<i>L. bavaricus</i>), <i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pedicoccus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L.</i> <i>hilgardii</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. panis</i> , <i>L.</i> <i>parakefir</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. sanfrancisco</i> , <i>L. suebicus</i> , <i>L. raccimostercus</i> , <i>L. vaginalis</i>
Grupo <i>Leuconostoc</i>			<i>Lactobacillus frustosus</i> , <i>Weissella confusa</i> (<i>Ln.</i> <i>confusus</i>), <i>W. (Ln.) viridescens</i> , <i>W. (Ln.) halotolerans</i> , <i>W.</i> <i>(Ln.) hilgardii</i> , <i>W. (Ln.) kandleri</i> , <i>W. (Ln.) minor</i> , <i>W. hellenica</i> , <i>W. (Leuconostoc)</i> <i>paramesenteroides</i> , <i>Leuconostoc amelobiosum</i> , <i>Ln. argentumum</i> , <i>Ln. lactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Ln. pseudomesenteroides</i> , <i>Ln. carnosum</i> , <i>Ln. geludum</i> , <i>Ln. fallax</i>

(Schleifer *et al.*, 1995)

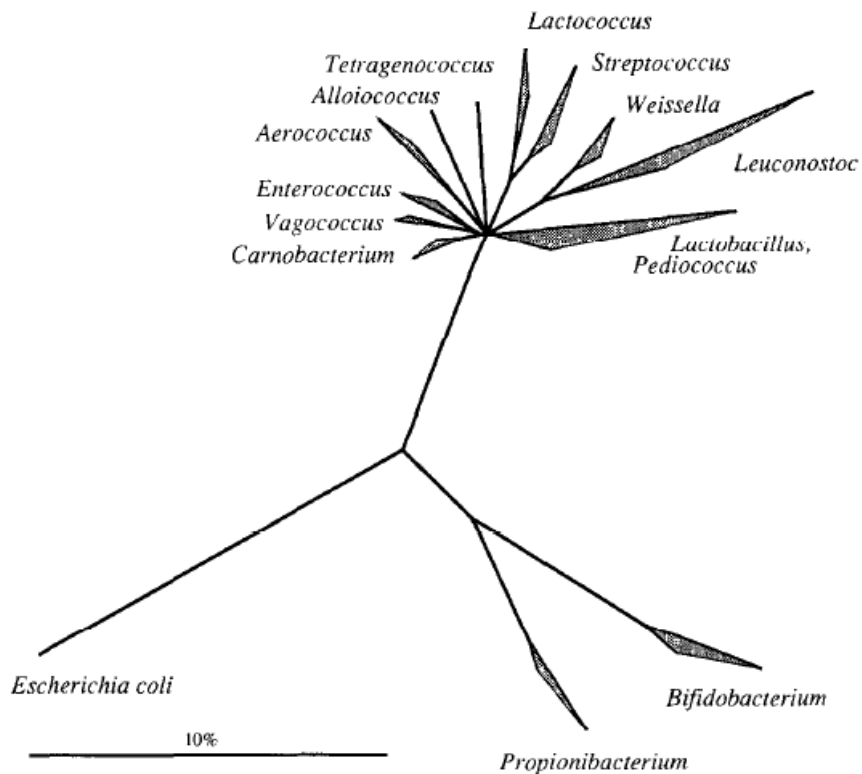


Figura 4. Árbol filogenético de bacterias lácticas basado en la secuencia de su ADNr 16S (Schleifer *et al.*, 1995).

Bifidobacterium, es un género de bacterias Gram positivas, anaeróbicas, no esporuladas y que no presentan movilidad, difiere de las bacterias ácido lácticas porque además de ácido láctico producen ácido acético como productos finales de su metabolismo a partir de las hexosas mediante la ruta frutosa-6-fosfato.

(Bollongue, 1992).

4. JUSTIFICACIÓN

Desde la época prehispánica, por evidencias arqueológicas y recopilaciones coloniales, se tiene el conocimiento del uso del pulque como una bebida ceremonial. Actualmente su consumo se da en su mayoría en poblaciones rurales, siendo las principales razones su naturaleza alcohólica y su uso como complemento para la dieta diaria particularmente en poblaciones de bajos recursos económicos. Tradicionalmente, al consumo de pulque se le ha asociado efectos terapéuticos en enfermedades y dolencias gastrointestinales (Cervantes y Marina, 2007).

El estudio de las posibles propiedades probióticas de las diversas especies de bacterias lácticas involucradas de forma natural en el desarrollo de la fermentación del pulque, permitirá sentar las bases científicas de varios de los beneficios nutricionales y sobre la salud intestinal que se ha dado tradicionalmente a su consumo.

5. HIPÓTESIS

El pulque es un ambiente naturalmente enriquecido en el cual existen bacterias lácticas que toleran de forma natural condiciones de acidez, considerando lo anterior como primera aproximación, será posible encontrar en esta bebida bacterias de éste tipo con potencial probiótico.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- Aislar y caracterizar bacterias lácticas con posible capacidad probiótica a partir de una fermentación de pulque proveniente de la localidad de Huitzilac, Morelos.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar bacterias lácticas del proceso de fermentación del pulque, desarrollada en condiciones de laboratorio.
- Evaluar la tolerancia de las bacterias lácticas aisladas a condiciones de pH ácido y sales biliares.
- Identificar aquellas bacterias lácticas aisladas de interés por métodos bioquímicos (sistema API 50CH) y por análisis de la secuencia de su ADNr 16S.
- Evaluar su capacidad antagónica contra *Escherichia coli* EPEC, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica enterica* Typhi y *Salmonella enterica enterica* Typhimurium.
- Conservar las cepas de interés por ultracongelación.

7. MATERIAL Y METODOLOGÍA

7.1 FERMENTACIÓN

Las muestras de pulque y aguamiel utilizadas en este trabajo fueron proporcionadas por un productor de la localidad de Huitzilac, Morelos. Las muestras fueron transportadas en recipientes de plástico al Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos, para su estudio.

Para realizar el aislamiento de las bacterias lácticas con capacidad probiótica se realizó una fermentación en laboratorio utilizando el aguamiel y pulque colectados. Para este fin se mezclaron 2 partes de aguamiel (1.6 L) y 3 partes de pulque (2.4 L; de acuerdo a las recomendaciones del productor) en una jarra de fermentación de vidrio estéril, en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar) para evitar la contaminación por microorganismos exógenos. La fermentación se realizó a temperatura ambiente (25°C).

7.2 MEDICIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

Durante el desarrollo de la fermentación se midieron pH y temperatura a partir de una muestra de pulque, de la mezcla aguamiel+pulque, tiempo 0 (T0); a las 3 horas de fermentación (T3) y a las 6 horas de fermentación (T6). La temperatura de la fermentación se midió con termómetro el cual fue introducido directamente en la muestra; y el pH se midió con un potenciómetro (Conductronic pH120).

7.3 CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

Se tomaron 10 mL de cada muestra (pulque, T0, T3 y T6) y se añadieron a 90 mL de agua peptonada al 0.1 % p/v en un matraz Erlenmeyer estéril. Se procedió a hacer diluciones decimales hasta 10^{-6} en agua peptonada. De las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , se hizo una extensión superficial de 0.1 mL en agar MRS por duplicado. Las placas se incubaron a 30 °C por 24 horas, al cabo de este tiempo se contaron las células viables considerando la caja estadísticamente representativa (25-250 unidades formadoras de colonias, UFC) (Figura 5).

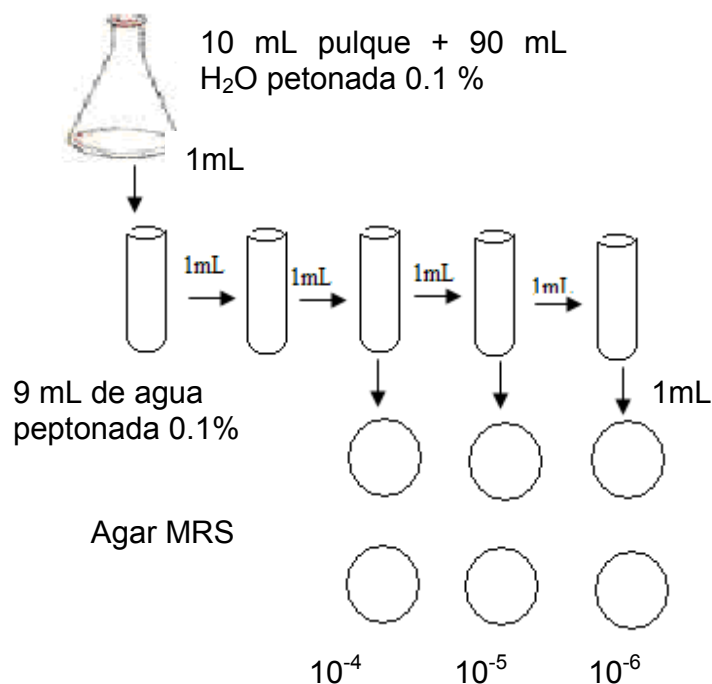


Figura 5. Metodología de cuantificación de bacterias lácticas.

Después de la cuantificación, se seleccionaron 40 colonias de cada caja representativa para las 3 muestras a evaluar (pulque, T3 y T6). Cada colonia se conservó de acuerdo a la metodología descrita en la sección de conservación de cepas (7.6) para ser purificadas y evaluadas posteriormente.

7.4 PURIFICACIÓN DE AISLADOS, TINCIÓN DE GRAM Y PRUEBA DE LA CATALASA

A partir de las 80 colonias de cada muestra se eligieron aquéllas que presentaron cualitativamente un mejor desarrollo. Una vez obtenidas las cepas activas (sección 7.6.3), se purificaron en placas de agar MRS utilizando el método de estría por agotamiento en cuadrante radial. Para verificar su pureza se hicieron observaciones morfocoloniales (pequeñas colonias puntiformes y butiráceas) y observaciones microscópicas (Gram-positivo). Debido a que las bacterias lácticas carecen de la enzima catalasa, se efectuó esta prueba para confirmar su identidad. La prueba se realizó tomando una asada de una colonia pura, puntiforme butirácea, la cual se coloca en un portaobjetos limpio y desengrasado, se deposita una gota de peróxido de hidrógeno sobre la muestra; sí se presentan burbujas, la prueba es positiva debido a la producción de oxígeno, si no hay desprendimiento de burbujas, la prueba es negativa.

7.5 AISLAMIENTO DE UNA CEPA PROBIÓTICA COMERCIAL

Se utilizó una bacteria probiótica aislada de un producto comercial (*Lactobacillus casei* Shirota, Yakult), para ser utilizada como control positivo en los experimentos posteriores. Para aislar este microorganismo se hicieron diluciones decimales del producto hasta 10^{-8} . Las diluciones 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} se plaquearon por extensión superficial de 0.1 mL en agar MRS por duplicado; y se incubaron a 36 °C por 24 horas. Al cabo de este tiempo se contaron las células viables considerando la caja estadísticamente representativa (25-250 UFC).

Una vez que se obtuvo la cepa comercial se conservó como se menciona en el apartado 7.6, además de ser aislada y purificada como se describe en la sección 7.4, y evaluada de manera similar que las cepas obtenidas a partir de la fermentación del pulque.

7.6 CONSERVACIÓN DE CEPAS

Las cepas no purificadas y purificadas se conservaron largo y mediano plazo, las no puras con la finalidad de evitar perder colonias durante el estudio, mientras que las puras para preservarlas a lo largo de este.

7.6.1 CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO

A partir de cada una de las 80 colonias aisladas, se realizó un cultivo en 3 mL de caldo MRS, durante 24 horas a 30 °C, al cabo de éste tiempo, se mezclaron 0.7

mL en un tubo eppendorf + 0.3 mL de glicerol, se homogeneizó y se congelaron a -70°C.

7.6.2 CONSERVACIÓN A MEDIANO PLAZO

Para la conservación a mediano plazo, se hizo un subcultivo por picadura partiendo de un cultivo de 24 horas en 3 mL de caldo MRS, en medio semisólido de MRS con 0.3% de agar bacteriológico y una punta de espátula de carbonato de calcio (aproximadamente 0.1g por tubo) para neutralizar el medio debido a la producción de ácido por las bacterias.

7.6.3 ACTIVACIÓN

Para la activación de las cepas puras y no purificadas conservadas a mediano y/o largo plazo, se tomó una asada de la cepa conservada en agar semisólido ó en ultracongelación con un palillo estéril, respectivamente, y se inoculó en tubos con 3 mL de caldo MRS, incubándose a 30 °C durante 24 horas. A partir del desarrollo obtenido, se reinocularon en medio líquido MRS, éste procedimiento se repitió 3 veces, con la finalidad de obtener células perfectamente viables.

7.7 EVALUACIÓN DE LA SOBREVIVENCIA EN PRESENCIA DE SALES BILIARES Y CONDICIONES DE ACIDEZ.

7.7.1 PRESELECCIÓN DE CEPAS RESISTENTES A MEDIO ÁCIDO

Cada cepa se inoculó en caldo MRS con 0.3% p/v de sales biliares (OXOID) y pH 3.5 y se incubó a 30° C durante 6 horas. Al término se depositaron 300 µL en una caja Petri con agar MRS y se incubaron a 30°C durante 24 horas. Las colonias desarrolladas, se consideraron resistentes a medio ácido y sales biliares. Éstas fueron las cepas con las que se trabajó posteriormente.

7.7.2 CUANTIFICACIÓN DE CEPAS RESISTENTES A MEDIO ÁCIDO

Para la cuantificación de tolerancia a pH ácido y sales biliares, se utilizaron cultivos de 24 horas a partir de las cepas conservadas y purificadas, inoculándose en caldo MRS acidificado a pH 3.5 y adicionado con 0.3 % p/v de sales biliares, se incubaron a 30 °C durante 6 horas, al término de este tiempo, se efectuó una dilución de 10^{-1} y se plaquearon 500 µL por triplicado las diluciones correspondientes a 10^0 y 10^{-1} incubándose a 30 °C y 37°C. La bacteria probiótica comercial se trabajó de manera similar.

7.8 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS RESISTENTES AL RETO ÁCIDO/SALES BILIARES

Las cepas tolerantes al reto ácido y sales biliares se identificaron por dos técnicas: Identificación bioquímica por el sistema API 50CH bioMérieux y por análisis de la secuencia completa del gen ADNr 16S. Las etapas que se siguieron para la identificación molecular se describen a continuación:

7.8.1 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR POR ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ADNr 16S

7.8.1.1 EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSOMAL

Se realizó un cultivo de cada cepa a identificar en 5 mL de caldo MRS a 30° C toda la noche. Al día siguiente se extrajo el ADN cromosomal utilizando el UltraClean Microbial isolation kit (Mobio), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Para evaluar la integridad del ADN se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% 100V en solución buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) (TRIS base 89 mM pH 8.0, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA) cargando 4 µL de cada muestra y como referencia el marcador de peso molecular O`Generule™ 1kb, DNA ladder (Fermentas). El gel fue visualizado bajo luz ultravioleta en un analizador de imágenes EagleEye (Stratagene), utilizando como revelador de bandas bromuro de etidio 0.04%.

7.8.1 .2 AMPLIFICACIÓN DEL ADNr 16S POR PCR

El ADN extraído para cada cepa fue utilizado como templado para la amplificación por PCR de sus respectivos ADNr 16S; para lo cual se utilizaron el par de primers:

fd1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y

rD1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg, *et al.*, 1991), que permiten obtener un producto amplificado de 1.5 kb.

La reacción de amplificación se realizó con la enzima Taq DNA polimerasa recombinante de Fermentas y la mezcla de reacción utilizada estuvo conformada por:

Templado (DNA cromosomal)	1 µL
Buffer 10x	5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	3 µL
dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 mM cada uno)	1 µL
Primer Fw (fd1, 0.5 µM)	0.1 µL
Primer Rv (rv, 0.5 µM)	0.1 µL
Enzima Taq DNA polimerasa recombinante (0.5 U/ µL)	0.5 µL
H ₂ O	39.3 µL
Volumen final de reacción	50 µL

La mezcla anterior, se colocó en un tubo para PCR de 0.2 mL y se realizó la amplificación en un termociclador *GeneAmp PCR System 9600* (Perkin Elmer), bajo las siguientes condiciones:

Un ciclo de desnaturalización inicial	95°C, 5 minutos
30 ciclos de amplificación	95°C, 1 minuto 42°C, 1 minuto 72°C, 2 minutos
Un ciclo de extensión final	72°C, 5 minutos

Al término de la reacción, se analizaron 5 µL de cada reacción de amplificación por electroforesis como se describió en la sección 7.8.1.1.

7.8.1.3 ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE ADNr 16S AMPLIFICADO (ARDRA)

El análisis ARDRA, por sus siglas en inglés “Amplified rDNA Restriction Analysis”, consiste en la digestión del ADNr 16S amplificado con enzimas de restricción, mediante las cuales se obtendrán fragmentos de ADN de acuerdo al número de sitios de restricción para cada enzima utilizada. Esta técnica se utilizó para identificar aquellas colonias aisladas con un perfil de restricción único para ser secuenciada y obtener su identidad por comparación en la base de datos no redundante del National Center for Biotechnological Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Para el análisis ARDRA se utilizaron las enzimas *Hae* III (Fermentas) y *Sau* 3A1 (Fermentas).

La mezcla de reacción utilizada para llevar a cabo el análisis ARDRA con la enzima *Hae* III, es la que se menciona a continuación:

Producto de PCR (ADNr 16S)	8	μL
Enzima (10U/ μL)	0.3	μL
Buffer 10x	2	μL
H ₂ O	9.7	μL
Total	20	μL

Para el análisis ARDRA con la enzima de *Sau* 3A1, la mezcla de reacción utilizada fue la siguiente:

Producto de PCR (ADNr 16S)	8	μL
Enzima (4U/ μL)	0.3	μL
Albúmina de suero bovina (10x)	2	μL
Buffer 10x	2	μL
H ₂ O	7.7	μL
Total	20	μL

Una vez preparada la mezcla de reacción, se incubó durante 2 horas a 37°C y la digestión se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% como se describió previamente (sección 7.8.1.1).

7.8.1.4 SECUENCIACIÓN DE ADNr 16S Y ANÁLISIS.

A partir de cada grupo con perfil de bandeo único, se eligió una cepa para volver a amplificar su ADNr 16S por PCR y se purificaron por medio del kit para purificación Pure Link PCR Purification kit (Invitrogen). El ADNr 16S purificado se secuenció en la unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM

(método basado en la técnica de Sanger), la mezcla de reacción a secuenciar consistió en:

Producto de PCR (10 ng de ADN templado por cada 100 pb de producto de PCR)	10 μ L
Primer (fd1 ó 1rd1) (10 pmol/ de cada uno μ L)	1 μ L
H ₂ O	5 μ L
Volumen final	16 μ L

El equipo en el que se llevó a cabo la secuenciación es: Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3739.

Una vez obtenidas las secuencias, éstas fueron visualizadas a través del electroferograma mediante el uso del programa BioEdit 7.0.9.0.(6/27/07) (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html).

El uso de los primers fd1 y rd1 en reacciones independientes permitió obtener una secuencia de en dirección 5' \rightarrow 3' y 3' \rightarrow 5' del gen ADNr 16S respectivamente, las cuales fueron ensambladas para obtener la secuencia completa de ~1500 pb.

Para obtener la identidad de las secuencia completas se analizaron en la base de datos no redundante del National Center for Biotechnological Information (NCBI) utilizando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). La identidad de la secuencia se determinó de acuerdo al mayor porcentaje de identidad al compararse con secuencias depositadas en la base de datos y el valor e (e value).

Con la finalidad de complementar los resultados de identidad obtenidos se realizó un árbol filogenético en el que se incluyeron como referencia diversas secuencias de ADNr 16S de microorganismos previamente depositados en la base de datos

NCBI y la secuencia completa del ADNr 16S de los aislados obtenidos. Para este fin se utilizó el paquete para inferir filogenias Phylip-3.68

(<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) utilizando los siguientes programas: De forma preliminar se realizó un alineamiento de las secuencias en el programa ClustalX 2.0.10 del paquete bioinformático Bio Edit7.0.9.0. El archivo resultante se guardó en formato *.phy y se utilizó para alimentar el programa Seqboot.exe en el que se definieron 1000 grupos de datos para un análisis de bootstrapping. El archivo de salida se utilizó para alimentar el programa DNAdst.exe en mediante el cual se construyó una matriz de distancia utilizando el algoritmo de Jukes-Cantor para cada uno de los 1000 grupos. El archivo de salida se utilizó para alimentar el programa Neighbor.exe con el cual se construyó un árbol filogenético a partir de cada uno de los 1000 grupos utilizando el método de Neighbor - Joining. El archivo de salida se utilizó para obtener el árbol consenso en el programa Consense.exe y finalmente el árbol consenso se visualizó en el programa Mega 4.1 (www.megasoftware.net).

7.8.2 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA POR EL SISTEMA API 50CH

Una vez obtenidos los grupos únicos a partir del análisis de restricción de ADNr 16S (ARDRA) descrito en la sección 7.8.1.3, se eligió al azar una cepa representativa de cada grupo, se verificó la pureza de cada colonia seleccionada por observación en uniformidad de la morfología, tamaño y características microscópicas (Gram). Se procedió a hacer la suspensión de cada una en 50 mL de API50CHL Médium (bioMérieux) hasta igualar la turbidez del tubo 2 de la

escala de McFarland utilizando un densitómetro Densimat BioMérieux y se inoculó en cada una de las cúpulas de la galería API 50CH con 300 µL. La galería se incubó a 30°C y los resultados se interpretaron a las 24 y 48 horas conforme a las indicaciones recomendadas por el fabricante (Anexo 1). La identidad de las colonias se determinó de acuerdo al mayor porcentaje de identidad obtenido con la fermentación de los 49 azúcares de la galería API depositados en la base de datos *API Lab Plus BioMérieux V 3.3.3*.

7.9 RETOS MICROBIANOS

Cada uno de los aislados obtenidos del reto ácido/sales biliares y la cepa probiótica comercial fueron evaluados para determinar su capacidad antagónica contra las bacterias patogénicas: *E. coli* enteropatógena (EPEC) 2348/69 (Treviño *et al.*, 2007), *S. Typhi* ATCC9992 y *S. Typhimurium* ATCC14028; además de *Listeria monocytogenes* de la colección del cepario de la Facultad de Química, UNAM. Se utilizaron estos microorganismos patógenos, debido a que en cepas que ya han sido caracterizadas como probióticas se ha evaluado su capacidad de prevenir o tratar diarrea inducida por microorganismos enteropatógenos, como *E. coli* enterotoxigénica, *Shigella* y *Salmonella*, además de ser patógenos a los que se les ha considerado como los principales causantes de la llamada “diarrea del viajero”, entre otras afecciones (Sullivan and Nord, 2002).

Se realizó un cultivo en 5 mL de caldo APT (DIFCO) de cada aislado y del lactobacilo control a 37°C toda la noche. Al día siguiente se realizaron estrías por

cuadruplicado un área de 1 cm² en una caja con agar APT, la cual se incubó a 37°C hasta el siguiente día.

Simultáneamente a la incubación de los aislados y del lactobacilo comercial, se realizó un cultivo de cada microorganismo patógeno: *E. coli* EPEC, *S. Typhi* ATCC9992 y *S. Typhimurium* ATCC14028 en caldo nutritivo y *L. monocytogenes* en caldo nutritivo + 1% de extracto de levadura incubándose a 37°C toda la noche. Al día siguiente se midió su densidad óptica (D.O) a 600 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer, para después ser ajustada a una $D.O_{600nm}=0.2$ en un volumen de 5 mL de agar suave (caldo nutritivo + 0.3 % de agar bacteriológico). Una vez ajustada la densidad óptica, se procedió a vaciar el agar suave con el microorganismo patógeno sobre la caja con la cepa de bacteria láctica a evaluar previamente crecida. Las cajas se incubaron con la tapa hacia arriba a 37°C durante toda la noche, y al siguiente día se observó la presencia de un halo de inhibición para cada patógeno (Rondon *et al.*, 2000).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 FERMENTACIÓN

Se realizó una fermentación de pulque bajo condiciones de laboratorio a partir de muestras de pulque y aguamiel obtenidos de la localidad de Huitzilac, Morelos. En la Figura 6 se muestra el sistema de fermentación del pulque.

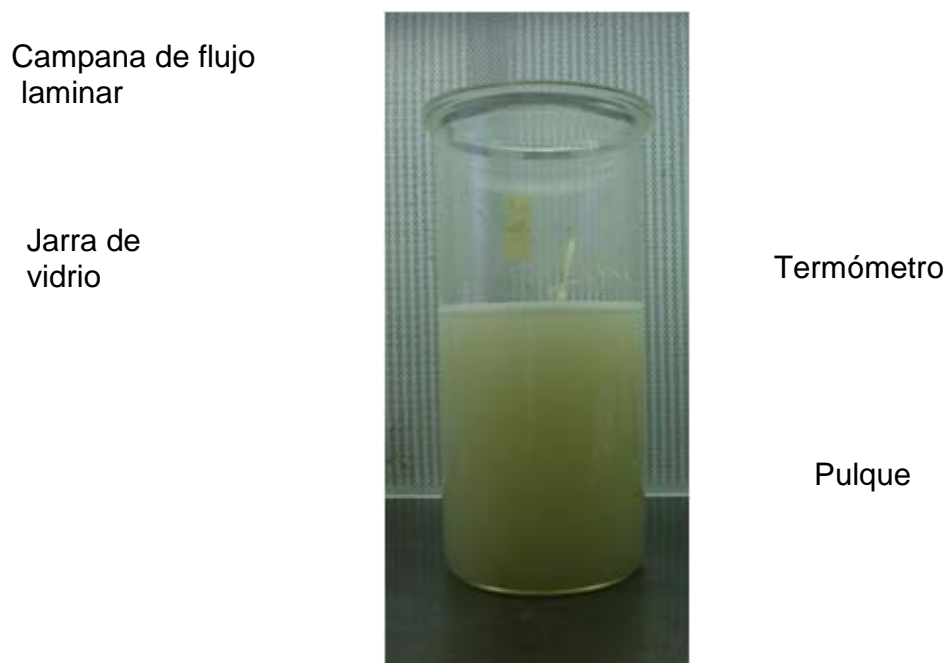


Figura 6. Sistema de fermentación del pulque bajo condiciones de laboratorio.

8.2 PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

Para cada muestra tomada durante la fermentación se midió el pH y la temperatura; los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Medición de parámetros fisicoquímicos

Condición	T (°C)	pH
Pulque	19	4.24
T3	25	4.17
T6	29	4.05

Se observó que la temperatura inicial es de 19° C, la cuál se incrementa conforme transcurre la fermentación, esto debido al incremento de la actividad microbiana durante la fermentación. En cuanto al pH del pulque (inóculo) es de 4.24, el cual va disminuyendo gradualmente, como consecuencia de los productos del metabolismo de los microorganismos como son ácido láctico y ácido acético (Escalante *et al.*, 2008).

8.3 CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE LA FERMENTACIÓN

A partir del inóculo (pulque previamente elaborado), y de las muestras T3 y T6, se llevó a cabo la cuantificación de bacterias lácticas en medio MRS, obteniéndose los siguientes resultados (tabla 4):

Tabla 4. Cuantificación de bacterias lácticas en el pulque (inóculo) y durante la fermentación.

MUESTRA	UFC/mL de muestra
Pulque	$247 \times 10^6 \pm 50.91$
T3	$243 \times 10^6 \pm 1.41$
T6	$147 \times 10^6 \pm 11.31$

Los valores de crecimiento mostrados, son el resultado del promedio de dos réplicas para cada condición.

Se observó que en el pulque y la muestra T3, el número de bacterias lácticas permanece constante, mientras que para T6, se tiene una ligera disminución, esto debido a que la generación de un ambiente ácido creó un ambiente selectivo para microorganismos que toleraron dichas condiciones.

Una vez que se ha llevado a cabo la cuantificación de bacterias ácido lácticas, para cada una de las muestras se procedió a elegir y purificar por duplicado 40 colonias de las cajas representativas que presentaran diversidad morfológica y se conservaron a mediano y largo plazo.

8.4 CARACTERÍSTICAS MORFOCOLONIALES Y PRUEBA DE LA CATALASA

La observación microscópica indicó para todas las cepas aisladas una morfología de diplococos Gram-positivo y para el caso de la cepa comercial se observó una morfología bacilar Gram-positivo.

Al realizar la prueba de la catalasa, todas las cepas aisladas, mostraron ser catalasa negativas.

Ambas características se compaginan con lo reportado en la literatura para bacterias lácticas (Axelsson, 1998).

8.5 SOBREVIVENCIA A CONDICIONES DE ACIDEZ Y SALES BILIARES

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud, (FAO/OMS), han establecido ciertas directrices y recomendaciones para la evaluación de la funcionalidad de probióticos:

- a) Tolerancia a las condiciones gastrointestinales (pH ácido y sales biliares).
- b) Adhesión a las células epiteliales.
- c) Inhibición de microorganismos patógenos. (FAO/WHO, 2002).

Es por ello que en primer lugar se realizó una selección en condiciones ácidas con la finalidad de detectar aquellas cepas resistentes a medio ácido y sales biliares (pH 3.5, 0.3% p/v respectivamente) y posteriormente llevar a cabo su cuantificación.

Éstas condiciones fueron establecidas, por ser en el estómago, donde se presenten las condiciones más extremas de acidez, su pH oscila entre 2.5 a 3.5, pudiendo aumentar hasta 6 después de la ingesta de alimentos, ó disminuir hasta 1.5 durante el ayuno (Masco *et al.*, 2006).

Una vez que las bacterias han logrado sobrevivir las condiciones de acidez, es en el intestino delgado donde se encuentran una segunda barrera, las sales biliares presentes en la bilis en una concentración de aproximadamente 0.35% p/v (De Castro y Pérez, 2006; Ganong,1996).

Todas las cepas presentaron una morfología de diplococos Gram-positivos, además de resultar a la prueba de la catalasa como negativos por carecer de dicha enzima (Carr *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos de la cuantificación antes y después de someterse al medio selectivo se muestran en la Tabla 5.

Se observó que se ha llevado a cabo una selección importante de microorganismos, disminuyendo en varios órdenes de magnitud su viabilidad, tanto a 30° C como a 37° C (Tabla 5). Incluso la cepa comercial también se vió disminuida significativamente su concentración microbiana. Ésta viabilidad indicó que hay cepas que lograron adaptarse al medio ácido desde que se lleva a cabo la fermentación para posteriormente resistir a la confrontación ácida y sales biliares.

Tanto las condiciones extremas de acidez, así como las sales biliares implican un gran desafío al que tienen que enfrentarse los microorganismos para que cumplan uno de los parámetros establecidos para poder considerarse como probióticos.

Tabla 5. Características morfológicas y sobrevivencia de cepas de bacterias lácticas a condiciones de acidez y sales biliares.

Cepa	Características morfológicas	Prueba de la catalasa	Cuantificación (UFC/mL)		
			Antes del reto ácido	Incubación a 30°C después del reto ácido y pH 3.5+0.3%SB	Incubación a 37°C después del reto ácido y pH 3.5+0.3%SB
^a P 4	Diplococos Gram (+)	Negativo	22x10 ⁷	291	0
P 9	Diplococos Gram (+)	Negativo	361x10 ⁸	171	< 30
P 22	Diplococos Gram (+)	Negativo	209 x10 ⁸	0	785
P 31	Diplococos Gram (+)	Negativo	86x10 ⁹	41.5	0
P 45	Diplococos Gram (+)	Negativo	383 x10 ⁸	745	400
P 49	Diplococos Gram (+)	Negativo	128 x10 ⁹	37	0
P 59 ch	Diplococos Gram (+)	Negativo	614 x10 ⁸	0	<30
P 59 g	Diplococos Gram (+)	Negativo	51x10 ⁹	480	0
^b 3h 38	Diplococos Gram (+)	Negativo	189x10 ⁹	13	505
3h 52	Diplococos Gram (+)	Negativo	228x10 ⁹	1520	0
^c 6h 15	Diplococos Gram (+)	Negativo	137x10 ⁹	87.5	32
6h 39	Diplococos Gram (+)	Negativo	164x10 ¹⁰	481	<30
6h 74	Diplococos Gram (+)	Negativo	57x10 ⁹	371	<30
Producto comercial	Bacilos largos Gram (+)	Negativo	386x10 ⁷	450	128

^aP: Pulque previamente fermentado; ^b3h: muestra de 3 horas de fermentación; ^c6h: muestra de 6 horas de fermentación.

8.6 IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS

8.6.1 EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSOMAL

La Figura 7 muestra que el ADN cromosomal extraído presenta buena calidad (no degradado), al observarse una sola banda por encima de 10kb.

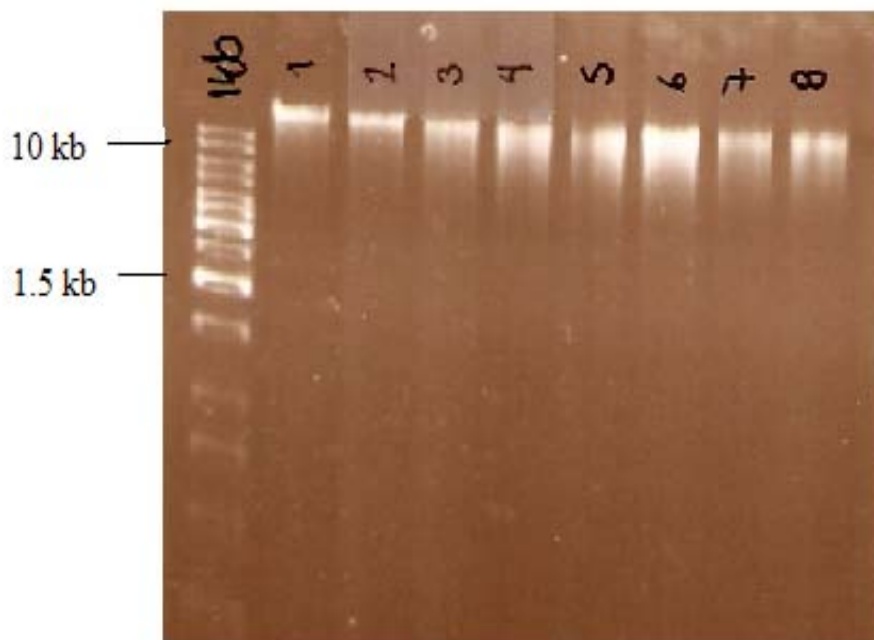


Figura 7. ADN cromosomal. Gel de agarosa al 1%. Carril 1 Kb: marcador de PM 1 kb ladder Fermentas; carril 1: AisladoY3; carril 2: Y4; (Y3 y Y4, corresponden a las cepas comerciales); carril 3: P59G; carril 4:P45; carril 5: P49; carril 6:P59 Ch; carril 7: 6h 74; carril 8: P31. Sólo se muestra la extracción del DNA de algunas cepas con fines ilustrativos.

8.6.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS ADNr 16S

Una vez obtenido el ADN cromosomal de cada una de las 13 cepas resistentes al reto ácido-sales biliares (Tabla 5), se procedió a amplificar el gen ADNr 16S por PCR. Las condiciones utilizadas permitieron la amplificación de un fragmento de 1.5 kb, correspondiente al tamaño esperado (Weisburg *et al.*, 1991) (Figura 8).

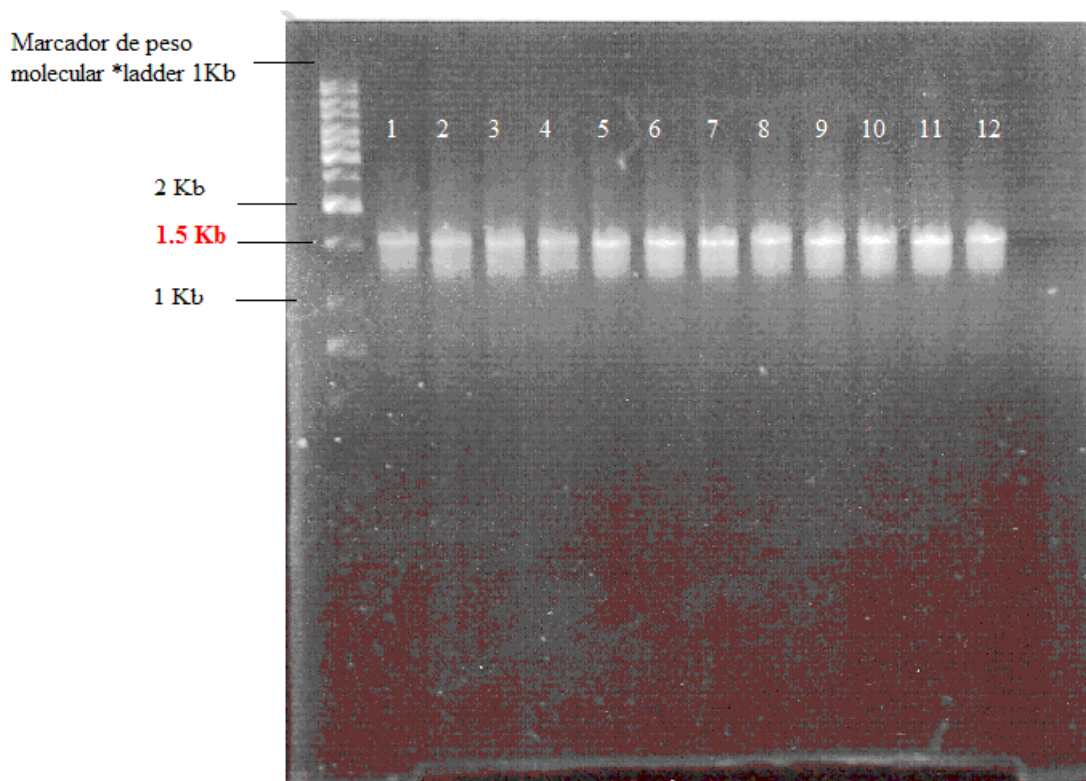


Figura 8. Amplificación por PCR. Gel de agarosa al 1%. Carril 1: Y3; carril 2; Y4; carril 3: P59g; carril 4: P45; carril 5: P59ch; carril 6: 6h74; carril 7: P31; carril 8: 3h52; carril 9: 6h15; carril 10: 6h39; carril 11: P22; carril 12: P49.

8.6.3 ARDRA

Se llevó a cabo el análisis ARDRA a cada uno de los aislados presentados en la Tabla 5. El análisis se realizó con las enzimas *Sau* 3A1 (Figura 9) y *Hae* III (Figura 10).

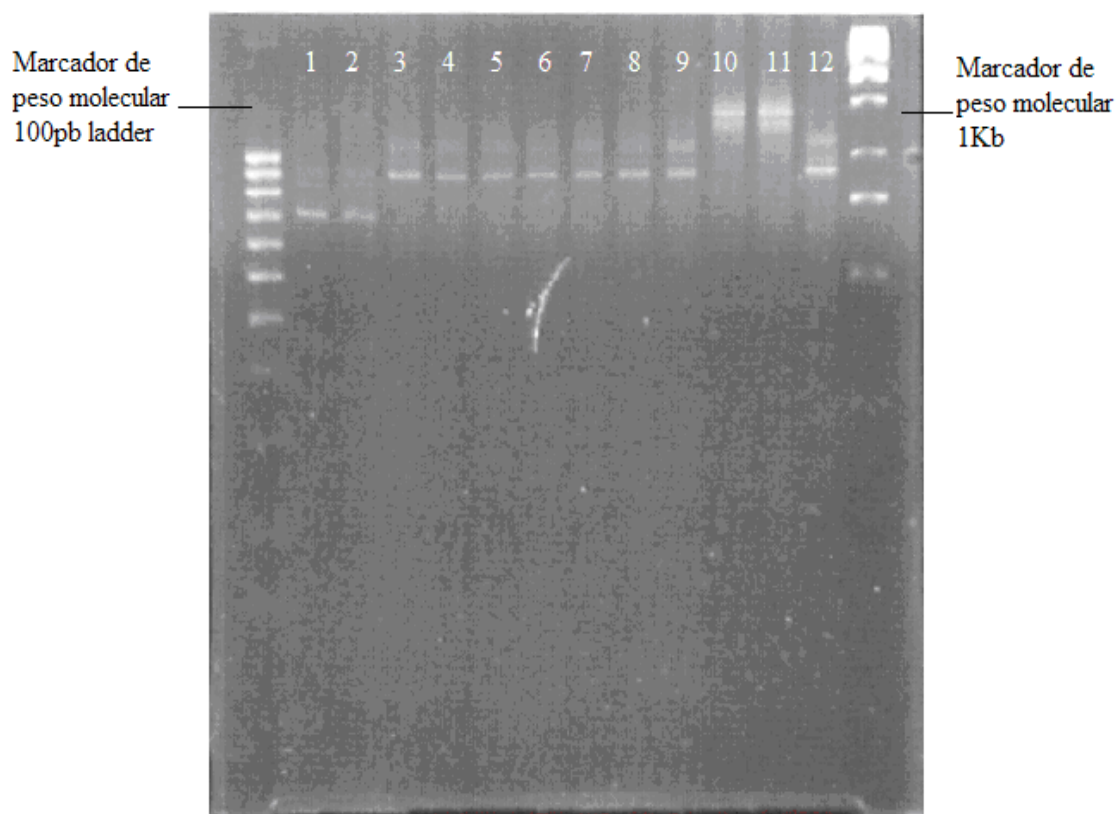


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% del ARDRA con la enzima *Sau* 3A1 de aislados resistentes al reto ácido-sales biliares: Carril 1: Y3; carril 2; Y4; carril 3: P59g; carril 4: P45; carril 5: P49; carril 6: P59ch; carril 7: 6h74; carril 8: P31; carril 9: 3h52; carril 10: 6h15; carril 11: 6h39; carril 12: P22. Se muestra la digestión de algunas cepas con fines ilustrativos.

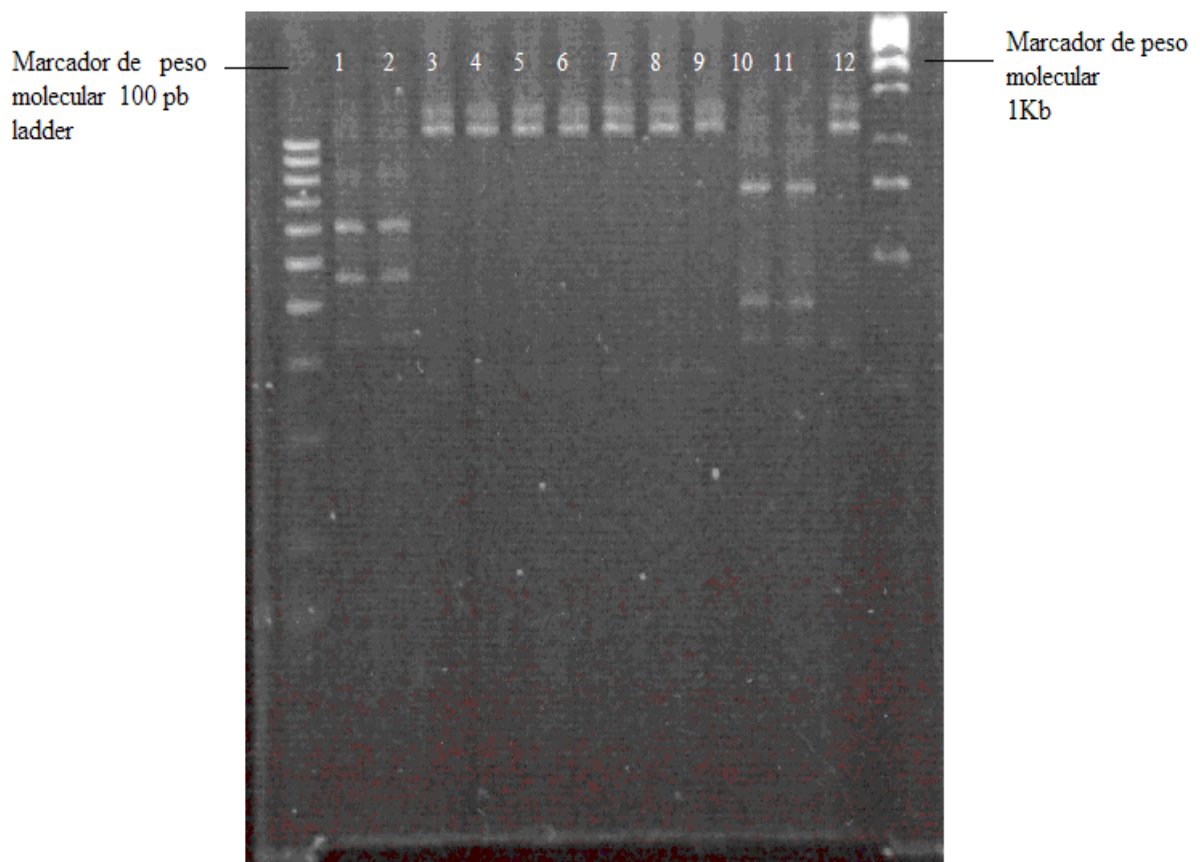


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% del ARDRA con la enzima *Hae* III de aislados resistentes al reto ácido-sales biliares: Carril 1: Y3; carril 2; Y4; carril 3: P59g; carril 4: P45; carril 5: P49; carril 6: P59ch; carril 7: 6h74; carril 8: P31; carril 9: 3h52; carril 10: 6h15; carril 11: 6h39; carril 12: P22. Se muestra la digestión de algunas cepas con fines ilustrativos.

De acuerdo a los perfiles ARDRA obtenidos, tenemos que tanto para la digestión con *Sau* 3A1 y para *Hae* III se distinguen 5 grupos genéticos (Tabla 6).

Tabla 6. Tipos únicos aislados

Tipo único ARDRA	Aislados con el mismo perfil ARDRA
P4	3H38
P9	
P22	
P49	P59, P45, P59 ch, 6H74, P31, 3H52
6H15	6H39

La secuenciación del ADNr 16S de un aislado de cada uno de los grupos ARDRA en la base de datos no redundante del GenBank empleando el programa BLAST, permitió identificar a estos aislados únicos como bacterias lácticas del género *Leuconostoc* (Tabla 7).

Tabla 7. Identidad de aislados únicos con base en el análisis de la secuencia completa del ADNr 16S en la base de datos no redundante del NCBI por medio del programa Blast.

Tipo único ARDRA	Cepas con el mismo perfil ARDRA	Identidad	Identidad (%)	Valor e	No. accesión secuencia con mayor % de identidad
P4	3H 38	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa kimchi 001	99	0	FJ655776.1
P9		<i>Leuconostoc durionis</i> cepa tipo LMG 22556T	95	0	AJ780981.1
P22		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa KIBGE-AA1	99	0	GU216257.1
P49	P59, P45, P59 ch, 6H74, P31, 3H52	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa kimchi 001	99	0	FJ656776.1
6H15	6H39	<i>Leuconostoc durionis</i> cepa tipo LMG 22556T	98	0	AJ780981.1

La identidad seleccionada para cada cepa aislada fue elegida de acuerdo al mayor porcentaje de identidad mostrado en el análisis de la secuencia en la base de datos del GenBank, este porcentaje nos indica que de todas las bases analizadas cuantas sí corresponden a la identidad del microorganismo depositado en ésta base de datos; mientras que el valor e , es un parámetro que nos indica la probabilidad al que esta identificación se haya efectuado al azar, entonces, entre mayor sea el porcentaje de identidad y el valor e se encuentre más cercano a 0, el resultado obtenido es más confiable. El análisis filogenético (Figura 11), permitió observar que la identidad obtenida en el análisis BLAST corresponde con la posición de las secuencias en el árbol filogenético, tomando como referencia secuencias conocidas obtenidas de la base de datos del genBank.

Figura 11. Árbol filogenético por Neighbor - Joining de aislados del pulque únicos con potencial probiótico. Los valores numéricos mostrados en las ramas corresponden al número de veces que se mantiene la topología de las ramas sobre 1000 grupos analizados en el paquete Phylip (análisis bootstrap). La secuencia de *Lactobacillus casei* cepa MB65, se utilizó como grupo externo.

8.7 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA POR EL SISTEMA API 50 CH

La identificación bioquímica por medio del sistema API 50CH de cada uno de los tipos ARDRA y el análisis del perfil de fermentación (Figura 12) para cada una de las cepas en el programa APIweb de BioMérieux permitió identificar a los aislados como diferentes especies del género *Leuconostoc* (Tabla 8).

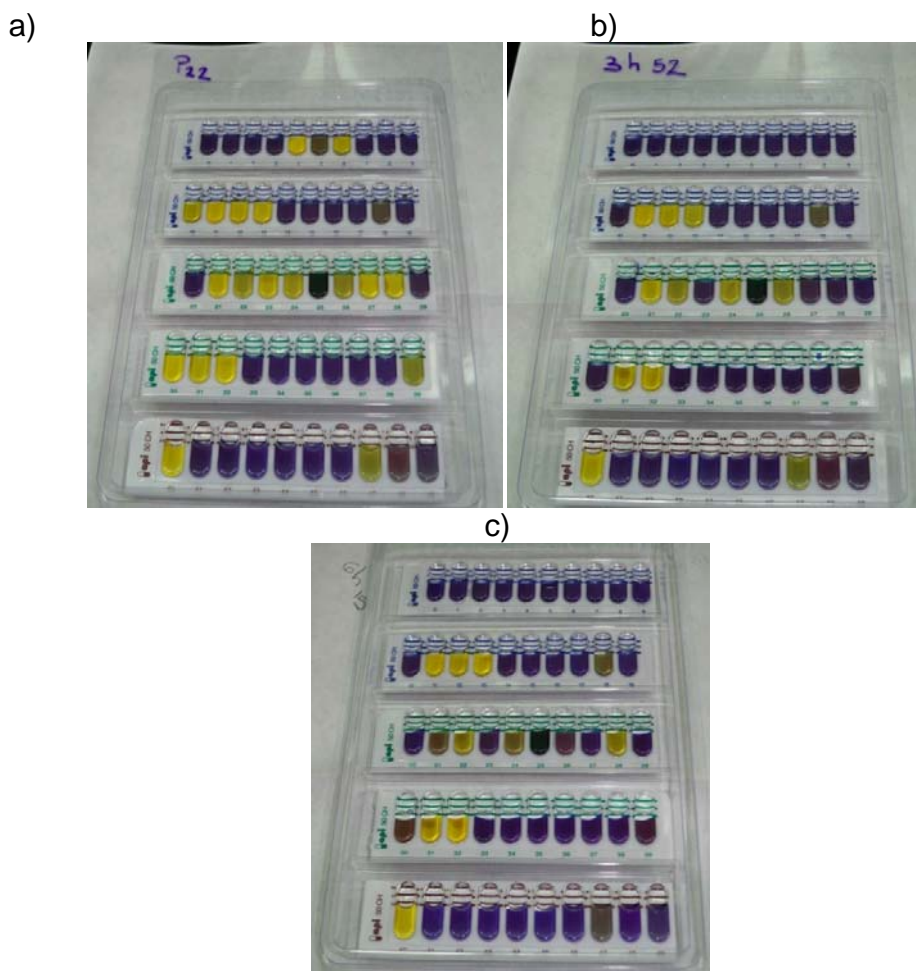


Figura 12. Patrón de fermentación de la galería API 50CH para algunos de los diferentes aislados identificados. a)Corresponde a la cepa aislada del pulque como inóculo; b) cepa aislada al tiempo 3 horas de fermentación; c) cepa aislada a las 6 horas de fermentación.

Tabla 8 . Identificación bioquímica de tipos ARDRA únicos por medio del sistema API 50CH.

Tipo ARDRA	Identificación fenotípica	% ID	Calidad de identificación
P4	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	76.1	Buena
P9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i>	99.6	Dudoso
P22	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i>	98.9	Buena
P49	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i>	94.6	Buena
6H15	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i>	98.7	Buena

El porcentaje de identidad obtenido para cada una de las cepas, nos refleja el porcentaje de identificación (probabilidad de la identificación de especies) y el índice de tipicidad (carácter típico del perfil estudiado). Los resultados obtenidos son considerados como buenos, sin embargo, una desventaja importante mostrada por los métodos de identificación fenotípicos es que la posible identidad del aislado a identificar se hace con relación a una base de datos conformada por microorganismos de referencia (limitada). Esta situación tiene como consecuencia que cuando se trata de un aislado de fuentes (origen) distintas de las que provienen las cepas de referencia, el programa, asigna una identidad basada en esta base de datos "limitada", siendo de poca precisión cuando se trata de aislados nuevos, no reportados previamente. El uso de técnicas moleculares de identificación complementarias a los métodos fenotípicos permite evitar la posible ambigüedad en la identificación de nuevos aislados de muestras ambientales. El perfil de fermentación para cada cepa se muestra en el apéndice 2.

Tabla 9. Identidad de los tipos ARDRA únicos determinada por análisis de secuencias de ARNr 16S y por el sistema API 50CH

Tipo único ARDRA	P4	P9	P22	P49	6H15
Identidad por ADNr 16S	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa kimchi 001	<i>Leuconostoc durionis</i> cepa tipo LMG 22556T	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa KIBGE-AA1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa kimchi 001	<i>Leuconostoc durionis</i> cepa tipo LMG 22556T
Identidad bioquímica (API 50CH)	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides/dextranicum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i>

El género *Leuconostoc* encontrado en este estudio, se caracteriza por ser cocos heterofermentadores que producen compuestos saborizantes como diacetilo o acetoina, productos del catabolismo del citrato. Las bacterias del género *Leuconostoc* resultan ser de gran importancia a nivel económico por atribuírseles diversas funciones, entre las que se encuentran: la fermentación de productos alimenticios, producción de CO₂ en quesos, producción de aromas y sabores en diversos productos lácteos, producción de dextranas y levanas útiles en la industria alimenticia así como en la clínica, y el más importante para fines de éste proyecto es el papel que juegan en los alimentos funcionales (Stiles and Holzapfel, 1997; Hemme and Foucaud, 2004).

L. mesenteroides, generalmente es el primer organismo en crecer en alimentos fermentados de origen vegetal (Stiles and Holzapfel, 1997). En el caso del pulque, éste microorganismo es el posible que sea el encargado de producir el aroma y sabor característico, además de textura por la producción de la dextrana, exopolisacárido que proporciona la viscosidad en dicho producto fermentado (Escalante *et al.*, 2004; Hemme and Foucaud, 2004)

L. durionis, es una BAL que ha sido aislada del tempoyak, que es un condimento fermentado de la localidad de Malasia, el cual está hecho a base de la fermentación de la pulpa del durián que es un fruto nativo del sudeste de Asia. (Leisner *et al.*, 2005).

L. kimchii, ha sido aislado de productos vegetales típicos de la gastronomía de Corea, llamado kimchi, que utiliza como ingrediente básico a la col china, rábanos y pepinos, a éste platillo se le han asociado ciertos beneficios a la salud, como son

incrementar las defensas en el organismo, propiedades antioxidantes y ayudar a eliminar el colesterol (Kim *et al.*,2000).

8.8 RETOS MICROBIANOS

A cada una de las cepas de bacterias lácticas resistentes a las condiciones selectivas (pH ácido y sales biliares) se les evaluó su capacidad antimicrobiana, de manera cualitativa contra los siguientes microorganismos patógenos: *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) cepa 2348/69 (Treviño *et al.*, 2007), *Listeria monocytogenes* de la colección del Cepario de la Facultad de Química, *S. Typhi* ATCC9992 y *S. Typhimurium* ATCC14028.

Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 13-16.

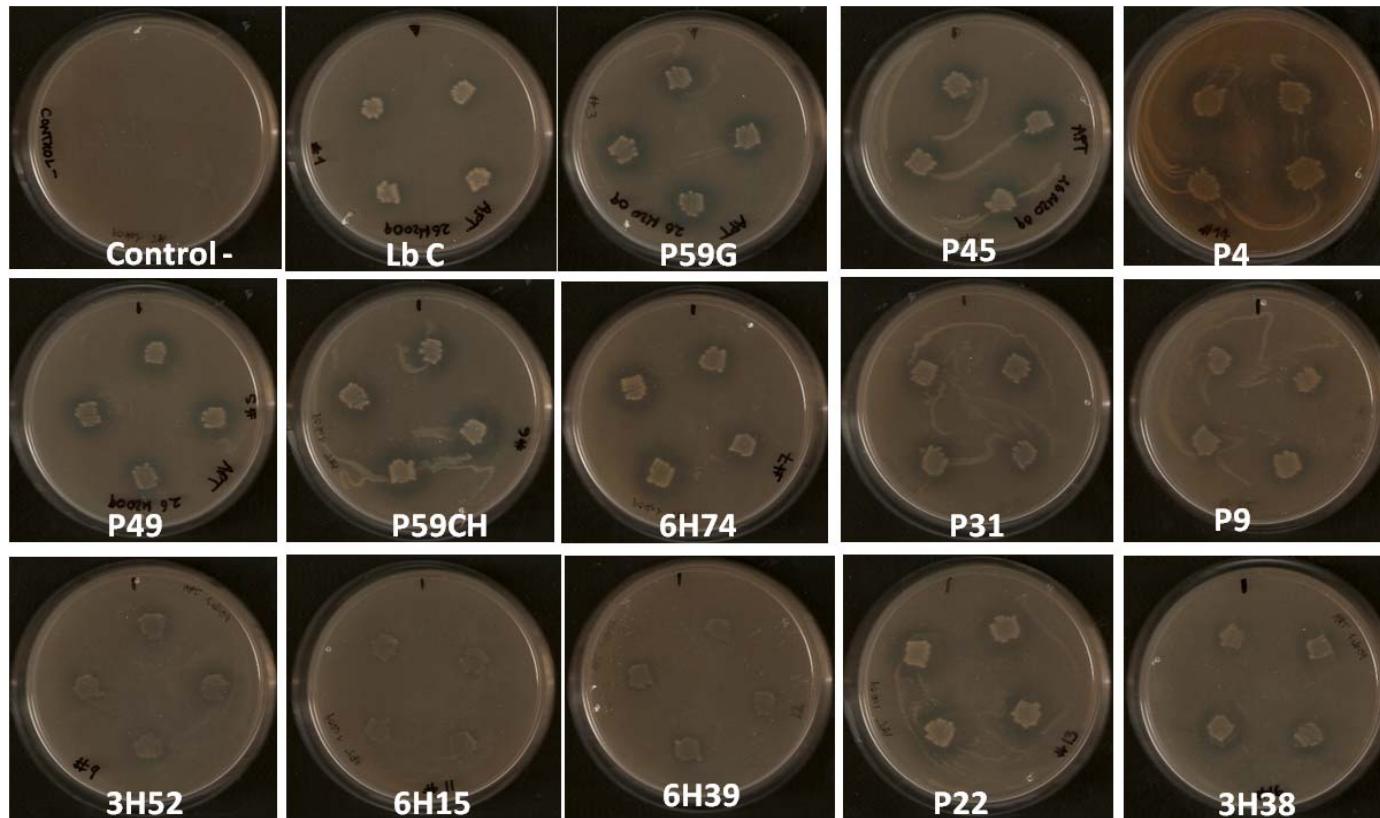


Figura 13. Reto antimicrobiano de LAB aisladas del pulque con capacidad probiótica potencial contra *E. coli* EPEC cepa 2348/69. *Control* - microorganismo patógeno sin bacterias lácticas. *LbC*, lactobacilo probiótico comercial.

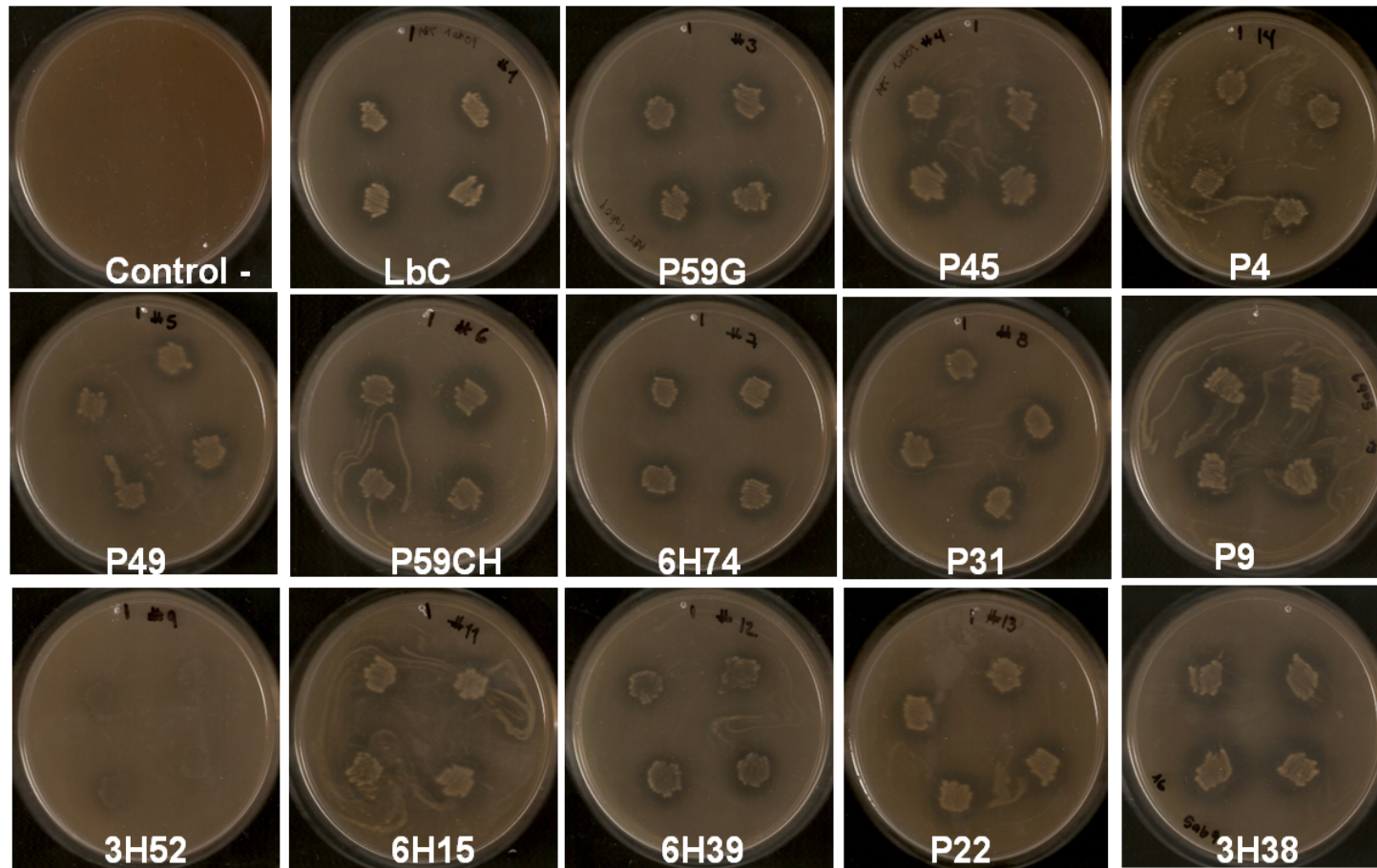


Figura 14. Reto antimicrobiano de LAB aisladas del pulque con capacidad probiótica potencial contra *Listeria monocytogenes*. *Control* - microorganismo patógeno sin bacterias lácticas. *LbC*, lactobacilo probiótico comercial.

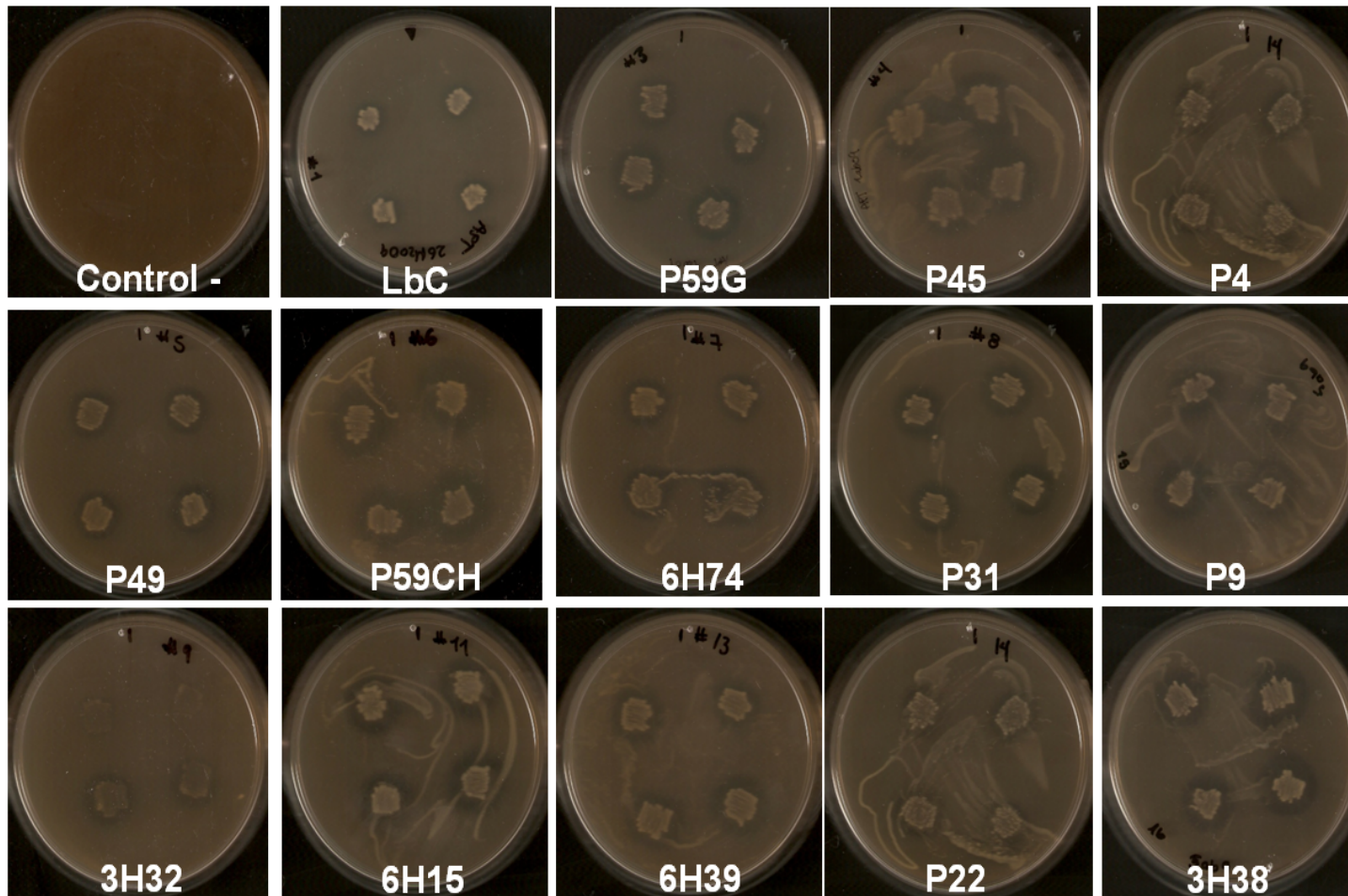


Figura 15. Reto antimicrobiano de LAB aisladas del pulque con capacidad probiótica potencial contra *Salmonella enterica enterica* Thypi ATCC9992 . *Control - microorganismo patógeno sin bacterias lácticas. LbC, lactobacilo probiótico comercial.*

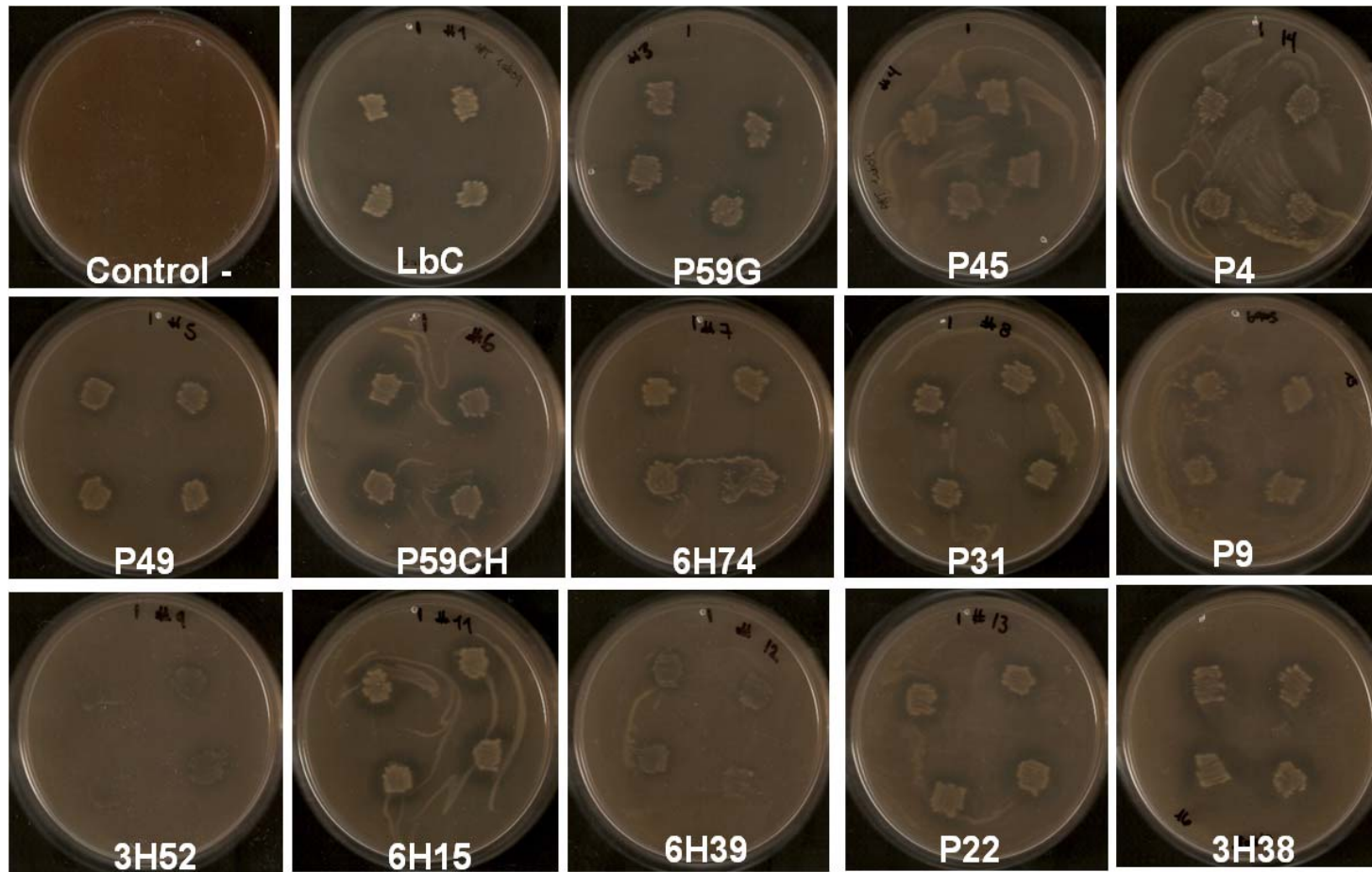


Figura 16. Reto antimicrobiano de LAB aisladas del pulque con capacidad probiótica potencial contra *Salmonella enterica enterica* Typhimurium ATCC14028. *Control* - microorganismo patógeno sin bacterias lácticas. *LbC*, *lactobacilo probiótico comercial*.

En los retos antimicrobianos se observó que todas las bacterias lácticas aisladas y la bacteria probiótica comercial fueron capaces de inhibir a todos los microorganismos patógenos analizados. Sin embargo, se observaron diferencias importantes en los resultados. El halo de inhibición mostrado por la bacteria probiótica comercial es en todos los casos, menor que cualquiera de los halos de inhibición producidos por las cepas aisladas del pulque. Es importante destacar que de acuerdo a los resultados arrojado por el ARDRA, varias cepas que pertenecen al mismo grupo, presentaron diferencias en el tamaño del halo de inhibición producido, lo cual puede ser el resultado de la concentración del metabolito antimicrobiano producido o bien, resultado de una posible variación de la capacidad antimicrobiana de cada cepa.

En la tabla 10 se muestra un resumen de los resultados del efecto antimicrobiano de cada uno de las bacterias lácticas aisladas del pulque y de la cepa probiótica comercial. Se observa que existió una correlación entre las dos cepas (P45 y 3h38) que presentaron una mayor sobrevivencia al reto ácido-sales biliares con la capacidad de generar un mayor halo de inhibición contra todos los microorganismos patógenos ensayados. Este resultado sugiere que estas microorganismos identificados como *Leuconostoc kimchii* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* presentan un potencial muy importante como posibles probióticos.

Para el caso de P31, P59ch y P59g, se observaron muy buenos halos de inhibición, pero la sobrevivencia al pH ácido y sales biliares es muy baja o no detectable, aún siendo identificada como *Leuconostoc kimchii*, esto indica que se

deberán reevaluar dichas cepas partiendo del mismo título antes de someterse al reto *in vitro*.

Considerando que las bacterias lácticas del género *Leuconostoc* juegan un papel importante en los alimentos funcionales, hay evidencias que demuestran la capacidad probiótica de especies de éste género, una de ellas es el conocimiento del mecanismo por el cual se da la inhibición de *Leuconostoc* contra microorganismos patógenos que es atribuido a los productos de degradación del metabolismo de carbohidratos y del citrato, entre los que se encuentran ácidos orgánicos como el ácido láctico y el acético, que afectan a la membrana celular; además que en presencia de oxígeno, *Leuconostoc* sp. acumula el peróxido de hidrógeno que inhibe el crecimiento de algunos microorganismos (Hemme and Foucaud, 2004).

Por otro lado, diversas cepas de *Leuconostoc* sp. tienen la capacidad de producir bacteriocinas, que son productos resultado del metabolismo de las bacterias lácticas, siendo un grupo de proteínas o péptidos biológicamente activos contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora (Klaenhammer, 1988).

Diversos estudios han demostrado la producción de bacteriocinas de la clase II, subclase IIa, por diversas especies de *Leuconostoc* que presentan actividad contra *Listeria monocytogenes* (Xiraphi, et al., 2008). El tamaño de las bacteriocinas de la clase II varía de entre 30 a 60 aminoácidos, son estables al calor y no contienen lantionina en su composición. La subclase IIa, es una de las 3 clases en que se subclasifican este tipo de bacteriocinas, siendo este el grupo

más grande sus miembros se distinguen por tener una secuencia amino terminal conservada y una actividad compartida contra *Listeria*. Las bacteriocinas de clase II actúan a través de la formación de poros en la membrana citoplasmática. Algunos ejemplos incluyen la pediocina AcH, la sakacina A y la leucocina A (Klaenhammer, 1988).

Otra evidencia mostrada por *L. mesenteroides*, como microorganismo benéfico hacia la salud, se presentó en India, al mostrar la reducción de cuadros diarreicos presentados en niños al consumir leche fermentada que contenía *L. mesenteroides* (Agarwal and Bhasin, 2002).

Debido a las diferentes evidencias y los resultados obtenidos, se puede hacer notar que *Leuconostoc mesenteroides*, además de ser el responsable de iniciar la fermentación en muchos productos vegetales, proporcionar aromas y sabores agradables y característicos del producto, así como textura, presenta alto potencial para ser un microorganismos con efectos benéficos tanto para la conservación de productos como para la salud del consumidor.

Tabla 10. Supervivencia a pH 3.5+0.3% SB a 37°C y análisis cualitativo del efecto antimicrobiano de aislados de bacterias lácticas del pulque.

Aislado	Identidad ^a	Supervivencia a reto <i>In vitro</i> ^b (UFC/mL)	Efecto antimicrobiano			
			<i>E. coli</i> (EPEC)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. Typhi</i>	<i>S. Typhimurium</i>
Cepa comercial	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	128	+	++	+	+
P4	<i>Leuconostoc kimchi</i>	No detectadas	++++	++	++	++
P9	<i>Leuconostoc durionis</i>	<25	++	++++	+++	++
P22	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	79	+++	++	+	++
P31	<i>Leuconostoc kimchi</i>	No detectadas	+++	+++	+++	+++
P45	<i>Leuconostoc kimchi</i>	400	+++	++++	++++	++++
P49	<i>Leuconostoc kimchi</i>	No detectadas	++	++	++	+++
P59 ch	<i>Leuconostoc kimchi</i>	<25	+++	++++	++++	++++
P59 g	<i>Leuconostoc kimchi</i>	No detectadas	+++	+++	+++	++++
3h38	<i>Leuconostoc kimchi</i>	51	++	+++	+++	++
3h52	<i>Leuconostoc kimchi</i>	No detectadas	+	+	++	+
6h15	<i>Leuconostoc durionis</i>	32	+	+	+++	+++
6h39	<i>Leuconostoc durionis</i>	<25	+	+	+	+
6h74	<i>Leuconostoc kimchi</i>	<25	++	++	++	++

^a Por análisis de secuencia de ADNr 16S, ^b pH 3.5+sales biliares, 37°C

+ Poca inhibición

++ Regular inhibición

+++ Bastante inhibición

++++ La mejor inhibición

9. CONCLUSIONES

- Se aislaron 13 bacterias lácticas del pulque resistentes a condiciones *in vitro* simuladoras del tracto gastrointestinal (pH 3.5 y 0.3% sales biliares).
- Los aislados pertenecen a cinco grupos genótipicamente distintos identificados como *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc durionis* y *Leuconostoc kimchi*, mostrando que no existe una correlación entre la especie obtenida por esta identidad y la obtenida por métodos bioquímicos.
- Se observó que para todos los aislados, hay una capacidad antagónica contra las bacterias patogénicas *E. coli* EPEC, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica enterica* Typhi y *Salmonella enterica enterica* Typhimurium, detectándose dos cepas P45: *Leuconostoc mesenteroides* y 3h38: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* con una mayor capacidad de inhibición, incluso mayor a la observada en la cepa probiótica comercial.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar los retos antimicrobianos *in vitro* de manera cuantitativa.
- Realizar retos antimicrobianos contra *Helicobacter pylori* y *Clostridium difficile*.
- Evaluar la capacidad de inhibición contra patógenos de manera *in vivo*.
- Identificar y cuantificar los posibles metabolitos o productos que tienen capacidad antimicrobiana (bacteriocinas, ácido láctico, peróxido de hidrógeno, etc.).
- Realizar estudios *in vivo* e *in vitro* del papel de la adherencia de cepas aisladas por producción de exopolisacáridos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, N. and Bhasin, K. (2002). Feasibility studies to control acute diarrhoean in children by feeding fermented milk preparations Actimel and Dahi. *European Journal of Clinical Nutrition* **56**: S56–S59.
- Alvarez M. and Oberhelman R. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Diseases* **32**: 1567-1576
- Amores R., Calvo A., Maestre J.R., Martínez-Hernández D. (2004). Probióticos. *Revista Española de Quimioterapia*. **17**:131-139.
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional Aspects*. Ed. Marcel Dekker. New York. 1-72.
- Ballongue, J. (1992). Bifidobacteria and probiotic action. En: Salminen S. and von Wright A. (Eds.) *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional Aspects*. Ed. Marcel Dekker. New York. pp:519-587
- Carr, F., Chill, D. and Maida N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology* **28**: 281-370.
- Cervantes M. y Marina A. (2007). El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopía de Raman. *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas* **8**: 135-146.

- Commane, D., Hughes, R., Shortt, C. and Rowland. I. (2005). The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutation Research* **591**: 276-289.
- De Castro, S. y Pérez, J.L. (2006). Fisiopatología y patogenia general del aparato digestivo. En De Castro, S. y Pérez, J.L. *Manual de Patología General*. MASSON, Barcelona España 6ª edición. pp 338-345.
- Donohue, D., Salminen, S. and Marteau. (1998). Safety of probiotic bacteria. En: Salminen S. and von Wright A. (Eds.) *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional Aspects*. Ed. Marcel Dekker. New York. 369-383.
- Doores S. (1993). Organic acids. En: Davidson P. and Larry A. (Eds.) *Antimicrobials in foods*. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Escalante A., Rodríguez M., Martínez A., López-Munguía A., Bolívar F., Gosset G. (2004). Characterization of bacterial Diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA análisis. *FEMS Microbiology Letters* **235**: 273-279.
- Escalante, A., Giles- Gómez M., Hernández G., Córdova- Aguilar M., López-Munguía A., Gosset G., Bolívar F. (2008). Analysis of bacteria community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach, *International Journal of Food Microbiology* **124**:126-134.
- FAO/WHO. (2002). Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada.

- Favela, E. (1993). Producción de alcohol en *Zymomonas mobilis*. En García-Garibay M., Quintero-Ramírez R., López Munguía A. (Eds). Biotecnología Alimentaria. LIMUSA, México D.F pp 617-636.
- Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. Journal Applied Bacteriology **66**: 365-378.
- Ganong, W. (1996). Regulación de la función gastrointestinal. En: Ganong, W. Fisiología Médica. El Manual Moderno. México D.F. pp: 517-519
- García-Garibay, M, y López-Munguía, A. (1993). Bebidas alcohólicas no destiladas. En: García-Garibay, M., Quintero-Ramírez, R. y López-Munguía, A. (Eds). Biotecnología Alimentaria. Limusa. México D.F. pp 263-311.
- Havenaar, R. and Huis, J. (1992). Probiotics: A general View. En: Wood, B. (Ed). The Lactic Acid Bacteria Volume 1. The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Elsevier APPLIED SCIENCE. London and New York. pp. 151-170
- Hemme, D. and Foucaud, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. International Dairy Journal **14**:467-494.
- Isolauri, E., Salminen, E. and Salminen S. (1998). Lactic acid bacteria and immune modulation. En: Salminen S. and von Wright A. (Eds.) Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional Aspects. Ed. Marcel Dekker. New York: 255-267.

- Kim, J., Chun, J. and Han HU. (2000). *Leuconostoc kimchii* sp. Nov., a new species from kimchi. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **50**:1915-1919.
- Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie **70**:337-349.
- Leisner, J.J., Vancanneyt, M., Van der Meulen, R., Lefebvre, K., Engelbeen, B., Hoste, B., Laursen, B.G., Bay, L., Rusul, G., De Vuyst L. and Swings, J. (2005). *Leuconostoc durionis* sp. nov., a heterofermenter with no detectable gas production from glucose. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **55**:1267-1270.
- Lilly D. and Stillwell R. (1965). Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. Science **147**:747-748.
- Loyola M., (1956). Cultivo y explotación del maguey. En: Loyola M., La Industria del pulque, Banco de México, S.A. Departamento de Investigaciones Industriales. México D.F. pp 10-20.
- Masco, L., Crockaert, C., Van Hoorde K., Swings, J. and Huys, G. (2007). In vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin. Journal of Dairy Science **9**:3572-3578.
- Mattila-Sandholm T., Myll P., Crittenden R., Mogensen G., Fond R., Saarelaa M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods, International Dairy Journal **12**: 173-182.
- Muñoz-Rojas, J. (2008). Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el

futuro humano. En: Martínez, E. y Martínez, J. Eds. Microbiología en línea, [http: www.microbiología.org-mx/microbiosenlínea](http://www.microbiología.org-mx/microbiosenlínea).

- Narro, J., Gutiérrez, H., López, M. (1998). Cirrosis hepática. En: Ávila, M. E., Cabrera, F., Echeverría, L., Gómez, C., Medina, M. E. Melo, G. T., Ybarra, I. Eds. Beber de tierra generosa. Ciencia de las bebidas alcohólicas en México. FISAC. México, D. F.: 58-71.
- Ouwehand, C. A. (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: Salminen S. and von Wright A. (Eds.) Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional Aspects. Ed. Marcel Dekker. New York. pp: 139-159.
- Ouwehand, A., Kirjavainen, P., Shortt, C., and Salminen, S., (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. International Dairy Journal **9**: 43-52.
- Pfeiler E. and Klaenhammer T. (2007). The genomics of lactic acid bacteria. TRENDS in Microbiology **15**: 546-553.
- Rondon, M. R., P. R. August, A. D. Bettermann, S. F. Brady, T. H. Grossman, M. R. Liles, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, I. A. MacNeil, C. Minor, C. L. Tiong, M. Gilman, M. S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman, R. M. Goodman. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Applied and Environmental Microbiology **66**: 2541–2547.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. and Mattila-Sandholm T., (2000). Probiotic bacteria:safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology **84**: 197-215.

- Sablon, E., Contreras, B. and Vandamme. (2000). Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria : mode of action, genetics and biosynthesis. *Advances in Biotechnology Engineering/Biotechnology* **68**: 21-60
- Sánchez-Marroquín, A. and Hope, P.H. (1953). Agave juice. Fermentation and chemical composition of some species. *Agricultural and Food Chemistry* **1**: 246–249.
- Schleifer, K., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W. and Ammann, R. (1995). Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **5**: 1081-1094.
- Shah N.P. (2000). Probiotic Bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. Symposium: Probiotic Bacteria. *Journal of Dairy Science* **83**: 894-907.
- Stiles M. and Holzapfel W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* **36**: 1-29.
- Sullivan, Å. and Nord, C.E. (2002). The place of probiotics in human intestinal infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* **20**:313-319.
- Treviño, LG., Escalante, A., Caro, AD., Martínez A., González R., Puente JL., Bolívar F. and Gosset, G. (2007). Phosphotransferase system dependent sucrose utilization regulon in enteropathogenic *Escherichia coli* strains is located in a variable chromosomal region containing the *IAP*

sequences. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **13**:117-125

- Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D. and Lane, D. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703.
- Xiraphi, N., Georgalaki, M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Tsakalidou, E. and Drosinos, E. (2008). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E 13. *Meat Science* **80**:194-203.
- Zaldívar M. (2002). El sistema inmunológico de las mucosas. *Revista Cubana de Medicina General Integral* **18(5)**:352-354

12. APÉNDICE 1

Sistema API50CH

El API 50CH es un sistema estandarizado compuesto por 50 sustratos y empleado para el estudio del metabolismo de carbohidratos en bacterias ácido lácticas.

La galería API 50CH está compuesta por 50 microtubos y permite el estudio de la capacidad de fermentación de carbohidratos y derivados (heterosidos, polialcoholes, ácidos urónicos). La galería una vez que es inoculada, se incuba a 30°C y los resultados se interpretan a las 24 y 48 horas, conforme a las indicaciones recomendadas por el fabricante, anotando en las hojas de resultados como positivo (cambio de color a amarillo, se realizó la fermentación), negativo (color morado, parecido al control, no se efectuó la fermentación) o dudoso (cambio de color dudoso); estos cambio de color se deben 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 (Figura 17).



Figura 17. Galería API 50CH. Izquierda: ensayos negativos; derecha: ensayos positivos; cúpula 1 control negativo.

A continuación se muestra la composición de la galería API 50CH:

Composición de la galería API 50CH

Principio Activo	Ensayo	Tubo
Testigo		0
Glicerol	GLY	1
Eritritol	ERY	2
D-arabinosa	DARA	3
L-arabinosa	LARA	4
D-ribosa	RIB	5
D-xilosa	DXYL	6
L-xilosa	LXYL	7
D-adonitol	ADO	8
Metil-beta-D-xilopiranososa	MDX	9
D-galactosa	GAL	10
D-glucosa	GLU	11
D-fructosa	FRU	12
D-mannosa	MNE	13
L-sorbosa	SBE	14
L-rhamnosa	RHA	15
Dulcitol	DUL	16
Inositol	INO	17
D-manitol	MAN	18
D-sorbitol	SOR	19
Metil-alfa-D-manopiranososa	MDM	20
Metil-alfa-D-glucopiranososa	MDG	21
N-acetilglucosamina	NAG	22
Amigdalina	AMY	23
Arbutina	ARB	24
Esculina citrato férrico	ESC	25

Principio activo	Ensayo	Tubo
Salicina	SAL	26
D-celobiosa	CEL	27
D-maltosa	MAL	28
D-lactosa	LAC	29
D-melibiosa	MEL	30
D-sacarosa	SAC	31
D-trehalosa	TRE	32
Inulina	INU	33
D-melezitosa	MLZ	34
D-rafinosa	RAF	35
Almidón	AMD	36
Glicógeno	GLYG	37
Xilitol	XLT	38
Gentiobiosa	GEN	39
D-turanosa	TUR	40
D-xilosa	LYX	41
D-tagatosa	TAG	42
D-fucosa	DFUC	43
L-fucosa	LFUC	44
D-arabitol	DARL	45
L-arabitol	LARL	46
Gluconato potásico	GNT	47
2-cetogluconato potásico	2KG	48
5-cetogluconato potásico	5KG	49

APÉNDICE 2

Perfil de fermentación de carbohidratos para cada cepa seleccionada.

Tipo único	Sustrato																									
	Testigo	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	
P4	+	+
P9	+	.	+	.	.	.	+	.	.	+	+	.	+	+
P22	+	+	+	.	.	.	+	+	+	+	+	.	.	+	+	+	+
P49	+	+	+	+	+	.	.	+	+	.	+
6H15	+	+	+	.	.	+	+	.	+
	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG	
P4
P9	+	.	+	+	.	+	+	+	+
P22	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	+	.	.	.
P49	+	+	.	+	+	+	+	+	+
6H15	+	+	+	.	+	+	+	+	+	+	.	.	.