

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA DE BACTERIAS LÁCTICAS
AISLADAS DEL PULQUE.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

MATUS ACUÑA VIOLETA

MÉXICO, D.F.

AÑO 2011



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 ASIGANDO:

PRESIDENTE	Profesor: MARÍA MERCEDES PALAO RINCON
VOCAL	Profesor: J. ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS
SECRETARIO	Profesor: JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA
1er. SUPLENTE	Profesor: MARTHA GILES GOMEZ
2do. SUPLENTE	Profesor: GUILLERMO CELESTINO CARDOSO SALDAÑA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

INST. DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM. DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
CALULAR Y BIOCATALISIS

ASESOR DEL TEMA

DR. JOSE ADELFO ESCALANTE LOZADA

SUSTENTANTE (S):

MATUS ACUÑA VIOLETA

Este trabajo contó con el financiamiento del proyecto PAPIIT DGAPA-UNAM IN224110-2.

Agradecimientos:

Agradezco a la UNAM por ser la casa de estudios en donde adquirí todos mis conocimientos no solo profesionales, si no también culturales, educativos y humanos que me han formado como ser humano.

Agradezco a Adelfo por ser el salvavidas que necesitaba después de la carrera, por dirigir mi vida hacía un puerto, por todos sus conocimientos, su sabiduría, su tiempo, su paciencia, sus consejos y su apoyo incondicional, por ser simplemente una gran persona.

A su esposa Martha Giles por el apoyo y los consejos que me brindó durante mi trabajo y por sembrar la semilla que me llevó a la biotecnología.

Así como a la MVZ Elizabeth Mata Moreno del Bioterio del IBT, UNAM por su apoyo en el trabajo con los ratones BALB/c utilizados en este trabajo, por sus consejos en esta etapa crucial del trabajo, su paciencia y su inmensa amabilidad.

Agradezco a Mercedes Palao y Eleazar Martínez por el tiempo que le dedicaron a leer este trabajo, por sus observaciones y su paciencia.

A mi queridas amigas con las que compartí todas esas experiencias que nunca olvidaremos, los desvelos, los enojos, las risas, las tristezas, el estrés. Por cada lagrima y risa derramada en cuatro años, años que marcan la vida de una persona, que nos hacen quienes somos en estos momentos. Gracias; Itzel por ser la estrellita que me acompañó durante estos años ,Carmen por se la sabiduría y el ejemplo a seguir, Andrea por ser siempre tan paciente y sabia.

Dedicatorias.

Madre. El mundo puede llegar a ser muy solitario, agresivo y a veces incomprendido, pero contigo a mi lado estas cosas las puedo tolerar, por que eres la persona que siempre ha estado a mi lado, me ha brindado apoyo en todos esos momentos de tristeza, enojo, preocupación, tu alma es algo impresionante, llena de bondad, de comprensión, de cariño, yo no se que sería sin ti, sin ese abrazo que nunca me niegas, sin ese calor que siempre irradian.

Papá. El poder estar a tu lado y sentirme comprendida, el poder compartir mi mundo contigo es lo que me hace sonreír cada día, es una sensación de tranquilidad que cargo conmigo todos los días de mi vida, gracias por todo lo que me has dado, por tener siempre fe en mi, por creer en mi cuando a veces ni siquiera yo lo hago, por hacerme reír y compartir tus locuras con las mías, gracias por ser sincero, por hacerme ver mis caprichos, por regañarme cuando lo merezco, gracias por estar siempre ahí.

Uli. Que puedo decir, has sido y serás siempre mi guía esa conciencia que me guía en cada acción que hago, eres la mano que nunca se cansa de dar, eres la persona que me conoce más, que esta en cada palabra que digo, eres una sombra que nunca se aleja de mi, gracias por ser las alas de mi vuelo.

Ixchel. Alguien una vez me pregunto que era de lo que me sentía más orgullosa en la vida y mi respuesta fue, el haber tenido una mejor amiga, me has enseñado tantas cosas sin siquiera ser tu intención, el mundo puede golpearme las veces que sean necesarias y lo resistiré, mientras tu estés a mi lado, lo puedo todo.

A las chicas Irene y Jazmín; su alegría y sus historias son parte de mi, esto va por ustedes por todos los momentos, por aquellos consejos por aquellas travesuras, viajes, por vivir a mi lado.

Y finalmente a Manuel, Esteban, Masa por enseñarme tantas cosas por compartir un poco de su vida conmigo, por su forma de ser o de no ser, gracias por la sinceridad y el poco o mucho tiempo compartido conmigo, no tienen idea de cómo me cambio solo conocerlos.

Índice.

Índice general

▪ Resumen	1
▪ Introducción	2
▪ Antecedentes	5
○ Historia del pulque	5
▪ Origen del pulque	5
▪ El pulque en la colonia	10
▪ El pulque en la época Post-Revolucionaria.	12
○ El maguey	20
○ Microorganismos del pulque	23
○ Probióticos	25
○ Bacteriocinas	30
▪ Métodos para identificar bacteriocinas	33
▪ Bacteriocinas de <i>Leuconostoc</i>	33
○ <i>Salmonella</i>	34
▪ Mecanismos de patogenicidad	36
• Mecanismos de adherencia	37
• Invasión	38
• Replicación	40
• Islotes de patogenicidad	42
• Sistema de secreción tipo III	
○ Modelos animales	44
▪ Justificación	44
▪ Objetivos	45
○ General	45
○ Particulares	45
▪ Material y métodos	45
○ Cepas y organismos utilizados en este trabajo	45

○ Estandarización de la cantidad de biomasa a utilizar en bioensayos de actividad antimicrobiana.	47
○ Bioensayos de activada antimicrobiana	47
○ Obtención del sobrenadante concentrado de los cultivos de BAL	48
○ Estudio en modelos animales utilizando la cepa BAL P45	48
○ Ensayo inhibición de patógenos por difusión en agar	50
○ Análisis por HPLC de sobrenadantes de cultivos de la cape P45	51
○ Secuenciación del operón ribosomal de la cepa P45	52
▪ Resultados y discusión	55
○ Estandarización de la cantidad de biomasa a utilizar en bioensayos de actividad antimicrobiana.	55
○ Bioensayos de activada antimicrobiana	57
○ Estudio en modelos animales	60
○ Ensayo inhibición de patógenos por difusión en agar	65
○ Análisis por HPLC de sobrenadantes de cultivos de la cape P45	68
○ Identificación de la cepa P45 por secuenciación del operón ribosomal	70
▪ Conclusiones	81
▪ Perspectivas	82
▪ Bibliografía	84
▪ Anexos	91

Índice de tablas.

▪ Tabla 1. Composición del agua miel	23
▪ Tabla 2 Grupos bacterianos detectados en el pulque por aplicación de técnicas de cultivo y técnicas no dependientes del cultivo.	24
▪ Tabla 3. Componentes mayoritarios de sales biliares hepáticas	28
▪ Tabla 4. Principales bacterias probióticas reportadas y sus efectos benéficos concretos	30
▪ Tabla 5. Bacteriocinas y los microorganismos que las producen.	33
▪ Tabla 6. Compuestos encontrados en una cepa de <i>L. paramesenteroides</i>	34
▪ Tabla 7. Resumen de los genes y proteínas más importantes que intervienen en la patogenicidad de <i>Salmonella</i> .	43
▪ Tabla 8. Cepas bacterianas y organismos utilizados en este trabajo.	46
▪ Tabla 9. Diseño de primers para la amplificación del operón ribosoma, usando la cepa <i>L. citreum</i> KM20	53
▪ Tabla 10. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de los primers.	54
▪ Tabla 11. Correlación entre de la DO _{600nm} y la cuenta viable del crecimiento de BAL aisladas del pulque con potencial probiótico.	56
▪ Tabla 12. Inhibición contra patógenos analizados	57
▪ Tabla 13. Concentración de ácido acético, láctico, fórmico y etanol en los sobrenadantes de 24 y 48h de la cepa P45.	68

Índice de figuras.

▪ Figura 1. Imagen de la diosa Mayahuel.	6
▪ Figura 2. Ometochtli, dios Nahua del pulque.	9
▪ Figura 3. “La bebida nacional”	14
▪ Figura 4. Mural de Rivera “La danza de los Huichilobos”	16
▪ Figura 5. Pintura de Rivera “Las ilusiones”	18
▪ Figura 6. Cajete	22
▪ Figura 7. Quiote	22
▪ Figura 8 Espectro de los efectos benéficos deseados de organismos probióticos que pueden ser de importancia relevante en el tratamiento de enfermedades digestivas.	31
▪ Figura 9. Clasificación de <i>Salmonella</i> .	35
▪ Figura 10. Mecanismo de invasión e infección sistémica de <i>Salmonella</i> en las células epiteliales del intestino.	39
▪ Figura 11. Proceso de replicación y diseminación de <i>Salmonella typhi</i> en humanos.	41
▪ Figura 12. Administración de <i>S. entérica</i> serovar typhi L1334 st ^f a ratones BALB/c mediante una sonda.	49
▪ Figura 13, Metodología de difusión en agar con el sobrenadante concentrado.	51
▪ Figura 14. Determinación de ácidos orgánicos y etanol por HPLA de los sobrenadantes de 24 y 48h.	52
▪ Figura 15. Organización genómica del operón ribosomal de <i>L. citreum</i> KM20 NC_010471 y <i>L. mesenteroides ssp mesenteroides</i> ATCC 8293 NC_008531.	52
▪ Figura 16. Representación esquemática de las regiones a amplificar del operón ribosomal con los primers diseñados	53
▪ Figura 17. Condiciones de reacción para PCR.	55
▪ Figura 18. Halos de inhibición de las cepas P9 y P45, contra los 4 patógenos	58
▪ Figura 19. Cuenta en placa de <i>Salmonella typhimurium</i> L1334 st ^f en el bazo de ratones machos BALB/c en medio LB con estreptomycinina de una dilución 10 ⁻²	61
▪ Figura 20. Cuenta en placa de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium L1334 en hígado y en bazo de ratón BALB/c de 8 semanas, en hembras y machos.	62

- Figura 21. Halo de inhibición de el sobrenadante concentrado de la cepa P45, a pH 7
contra cada uno de los cuatro patógenos 67
- Figura 22. Secuencia del operón ribosomal de la cepa P45 y las cepas de
Referencia 72

1. Resumen

El pulque es una bebida tradicional Mexicana fermentada a partir del agua miel producida a partir de tres tipos de magueyes. Es un proceso espontáneo, lo que significa que no se añade ningún microorganismo estándar para su fermentación, han existido diversas caracterizaciones de la microbiota de esta bebida, una de ella realizada por Campos (2010) consistió en el aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL), utilizando como criterio de aislamiento resistencia al pH ácido (3) y sales biliares (oxagal 0.3%). Obteniendo 13 cepas las cuales fueron ribotipificadas y su capacidad inhibitoria fue probada cualitativamente contra 4 patógenos; *Salmonella enterica* serovar Typhi, Typhimurium, *E. coli* EPEC y *Listeria monocytogenes*. Partiendo de este trabajo se utilizaron las 13 cepas, con el fin de seleccionar una con las mejores características probióticas, para esto se realizó una cuenta en placa de cada microorganismo así como ensayos de difusión en agar APT (Difco) de un número estándar de microorganismos contra los patógenos antes mencionados.

Se encontró que la cepa P45 presenta las mejores características probióticas, por lo tanto se estudió la inhibición *in vivo* de esta cepa en 18 ratone BALB/c de ocho semanas, contra la infección de una cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium st^f, encontrando que esta cepa es capaz de disminuir en al menos un ciclo logarítmico la infección, en un periodo de 3 días.

Para comprender mejor este resultado se realizó un estudio de inhibición con el sobrenadante de la cepa, para observar si esta cepa era capaz de producir bacteriocinas. Se encontró que existe actividad inhibitoria contra los 4 patógenos: *Salmonella enterica* serovar Typhi, Typhimurium, *E. coli* EPEC y *Listeria monocytogenes*, actividad posiblemente debida a la producción de un péptido.

Se realizó un estudio por HPLC para determinar los ácidos orgánicos que produce la cepa seleccionada (Cepa P45), encontrando una mayor producción de ácido láctico además de una abundante producción de ácido acético producidos mayoritariamente a las 24h.

Debido a las características particulares de esta cepa se secuenció el operón ribosomal para poder conocer con qué microorganismo se estaba trabajando, encontrando que tiene similitud muy alta del 92%, con *Leuconostoc mesenteroides* pero también se encontraron

varios segmentos de inserción y de delección que no están presentes en la cepa de referencia, sugiriendo la posibilidad de un microorganismo no anteriormente reportado.

2 Introducción.

En el Distrito Federal, la prevalencia de diarrea en niños menores de cinco años en el 2006, fue mayor a la reportada en el ámbito nacional (18.6% contra 12.9%, respectivamente), según datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT), (Olaiz 2006) mientras que en hombres y mujeres la prevalencia fue similar (17,5% y 16%, respectivamente). La distribución por edad señala que en los hombres la frecuencia más alta de este padecimiento fue al año de edad (40,0%) y la más baja a los dos (10,1%). En las mujeres se observa una mayor frecuencia en menores de un año de edad (35,2%) y la menor frecuencia a los tres años (6,8%), lo que indica que ésta enfermedad es una de las más frecuentes en nuestro país y el alto porcentaje de personas que la presentan es evidencia de que no se ha encontrado una solución a este problema.

La colonización del intestino humano toma lugar desde el nacimiento; cuando el bebé es parido. La complejidad y densidad de la microbiota en el intestino del bebé se incrementa con el paso del tiempo y generalmente es estable a lo largo de su vida. Esta colonización no es aparentemente guiada por reglas específicas. Se ha observado que depende de la microbiota de la madre en el conducto vaginal, de los microorganismos del ambiente que lo rodean al nacimiento, y de la alimentación (fórmula o leche materna).

A partir de la compleja diversidad desarrollada en este ecosistema, el individuo puede tener o no ciertas enfermedades en el transcurso de su vida. El intestino humano adulto contiene 10^{13} a 10^{14} bacterias pertenecientes a 500 especies diferentes, con alrededor de 9 diferentes fila bacterianos; sin embargo los Firmicutes y Bacteroidetes representa el 90% de todas las bacterias. Se asume que el ecosistema microbiano, una vez que se forma, previene eficientemente la invasión de especies extrañas, esto ha sido extensamente estudiado en el caso de bacterias patógenas entéricas, fenómeno conocido como; resistencia a la colonización (RC).

Hasta la fecha las bases de la RC así como las especies bacterianas claves involucradas permanecen poco definidas. Es claro que si la microbiota está ausente o se ve modificada por ejemplo tratamientos con antibióticos, inflamación intestinal, desnutrición, etc.,

el riesgo a enfermarse aumenta drásticamente (Jones 2010). Además de que se sabe que los probióticos pueden mejorar las defensas intestinales del hospedero, no solo normalizando los patrones de colonización en el intestino sino afectando directamente las funciones del epitelio intestinal. Varios estudios han mostrado que bacterias comensales regulan las defensas intestinales incluyendo las funciones de barrera, secreción de mucina e inmunoglobulina A, así como la inflamación y los procesos de homeostasis como proliferación y apoptosis (Perdigon *et al.*, 1995).

De acuerdo en la ENSANUT, el grupo más propenso a tener problemas de diarrea son los niños menores de un año; etapa crucial en la que la microbiota se conforma y desarrolla, por esto es muy importante estudiar el efecto de los primeros alimentos consumidos (fórmula o leche materna) en las primeras etapas de la vida, así como la salud de la madre, en la conformación de la microbiota, ya que la adecuada distribución de ésta podría solucionar muchos problemas. Es también por esto que el estudio de los probióticos ha avanzado significativamente en los últimos años.

La diarrea puede ser causada por diversas razones, la más común es debida a una gastroenteritis viral, que es una infección viral leve que desaparece espontáneamente (en cuestión de unos cuantos días), existen diversos tipos de virus causantes de la gastroenteritis como pueden ser: Rotavirus y el Norovirus. El Rotavirus es la causa viral de diarrea presente en todo el mundo, con 111 millones de casos (en 2003), siendo los más afectados los niños a la edad de 5 años (Infectología 2006).

Otra de las causas más comunes es la intoxicación alimentaria que se presenta a partir del consumo de alimentos o agua contaminada con bacterias y parásitos, dentro de éstos las especies responsables son: *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Escherichia coli* y *Listeria sp.*, entre otras. Los tratamientos aplicados dependen de la causa de la diarrea, en el caso de infecciones bacterianas lo más común es utilizar antibióticos, pero en muchos casos estos traen efectos secundarios. Por ejemplo los antibióticos de amplio espectro elimina gran parte de la microbiota del intestino, lo que acarrea problemas de digestión, formación de gases, inflamación y diarrea. El tratamiento con probióticos ayuda a restituir la flora microbiana en el intestino, restableciendo de esta manera sus funciones normales. Incluso varias

investigaciones han demostrado que previenen la infección de bacterias patogénicas, por lo que también son utilizados como tratamiento para la prevención de infecciones (Nomoto 2005).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, los probióticos son microorganismos que consumidos en concentraciones adecuadas otorgan beneficios al hospedero que los consume. Estos microorganismos generalmente viven en el tracto intestinal de humanos o animales, sin embargo, algunos estudios muestran que cepas reconocidas como probióticos se encuentran en sustratos no lácteos, como vegetales fermentados (Rivera y Gallardo 2010). Pertenecen principalmente al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales son inocuas para el ser humano, Gram-positivas, hetero- u homofermentativas, cuya principal característica es la producción de ácido láctico. Los géneros más estudiados son los lactobacilos (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*) y las bifidobacterias (*Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. lactis*), así como los géneros *Leuconostoc*, y otras bacterias no ácido lácticas como son: *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus* var Toyos), *Pediococcus* y *Enterococcus* (*E. faecium*) (Holzapfel *et al.*, 2001).

La mayoría de las especies de bacterias probióticas son aparentemente seguras, sin embargo ciertos microorganismos pueden causar problemas, particularmente los enterococos, como *E. faecium* y *E. fecalis*. Estos son patógenos oportunistas causante de infecciones nosocomiales como endocarditis, bacteremia, además pueden causar infecciones en las vías del tracto urinario y el sistema nervioso central. Por otra parte se sabe que pueden desarrollar resistencia a antibióticos (Mathur y Singh 2005).

Durante siglos las fermentaciones han sido utilizadas para preservar, mejorar la calidad o modificar sabores de cereales, frutas, vegetales, legumbres y carne. El proceso de fermentación de las bebidas tradicionales, involucra la mezcla de microorganismos como levaduras y BAL. Este tipo de ambientes son una fuente abundante de nuevos microorganismos, muchos de ellos con potencial para ser utilizadas como cepas probióticas (Holzapfel 2002).

El pulque es una bebida fermentada tradicional mexicana de naturaleza alcohólica no destilada, obtenida a partir de la fermentación de la savia o aguamiel, de diversas especies de maguey (agave pulquero). Los microorganismos responsables de la fermentación varían dependiendo de la zona y el proceso por el que sea elaborado. El pulque se ha consumido en

México desde tiempos prehispánicos, e incluso en muchos lugares en donde el pulque es una tradición, se le ha otorgado empíricamente propiedades curativas, principalmente en enfermedades digestivas. (Escalante *et al.*, 2008)

Existen varios beneficios que se le han otorgado a las bacterias probióticas, pero estos microorganismos actualmente no han sido completamente caracterizados, ni sus beneficios han sido completamente esclarecidos.

Se han propuesto varios criterios para definir a un microorganismo como cepa probiótica, como un primer criterio de selección se realizan pruebas *in vitro*, y posteriormente para su uso tecnológico y producción industrial es necesario certificar los efectos que produce cada una de las cepas caracterizadas como microorganismos probióticos, mediante metodologías *in vivo*, debido a que como se mencionó anteriormente no todos los microorganismos tienen el mismo efecto en el organismo y por lo tanto, se debe ajustar la metodología al beneficio que se quiere comprobar, para esto es común que se utilicen ratones como primer modelo de estudio.

3 Antecedentes

I. Historia del pulque

Origen del pulque.

Los nombres del pulque y del maguey, a pesar de lo que se pudiera suponer debido a su cotidianidad en la cultura mexicana, no provienen de ninguna lengua mesoamericana. La palabra maguey es de origen antillano: taíno o arahuaco que, como otros sustantivos fueron traídos por los conquistadores hispanos de las islas del caribe, al continente americano. En cambio el origen de la palabra pulque sigue siendo incierto, se cree que fue una corrupción castellana de las voces nahuas *Poliuqui octli*, que significa bebida descompuesta, y que con el tiempo se redujo hasta llegar a pulque. El pulque en Náhuatl es *Octli*, nombre con el que se le denominan a las bebidas de carácter alcohólico (Montemayor 2004).

Desde los primeros agricultores (y tal vez desde los nómadas cazadores y recolectores), las personas vieron en el maguey, una planta extraordinaria que les proporcionó; casa, vestido y sustento. Durante el periodo de conformación de las sociedades urbanas, las ceremonias públicas del Preclásico, tenían el objetivo de pedir la intervención de divinidades a favor del género humano, creando la costumbre de la presencia de bebidas alcohólicas o sus símbolos como expresión del deseo de fertilidad para las cosechas y de fecundación para las

mujeres y, por ende de la abundancia (Rendón 1990).

En la cosmovisión de los pueblos del centro de mesoamérica el maguey fue identificado con la diosa Mayahuel (“la de los cuatrocientos senos”). Mayahuel era un personaje mítico (tal vez una mujer mortal de filiación Olmeca), que descubrió que el maguey podía producir un líquido blanquecino y dulce que conocemos como aguamiel o *necuhtli*. En el mito de la creación del maguey, Mayahuel es una diosa virgen que vivía en el cielo, ella deseaba poder conocer la vida en la tierra, Ehecatl-Quetzalcoatl, quien conocía los sentimientos de ella, fue a verla para convencerla de viajar a este mundo, aprovechando que su abuela y hermanas estaban dormidas, ellos pudieron viajar juntos a la tierra y al llegar se transformaron en un árbol florido que entrecruzaba sus ramas. Cuando la abuela despertó fue a buscarla con sus hermanas y al encontrarla transformada, la separaron del árbol de Ehécatl y la despedazaron, repartiendo sus restos entre sus hermanas. Cuando se marcharon, Ehécatl-Quetzalcóatl se transfiguró a su forma original y recogió los restos de la diosa, los enterró y de sus restos nació el maguey. Mayahuel es por tanto el caso de una persona real, divinizada más tarde, que llegaría a constituirse como un símbolo, el del maguey (Ramírez 2004).



Figura 1. Imagen de la diosa Mayahuel.

Mayahuel descubrió el líquido del maguey, pero hubo otros dioses que descubrieron la forma de convertir el aguamiel en líquido fermentado. Entre ellos *Pentecatli* fue el descubridor de las raíces (ocpatlí) que se adicionaban al pulque para volverlo más fuerte, además se le asignaba el papel de esposo de Mayahuel (Ramírez, 2004). Los demás hombres-dioses eran: Yiauhtecatli, Tlilhoa, Quantlapantli, Tzoaca, Izquitecatli, Toltecatli, Papztac, Tlaltecaiooa, Ometochtli, Tepoztecatli, Chimalpanecatli, Colhoatzincatl, y el más importante entre estos era Tezcatzoncatli, quienes perfeccionaron la hechura del pulque y en sus nombres tienen los locativos de diferentes regiones de Mesoamérica donde se cultivaba el maguey y se rendía

culto a esta bebida (Ramírez 2004).

En los pueblos prehispánicos los que consumían el pulque eran regularmente los ancianos de más de 52 años (edad en que se cumplía un ciclo vital para los antiguos nahuas), quienes estaban facultados para producir y tomar pulque. El signo calendárico *Ome Tochtli* (2-conejo) es el símbolo de estos *Centzontotochin* (“cuatrocientos o innumerables conejos”), quienes eran los dioses de la tierra, la embriaguez y de las diversas bebidas fermentadas producidas con la miel del maguey. A estos dioses también se les identificaba con las innumerables maneras de emborracharse y de actuar en ese estado (Monterrubio 2007).

Para mayor entendimiento de esta relación entre el maguey y el conejo, Alfredo Chavero rescató (Ramírez 2004) en una comunidad hacia fines del s. XIX:

“Cuentan los campesinos que hay un animalito, a manera de rata o tuza, que por instinto raspa el tronco del maguey con su trompa, que tiene cierta forma como de cuchara; en el lugar raspado va brotando y depositándose el jugo o agua miel de la planta, y entonces vuelve el animalito a beberse el licor.”

Cabe destacar que en esta descripción de los campesinos, se da a conocer que la idea de succionar el aguamiel (por medio del acocote) es una práctica imitativa de lo que hacía el animal al tomarlo. En cuanto a la relación del maguey con la luna, Raúl Guerrero transcribe las siguientes palabras de González Torres.

“Recordamos que, según dicen los cronistas, los efectos de la bebida debieron adjudicarse a una fuerza superior centrada en la Luna, misma que influía sobre la vegetación y el agua. La mente mágica de los indígenas mexicanos debió asombrarse al comprobar que cada maguey se convertía en la fuente maravillosa donde surgía líquido cuya menor o mayor afluencia dependía de las fases de la luna; después, la transformación que implicaba un ciclo y cuyas etapas también estaban asociadas a las fases lunares. Todavía en la actualidad el maguey es castrado cuando la luna está en creciente, nunca en menguante, y el aumento o disminución de la afluencia del líquido puede ser notado perfectamente según las fases de la luna.”

Y añade el autor que “debe de recordarse aquí que la luna está íntimamente relacionada con el conejo y probablemente también con el matriarcado, y que el conejo a su vez está en relación con la fertilidad, características del género femenino”, además de su relación con la embriaguez. En relación a esto en algunos estudios arqueológicos, realizados en Tajín,

Veracruz, se han encontrado representaciones de estos personajes míticos (como un dios-Conejo), en el Juego de Pelota lo cual hace suponer que, por lo menos desde la época del Clásico, se tenía ya la relación entre el maguey, el pulque y los rituales de sacrificio humano y de fertilidad.

Otro ejemplo es el mural de los bebedores encontrado en Cholula, Puebla, donde se observa una reunión de personas que realizan una libación. Posteriormente en el Clásico tardío, se desarrollaron muestras de conocimiento y utilización del maguey en las culturas teotihuacana y tolteca donde, a través de la pintura mural y objetos de uso como raspadores de obsidiana, se reconoce la importancia del pulque como bebida ritual que permitía el contacto con los seres divinos dadores y mantenedores de la vida aquí en la Tierra. Destaca el aprecio al maguey y el pulque por los pobladores del Altiplano Central Mexicano en la época Posclásica, porque el descubrimiento del *necutli* representó para las tribus Nahuas, un hecho de doble valía: el hallazgo de un líquido mitigador de la sed y a la vez del hambre (Ramírez 2004).

El *necutli* o aguamiel y su producto fermentado *octli* fueron, desde este pasado, importantes alimentos tanto para la vida material como espiritual de las comunidades tradicionales que ritualizaron el consumo de estas bebidas. En el caso del pulque la finalidad de ingerirlo era entrar en un estado de relajación y de alegría que servía para reforzar los lazos intrapersonales pero también los divinos. Con el consumo de esta bebida se hacía presente en las personas esa esencia etérea, aunque de muy diversas formas y actitudes.

Debido a la importancia religiosa, el pulque era una bebida tan apreciada, que entre los antiguos pobladores de Mesoamérica inspiró una serie de leyendas y cantos apologéticos que enriquecieron sus tradiciones y cultura. Entre los primeros se localiza la historia acolhua (Cultura pre-colombina establecida en el valle de México que gobernó Texcoco S. XII) de la princesa Xóchitl, en la zona productora del maguey (Mezquital), quien ofrecería el *necutli* fermentado al gobernante Tecpancaltzin de Tula, quien se enamoraría de ella y con los efectos afrodisíacos del líquido pidió que regresase a visitarlo con más de esa ofrenda. Al volver la virgen, él la raptaría a uno de sus palacios y de la unión carnal daría a luz un niño que se llamaría Meconetzin (hijo del maguey) y que sería, según la tradición, el último gobernador de Tula (Salazar 2004).

Con la llegada de grupos Nahuas y la asimilación de costumbres de otros pueblos, varias culturas aprendieron a cultivar el maguey para el aprovechamiento de su aguamiel y su conversión en pulque. Los Mexicas, por ejemplo, lo elevaron al rango de símbolo de su vida común y corriente y de su muerte gloriosa, ante los altares de sus principales dioses, empezando por Huitzilopochtli y Tezcatlipoca, adoptándolo como un elemento característico de su cultura. Los pueblos que aún mantienen un conocimiento mítico-religioso de la cultura del pulque son los Ñha Ñhu, los P'urhe-pecha y los Nahua. Todos ellos tuvieron dioses protectores del pulque que fueron *Yudó* o *Yodjuá*, *Tharés Úpame* y *Ome Tochtli*, respectivamente (Salazar 2004).



Figura 2 Ometochtli, dios Nahua del pulque.

Desde esta época ya se elaboraban distintas calidades de octli, según la clase de maguey. En los convivios o bautizos a los ancianos se les servía un tipo de pulque conocido como *iztac octli* (pulque blanco), que se trataba de un pulque de mejor calidad. En otras ocasiones se distribuía uno “cocido” o fermentado con la raíz *ayoctli*, (conocido como pulque de agua).

La importancia del pulque en la vida ceremonial de los pueblos mesoamericanos se manifestó hasta en los patrones de conducta que giraban en torno a este producto, por ejemplo: los utensilios donde se tomaba el octli eran piezas de calabazas partidas a la mitad, lisas o pecosas –entre verde y blanco o manchadas–, llamadas *tzilacayoti* (chilacayote), origen de las actuales jícaras y vasos, que se les extraía la carnosidad vegetal, para utilizarlas como tazones donde se depositaba la bebida y se servía como ofrendas a los dioses de culto (Loyola 1956).

El pulque en la colonia.

La idea y el hábito de ingerir bebidas alcohólicas estaban íntimamente vinculados con actos religiosos de las sociedades ancestrales de México. Con el arribo de la cultura hispana y de la religión católica este sentido se vio alterado durante toda la época colonial. En el proceso de evangelización los dioses del pulque fueron considerados como demonios, el consumo del pulque y sus efectos empezaron a provocar rechazo, porque estaban vinculados con el vicio y por ser parte de los rituales “idolátricos” que se necesitaban erradicar. Fray Toribio de Benavente, escribió que tras la conquista armada, cuando los pueblos vencidos perdieron la confianza en su concepción del mundo vivían entregándose a los “vicios y pecados, dándose a sacrificios y fiestas, comiendo, bebiendo y embeodándose en ellas”; esto era evidente también por las grandes cantidades de *octli* que circulaban en las fiestas, “volviendo lascivos tanto a los hombres como a las mujeres, lo que resultaba contradictorio ya que en estado sobrio eran generalmente mansos y pacíficos”(Loyola 1956).

Pero a pesar de esto en el periodo colonial, el cultivo de la planta de maguey para elaborar el pulque, se incrementó en gran medida por las condiciones sociales existentes, ya que esta era utilizada como mitigador de la explotación de trabajo de los habitantes de la Nueva España, además que los requerimientos para el cultivo de esta planta eran pocos.

Las pésimas condiciones de higiene en la producción de pulque para su venta en el periodo colonial lo atribuye Álvarez Martínez (Ramírez 2004) a los “resabios que en este sentido importaron los conquistadores y a la nula educación que se inculcó a los habitantes de la Nueva España a propósito de sus costumbres alimenticias”.

Por esto la corona española busco limitar la producción y el consumo de esta bebida; con este fin otorgó licencias a cierta parte de la población en donde autorizaba su producción, pero su consumo siguió siendo elevado y los actos de violencia no disminuyeron.

Entonces en 1631 el Marqués de Cerralvo, Virrey de la Nueva España(Ramírez 2004), ordena que; no se produzca, venda, ni trajine el aguardiente del maguey y revoca las licencias que se habían otorgado para ese entonces, sólo pueden hacerlo los boticarios. Asimismo ordena que no se trajine el pulque amarillo, tepache y miel negra de caña” Como consecuencia las autoridades virreinales prohibieron la elaboración y venta del pulque, situación que fue puesta en acción por periodos, aunque nunca con la rigidez conveniente. En el s. XVII el Virrey Luis Enriquez de Guzmán, al conocer que el pulque era una bebida menos embriagante y de

mayor aprovechamiento entre la población, permitiría el establecimiento de expendios ubicados en distintos sitios de la ciudad de México, a condición de que fuera puro. Hacia 1650 existían ya 212 lugares donde se vendía pulque a un precio muy bajo; por medio real podían comprarse 3 cuartillos de pulque fino (1.2 lt.) y unos 5 de pulque ordinario (2.5 lt.) (Rendón 1990).

Este precio aumentaría a causa de diversos impuestos, que con el paso del tiempo se fueron implementando. El Virrey Duque de Alburquerque, en 1652, estableció el primer impuesto sobre el pulque introducido a la capital novohispana: 12 reales por carga (175 lt.) que era recaudado por los corregidores y administradores. Durante este siglo se calcularía el consumo de pulque en la capital entre 2,000 y 15,000 cargas diarias (Rendón 1990).

El 8 de junio de 1692 se efectuó un gran motín en la ciudad de México contra las autoridades virreinales debido a una fuerte hambruna, las autoridades lo achacaron al consumo del pulque, lo que produjo un decreto del Virrey Conde de Gálvez en donde prohibía la introducción de la bebida a la ciudad que estaría vigente hasta el 3 de junio de 1697. El virrey pidió un informe a la Real y Pontificia Universidad de México, a la Compañía de Jesús y al Protomedicato acerca de si se podía justificar o no la prohibición de esta bebida. Mientras tanto el arzobispo de México prohibió el consumo del líquido bajo pena de excomunión (Ramírez 2004). En el informe se pedía que en los lugares donde se cultivaban magueyes se cambiase el cultivo a plantas de hortaliza, lo cual pasaba por alto el hecho de que otros productos no eran factibles de ser cultivados por el tipo de tierra en donde se sembraban los magueyes. Lo que también puede expresar es que dicho informe no tomaba en consideración la importancia del maguey para las comunidades indígenas, en donde era el principal o su único medio para vivir.

En 1791, el barón Alexander von Humboldt (Ramírez 2004) hace una investigación sobre los consumos en la capital de la Nueva España, en donde hizo notar que en la ciudad de México tuvo un volumen de entrada de 294,794 cargas de pulque, en dicho año y en 1793 se elabora un mapa de la ciudad en el que aparecía la ubicación de las pulquerías.

Este año alcanzó un consumo anual de 46 millones de L. aproximadamente, entre 1799 y 1800 la cantidad de pulque consumida bajaría a menos de la mitad que en total fue de 1794 L (Monterrubio 2007).

Como José Antonio Martínez Álvarez (Ramírez, 2004) escribe: "Hacia el ocaso del

periodo colonial, el pulque conservaba, pues, una indudable hegemonía en el gusto de los mexicanos, como lo expuso Luis González Obregón, vinculando la bebida sobre todo con los habitantes más pobres de la zona urbana”. Con el estallido del movimiento de insurgencia se desajustó el sistema económico en el virreinato, lo que ocasionaría una depresión crónica por los disturbios sociales y revueltas militares que caracterizarían al s. XIX. En esta época los gobiernos vigentes intentarían reducir el consumo de pulque en los sectores populares sin lograr gran éxito.

La intervención francesa trajo consigo el cambio a un régimen monárquico con el ascenso de Maximiliano de Habsburgo y de su esposa Carlota de Bélgica. Y la primera intención de los emperadores fue conquistar a los sectores sociales populares utilizando la distribución del pulque ya que consideraba a las etnias como el “verdadero pueblo mexicano”. Pero la propia corte austriaca censuró de populista la manera de mostrarse de los emperadores para con el pueblo de México.

Al término del Segundo Imperio Mexicano, el pulque continuó siendo la bebida indispensable y predilecta de la mayoría del pueblo mexicano, siendo necesario para toda celebración de las clases populares mestizas y de las etnias. Según Francisco Pimentel (Ramírez 2004), para éstas, “los cohetes, las luminarias, los repiques” eran lo que más llamaba la atención, quienes no perdonan gasto alguno en sus fiestas religiosas, así como en sus bodas, nacimientos y funerales, todas acompañadas de un uso excesivo de pulque.

El pulque en la etapa Post-Revolucionaria

México en los años 1930’s, estaba en una etapa de renovación, cambio y construcción de valores, era la época de los pintores muralistas que intrigados; por el pasado Maya y Azteca, maravillados con los mercados en donde se podía percibir el olor de los frijoles recién hechos y tortillas hechas a manos, los puestos adornados con el brillo de las máscaras coloridas y los esqueletos delicadamente decorados para el día de muertos, buscaban construir una identidad en la sociedad mexicana que estuviera fundamentada en sus raíces, en su historia antes de la llegada de los españoles, algo con lo que los mexicanos se pudieran sentir identificados y así poder valorar su propia cultura. En esa época, el campo estaba principalmente adornado con enormes extensiones de espléndidos agaves, y en las ciudades se distribuía el néctar del agave; el pulque.

Después de una independencia (1821) y una revolución (1920) el pueblo mexicano buscaba tranquilidad y construir una identidad propia, por lo que el periodo de 1920 a 1946 se convirtió en uno de los periodos más importantes en la construcción de la nacionalidad, en donde el pulque se convirtió para México en un símbolo crucial de identidad nacional.

En el periodo de 1920-1940 México encaraba un periodo de reconstrucción post-revolucionaria, por las transformaciones económicas y sociales promulgadas por la oligarquía liberal durante el porfiriato (1876-1911). El régimen de Díaz destacó la herencia y valores Europeos como camino hacia la modernidad. Sin embargo en los 1890's México fue y sigue siendo una nación mestiza; la mezcla de herencia española, indígena y africana. El proyecto de la construcción de identidad busco cambiar los precedentes establecidos en el Porfiriato, y en su lugar reflejar la historia mestiza de México mediante una estrategia que combina el indigenismo y el mestizaje. Primero se enfatizó en la promoción de la herencia indígena de México, posteriormente se desarrolló la virtud de México como una nación mestiza, para esto se utilizó al pulque como un símbolo de la identidad, ya que cumplía con estas dos características; su origen prehispánico, y su propagación durante la colonia; un símbolo de "Mexicanidad".

En la actualidad, el pulque es uno de las tres bebidas tradicionales "mexicanas", las otras son el tequila y el mezcal, todas elaboradas a partir de agave. El pulque a diferencia de las otras bebidas, no puede ser exportada en grandes cantidades debido a que continua fermentándose, además de que es considerada la más antigua de las tres bebidas con una amplia cantidad de historias empíricas, y ampliamente repetidas que datan desde tiempos prehispánicos. El tequila y el mezcal, en contraste emergieron durante el periodo colonial y utilizan una parte diferente de la planta como materia prima, que son las raíces del agave y las hojas bajas. Se cree que el tequila es la bebida oficial de México hoy en día, pero muchos textos siguen refiriéndose al pulque como la verdadera bebida nacional, debido a su inaccesibilidad, además su producción esta limitada al país, lo que no sucede con el tequila. Los españoles rápidamente reconocieron el valor del pulque y en 1570 el rey Felipe II envió a un científico Francisco Hernández a dirigir el primer estudio de la planta (Todd *et al.*, 2009).

El pulque es asociado a dos festividades prominentes, el día de los muertos y el día de la Virgen de Guadalupe. La conexión simbólica del pulque con la Virgen de Guadalupe de

México es muy cercana. En los años 50's un antropólogo, John Bushnerr (Wright, 2009) condujo un estudio de campo observando que durante las fiestas; los hombres veneraban la estatua de la Virgen mientras alzaban sus copas con pulque, proclamando –pulque; la leche de la virgen- Bushnell argumento que esta conexión viene del verdadero valor del agave de “dar vida” ya que en ciertas partes de México el acceso al agua es reducido e incluso inexistente. El se dio cuenta que en mucho de los hogares el pulque es el único líquido que pueden beber, es de los primeros alimentos que se dan a los niños en lugar de leche materna. Tanto niños como adultos beben pulque diariamente en cada comida, es así como Bushnell concluye que este brebaje esta vinculado con la Virgen debido a que es visto como madre sustituta.

A pesar de estas dos asociaciones tradicionales, la relación de México con el pulque en estos años era confuso. Ya que de un lado el pulque representaba las hondas raíces históricas, algo que le pertenecía al pueblo, pero internamente el gobierno asociaba al pulque con depravaciones morales y nutricionales que datan de la colonia, que el historiador Jeffrey Pilcher (Wright 2009) calificó como algo incierto (porque el pulque es de hecho bastante rico nutricionalmente).

Es esta época a él gobierno de México le preocupaba las percepciones internacionales de su país, debido a la larga proliferación de la imagen negativa que se dio durante la Revolución como se puede observar en la figura 3.



Figura 3. “La bebida nacional”.
Fuente: Wright A. (2009)

Mark C. Anderson (Wright 2009), encontró varias imágenes en la prensa americana pertenecientes a el año 1913-15 en las cuales se implica que a pesar de que México había puesto a un lado su comportamiento de retraso; permanecía su fuerte inclinación hacía el consumo de alcohol, lo cual aseguraba su camino hacia la auto aniquilación. Este tipo de

imágenes negativas continuaron hundiendo el periodo de construcción de una identidad de nación.

Manuel Gamio y José Vasconcelos fueron figuras claves en el proyecto de la construcción de identidad nacional en el periodo de 1920-1940, creían que una de las maneras más exitosas en que México podía construir un fuerte sentimiento de patria era a través de introducción de valores culturales Mexicanos e ideas post-revolucionarias en la identidad de México. Vasconcelos lo logró a través de un proyecto patrocinado por el gobierno en conjunto con los muralistas de la época, Gamio apoyó esto a través de la difusión de turismo internacional, para dar a conocer las ruinas pre-colombinas (White 2007).

El antropólogo Deborah Pooler (1994) (Wright 2009), notó que la difusión de ideas estereotipadas de identidad y cultura afectaba profundamente la creación de la tipología. Los argumentos de Pool dieron un marco en el cual se observaba, cómo la imagen visual producida por las iniciativas de Gamio y Vasconcelos para crear “estereotipos” esenciales Mexicanos promovían ideas de Mexicanidad.

Por todo esto, los dos eventos principales que influenciaron el proceso de la construcción de Nación y dos excelentes oportunidades para la imagen de México en el extranjero y en el país, fueron las excavaciones realizadas por el antropólogo Manuel Gamio en 1913 del sitio arqueológico de Chichen Itzá, así como otras zonas, y la creación de la Secretaría de Educación por José Vasconcelos en 1921. El primero trabajó para promover las raíces míticas e históricas a una audiencia nacional e internacional, mientras que el segundo patrocinó programas pedagógicos para promover la tolerancia en la identidad mestiza del mexicano, ambos trabajaron en el orgullo Mexicano y en la herencia pre-colonial e indígena .

Gamio influenciado significativamente por la teoría del Antropólogo Franz Boas acerca del “relativismo cultural”, una teoría, que iba en contra de la idea prevaleciente en los noventa, proclamaba; que el progreso es un concepto relativo, las naciones no Europeas como México solo podrán “competir” con Europa en sus propios estándares, con su propia historia, y podrán romper con la constante imitación de los comportamientos Europeos en la búsqueda del progreso. Gamio creía que revelando los secretos de la herencia indígena, México podría obtener sentimientos de orgullo, unión y podría llevar a una modernización ideológica a todo México.

La otra prominente ideología en la construcción de una identidad de nación durante este periodo fue el mestizaje, que también tenía que ver con la modernización de la nación. El mestizaje está más relacionado con las ideas de José Vasconcelos (White 2007), Secretario de Educación entre los años 1921 y 1924, así como el indigenismo, el mestizaje también debía ser incorporado a todos los elementos culturales en la sociedad de México, particularmente en las poblaciones indígenas y trabajadoras.

Vasconcelos creía que las artes populares otorgaban una ventana de competencia para atraer a todos los Mexicanos a través de la creación y promoción de una imagen amplia y participativa de nación, por lo que creó un gran proyecto, para esto las principales figuras artísticas como Diego Rivera (1887-1957), José Clemente Orozco (1883-1949), y David Alfaro Siqueiros (1897-1974), fueron comisionados para crear murales en las paredes de edificios públicos y en espacios abiertos, que incluían iglesias, conventos, escuelas, universidades y hospitales. Vasconcelos inició el proyecto de la producción de murales con caracteres patrióticos con un propósito ampliamente pedagógico y de construcción de identidad de nación (Wright 2009).

Este “retorno” de la tradición se ve especialmente en el mural de Rivera, “La danza de Huichilobos” (Figura 4) que fue pintada en la Ciudad de México en el Hotel Reforma en 1936 y ahora está exhibida en el tercer piso de Bellas Artes. En este mural, las pulquerías son casi la expresión de la Mexicanidad. La danza de Huichilobos no es una escena del pasado precolombino pero ilustra bien la victoria local de las fuerzas de Maximiliano durante la invasión francesa en México de 1864-67. El pintor representa este triunfo moderno como si fuera una danza tradicional de victoria, combinando elementos contemporáneos y antiguos.



Figura 4. Mural de Rivera “La danza de los Huichilobos”.

Los soldados en este mural están vestidos con tocados de plumas y sandalias de cuero. De acuerdo con el pintor Maltby Skyes que ayudó a Rivera en éste mural, el oficial comandante a caballo representa un dios de la guerra azteca, a pesar de que viste un uniforme del siglo XIX. En el fondo de la escena de la victoria se encuentra una pulquería con el nombre de “La gran victoria”. Aquí Rivera pone de manifiesto las pulquerías que participan como testigos vigilantes de los eventos gloriosos de la historia de México (Wright 2009).

Las pintura de Rivera en 1944 “Las ilusiones” (Figura 5) nos brinda detalles pictográficos acerca de la producción del pulque. En la pintura el hombre esta pintado fuera de una pulquería transportando en un burro el pulque en cueros elaborados con piel de cerdos. Los cueros usados podían ser de cerdos o de cualquier otro animal, estos eran los contenedores tradicionales del pulque, porque incluso en los 30’s, la industria del pulque seguía siendo artesanal.



Figura 5. Pintura de Rivera
“Las ilusiones”

Incluso la categoría de pulque “fino” está escrito todavía en algunas pulquerías, que es una continuación de la tradición pre-colonial de vender diferentes categorías de pulque. Sin embargo “Las ilusiones” de alguna manera romantiza la producción del pulque. A pesar de que en muchos lugares en los años 30’s la producción permanecía siendo artesanal, el proceso de industrialización y producción a gran escala empezó en la Ciudad de México y en Oaxaca, centros tradicionales en la producción del pulque durante el periodo colonial, remplazando los lugares de producción artesanal (Wright 2009).

Después del fracaso de Vasconcelos en la candidatura por la presidencia, el gobierno sucesor tomó una postura diferente, éste tenía dos preocupaciones; la primera que el pulque era una bebida no higiénica, que promovía el alcoholismo, lo que provoca un especial peligro en las comunidades indígenas y segundo, que la bebida no era un componente apropiado en la identidad “moderna” de México. (Olvera 2000)

Dos sociólogos mexicanos, Lucio Mendieta y Núñez, y Francisco Rojas González , escribieron acerca de estos elementos en los debates sobre el pulque, en 1939 y 1942 respectivamente. Sostuvieron que las haciendas pulqueras habían contribuido al esparcimiento del alcoholismo en México y que últimamente ya era una industria poco viable e insana. Mendieta y Núñez, trabajó con estadísticas del Departamento de Asuntos Indígenas afirmando que debido a la eficiente producción del alcohol y la introducción de bebidas alcohólicas importadas por los españoles, cerca del 60% de las personas indígenas bebían a diario. Los hombres usualmente se alcoholizaban más que las mujeres, pero Mendieta y Núñez observó

con alarma que especialmente durante el tiempo de fiestas ambos sexos bebían pulque en grandes cantidades e incluso les daban a los niños. Finalmente ellos concluyeron que el pulque promovía actos violentos como homicidios, esto fue tan extendido, que todas las plantas de agave en México tuvieron que ser removidas. Además de ello sugirieron mayores impuestos al pulque y una estricta persecución a las personas que lo vendiera ilegalmente.

Rojas Gonzáles (Wright 2009), no hizo una declaración tan fuerte como Mendieta y Núñez, pero él sugirió que la apropiación de la tierra por los españoles y el sistema de haciendas había creado ciclos viciosos que conducían al alcoholismo. Rojas creía que las grandes haciendas habían diezmado la tierra Mexicana, empujando a los obreros e indígenas a trabajar en valles estériles con poco acceso al agua, en tales condiciones Rojas Gonzales declaró que “para aliviar la sed, los hombres de todas las edades se veían obligados a ingerir diariamente una gran cantidad de aguamiel”.

A pesar de toda la mala publicidad, las poblaciones obreras e indígenas, mantuvieron la industria del pulque por razones económicas y de tradición. Esta industria empleó miles de mexicanos, como se menciona en el libro de Paz (Paz 1935) “En defensa del pulque”. El estilo de vida de estos proletariados debe ser respetada ya que muchos de estos trabajadores no tenían otro modo de sostenerse”. El gobierno promovió redistribuir los Estados Haciendas a las comunidades indígenas de manera que se usara como tierra ejido, lo que nunca se cumplió. Lo que si se cumplió es que se empezó a castigar a las personas que eran descubiertas produciendo ilegalmente el pulque.

El gobierno pudo haber persuadido la eliminación del pulque no tanto por razones sociales o higiénicas si no por razones económicas. La cerveza fue introducida en México durante el colonialismo y fue comercializada en 1928. Durante la Prohibición Americana (1920-1933), muchas compañías movieron sus fábricas destiladoras de alcohol hacia México, creando un gran campo de oportunidad. Tal vez la principal preocupación del gobierno no radicaba en el alcoholismo, sino en el deseo de alejar a México de sus tradiciones indígenas como lo es el pulque, e ir más hacia algo moderno como es la cerveza.

Como se mencionó anteriormente, las culturas precolombinas limitaban su consumo sólo para festivales y propósitos medicinales, además su consumo era controlado por la clase social. Estos patrones se pueden observar en el Codex Florentino, un recuento misionario de la

historia pre-colonial de México realizada en 1560-1570 por Bernardino de Sahagún (Wright 2009), narra que durante las celebraciones, los curas Aztecas limitaban el consumo a sólo 4 tazas de pulque, de manera que nadie se pusiera borracho, limitación que no se tenía en la época colonial, y post-revolucionaria.

El consumo contemporáneo del pulque en México tiene un comportamiento intermediario entre elementos modernos con costumbres ancestrales. Sin embargo lo que pasa desapercibido en estas representaciones es que los actuales modelos de consumo del pulque no son producto de las costumbres aztecas, sino el resultado del comportamiento desarrollado durante la era colonial (1521-1821). Además debido al sistema mercantil español, los administradores de la Colonia apoyaron la expansión de los cultivos de agave y la comercialización del pulque, aumentando significativamente los ingresos renovables para España. El impacto de estos cambios fue tanto, que para el periodo colonial tardío, el número de pulquerías, la mayoría ilegales, había aumentado a casi 800, y el pulque antes restringido sólo como bebida del periodo Pre-Colombino se convirtió en una bebida “de todos los días” en México.

En la actualidad el pulque es poco valorado tanto cultural como nutricionalmente, su producción está limitada a la producción artesanal y el proceso depende de la región en la que se elabore, se consume principalmente en los estados del centro de la República.

II. El Maguey.

EL maguey es una planta de la familia Agavaceae que crece en el altiplano semiseco y frío de México. Son plantas perennes, la mayoría de ellas arbustos sin tallo, aunque hay algunas que si lo desarrollan. Tienen forma de piña, de la cual salen sus hojas o pencas, a veces rectas y otras dobladas, de color verde intenso o amarillo, crecen formando rosetas de hojas carnosas, rígidas en los sitios de baja precipitación pluvial, flexibles en los sitios con precipitación abundante, sus flores están dispuestas en espigas o en racimos. Después de muchos años de crecimiento, brota del centro de la roseta, la inflorescencia llamada quitoe (Figura 7), dado que toda la energía acumulada por años es canalizada en la reproducción, que ocurre solamente una vez en la vida del maguey, ésta es el irremediamente anuncio de su muerte.

La materia prima del pulque es el aguamiel, la savia que se obtiene del maguey y se produce en las plantas adultas obtenida en la etapa previa a la floración. El jugo se acumula en

la parte baja de la planta, este fluido sirve de alimento para la etapa de floración, debido a eso, es rico en carbohidratos como inulina, sacarosa y fructosa, además contiene pequeñas cantidades de aminoácidos y vitaminas. Se han reportado alrededor de 310 especies de agaves y aproximadamente 271 se encuentran en México. Estas plantas caracterizan los paisajes de las zonas áridas y semiáridas de nuestro país y algunas especies viven en las selvas cálido-húmedas y los bosques templados. Los magueyes productores del pulque en el Valle de México son *Agave mapisaga*, *A. atrovirens* y *A. salmiana*. Las zonas productoras de pulque son principalmente Hidalgo, Tlaxcala, Estado de México y Puebla, aunque también se le encuentra marginalmente en San Luis Potosí, Michoacán, Querétaro, Morelos, Guanajuato, Veracruz y Oaxaca (Flores *et al.*, 2008).

El maguey crece entre los 2000 y 2400 metros a nivel del mar en las zonas semiáridas del altiplano central y regiones aledañas, con temperaturas templadas o frías, suelos resacos y duros de composición arcillosa. EL maguey cultivado en lugares húmedos con climas templados suele producir un aguamiel de baja calidad, ya que tiene poca concentración de azúcares, los magueyes con una producción de aguamiel más rica en azúcares son aquellos cultivados en suelos secos con climas cálidos (Loyola 1956).

La etapa productiva de un maguey pulquero comienza cuando este es “capado” es decir cuando se le corta el conjunto de pencas más tiernas del centro de la planta. La siguiente labor; la picazón debe hacerse una o dos semanas antes de que vaya a iniciarse el raspado y la extracción del aguamiel, la cual consiste en raspar la superficie de donde nace el meyolote (centro de donde se desprenden las pencas y nace el quiote) a fin de formar una cavidad llamada “cajete” Figura 6 , hacía la cual escurre el aguamiel.



Figura 6 *Cajete*



Figura 7 *Quiote*

Al cabo de tres o cuatro meses inicia la “raspa” y extracción del aguamiel. Para ello es preciso esperar que el cajete adquiera un color entre rojo y amarillo oscuro. A partir de ese momento se realizará dos veces por día la extracción del aguamiel con el “acocote” (calabaza grande y hueca, a la cual se le hicieron orificios en ambos extremos), succionando el aguamiel que se depositó en el cajete y vaciándolo en pequeñas barricas de madera o en un odre de piel de cerdo o chivo, al terminar de extraer el líquido el agujero se cubre.

La producción de aguamiel aumenta conforme pasa el tiempo de raspa, en dos semanas el volumen aumenta hasta tres litros en cada raspa y en los siguientes dos meses se puede producir hasta seis litros en cada ocasión. En el último periodo de su vida, con las pencas marchitas, la producción desciende drásticamente y el maguey muere, la producción total de cada planta varía de 500 a 1000 litros (Salazar 2004).

El aguamiel es un líquido dulce incoloro y transparente. Posee un ligero olor herbáceo y contiene diversos minerales, además de ser rico en carbohidratos y proteínas. El contenido de sacarosa en el jugo de la planta es apreciable y por tanto, el aguamiel es un sustrato que puede ser empleado como materia prima para ser fermentado y obtener, proteína de la fermentación de levadura así como para la obtención de vitaminas mediante la fermentación bacterias. La composición del agua miel se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición del aguamiel

Componente	Variedades		
	Manzo	Cenizo	Amarillo
Densidad (g.L ⁻¹)	1.298	1.268	1.231
pH	6.3	6.4	6.6
Índice de refracción	1.352	1.353	1.365
Sólidos solubles (°Brix)	11.44	11.01	12.67
Acidez (%)	1.65	1.41	1.47
Humedad	87.0	87.9	86.0
Proteínas (g.L ⁻¹)	3.41	3.11	2.49
Cenizas (g)	0.534	0.413	0.480
Azúcares reductores (g.L ⁻¹)	1.637	1.973	1.069
Glucosa (mg.L ⁻¹)	2.310	3.12	2.5
Fructosa (mg.L ⁻¹)	4.703	4.928	4.7

(Flores, *et al.* 2008).

Los aminoácidos presentes en mayor proporción en el pulque son el ácido aspártico y el ácido glutámico. Es importante hacer hincapié en que aminoácidos como lisina, metionina y cisteína se encuentran en proporción considerable (Flores *et al.*, 2008).

III. Microorganismos en el Pulque.

La fermentación del pulque inicia en el aguamiel procedente del maguey, pero el proceso de fermentación es acelerado con la adición de un “inóculo” (una porción de pulque previamente producido). El tiempo de fermentación e inóculo varía dependiendo del productor y la región geográfica en la que se elabora, el tiempo puede variar desde unas horas, un día completo o toda la noche (dependiendo de cuándo fue recolectado el aguamiel). Los principales criterios para determinar que la fermentación ha llegado a su fin es la viscosidad generada debido a polisacáridos producidos o a su contenido de alcohol. Todo el proceso no se hace en condiciones completamente asépticas, por lo que la mezcla de microorganismos involucrados en el proceso de fermentación depende de los microorganismos naturalmente asociados al aguamiel, que se hayan añadido durante su recolección, manipulación, transporte e inoculación (Escalante *et al.*, 2004).

Los microorganismos que se han reportado con mayor frecuencia que forman parte de la microbiota del pulque (Tabla 2) incluyen: levaduras y varias especies de bacterias como a *Zymomonas mobilis* productora de alcohol y BAL homo- y hetero- fermentativas, como *Leuconostoc mesenteroides* productora de polisacáridos.

Tabla 2. Grupos bacterianos detectados en el pulque por aplicación de técnicas de cultivo y técnicas no dependientes de cultivo.

Organismo identificado o detectado

Subdivisión <i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i>
<i>Lactobacillus</i> cepa ASF360, <i>L. spp</i> AC07 <i>L. Y10</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. acetotolerans</i> , <i>L. hilgardi</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracollinoides</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> ,
<i>Lactococcus spp</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. lactis ssp cremoris</i> , <i>Leuconostoc kimchii</i>
<i>Leuconostoc citreum</i> , <i>L. gasicomitatum</i> , <i>L. mesenteroides spp mesenteroides</i> , <i>L. pseudomesenteroides</i>
<i>Bacillus sp.</i> , <i>B. lichenformis</i>
<i>Pediococcus urinaeequi</i>
<i>Streptococcus devriesei</i>
Subdivisión <i>Arthrobacter</i>
<i>Micobacterium arborescens</i>
Subdivisión <i>Flexicabter-Cytophaga-Bacteroides</i>
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>
Subdivisión <i>protobacteria</i>
<i>Acetobacter pomorium</i>
<i>Gluconobacter oxudans</i>
<i>Zymomonas mobilis</i>
<i>Acetobacter malorum</i>
Subdivisión <i>proteobacteria</i>
<i>Hafnia alvei</i>
Rhodospiriales
<i>Acetobacter orientales</i>
Sphingomonadales
<i>Pomaceae</i>
Subdivisión <i>gama protobacteria</i>
<i>Citrobacter spp</i>
<i>Sterotrophomonas spp.</i>
<i>Acinetobacter radioresitens</i>
Enterobacterias
<i>Enterobacter spp</i> , <i>E. agglomerans</i>
<i>Erwina rhapontici</i>
<i>kluyvera ascorbata</i> , <i>K. cochleae</i>
<i>Providencia spp</i>
<i>Serratia gimensii</i>
Flavobacterias
<i>Chryseobacterium spp.</i>
Eucariotas
<i>I. Tipo Saccharomyces</i>
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>S. paradoxus</i>
<i>IV. No saccharomyces</i>
<i>Candida spp</i> , <i>C. parapsilosis</i>
<i>Clavispora lusiraniae</i>
<i>hanseniapora uvarum</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>Pichia spp</i> , <i>P. membranifaciens</i>
<i>Torulaspota delbrueckii</i>

Tabla elaborada a partir de (Escalante *et al.*, 2004; Lappe *et al.*, 2008; Escalante *et al.*, 2008)

Como se puede observar en la tabla varios microorganismos clasificados como bacterias probióticas se encuentran ampliamente distribuidas en esta bebida. La microbiota esta

compuesta de varias especies de microorganismos que en conjunto ayudan a la digestión de los alimentos, así como al mejoramiento y estimulación del sistema inmune, efecto que solo se logra si se encuentra en las proporciones indicadas de microorganismos, principalmente se busca el desarrollo de bacterias inocuas que estimulen el sistema inmune además de inhibir la proliferación del patógenos oportunistas, por lo tanto el pulque es una bebida que aumenta la proporción de estas bacterias.

IV. Probióticos:

La mayoría de los probióticos son BAL. Existen varias propiedades que caracterizan una bacteria probiotica, pero cada microorganismo actúa por mecanismos diferentes, cada cepa probiótica tiene sus propias funciones en el organismo humano. Debido a que son microorganismos para consumo humano deben ser evaluadas en animales y posteriormente en humanos antes de ser distribuidas comercialmente.

Es importante tener en cuenta que los mecanismos por los cuales estas bacterias causan un beneficio, no está bien establecido, por lo tanto al establecer una metodología para justificar el efecto benéfico de la cepa al hospedero, lo primero es establecer concretamente; qué efecto y en qué circunstancias se obtiene este beneficio. Se sabe poco de la dosis efectiva de un probiótico capaz de tener un efecto benéfico en la salud gastrointestinal, sin embargo las cuentas fecales endógenas comunes de lactobacilos en humanos sanos se encuentran alrededor de 10^5 y 10^8 UFC/g de heces, por lo tanto se busca tener un nivel poblacional dentro de estos rangos para que se observe un efecto benéfico en el hospedero (Tuohy *et al.*, 2007).

La mayoría de las bacterias probióticas; son similares o forman parte de la microbiota intestinal, estas bacterias pertenecen principalmente a dos géneros; *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*. Dentro de cada grupo, existen diferentes especies por ejemplo: *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. ruteri* y *Bifidobacterium bifidus*, *B. Longum*, etc, pocos probióticos comunes como *Saccharomyces boulardii*, son levaduras.

En el humano adulto existen $\sim 1 \times 10^{12}$ (Stecher *et al.*, 2010) bacterias por gramo de contenido en el intestino grueso, en el cual se estima que existen varios cientos de especies bacterianas. Además de ésta complejidad, está el hecho de que cada ecosistema intestinal individual puede tener sus propias características distintivas que varían con la edad y con varios parámetros ambientales.

El sistema gastrointestinal está poblado por bacterias potencialmente patógenas que son capaces de degradar proteínas (proceso conocido como putrefacción), liberando amonio, aminas e indoles, que en altas concentraciones pueden ser tóxicas para los humanos, siendo las más importantes; histamina, putrescina, feniletilamina y tiramina, que se producen por la descaboxilación de aminoácidos mediante enzimas específicas, por ejemplo la histamina se produce de la descarboxilación de la tirosina, por la tirosina descarboxilasa. La feniletilamina por la descaboxilación de la fenilalanina, por la fenilalanina descarboxilasa (Fotiadis *et al.*, 2008). Esta enzima se encuentra altamente activa en bacterias enteropatógenas como *Clostridium*, *E. coli*, *Salmonella*, etc. Por lo que la suplementación de la dieta con probióticos ayuda a reducir el número de bacterias potencialmente dañinas en el intestino, enriqueciendo así la población intestinal con microbiota capaz de fermentar carbohidratos, como principal fuente de carbono.

Las bacterias lácticas también tienen actividad proteolítica, ya que muchas de ellas crecen en alimentos de origen lácteo y degradan la caseína liberando péptidos y aminoácidos para la obtención de energía. Se han encontrado enzimas que descarboxilan aminoácidos, liberando aminas, pero su actividad es menor que la de las bacteria enteropatógenas y depende de las condiciones exteriores. Se sabe que en escasez de nutrientes esta actividad se ve favorecida y se ve disminuída cuando hay una alta producción de ácidos orgánicos.

Stecher *et al.* (2010) observaron que la prevalencia de una especie de microorganismos favorece la colonización de microorganismos similares en el intestino, estos autores probaron que el consumo de *Lactobacillus ruteri* favorece y aumenta la cuenta total de lactobacilos en la microbiota intestinal favoreciendo así el desarrollo de estas bacterias benéficas.

También se ha observado que los próbioticos son parte importante en el desarrollo de un sistema inmune adecuado, así como formadores de una barrera protectora contra microorganismos causantes de enfermedades y el mejoramiento de la absorción de nutrientes. Cada persona tiene una mezcla diversa de microorganismos, la interacción entre la persona y los microorganismos en el cuerpo y entre los mismos microorganismos puede ser crucial para la salud y el bienestar de la persona.

Los probióticos se han utilizado balanceando la microbiota cuando:

- Se administran antibióticos. Los antibióticos eliminan bacterias, benéficas y patógenas, lo que provoca que la barrera creada por la microflora se vea reducida, generando

espacios en donde las bacterias patógenas pueden colonizar. También al reducir el número de microorganismos, disminuye la capacidad de absorción de nutrientes, debió que muchos de los compuestos que consumimos no son digeridos por el estómago, o por las enzimas del intestino, a causa de la complejidad de su estructura como es la celulosa, el almidón, y las gomas utilizadas como aditivos alimentarios, por lo tanto no son absorbidas, provocando así un desequilibrio osmótico que produce diarrea. En este caso se utilizan los probióticos para restablecer la proporción de Fimicutes necesarios para el buen asimilamiento de estas fuentes no digeribles, disminuyendo los efectos secundarios como gases, calambres, o diarrea, y evitando que patógenos oportunistas colonicen el intestino, provocando así diversas infecciones.

- Cuando se contrae alguna infección ya sea causada por bacterias, hongos, levaduras y parásitos. Varias investigaciones están explorando si los probióticos pueden detener el crecimiento de estos microorganismos en primer lugar y suprimir su crecimiento en condiciones como:
 - Diarrea infecciosa
 - Síndrome del intestino irritado
 - Síndrome del intestino inflamado
 - Infección con *Helicobacter pylori*
 - Decaimiento de los dientes por enfermedad periodontal
 - Infecciones vaginales
 - Infecciones estomacales y respiratorias en niños
 - Infecciones en la piel

A parte de esto, el interés recientemente se ha enfocado en el hecho de que hay células en el intestino que están conectados con el sistema inmune. Existen diversas teorías en las que se ha observado que al alterar la microbiota intestinal (consumiendo bacterias probiótica), se puede afectar el sistema inmune. Las investigaciones científicas de los probióticos y su potencial para prevenir y tratar enfermedades está en una primera etapa, pero moviéndose rápidamente. En noviembre del 2005, en un congreso del Centro Nacional de Medicina alternativa y complementaria NCCAM (por sus siglas en ingles), se discutió y se dio evidencia de que los probióticos ayudan en los siguientes problemas:

-En tratamiento de la diarrea (esta es la evidencia más fuerte, especialmente para diarrea causada por rotavirus).

-Para prevenir y tratar infecciones en el tracto urinario o en el tracto genital femenino.

-Para tratar el síndrome de intestino irritado.

-En la reducción del cáncer de vejiga

-Para acortar el tiempo de duración de una infección causada por la bacteria

Clostridium difficile

-Para prevenir y tratar pouchitis (inflamación del saco ileal quirúrgico)

-Para prevenir y tratar dermatitis atópica (eczema) en niños.

En este mismo congreso se observó que los estudios de probióticos como posible cura son pobres y se observa un fuerte efecto placebo. Para dar conclusiones más precisas son necesarias más investigaciones con pruebas clínicas más largas y cuidadosas (NCCAM 2008).

Una propiedad muy importante para seleccionar una cepa potencialmente probiótica es determinar la resistencia a pH bajos, similar al encontrado en el estómago (pH=3.5), así como resistencia a concentraciones de sales biliares similar a la encontrada en el intestino. Se ha reportado que la resistencia a estas dos condiciones es la propiedad probiótica que asegura que un microorganismo llegue vivo al tracto intestinal.

Las sales biliares son soluciones acuosas de compuesto orgánicos e inorgánicos, la composición se muestra en la tabla 3.

Tabla 3 .Componentes mayoritarios de sales biliares hepáticas

Constituyente	
Sodio (mmol/L)	145
Potasio (mmol/L)	4
Cloruro (mmol/L)	90
Sales biliares (mmol/L)	40
Colesterol (mmol/L)	3
Fosfolípidos (mmol/L)	7
Peso seco (mg/mL)	20
Osmolaridad (mOsm/L)	280
pH	7.5-8.0

(Begley *et al.*, 2005)

La función principal de las sales biliares es actuar como detergentes biológicos que emulsifican y solubiliza grasas. Además de que por su naturaleza también pueden emulsificar y

solubilizar; los fosfolípidos y algunas proteínas de la membrana celular, desequilibrando la homeostasis celular de las bacterias, confiriéndole así un gran potencial antimicrobiano. Además de esto las sales son secretadas con Inmunoglobulina A y mucus con el fin de prevenir crecimiento y la adhesión de bacterias.

Algunas bacterias tienen la capacidad de resistir la acción de sales biliares, esta resistencia se ha asociado con la presencia de actividad hidrolasa. Sin embargo (Begley *et al.*, 2005) observó que bacterias Gram negativas tienen una mayor resistencia a sales biliares, probablemente por la estructura de su pared celular más que a la presencia de una hidrolasa. Además observaron que la resistencia es dependiente de la cepa y que los mecanismos son muy complejos, por lo que es difícil hacer generalizaciones acerca de cuales son las características que les confieren esta propiedad de resistencia y por tanto es importante efectuar este ensayo con cada una de las cepas que trabajé para observar si presenta resistencia o no.

Otra característica de las cepas probióticas es la capacidad de generar una barrera contra patógenos por la producción de polímeros, por esto, aquellos microorganismos productores de polímeros son más factibles de ser usados como cepas probióticas, porque crean una barrera que evita la adhesión de patógenos, pero también de otras bacterias probióticas por lo tanto es importante modular el consumo de estos microorganismos, debido a que el beneficio de un solo microorganismo es menor que el beneficio de una comunidad microbiana equilibrada, ya que como se puede observar las actividades de la microbiota intestinal son diversas y todas son igualmente importantes (Stack *et al.*, 2010).

Desde hace mucho se han consumido alimentos suplementados con probióticos, ya que los alimentos tradicionales fermentados en muchos países son un medio ideal para su crecimiento y desarrollo. Para producir un producto nuevo adicionado con probióticos es importante tomar en cuenta las siguientes consideraciones, de manera que se asegure que los probióticos lleguen en condiciones adecuadas al tracto gastrointestinal:

- 1 El estado fisiológico dado por la fase de crecimiento a la que se encuentra, ya sea estacionaria o logarítmica.
- 2 La concentración al momento del consumo.
- 3 La condiciones físicas durante el almacenamiento.

- 4 La composición química del medio al cual es añadido; pH, actividad del agua, carbono, nitrógeno, minerales y contenido de oxígeno.
- 5 La posible interacción del probiótico con cultivos iniciadores (en caso de que existan) la producción de bacteriocinas, antagonismo, sinergismo.

Los efectos que se han reportado hasta la fecha se observan en la tabla 4.

Tabla 4. Principales bacterias probióticas reportadas y sus efectos benéficos concretos.

Microorganismo	Beneficio	Fuente
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Modulador de la fisiología intestinal, previniendo la infección por bacterias patógenas.	(Sarker <i>et al.</i> , 2005). (Ibnou-Zekri <i>et al.</i> , 2003) (Martin <i>et al.</i> , 2006)
	Estimular el sistema inmune.	
	Normaliza desordenes gastrointestinales.	
<i>L. rhamnosus</i>	Disminuye el tiempo de diarrea por retrovirus en niños.	(Szymański <i>et al.</i> , 2006)
	Ayuda en el síndrome de intestino inflamado.	
	Ayuda en el tratamiento de eczema atópico. En la prevención de infecciones en el tracto urinario y vaginal.	
<i>L. acidophilus</i>	Ayuda en el tratamiento de diarrea en personas tratadas con radiación.	(Chitapanarux <i>et al.</i> , 2010) (Franceschi <i>et al.</i> , 2007) (Midolo <i>et al.</i> , 1995)
	Inhibición contra <i>Helicobacter pylori</i> <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	
<i>Lactobacillus casei</i> shirota.	Mejora la respuesta inmune causada por alergia, en un modelo animal: ratones propensos a alergias.	(Lim <i>et al.</i> , 2009)
	Previene diabetes mellitus en murinos. Inhibe la producción en suero de IgE en ratones sensibilizados con ovoalbúmina. Reduce carcinogénesis y bloquea la adherencia de patógenos a las células del intestino.	
<i>Bifidobacterias</i>	Desarrollo del sistema inmune y mantenimiento de las funciones intestinales.	(Chiang <i>et al.</i> , 2000) (Rinne <i>et al.</i> , 2005) (Ouwehand <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , y <i>B. pseudocatenulatum</i>	Tienen efecto específico en la activación de células dendríticas observadas en la expresión de CD83.	(Tannock 2010)

Las investigaciones sobre probióticos se han enfocado a buscar microorganismos con efectos más específicos que los hacen ideales para tratar alguno de los trastornos digestivos y se han agrupado como se observa en la figura 8.

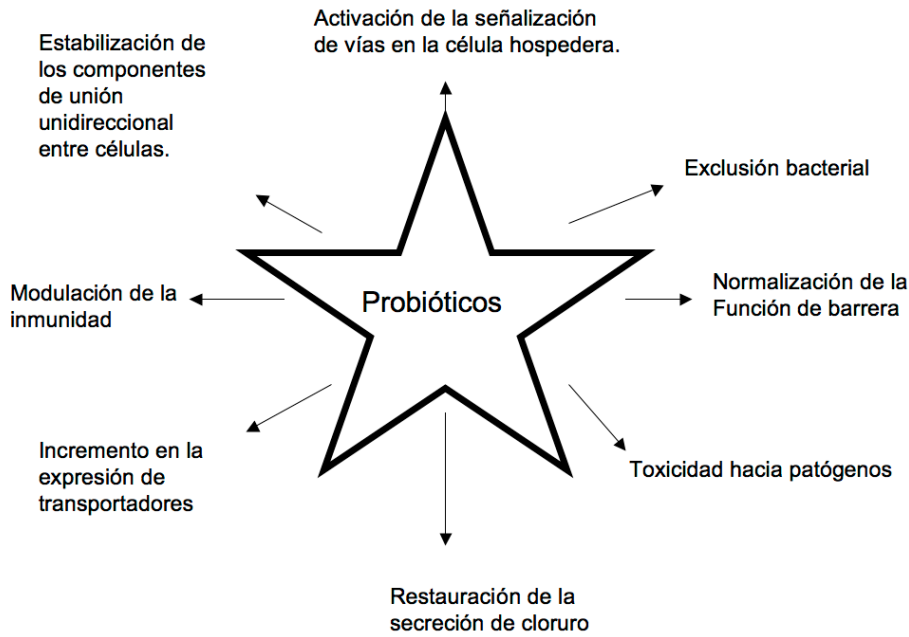


Figura 8 Espectro de los efectos benéficos deseados de organismo probiótico que pueden ser de importancia relevante en el tratamiento de enfermedades digestivas (Resta-Lenert y Barrett 2009).

V. Bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana sintetizados en los ribosomas (aunque varios de ellos requieren una extensa modificación postraduccional para adquirir su actividad). El gen estructural de la bacteriocina y los genes que codifican proteínas implicadas en el procesamiento y transporte de la bacteriocina (y en exhibir inmunidad a su acción) se encuentran a menudo, en un plásmido o en un transposón. Las bacteriocinas de BAL están asociadas al crecimiento, generalmente hay una alta producción y excreción de estas en la fase exponencial y cesa al final de ésta. La producción de bacteriocinas se ve afectada por la concentración, fuente de carbono, fuentes de nitrógeno, fosfato, cationes, presencia de tenso activos e inhibidores.

Las bacteriocinas se designan de acuerdo con la especie del organismo que las produce. Así *Escherichia coli* produce colicinas codificadas en el plásmido Col. Las bacteriocinas o agentes similares de las bacterias Gram-positivas son bastante diferentes de las colicinas. Se piensa que al menos el 99% de las bacterias pueden producir cuando menos una bacteriocina y la única razón de que no se hayan aislado es debido a que han sido muy poco estudiadas (Monroy *et al.*, 2009).

La mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL son péptidos pequeños termoestables que presentan actividad inhibitoria contra especies bacterianas relacionadas. Estas bacteriocinas inducen a la formación de poros en membrana citoplasmática provocando la salida de compuestos intracelulares. Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas, como las BAL son péptidos pequeños de 3-6kDa, aunque puede haber excepciones. Recientemente se ha encontrado que las bacteriocinas también tienen efecto contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora, por lo tanto se ha buscado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo con sus características bioquímicas y genéticas, como se muestra a continuación (Ruiz 2008);

Clase I o lantibióticos. Un lantibiótico es un péptido que tiene acción bactericida, los cuales constituyen un grupo de péptidos pequeños que están caracterizados por su alto contenido de aminoácidos inusuales, como son la lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre a la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos.

Clase II o no lantibióticos. Son péptidos pequeños estables al calor, que contienen aminoácidos regulares.

Clase III. Péptidos largos lábiles al calor, no modificados.

Clase IV. Mezcla de proteínas con lípidos y/o proteínas.

El estudio de bacteriocinas en BAL inició en 1928 en *Lactococcus* en queso. En 1933 se describió por primer vez una sustancia de naturaleza peptídica con actividad antimicrobiana producida por cepas de *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, conocida como Nisina, comercializada en 1953 y aprobada por la OMS en 1969. La Nisina es un péptido de 34 aminoácidos, existen dos tipos; Nisina A y Nisina Z. Esta bacteriocina es activa en medio ácido, y su actividad aumenta conforme aumenta la temperatura y disminuye el pH, inhibe especialmente *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria* (Savadogo *et al.*, 2006). Otras bacteriocinas aisladas de bacterias lácticas se presentan en la Tabla 3.

Tabla 5. Bacteriocinas y los microorganismos que las producen.

Bacteriocina	Microorganismo aislado	Procedencia
Pediocina	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Carnes
Plantaracina	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Vegetales fermentados
Helveticina J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	-
Mesenterocina 54	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Vegetales fermentados
Pediocina AcH	<i>Pediococcus Acidilactici H</i>	Carnes
Leucocin	<i>Leuconostoc gelidum</i> UAL 187	Vegetales fermentado
Carnobacteriocin	<i>Carnobacterium piscicola</i>	

(Savadojo *et al.*, 2006)

La interacción entre la cepa y el efecto, producto de alterar la microflora fue inicialmente observado por MechnikBoff (1907) (Monroy *et al.*, 2009), en bacterias productoras de ácido láctico usadas en la prevención y tratamiento de enfermedades intestinales. La interacción entre la cepa probiótica y la microflora puede basarse en la competencia con bacterias patógenas por sitios de adhesión a los receptores epiteliales, por nutrientes y a la producción de sustancias específicas como bacteriocinas.

Métodos para identificar bacteriocinas

Los bioensayos más utilizados para la detección de bacteriocinas son las pruebas de difusión en agar y los métodos turbidimétricos en la inhibición del desarrollo de un microorganismo indicador. A pesar de que los bioensayos de difusión en agar tienen muchas limitaciones, como baja sensibilidad y mayores tiempos de ejecución, es el método más utilizado en los ensayos cotidianos, debido a su aceptable sensibilidad, simplicidad y relación costo-eficiencia (Pongtharangkul y Demirci 2004). Es importante tener en cuenta que la cuantificación de la actividad antimicrobiana es subjetiva y depende de la sensibilidad de la cepa indicadora, además de que son pruebas inespecíficas, pues no pueden discriminar entre los posibles compuestos que causan el efecto.

Bacteriocinas en *Leuconostoc*.

Se han encontrado varias bacteriocinas en *Leuconostoc* y se ha observado que la máxima actividad de estas se presenta cuando las células crecen en fase exponencial a pH de 5.5 y 7.5 a una temperatura óptima de 30°C, y su estabilidad depende de la fuente de carbono presente en el medio. En experimentos anteriores se ha visto que la presencia de Na⁺ y K⁺ ayuda a la actividad de la bacteriocina y se inhibe la acción de estos péptidos en presencia de Mn²⁺ Mg²⁺ y

Ca²⁺, su actividad es inhibida en presencia de Hg²⁺. Las cepas de *Leuconostoc* tienen un fuerte poder inhibitorio contra *Listeria monocytogenes* (Martinez y Martinis 2006).

El poder inhibitorio no es sólo debido a la presencia de bacteriocinas. En *L. mesenteroides* se ha reportado que producen peróxido de hidrógeno, diacetilo y ácido acético L y D. Se ha demostrado que el isómero que tiene mayor poder inhibitorio es el D y también se sabe que los ácidos acético y propiónico son más efectivos que el ácido láctico, esto debido a los valores de pK_a (3.8, 4.75, 4.87). También se sabe que el ácido acético es más efectivo contra *Listeria monocytogenes* y actúa en sinergismo con el ácido láctico disminuyendo el pH y aumentando la toxicidad del ácido acético. El peróxido de hidrógeno es precursor de radicales libres bacteriocidas como el super óxido que pueden dañar el DNA. Este compuesto inhibe a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas* spp. Diversos autores reportan la producción de varios compuestos con actividad antimicrobiana (Tabla 6) en *L. paramesenteroides*.

Tabla 6. Compuestos encontrados en una cepa de *L. paramesenteroides*

Compuesto	Peso molecular (G/mol)	Usos
Ácido pentadecanoico	242	Actividad en el mejoramiento de la artritis y el reumatismo y tiene acción anti-inflamatoria.
Ácido nonadecanoico	298	Acción antiinflamatoria
Ácido benzoico	278	Acción antiinflamatoria
Nonacosano	278	Propiedades antirreumáticas y antisépticas
Hexacosano	366	Promueve el crecimiento y el oscurecimiento del cabello
Nonacosanol	424	Constituyente de policosanol- reduce LDL y aumenta colesterol HDL
Xilacina	220	Usado como sedante, analgésico, relajante de músculos en veterinaria
Propoxifeno	325	Fármaco analgésico.

(Shoba 2007).

VII. *Salmonella* .

Salmonella es un bacilo Gram-negativo que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, son móviles por la presencia de flagelos peritricos y se reconoce dos especies; *S. bongori* y *S. enterica* la que a su vez se dividen en diferentes serotipos (Figura 8). Esta subdivisión se ha apoyado en varios métodos de hibridación ADN/ADN y métodos serológicos. Cada subespecie, a su vez esta subdividida en serotipos, de acuerdo al tipo de antígenos H (flagelar; del alemán *haunch*, por el halo producido en un medio de cultivo a raíz del movimiento) u O (somático: del

alemán *ohne hauch*, sin movimiento). El antígeno H está conformado por la proteína más abundante del flagelo, que es la estructura que permite el movimiento. El antígeno O está conformado por una cadena repetida de polisacáridos, que forma parte del lipopolisacárido (LPS), que se genera y sobresale de la membrana externa y que actúa como una barrera de protección a agentes externos (Figueroa y Verdugo 2005).

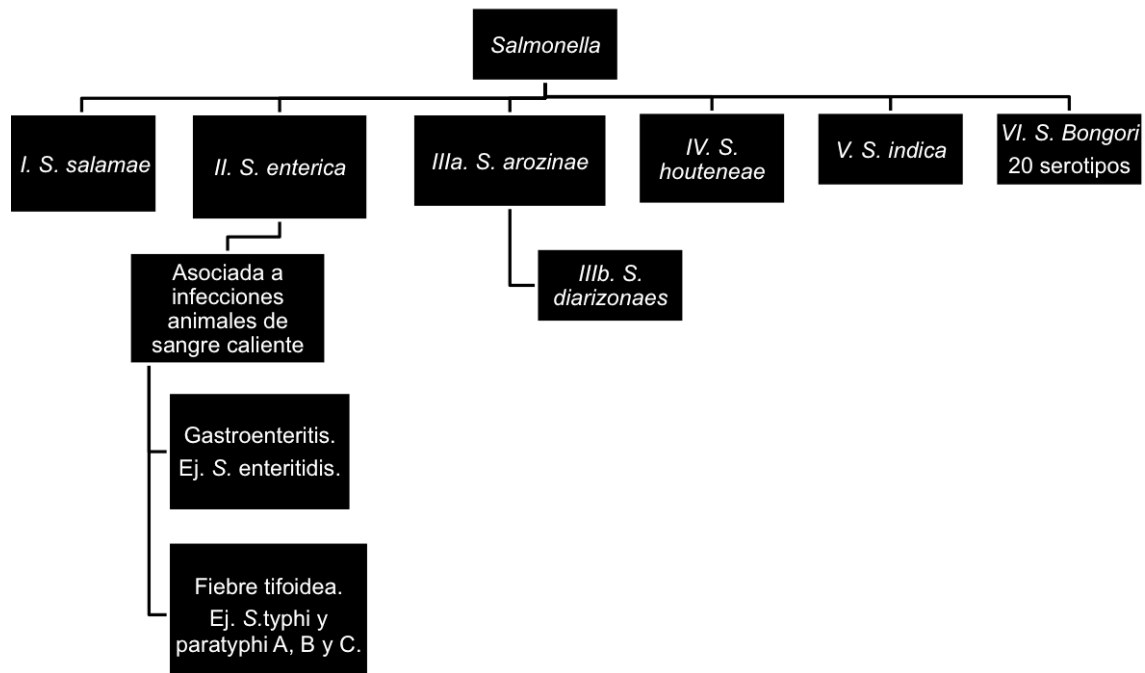


Figura 9. Clasificación de *Salmonella*

Como se observa en la figura 8 sólo *S. enterica* causa enfermedades en humanos y en animales de sangre caliente. Cuando *Salmonella* interacciona con el hospedero se pueden dar tres posibilidades:

1. Eliminación del microorganismo por el sistema inmune
2. Aparición de un estado de portador asintomático
3. Desarrollo de enfermedad, con distintas manifestaciones clínicas; infecciones intestinales (enteritis y colitis) e infecciones invasivas. Entre estas últimas se incluyen las fiebres entéricas, infecciones intestinales y la septicemia, con o sin infección focal.

Aunque la exposición a *Salmonella* es frecuente se requiere de un inóculo de aproximadamente 10^6 - 10^8 bacterias para el desarrollo de la enfermedad sintomática; otros

factores como el tipo de cepa, que alimento es consumido con la bacteria y el estado fisiológico del hospedero, favorecen o no el desarrollo de la enfermedad (Sánchez 2003).

La aparición de la enfermedad con *S. typhimurium* ocurre de 8 a 48h después de la ingesta. Los síntomas incluyen repentino dolor de cabeza, escalofríos, vómitos, y diarrea seguido de fiebre durante varios días. Esta enfermedad normalmente desaparece sin intervención en 2 o 3 días. Sin embargo, incluso después de la recuperación, los pacientes tienen *Salmonella* en las heces durante varias semanas. *S. enterica* serovar Typhi causa una enfermedad conocida como fiebre tifoidea en donde las células son capaces de evadir el sistema inmune del hospedero, resultando en una septicemia, los síntomas son fiebre, dolor de cabeza, diarrea en algunos casos, y si no se trata puede resultar en la muerte.

Mecanismo de patogenicidad.

La bacteria experimenta severos cambios ambientales cuando entra al hospedero por vía oral, como por ejemplo; pH ácido, aumento de la temperatura, baja tensión de oxígeno y alta osmolaridad y responde a estos cambios modulando la expresión de sus genes a través de una regulación coordinada y precisa. Para lograr este control, *Salmonella* utiliza sistemas reguladores de dos componentes que incluyen un sensor de histidina cinasa (proteína transmembranal) y un regulador de respuesta que se activa por fosforilación, que provoca la activación o represión a nivel transcripcional, la expresión de un grupo de genes.

Los sistemas de regulación son los siguientes (Figuroa y Verdugo 2005).

- PhoP/PhoQ: Involucrado en la regulación de la respuesta a la tolerancia ácida y en la regulación de la capacidad de resistir a los péptido catiónicos. Fosforila y desfosforila proteínas.
- PmrB/PmrA: Activa promotores que alteran el LPS y median resistencia a péptidos catiónicos como las poliximinas. Los péptidos catiónicos antibacterianos se unen iónicamente al grupo fosforil del lípido, desestabilizando las membranas bacterianas y causando muerte celular.
- SsrA/SsrB: Regulador de la isla de patogenicidad 2 (SPI-2).
- EnvZ/OmpR; Regulan genes de virulencia como *ssrA*, y *sifA*. Una vez que Envz detecta pH bajo y disminución en la osmolaridad fosforila a OmpR, el cual es un promotor de *ssrA*. *ssrS* es un segundo sensor de señales tardías del comportamiento

vacuolar, probablemente detecta la disminución de fosfato; SsrA fosforila a la proteína SsrB el cual permite la transcripción de *sse*, *ssc* y *ssal*.

- BarA/SirA. Codifican para un sensor cinasa de dos componentes y a un regulador respectivamente, este sistema aumenta la expresión de los genes de virulencia y disminuye la expresión de los genes relacionados con la movilidad.

La regulación de los genes de SPI-1 esta mediada por HilA. A su vez la expresión de *HilA* esta controlada transcripcionalmente por los sistemas PhoP/PhoQ y Sir A. PhoP reprime a *hilA*, mientras que SirA activa su transcripción. Las señales que activan a SirA son bajas concentraciones de oxígeno, alta osmolaridad y pH ligeramente alcalino, por otra parte PhoP se activa en condiciones limitadas de Mg^{2+} , condiciones que se ven reflejadas en el lumen intestinal y en el medio intracelular.

Así un pH ligeramente alcalino y elevada osmolaridad inducen la SPI-1 y reprimen SPI-2 por el contrario una osmolaridad y pH bajos reprimen a la SPI-1 e inducen SPI-2.

Existen 5 pasos que *Salmonella* debe seguir para poder causar daños al hospedero, en cada uno de ellos la regulación de los genes se ve modificada:

1. Adhesión
2. Invasión
3. Replicación
4. Resistencia a los mecanismos de defensa
5. Daño al hospedero.

a) Mecanismos de adherencia.

EL mecanismo de invasión de *Salmonella* depende de su capacidad de interactuar con las células del epitelio para así poder accionar una reacción en cadena que lleva a la invasión de esta dentro de las células epiteliales donde puede accionar mecanismos de defensa y replicación para sobrevivir.

Salmonella cuenta con flagelos que dirigen a la bacteria para llegar al epitelio intestinal, mediante quimiotaxis, permitiendo atravesar la espesa capa de mucina y contribuyen con el proceso de inflamación. Algunos mecanismos de adhesión pueden involucrar varios tipos de fimbrias o pili, cuatro de los cuales están definidos genéticamente: fimbria tipo 1 (*fim*), fimbria codificada por plásmidos (*pef*), fimbria polar larga (*lpf*) y fimbria agregativa delgada (Curli)

(*agf/csg*). Es posible que las fimbrias ayuden a la bacteria a generar un contacto estrecho con las células hospederas y además permitir la interacción de factores que estimulan la migración transepitelial de neutrófilos. La presencia de por lo menos estos cuatro sistemas fimbriales sugiere que la adhesión a superficies celulares y no celulares puede ser un paso crítico en la supervivencia de *Salmonella* en el medio ambiente, ya que ésta responde a factores del medio como pH y osmolaridad (Sánchez 2003). Las adhesinas tienen la capacidad de activar a los linfocitos B y neutrófilos. *Salmonella* expresa una gran variedad de tipos de fimbrias con diferente especificidad de unión. Se han descrito diferentes operones en cada una de las variedades de *S. enterica*, cada uno de ellos participa en la adhesión a diferentes tipos celulares, y se expresan cuando se presentan las condiciones adecuadas de temperatura, pH, osmolaridad y disponibilidad de nutrientes.

b) Mecanismos de invasión.

Después de la ingestión, *Salmonella* inicia su ciclo de infección invadiendo al hospedero a través del tejido linfoide, incluyendo las placas de Peyer; se adhiere apicalmente a las células epiteliales del íleon y a las células M debido a que estas células no presentan estructura en borde de cepillo, ni glicocálix.

Salmonella responde al contacto con las células del organismo hospedero activando un sistema especializado de secreción de proteínas llamado; proteínas de secreción Tipo III (SSTIII) que forman parte de la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) (Hueck 1998), y que permite a la bacteria inyectar proteínas de patogenicidad en el citosol de la célula hospedera.

La invasión depende de la actuación de SPI-1-SSTIII que inyecta en la célula blanco, una gran variedad de efectores, no todos codificados por SPI-1. Estas moléculas interactúan directamente con los sistemas de señalización celulares, forzando la entrada del patógeno. Entre ellas se incluyen dos activadores de las GTPasas Cdc42 y RAC de la familia Rho (SopE y SopE2) y una inositol fosfatasa (SopB también conocida como SigD), una proteína de unión a actina (SipA, conocida como SsA) y dos efectores de función desconocida (SopA y SopD), que enciende señales en las células epiteliales que inducen rearrreglos del citoesqueleto, dando lugar a la formación de un ondulamiento en la superficie celular (fenómeno conocido como ruffling). Una vez que la *Salmonella* es internalizada la proteína SptP antagoniza la acción de

SopE en el rearrreglo del citoesqueleto, regresando a su forma inicial, este proceso se puede observar en la figura 10.

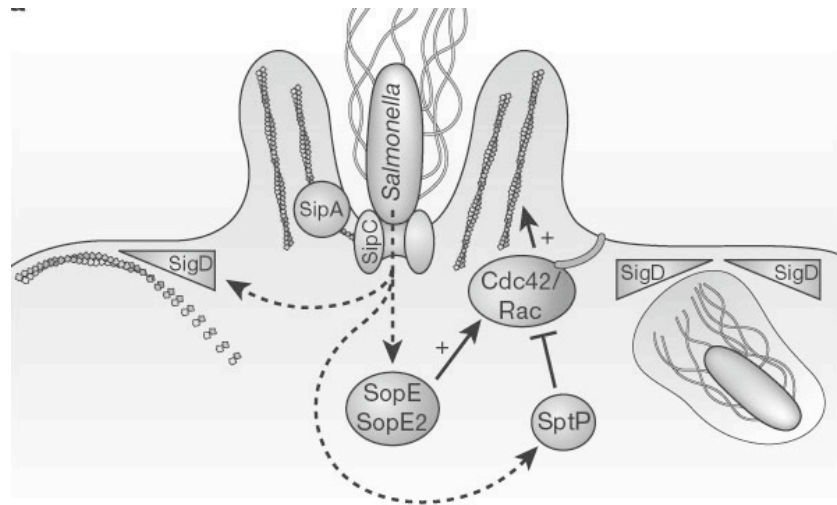


Figura 10. Mecanismo de invasión e infección sistémica de *Salmonella* en las células epiteliales de intestino (Gruenheid S. y Finlay B. B. 2003)

EL termino isla de patogenicidad (SPI; por sus siglas en inglés) se utiliza para designar regiones de expresión de DNA cromosomal esencial para la patogenicidad. Estas piezas de DNA frecuentemente no están presentes en bacterias no patógenas relacionadas. Se cree que las islas de patogenicidad y por ende los sistemas tipo III fueron adquiridos horizontalmente a través de una bacteria facilitadora en un "salto cuántico evolucionario" en patogénesis bacteriana (Darwin y Miller 1999).

Salmonella puede producir efectos citotóxicos que resultan en la destrucción de las células M y la invasión de enterocitos adyacentes tanto por la cara apical como por la basolateral, induciendo apoptosis de macrófagos activados mediante la proteína efectora SipB (Tabla 6). Y fagocitosis inducida en macrófagos no activados, para poder ser transportados a hígado y bazo.

Salmonella también induce la migración de neutrófilos y macrófagos (PMS) así como la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-18, GM-CSF, IFN- γ , TNF α , GCP-2 (proteína 2-quimiotáctica de granulocitos), GRO- α (gen α relacionado a crecimiento, GRO- β , y GRO- γ) que reclutan células fagocíticas y están involucradas en el proceso que provoca diarrea. La producción de citocinas proinflamatorias inducida por *Salmonella* es debida a la activación de

factores de transcripción NF- κ B y AP-1 como consecuencia de la estimulación de las MAP cinasas por parte de la proteína efectora SopE.

SopB activa Akt, (cinasa serina treonina) que puede regular la actividad de NF- κ B. El incremento de la permeabilidad vascular que acompaña la inflamación en combinación con la pérdida de integridad epitelial de la mucosa intestinal provoca la diarrea, al verse incrementada la salida de líquidos y electrolitos al lumen intestinal.

Algunos serotipos de *Salmonella* en especial *S. enterica* posee la capacidad de sobrevivir en el interior de los macrófagos, gracias a la actuación de un segundo SSTIII, codificado por SPI2 y de otros factores de virulencia. Sin embargo, los macrófagos que han reconocido y fagocitado a las bacterias también liberan IL-2, responsables del inicio de la respuesta inmune específica. Esta interleucina activa a macrófagos, adquiriendo éstos la capacidad de destruir a las bacterias que han sobrevivido en su interior.

En grupos de riesgo, fundamentalmente en personas inmunocomprometidas, pero también en jóvenes y adultos aparentemente sanos, las infecciones intestinales por *Salmonella* pueden evolucionar hacia infecciones extraintestinales. Esto se relaciona con la incapacidad de los macrófagos de destruir a las bacterias ingeridas.

c) Replicación

Después de un periodo de adaptación, *Samonella* tiene la capacidad de replicarse dentro de las vacuolas contenedoras de *Salmonella* (SCV, por sus siglas en inglés) que se caracterizan por tener concentraciones limitadas de Mg^{2+} , Fe^{2+} y un pH ácido, la acidificación dentro del fagosoma es necesaria para la supervivencia y replicación intracelular.

Para esto hace uso de SPI-2; las actividades del SSTIII codificado por SPI-2 son múltiples en la que destacan; interferir con distintos aspectos del tráfico vesicular, impidiendo la fusión de las SCV con endosomas y lisosomas, y por tanto, la destrucción intracelular; evita la muerte de las bacterias por acción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o de nitrógeno producidas por los fagocitos; controla la dinámica de la membrana de las SCV, el ensamblaje de una red de actina en torno a las SVC, origina la formación de extensiones filamentosas de la membrana (SIF *Salmonella*-induces filaments) de las SCV, y retrasa la destrucción apoptótica de las células infectadas. Al no ser degradada *Salmonella* en los macrófagos se inhibe el procesamiento y presentación de sus antígenos, los macrófagos migran a los ganglios linfáticos

mesentéricos, donde se multiplican. Desde el sistema linfático son liberadas al torrente sanguíneo, lo que permite su rápida dispersión. Las bacterias son eliminadas de la sangre por los macrófagos que recubren las sinusoides del hígado, bazo y médula ósea, donde se multiplican activamente. De ahí regresan a sangre, hecho que marca el inicio de las manifestaciones clínicas.

Las bacterias vuelven a ser retiradas de la sangre por macrófagos y vía hígado pueden alcanzar la vesícula biliar. Esto permite la reinfección del tracto gastrointestinal, estableciéndose la bacteria en las placas del Peyer del íleon distal, donde causa inflamación, ulceración y necrosis, como se observa en la figura 11.

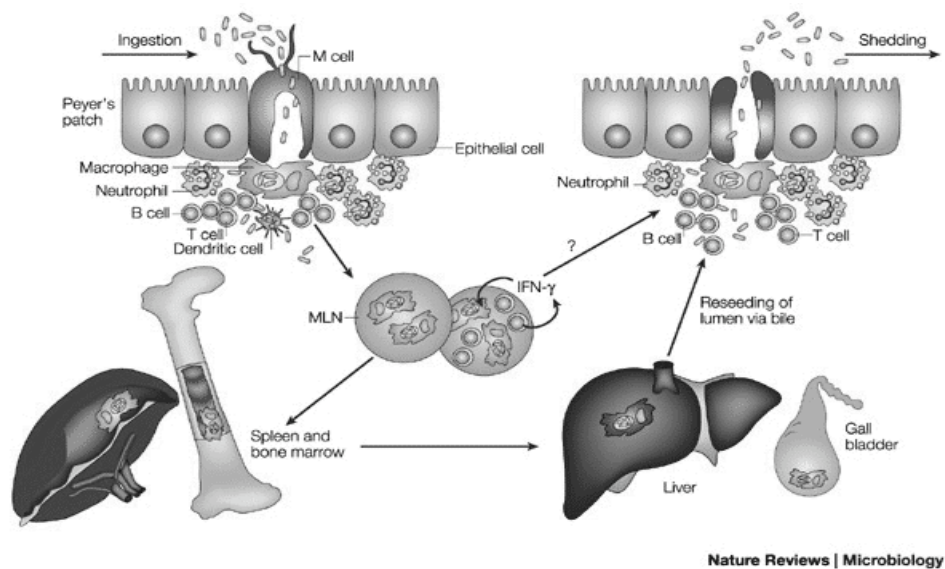


Figura 11. Proceso de replicación y diseminación de *Salmonella typhi* en humanos (Monack et al., 2004).

d) Islotes de patogenicidad.

Salmonella requiere de otros genes para su virulencia como *pagC*, *msgA* y el operón *iviVI-AB* (*in vivo induced*) que le brindan a la bacteria mejores capacidades de invasión. Algunos autores han llamado a estos genes extras islotes de patogenicidad. El gen *sifA*, *sopD*, *sspH2* y el operón *lpf* mencionados anteriormente también se encuentran dentro de esta categoría.

e) Sistema de secreción tipo III.

Las proteínas liberadas al medio externo deben de pasar por la membrana interna, el espacio peroplásmico y finalmente la membrana externa para lo cual las bacterias Gram-negativas han desarrollado diferentes sistemas de secreción

El sistema de secreción tipo III (SSTIII) de *Salmonella* (Hueck 1998) presenta las siguientes características: Las proteínas efectoras requieren chaperonas específicas para su secreción; para la activación completa del sistema se requiere de una señal inductora que generalmente es el contacto con la célula hospedera. Los componentes estructurales del SSTIII de la SPI-1 pueden ser divididos en categorías que incluyen: ATPasa de membrana interna, como Inv C, que posee secuencias similares a la subunidad B de F₀F₁ proteínas de membranas interna. InvG, PrgK y PGR forman la base de un estructura supramolecular llamada complejo de aguja, consiste en 4 anillos conectados por un bastón, los anillos inferiores interactúan con la membrana interna; los anillos superiores interactúan con la membrana externa y el peptidoglicano cuyo principal componente es PrgI, PrgJ controla su longitud. InvE permite el correcto ensamblaje del complejo aguja e interviene en la regulación del proceso de secreción, disparando los eventos intracelulares que permiten la invasión. InvH se requiere para la correcta localización de InvG.

La proteína InvA se considera como una de las más importantes para ensamblaje del SSTIII y exportación de proteínas efectoras.

Tabla 7. Resumen de los genes y proteínas más importantes que intervienen en la patogenicidad de *Salmonella*.

Isla o islote de patogenicidad	Genes más importantes	Proteínas codificadas más importantes	Función	Regulación
SPI-1 Localizada en el centisoma (cs) 63. Contiene 35-40kb con 31 genes. Y un porcentaje de G+C del 42-47%. Actúa en los primeros pasos de la infección	invABCDEFGH	InvA	Involucradas en un sistema de secreción tipo 3 SSTIII	
		InvH		
		pgrH		
	sipABC	SipA	Proteína de unión a actina que activa T-plasmina	
		sipB	Proteínas formadoras de poro por el que <i>Salmonella</i> penetran en el citosol de la célula eucariota .	
		sipC		
SPI-2 Codifica un SSTII que se activa cuando la bacteria se encuentra intracelularmente dentro de la vacuola. Cs31, 40kb, Porcentaje de G+C del	ssa (sistema de aparato de secreción)	SsA	Codifican el sistema de secreción tipo III. SsaB interfiere con el tráfico intracelular de membranas, inhibiendo la fusión de la vacuola con los lisosomas	

44.6%, con 32 genes.	<i>ssr/spiR</i>	SsrA,	Codifican un sistema regulador de dos componentes, requeridos para la expresión de sse, ssa, ssc.	ssrA a su vez regulado por OmpR/Envz que es responsable de la activación y represión de genes en respuesta a cambios de osmolaridad y pH.
		SsrB		
	sscAB	SscA y	Codifican chaperonas indispensables para el STIII.	
		SscB		
	sse (efector del sistema de secreción)	SseA	SseB necesaria para prevenir la localización de NADPH oxidasa, así como la formación de radicales reactivos de oxígeno en la membrana del fagosoma de macrófagos. SseD proteínas formadoras de poro requeridas para la translocación	
		SseS		
SseB				
SPI-3 Provee productos esenciales para el crecimiento en condiciones limitadas de Mg ²⁺ . Mide 17kb, cs 82, % de G+C es 39.8-49.3%	Operón <i>mgtCM</i>	MgtC (proteína supervivencia a macrófago)	Ayuda a mediar con el ambiente hostil dentro del macrófago.	Regulada por PhoP/PhoQ
		MgtB	MgtB transportador de Mg ²⁺ de alta afinidad	
SPI-4 Codifica un sistema de secreción tipo I ; media la secreción de toxinas. Adaptación en ambientes intracelulares en los macrófagos. Mide 27kb, con 18 genes en cs92.	<i>sopB</i>	SopB	Estimula la secreción de cloro, y se encuentra involucrada en el flujo de macrófagos para su secreción usa SSTII de SPI-1	Regulada por SsrAB
SPI-5 mide 7.5kb, cs 20 / de G+C 43.6%. Codifica proteínas efectoras involucradas en la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa.		MarT	Secreta una toxina similar a la <i>V. cholerae</i> .	
Otros islotes		Sef (Salmonella enteriditis fimbria)	Producción de fimbrias para la adherencia de Salmonella a las células epiteliales.	
	operon <i>lfp</i> ADBCE	Producción de		
		spTp	Actividad que incluye tirosina fosfatasa y actividad GTPasa. Después de la internalización, GAP genera el efecto inverso en el rearreglo del citoesqueleto inducido por <i>sopE</i> .	Controlado por Hila A e INEF.
		SipB (Proteína de invasión)	Translocasas y formación de poros cuando actúa con SipC. También se asocia con la proteasa proapoptótica I, que activa las citotoxinas IL-1B e IL-18	
		SipD (Proteína de invasión)	Regula el sistema de secreción tipo III	
	<i>sifA</i> (inductora de filamentos en Salmonella.	SifA	Induce la formación de filamentos necesarios para promover de nutrientes lasSCV.	Dependiente de SPI-2
	<i>spvRABCD</i>	SpvR	Codifica para un activador transcripcional que regula su propia síntesis y es requerido para la expresión de operón <i>spv</i> ABC.	Inducido por RpoS

VIII. Modelos animales

En las dos últimas décadas, los ratones se han convertido en una herramienta fundamental para los científicos. En primer lugar, porque son mamíferos, de modo que se pueden establecer innumerables paralelismos fisiológicos, anatómicos y metabólicos entre ellos y el ser humano.

Según escribe Allan Bradley, del Wellcome Trust Sanger Institute, de Cambridge, "A pesar de que las diferencias anatómicas entre los humanos y los ratones parecen notables (...), el análisis detallado de tejidos, órganos y células revela muchas similitudes, que se extienden a los sistemas de órganos, reproducción, comportamiento y enfermedades" (Bär 2006).

Desde este punto de vista, el ratón es un espejo que refleja con precisión la biología y patología de las personas, el desarrollo embrionario, el metabolismo de las enfermedades y el comportamiento del cáncer.

Además de que los ratones son ideales para estos ensayos debido a que son pequeños, fáciles de mantener en un laboratorio, y comparado con los mamíferos tienen un ciclo de crecimiento menor (alrededor de 2 meses).

4 Justificación.

El pulque es una bebida Mexicana tradicional elaborada a través de la fermentación del aguamiel producido por varias especies de maguey, bebida que se ha buscado erradicar a través del tiempo de la cultura mexicana en varias ocasiones sin ningún éxito. Esta resistencia a su erradicación es consecuencia de diversas razones, pero una de las más importantes es debido a su papel como sustituto del agua en regiones en donde el agua potable es inaccesible.

Con el tiempo los pueblo indígenas han observado que el consumo del pulque les trae ciertos beneficios, lo que ha generado alrededor de esta bebida varios mitos. Algunos beneficios se han demostrado científicamente, pero la mayoría permanecen solo como mitos, uno de los mitos habla de que el consumo del pulque ayuda en el tratamiento y prevención de enfermedades gastrointestinales. Por lo tanto el objetivo de este trabajo es fundamentar estas observaciones que se han realizado con el paso del tiempo, a través del aislamiento y caracterización de algunos microorganismos de esta bebida, ya que creemos que el beneficio se debe a la presencia de cepas posiblemente probióticas.

Anteriormente Campos (2010) aisló 13 cepas del pulque con resistencia a pH ácido, así como a una alta concentración de sales biliares y con actividad inhibitoria contra *Escherichia coli* EPEC, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi* y *S. typhimurium*. Con base a esto se utilizaron estas cepas para caracterizarlas mediante pruebas *in vitro* como son la inhibición contra los patógenos anteriormente mencionados así como su crecimiento a las 17 horas, con el fin de escoger una cepa para ser probada en modelos animales y observar si el consumo de esta cepa era suficiente para inhibir o disminuir el desarrollo de patógenos en ratones BALB/c de ocho semanas, para esto utilizamos *Salmonella enterica* serovar Tyohimurium, ya que esta causa un cuadro de infección tipo fiebre tifoidea y la infección puede ser detectada en hígado y bazo. Por lo tanto se espera que el consumo de la cepa aislada del pulque, administrada por un periodo de siete días, disminuya el grado de infección.

5. Objetivos

Objetivo general.

Seleccionar una de las 13 cepas aisladas del pulque con la mejor inhibición contra; *Escherichia coli* EPEC, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi* y *S. typhimurium* y buen crecimiento a las 17 horas para ser probada en modelos animales, y de esta manera poder observar en un modelo más complejo que una caja de Petri, la acción de esta bacteria y su efecto frente a un infección con *Salmonella enterica* serovar thyphimurium st^f. Hacer uso de las técnicas *in vitro* como son pruebas de difusión en agar y cuantificación de algunos de los metabolitos que la bacteria produce, con el propósito de explicar de manera general el mecanismo por el que estas cepas causan o no un beneficio al ratón y finalmente hacer uso de técnicas de biología molecular para poder identificarla y determinar si es una cepa previamente reportada o es una cepa nueva.

Objetivos particulares.

- 1.1 Cuantificar el efecto inhibitorio de las 13 cepas aisladas del pulque por Campos (2010) con un número estándar de microorganismos, contra el desarrollo de: *Escherichia coli* EPEC, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi* y *S. typhimurium* en medio MRS Difco™.
- 1.2 Seleccionar una cepa de las 13 cepas aisladas del pulque que presente la mejor inhibición contra los patógenos antes mencionados así como un buen crecimiento a las 17 horas en medio MRS Difco™.

1.3 Evaluación del efecto de la cepa seleccionada en la infección *in vivo* de *Salmonella typhimurium* L1344 st^f, en ratones BALB/c hembras y machos de ochos semanas.

1.4 Evaluación de la presencia de agentes antimicrobianos en sobrenadantes de cultivo MRS DifcoTM en medio líquido de la misma cepa.

1.5 Identificación de la cepa seleccionada por secuenciación del operón ribosomal.

6. Materiales y métodos.

a) Cepas y organismos utilizados en este trabajo.

Tabla 8. Cepas bacterianas y organismos utilizados en este trabajo.

Cepa bacteriana/organismo	Características/origen	Referencia
BAL 3H38	Aislado del pulque, identificado como <i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i> .	(Campos 2010)
BAL 3H52	Aislado del pulque, identificado como <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .	(Campos 2010)
BAL 6H15	Aislado del pulque, identificado como <i>Leuconostoc fructosum</i>	(Campos 2010)
BAL 6H39	Aislado del pulque, identificado como <i>Leuconostoc fructosum</i>	(Campos 2010)
BAL 6H74	Aislado del pulque, identificado como <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	(Campos 2010)
BAL P4	Aislado del pulque, identificado como <i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i>	(Campos 2010)
BAL P9	Aislado del pulque, identificado como <i>Leuconostoc durionis</i>	(Campos 2010)
BAL P22	Aislado del pulque, identificado como <i>Leuconostoc douzhi</i>	(Campos 2010)
BAL P31	Aislado del pulque, identificado como <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	(Campos 2010)
BAL P45	Aislado del pulque, identificado como <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. kimchi</i>	(Campos 2010)
BAL P49	Aislado del pulque, identificado como <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	(Campos 2010)
BAL P59CH	Aislado del pulque, identificado como <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	(Campos 2010)
BAL P59G	Aislado del pulque, identificado como <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	(Campos 2010)
<i>Escherichia coli</i> EPEC 2348/69	Cepa EPEC prototipo, serotipo O127:H6	(Myron <i>et al.</i> 1978)
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	ATCC9992	
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	ATCC14028	
<i>S. enterica</i> serovar	Resistente a estreptomicina	

<i>Typhimurium</i> L1334		
<i>Listeria monocytogenes</i>	Colección bacteriana del Cepario de la Facultad de Química, UNAM	
Ratones BALB/c	Cepas congénitas de machos y hembras, con un peso alrededor de 19-23g, con 8 semanas de edad, obtenidas del bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM. Campus Cuernavaca.	

- b) Estandarización de la cantidad de biomasa a utilizar en bioensayos de actividad antimicrobiana.

El análisis de la actividad antimicrobiana contra los microorganismos patógenos *E. coli* EPEC, *L. monocytogenes*, *S. entérica* serovar *Typhi* y *Typhimurium* realizado por Campos, (2010) se realizó de forma cualitativa. Con la finalidad de homogenizar la cantidad de microorganismos para cada una de los trece aislados de BAL, se determinó el número de UFC/mL en placas de agar-MRS Difco™. Cada una de las 13 cepas se mantuvieron en glicerol al 50% a -70°C. Para la determinación de cuenta en placa se sembró en 5mL de caldo MRS Difco™ durante 17h. Posteriormente se hicieron diluciones seriales hasta 10⁻⁵ y de las últimas 3 diluciones se tomaron 5µL a los cuales se les añadió 50µL de medio y se homogenizó con perlas de vidrio durante 3 minutos. Se incubaron 24h a 37°C, la cuenta en placa de cada una de las diluciones se hizo por triplicado.

- c) Bioensayos de actividad antimicrobiana.

Para determinar la actividad inhibitoria de cada una de las 13 cepas aisladas del pulque contra patógenos causantes de enfermedades en alimentos, se realizó una prueba en donde se inoculó por cuadruplicado 100µL con una concentración de 1X10⁹ UFC/mL, en cajas con agar APT Difco™, incubándose a 37°C durante 24 h. Al mismo tiempo se onocularon los cuatro patógenos *S. enterica* serovar *Typhi*, *S. enterica* serovar *Typhimurium*, *E. coli* EPEC y *Listeria monocytogenes* en caldo nutritivo Difco™. Para el caso de *L. monocytogenes* se hizo en caldo nutritivo suplementado con extracto de levadura Difco™ al 1%, incubándose 24h a 37°C. Al final del tiempo de incubación, se midió la DO_{600nm} (Espectrofotómetro DU[®] 70 Beckman) de cada cultivo y se ajustó la lectura a 0.2, de esta suspensión microbiana se tomaron 0.5mL y se mezclaron con 5 mL de agar suave (7.5%). La mezcla fue vertida en las cajas de APT con las BAL crecidas, incubándose 24 a 37°C, después de este tiempo se midió el halo de inhibición.

- d) Estudio en modelos animales con la cepa de BAL P45

Con los resultados de halo de inhibición y crecimiento a las 17h, se seleccionó la mejor cepa de BAL a estudiar en ratones hembras y machos BALB/c de 8 semanas. La cepa de BAL seleccionada fue administrada mediante bebederos graduados comerciales a 9 ratones machos y 9 ratones hembras por 7 días, utilizando 5 controles en cada caso. Para determinar la cantidad de células de BAL seleccionada que se debía administrar a cada ratón, se hizo un ensayo con el objetivo de cuantificar el consumo de agua de cada ratón en el transcurso de un día. Para esto, se les quitó el agua por 5 horas (tiempo que se recomienda dejar como máximo sin agua a los ratones sin afectar el estado fisiológico normal, Elizabeth Mata comunicación personal), observándose que consumen 3mL diarios. Una vez determinada la cantidad de agua consumida se les administró durante 7 días 2×10^9 UFC/día de la BAL resuspendidas en buffer (pH 7.2). Se utilizó como control el mismo volumen de buffer PBS. Al octavo día, se les administró 1×10^7 UFC/día de *S. enterica* serovar *Typhimurium* L1334 st^r utilizando una sonda gástrica, como se muestra en la figura 12.



Figura 12. Administración de *S. enterica* serovar typhi L1334 st^r a ratones BALB/c mediante una sonda.

Una vez infectados, se dejó al alcance de cada ratón agua y el alimento de manera que la causa de muerte sea enteramente por la infección de *Salmonella* y no debido a la deshidratación generada por la infección. Al tercer día de infección se sacrificaron los ratones por dislocación cervical, se disectó en condiciones estériles el hígado y bazo, los cuales se colocaron cada uno en 5 mL de agua desmineralizada y fueron homogenizadas con perlas de

vidrio, en un vortex. De esta suspensión se realizaron diluciones hasta 10^{-3} . De las últimas dos diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) se tomaron 20 μ L y colocaron en cajas de LB(10g/L de Triptona Difco™, 5g/L de extracto de levadura Difco™ y 10g/L NaCl J.T Baker ajustado a pH 7.5) suplementadas con 100 μ g/mL de estreptomicina. Se incubaron por 24h a 37°C.

e) Obtención del sobrenadante concentrado de los cultivos de BAL.

Se inocularon por asada 5 mL de caldo MRS Difco™ con cada una de las BAL a analizar y se incubaron a 37°C por 12, 24 y 48h. Al final de cada tiempo de incubación, se ajustó la DO_{600nm} para tener una concentración de 1×10^9 UFC/mL. Posteriormente las células se centrifugaron a 20,000rpm por 20 min en una centrifuga (Termo Scientific Sorvall® Legend Mach 1.6) . Los sobrenadantes se concentraron en un Concentrator 5310 (Eppendorf) por una hora, concentrándose un volumen de 1,6 mL a 1mL (1.6 veces), posteriormente se filtraron con una membrana de 0,22 μ m milipore (MILLEX®GS) y se utilizaron para el ensayo de inhibición de patógenos por difusión en agar.

a) Ensayo inhibición de patógenos por difusión en agar.

Para determinar si algún componente del sobrenadante del cultivo de las BAL analizadas era responsable de la inhibición del crecimiento de cada uno de los patógenos evaluados, se realizó una prueba de difusión en agar. Se prepararon placas con 20mL de agar nutritivo DIFCO™, las cuales se solidificaron en campana de flujo laminar por 20 min, posteriormente, se inocularon 5 mL de caldo nutritivo cada uno con los patógenos utilizados, incubándose por 24h. Este cultivo se mezcló con 20 mL de agar nutritivo al 50%, ajustando la DO_{600nm} final a 0.2. Esta mezcla fue vertida sobre los 20 mL de agar nutritivo previamente vertidos. Una vez solidificada la sobrecapa de agar se realizaron 4 pozos de 5 mm de diámetro (con profundidad de hasta la primer capa de agar), en los que se adicionó una alícuota de 100 μ L del sobrenadante concentrado del cultivo de cada BAL colectado a las 12, 24 y 48 horas (un ensayo para cada tiempo). Al concentrar el sobrenadante también se concentran los compuesto que conforman el medio, los cuales pueden tener un efecto inhibitorio por un fenómeno osmótico, para descartar esta posibilidad se hicieron los ensayos solo con el medio estéril concentrado. Todas las placas se incubaron a 37°C durante 24h (Figura 13). Finalmente, la presencia de halos de inhibición se registró tomando una fotografía con un

fotodocumentador GelDocXR (BioRad) bajo luz blanca (modo transwhite), el tiempo de exposición para todas las fotos fue de 0,004 s.

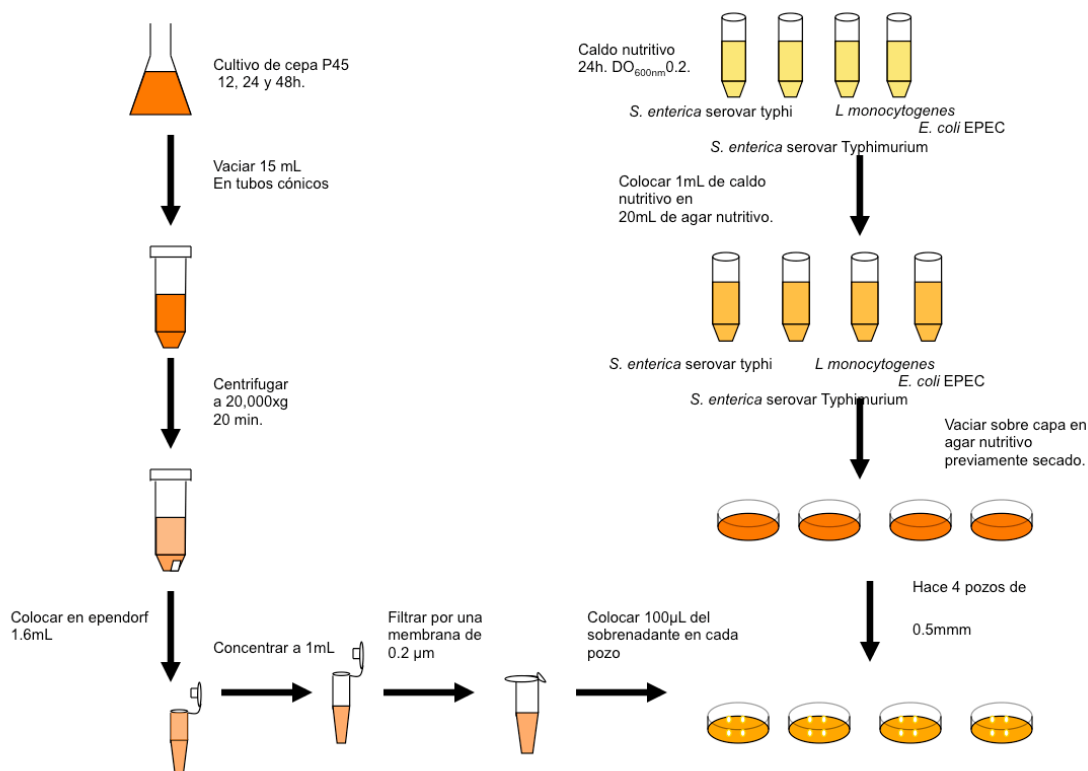


Figura 13. Metodología de difusión en agar con el sobrenadante concentrado.

b) Análisis por HPLC de sobrenadantes de cultivos de la cepa P45.

Para tener una idea de alguno de los metabolitos producidos por la cepa P45 durante su crecimiento en caldo MRS que pudiera producir el efecto inhibitorio observado en el ensayo de difusión en agar, se analizaron muestras de sobrenadantes por HPLC. Los metabolitos de los sobrenadantes filtrados se midieron por HPLC, utilizando un equipo Waters, consistente de una bomba mod 600E, automuestreador Mod 717, detectores de índice de refracción (Mod. 2410) y de arreglo de diodos (Mod. 996). Para la determinación de ácidos orgánicos, se empleó una columna Aminex HPX-87H (300 X 7.8mm; 9mm), de Bio Rad (Watford, UK). La fase móvil fue H₂SO₄ Baker 5mM, a un flujo de 0.5 ml/min y a una temperatura de 50°C. En los otros metabolitos se usó un detector por arreglo de diodos, a 210 nm (de cultivos de esta cepa), utilizando como fase móvil una mezcla 10:1 de H₂O y H₂SO₄ Baker

Así mismo se analizaron muestras del medio solo, concentrado, muestras directas del sobrenadante de cultivos de 24 y 48 horas (como se describió previamente) de cada uno de los cultivos (Figura 14).

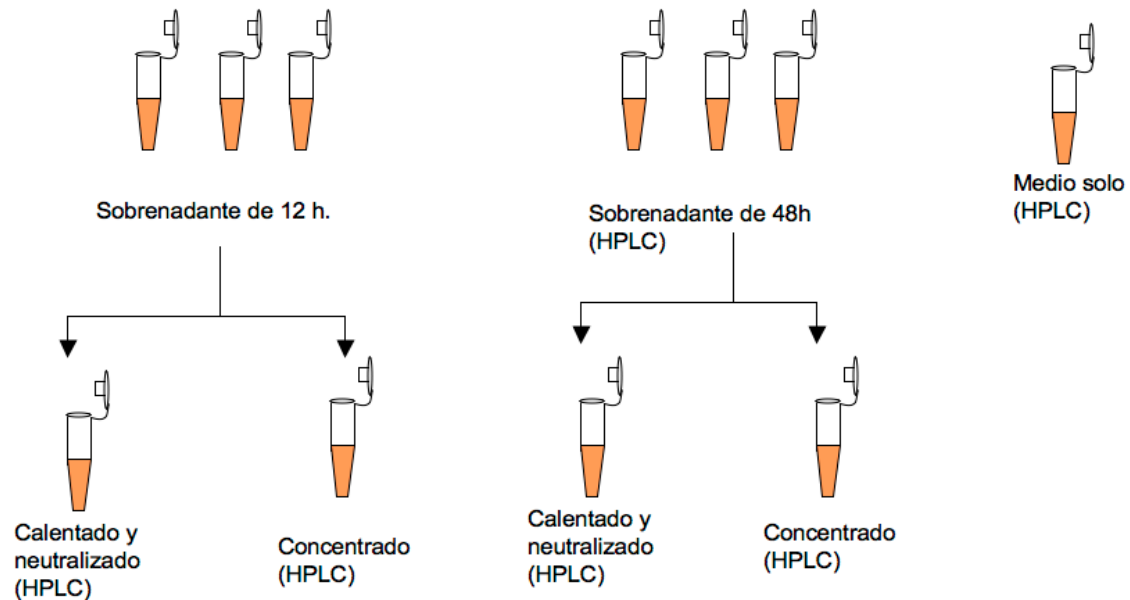


Figura 14. Determinación de ácidos orgánicos y etanol por HPLC de los sobrenadantes de cultivos de 24 y 48h .

c) Secuenciación del operón ribosomal de la cepa P45.

La cepa P45 fue identificada previamente como *L. mesenteroides ssp kimchi* (Campos 2010). Para una mejor identificación de esta cepa se secuenció su operón ribosomal completo. Para esto se buscaron en la base de datos de la NCBI operones ribosomales de cepas similares, estando disponible solo el genoma completo de *L. citreum* KM20 (NC_010471) y *L. mesenteroides ssp mesenteroides* ATCC 8293 (NC_008531) (Figura 15).

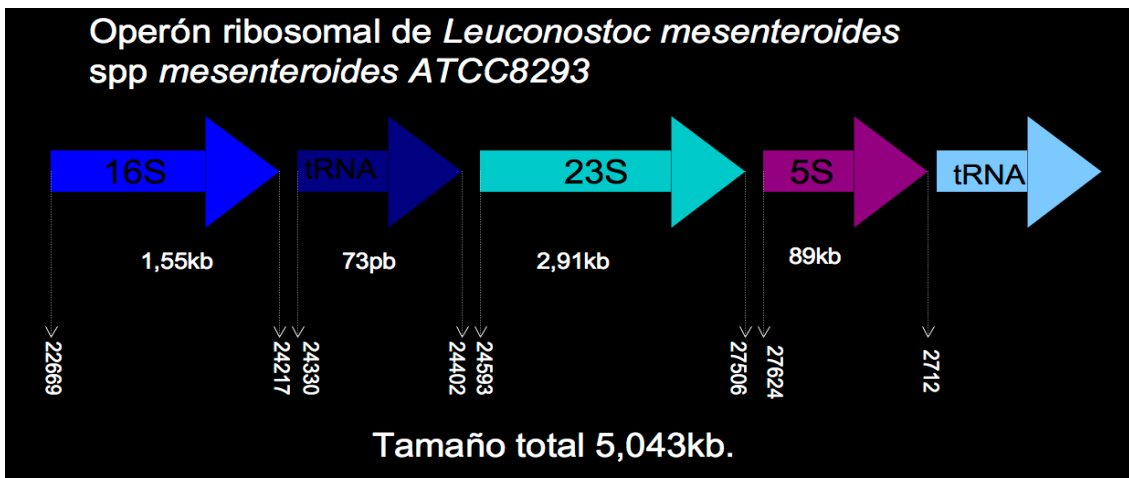
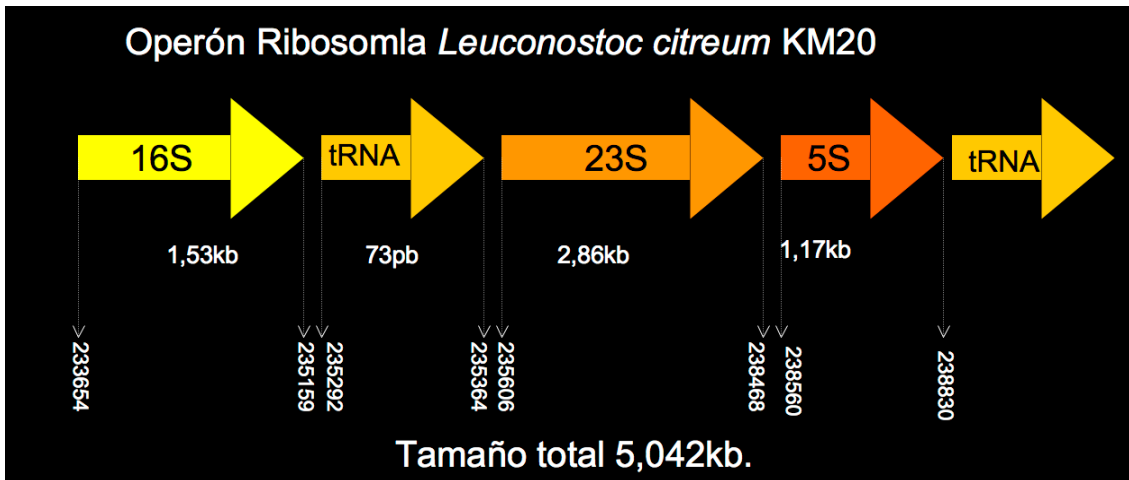


Figura 15. Organización genómica del operón ribosomal de *L. citreum* KM20 NC_010471 y *L. mesenteroides ssp mesenteroides* ATCC 8293 NC_008531.

Tomando como referencia un alineamiento de la secuencia de los operones ribosomales de ambas especies de *Leuconostoc* se diseñaron primers para amplificar fragmentos del operón de aproximadamente 800 pb (Figura 16).

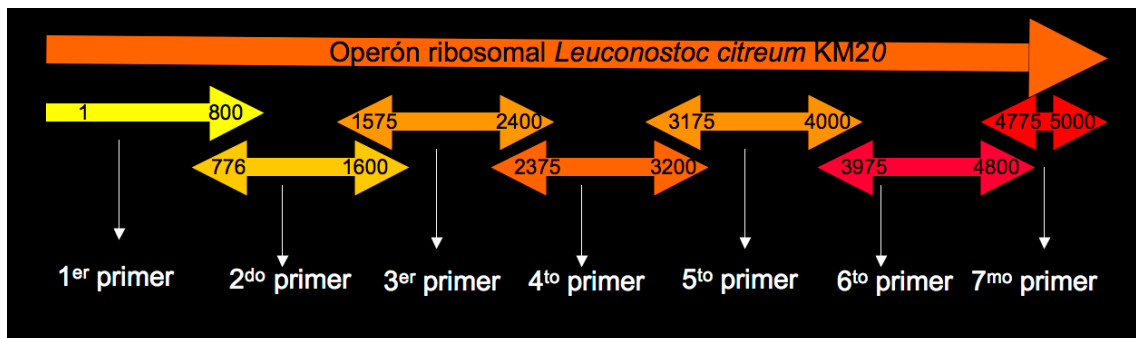


Figura 16. Representación esquemática de las regiones a amplificar del operón ribosomal con los primers diseñados.

Al mandar a secuenciar, los primeros pares de bases no tienen buena resolución por lo que se diseñaron 6 primers más para completar esas partes. Siendo en total 12 pares de primers (Tabla 9).

Tabla 9. Diseño de primers para la amplificación del operón ribosoma, usando la cepa *L. citreum* KM20

Región 5'-3'	Forward	Reverse	Tamaño (pb)
1-800	GAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAA	ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCT	800
776-1616	AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT	ACTCAAAACTAAACAAAACCTTTGAA	840
1591-2400	TTCAAAGTTTTGTTTAGTTTTGAGT	AGGGAGTATTTAGCCTTACGGGATG	809
2375-3200	CATCCCGTAAGCTAAATACTCCCTA	GTAAGCGCTCCAGCAGTCCTCACGG	825
3175-4000	CCGTGAGGACTGCTGGAGCGCTTAC	GGGGTCTTTCCGTCCTGTCGCGGGT	825
3975-4782	ACCCGCGACAGGACGAAAGACCCC	CTTCCACTTCTAGCCTATCTACCTC	807
4758-5000	GAGGTAGATAGGCTAGAAGTGAAG	CGTGATAGAGCTTAACTTCTGTGTT	242
1-224	TGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGAT	GGTGACGCCGAAGCGCCTTTAACT	200
700-1725	GCGTAGATATATGGAAGAACCAG	GCGGGATCGAACCGCTGACCCCCTG	1,025
2300-2600	GCGAAATGAAGCACACTCTTTTCAG	GGGAGTATTTAGCCTTACGGGATGG	300
3120-4045	TGCGGGTGCACGTAAGTGCGCGATA	AAGCAGCACAAACATTCAATATCAA	925
4660-5002	CTATGTATGGATGAGATAAACGCTG	CGCTATAGAGCTTAACTTCTGTGTT	342

La extracción del ADN cromosomal de la cepa P45 se realizó utilizando el kit extracción de DNA cromosomal bacteriano (Ultra clean™ Microbial DNA isolation Kit MoBio Laboratories Inc.) de acuerdo en las indicaciones del proveedor. Para la amplificación de cada fragmento del operón ribosomal, se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa recombinante (Fermentas) utilizando la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 10. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de los primers.

A adicionar	Volumen (µL)
Templado	1
Buffer 10X sin Mg ²⁺	5
dNTPs mix 10 mM (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)	1
Mg ²⁺	3 (25mM)

Primer Forward	2.5 (0.5mM)
Primer Reverse	2.5 (0.5mM)
Enzima (Taq polimerasa recombinante de fermentas)	0.5 (u/μL)
H ₂ O (a volumen final de 50μL)	34.5

La reacción de amplificación se realizó de en un termociclador ThermoHybaid PCR bajo las condiciones observadas en la figura 17.

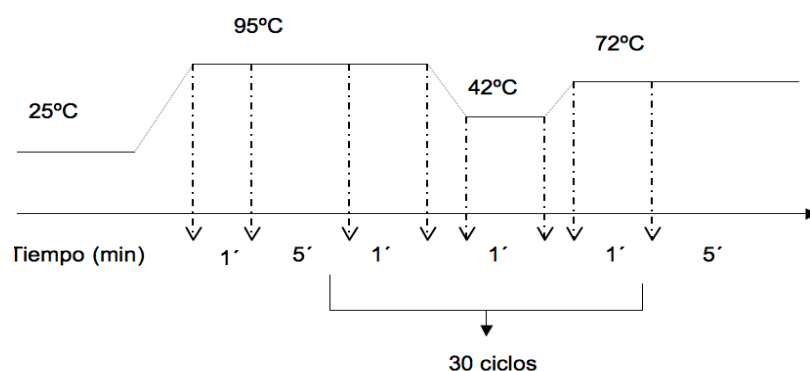


Figura 17. Condiciones de reacción para PCR.

Los productos de la reacción se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% con 4 uL de bromuro de etidio al 4%. Las bandas fueron visualizadas en un fotodocumentador GelDoc XR. Los productos de PCR del tamaño esperado se purificaron utilizando el kit de (Invitrogen) y se cuantifico la concentración de DNA en un equipo Nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop 2000c Spectrophotometer). Los amplicones purificados se secuenciaron en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM, de acuerdo en las especificaciones de la Unidad por el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing en un equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730. Las secuencias obtenidas se analizaron en el programa Bioedit (Para Win 95/98/NT2K/XP) y fueron ensambladas tomando como referencia la secuencia del operón ribosomal de *L.citreum* KM20 NC_010471. La secuencia completa del operón ribosomal se comparó en la base de datos no redundante del GenBank utilizando el programa Blast para verificar la identidad de la cepa P45. Finalmente, la secuencia completa fue submitida a esta base de datos.

7. Resultados y discusión.

Estandarización de la cantidad de biomasa a utilizar en bioensayos de actividad antimicrobiana.

Campos (2010), evaluó por primera vez la actividad antimicrobiana de cepas de BAL aisladas del pulque, contra cuatro microorganismos patógenos *E. coli* EPEC, *S. enterica* serovar Typhy y *S. enterica* serovar Typhymurium y *L. monocytoges*, sin embargo, se realizó de manera cualitativa y sin estandarizar la cantidad de las BAL utilizadas en el ensayo. Con la finalidad de realizar este ensayo de forma cuantitativa y por otro lado identificar aquella BAL con mayor crecimiento, se determinaron las DO_{600nm} directamente proporcionales a las UFC/mL de cada una de las cepas cultivadas en 5 mL de caldo MRS Difco™ durante 17 hrs. Los resultados de esta determinación se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Correlación entre de la DO_{600nm} y la cuenta viable del crecimiento de BAL aisladas del pulque con potencial probiótico.

Cepa.	DO PROMEDIO	UFC PROMEDIO ¹
3H38	0.832	5.19X10 ⁹ ±0,646
3H52	1.107	8.10X10 ⁸ ±0.185
6H15	0.39395	5.65X10 ⁸ ±0.101
6H39	0.491	8.10X10 ⁸ ±0.060
6H74	2.7305	7.18X10 ⁹ ±0.038
P22	0.4469	2.82X10 ⁹ ±0.622
P31	1.2675	8.47X10 ⁹ ±0.072
P4	0.7419	2.84X10 ⁹ ±0.676
P45	2.342	1.24X10 ¹⁰ ±0.207
P49	2.406	1.31X10 ¹⁰ ±0.115
P59CH	0.95445	2.92X10 ⁹ ±0.097
P59G	0.87885	1.01X10 ⁹ ±0.206
P9	2.6065	7.12X10 ⁹ ±0.062

¹ Valores promedio de cuadruplicados de D.O_{600nm} y UFC/mL. Los valores mayores a uno son resultado de una dilución 1/10 del medio de cultivo inicial. Los datos de cada determinación se presentan en el anexo 1.

Es importante observar que la ley de Beer-Lambert no se cumple ya que en varias cepas la DO no es directamente proporcional a la cuenta observada, esto debido a que se observó la producción de polisacáridos que se genera en el medio, por lo tanto los valores que se tomaron para hacer la discusión de resultados en la sección de abajo son los valores resultantes de la cuenta en placa a las 17 horas.

Los resultados de la Tabla 11, indican que cada una de las cepas analizadas presenta un crecimiento distinto después de ser cultivadas bajo las mismas condiciones (caldo MRS, 37°C por 17 h). De estos datos cabe destacar que las cepas con mejores crecimientos son la P45, P31 y P49. Esta característica es importante debido a que un crecimiento rápido facilita su propagación, así como la alta densidad celular asegura que estos microorganismos con potencial probiótico, alcancen la cantidad de células adecuadas recomendada (1×10^7), al tracto gastrointestinal para así propiciar un efecto benéfico.

Estos resultados muestran además que cepas que comparten el mismo perfil ARDRA tienen un crecimiento similar, así por ejemplo, la cepa P49 posee el mismo perfil ARDRA que las cepas P59G, P45, P59CH, 6H74, P31 y 3H42. En estos casos todas las cepas alcanzan cuentas de 10^9 UFC/mL, a excepción de la cepa 3H52 en donde se observa que alcanza una cuenta final menor (10^8 UFC/mL). Entre estas 7 cepas se pueden observar 2 comportamientos diferentes 4 cepas; P49, P45, P32 y 6H74 alcanzan valores de casi 10^{10} UFC/mL, mientras que las otras 3; P59Ch, P59G y 3H52 están cerca de 10^9 UFC/mL, un ciclo logarítmico abajo. Estas cepas fueron identificadas como *Leuconostoc mesenteroides* (Campos 2010). Este resultado es de interés ya que las diferencias observadas en el crecimiento podrían explicarse por variaciones en la diversidad existente entre cepas de la misma especie.

Entre las cepas 6H15 y 6H39 se observa un mismo patrón de crecimiento (alrededor de 10^8 UFC/mL), estas cepas identificadas por Campos (2010) como *Leuconostoc durionis* presenta los crecimientos más lentos de las 13. En el caso de 3H38 y P4, se observa un buen comportamiento de crecimiento de alrededor de 10^9 UFC/mL en ambos casos.

Bioensayos de actividad antimicrobiana.

Una vez estandarizada la cantidad de UFC/mL que se obtiene de los cultivos de las 13 cepas de las BAL durante 17 h, se realizaron los ensayos de difusión en agar, con el fin de determinar que bacteria tenía la mejor actividad inhibitoria contra *S. enterica* serovar Typhi y Typhimurium, *L. monocytogenes* y *E. coli* EPEC en medio APT Difco™. Para esto, se midieron los halos de inhibición de cada uno de los ensayos como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Inhibición de contra patógenos analizados.

Cepa	<i>S. typhimurium</i> (cm)	<i>S. typhi</i> (cm)	<i>E. coli</i> (cm)	<i>L. monocytogenes.</i> (cm)
3H52	0,5	0,7	0,5	0,4
3H38	0,7	0,6	0,5	0,4
6H15	0,1	0,1	-	0,1
6h39	-	-	-	-
6H74	0,3	0,7	0,6	0,4
P9	0,6	0,6	0,6	0,6
P22	0,1	0,2	0,2	0,1
P31	0,5	0,4	0,6	0,4
P49	0,4	0,8	0,6	0,4
P59G	0,5	0,6	0,5	0,4
P59CH	0,6	0,5	0,6	0,5
P45	0,7	0,6	0,6	0,4
Yakult	0,2	0,2	0,3	0,2
P4	-	-	-	-

En la tabla 12 se presenta el tamaño de los halos de inhibición de las 13 cepas contra los 4 patógenos de interés, las cepas resaltadas con gris son las que presentan mejor inhibición (P9 y P45 figura 17). Así mismo observamos que la cepa de referencia (extraída de la bebida comercial Yakult, reportada como *L. casei* Shirota) tiene valores de inhibición muy por debajo de la mayoría de las cepas probadas en este trabajo, sugiriendo una buena actividad antibacteriana de estos microorganismos aislados del pulque.

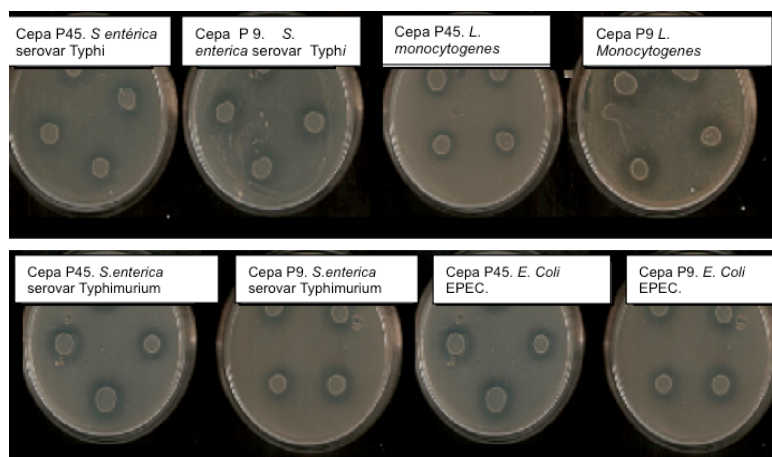


Figura 18. Halos de inhibición de las cepas P9 y P45, contra los 4 patógenos.

Se puede observar que el efecto inhibitorio no es específico a especies relacionadas, pues presenta inhibición tanto en bacterias Gram-positivas (*Listeria*) como en Gram-negativas (*Salmonella* y *E. coli*), exhibiendo mejor inhibición contra estas últimas, seguramente por la composición de la membrana celular. En este trabajo se encontró que la mayoría de las cepas inhiben mejor a *Salmonella enterica* serovar Typhi y *E.coli* EPEC. Sin embargo con los 4 patógenos se observa una buena inhibición. Desplegando la menor actividad contra *Listeria monocytogenes*.

Es probable que en general presenten mayor inhibición contra bacterias Gram-negativas, ya que como se mencionó anteriormente las bacteriocinas aisladas de BAL, actúan formando poros en la membrana celular, por consiguiente se espera que en microorganismos con estructura membranal similar se tenga el mismo efecto, lo que resulta muy atractivo para la industria de los alimentos, pues la mayoría de los patógenos alimentarios pertenecen a este grupo.

P9 fue identificada según su perfil de ARDRA como *L. durionis*, microorganismo descrito por primera vez en el 2005. Obtenido del tempoyak, condimento utilizado en malasia, producto de la fermentación de una fruta denominada durionis (Leisner 2005). La naturaleza de estos alimentos fermentados sin un estricto control con microorganismos del medio ambiente, nos hacen suponer que son fuente importante de microorganismos capaces de inhibir patógenos, debido a que en el transcurso de la fermentación se producen varias moléculas que no permiten el crecimiento de estos. Además de que son alimentos que se han consumido por mucho tiempo sin presentar ningún brote infeccioso. Para poder determinar más claramente la presencia de bacteriocinas u otras moléculas inhibitorias sería importante desarrollar más estudios de la cepa.

P49 y P45 fueron identificadas como *L. mesenteroides*, microorganismo en el cual se han reportado ensayos de difusión en agar contra patógenos alimentarios, debido a que se encuentra frecuentemente en productos vegetales fermentados, como lo es la bushera que se prepara hirviendo harina de mijo sin germinar para producir una pasta espesa en Uganda

(Muyanja *et al.*, 2003), también en el pozol: maíz fermentado, alimento común en el sur de México; (Ampe *et al.*, 1999) y en la col fermentada producida en Asia (Chiu *et al.*, 2008).

Shoba *et al.*, (2007) demostraron mediante ensayos de difusión en agar; actividad antimicrobiana de este microorganismo contra *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sp.*, *Yersenia enterocolitica* y *E. coli*, encontrando que inhiben más eficientemente a *Vibrio cholerae* seguido de *Shigella sp.* y *E. coli*.

Trias *et al.*, (2008) reportó los beneficios de utilizar cepas del *Leuconostoc* como bioprotectoras contra *Listeria monocytogenes* en frutas y vegetales, pues observaba que existe una buena inhibición por parte de este microorganismo contra el patógeno, utilizó 11 cepas de *Leuconostoc*, encontrando 2 que presentaban buena inhibición, con la posible producción de una bacteriocina de clase II, bacteriocina que lisa la membrana de otras bacterias, actividad que se mantiene a un amplio rango de pH y temperatura.

Además presenta características que lo clasifican como un microorganismo con potencial probiótico. Estas características son; la producción de bacteriocinas como mesentericina Y105 (Hechard *et al.*, 1992), así como producción de polisacárido (beta-glucanos) herramienta posiblemente útil para la adhesión en el tracto gastrointestinal (Stack *et al.*, 2010), producción heterogénea de ácido láctico y ácido acético, resistencia a bajo pH, además de ser inocuo para los seres humanos.

Por lo tanto se escogió a la cepa P45 para ser probada en modelos animales, ya que presenta el mejor crecimiento (1.24×10^{10} UFC/mL ± 0.207) a las 17h en medio MRS, además de ser una de las cepas que muestra buena actividad inhibitoria contra los 4 patógenos utilizados en este trabajo, además su perfil ARDRA determinado por Campos (2010) indica que tienen un alto porcentaje de similitud del (99%) con *L. mesenteroides*, cepa con buenas propiedades probióticas.

Estudio en modelos animales.

Como ya se mencionó anteriormente se seleccionó la cepa P45 porque reúne las mejores características como cepa con potencial probiótico para ser probado en modelos animales, (ratones BALB/c de 8 semanas). Los criterios de selección, fueron;

- Buena capacidad de supervivencia en medios ácidos y en altas concentraciones de sales biliares. Experimento realizado por Campos (2010)

- Buen crecimiento a 37°C
- Crecimiento abundante a las 17 hrs de cultivo
- Actividad antimicrobiana contra los 4 patógenos.

Para la metodología del estudio en modelos animales, nos basamos en varios trabajos que reportan resultados satisfactorios de la administración de *L. mesenteroides* en diversas cepas de ratones, además de que se buscó una metodología que fuera rápida y concreta. Para esto se utilizaron los trabajos de (Kekkonen *et al.* 2008) y (Chiu *et al.* 2008).

Se utilizaron ratones BALB/c en este trabajo ya que son cepas de ratones ampliamente empleados en experimentos que buscan una respuesta concreta a la invasión de un determinado microorganismo, esto se debe a que estos ratones son cepas congénitas, lo que disminuye la variabilidad de la respuesta (SAGE 2010).

Una vez que *Salmonella* infecta, ésta es fagocitada por los macrófagos, y por los mecanismos mencionados anteriormente logra sobrevivir dentro de estos, entonces es transportada a hígado y bazo en donde se reproduce y comienza la propagación de la bacteria en estos órganos, llegando en etapas más avanzadas a vía sanguínea. La cuenta en placa (Figura 19) de *Salmonella typhimurium* L1334 st^f se realizó al tercer día de la infección.



Figura 19 Cuenta en placa de *Salmonella typhimurium* L1334 en el bazo de ratones machos BALB/c en medio LB con estreptomicina de una dilución 10^{-2} . De lado izquierdo es el control, de lado derecho el ratón administrado por 7 días con la bacteria láctica.

A los 5 ratones control (Buffer PBS pH 7.2) y los 9 ratones muestra (administrados con la cepa P45), se les disectó hígado y bazo. El homogenizado de cada uno de los órganos se plaquearon por duplicado, los resultados se observan en la gráfica de la figura 20, los datos se adjuntan en el anexo 2.

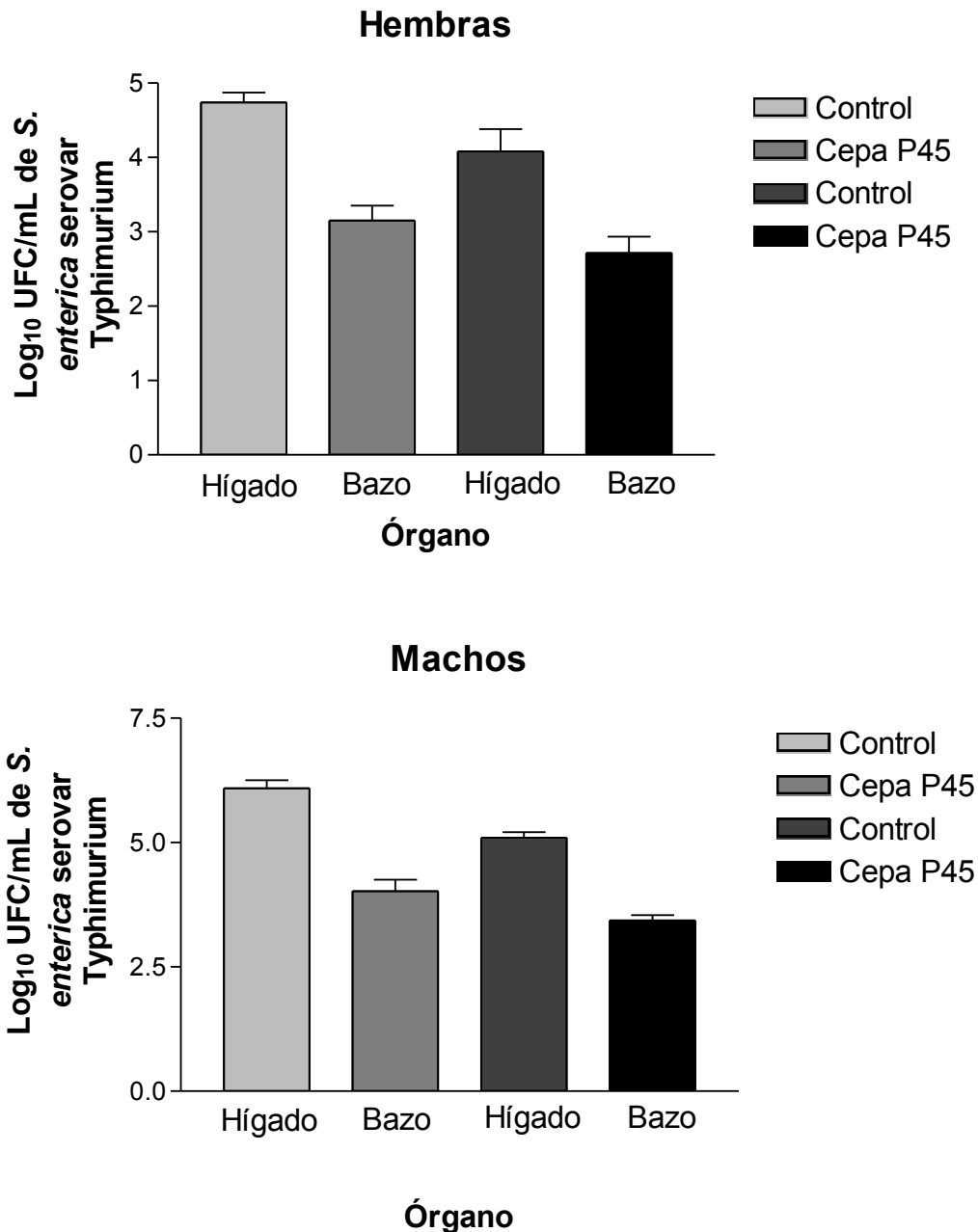


Figura 20. Cuenta en placa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium L1334 en hígado y en bazo de ratón BALB/c de 8 semanas, en hembras y machos.

Como se puede observar en la figura 20 la infección fue mayor en machos, alcanzando valores de hasta 4×10^6 UFC/mL en el caso del hígado del control, que en hembras en donde llegaron hasta 1×10^5 UFC/mL. Este comportamiento se puede explicar porque el estrógeno aumenta la resistencia del hospedero a infecciones causadas por bacterias enteropatógenas. Asimismo se ha observado que la testosterona reduce la resistencia del hospedero a infecciones por *Leishmania*, suprimiendo las funciones bacteriocidas de los macrófagos, e

inhibiendo la proliferación clonal de los anticuerpos por las células B del sistema inmune. Por otro lado también se sabe que las hormonas sexuales femeninas como lo es el estrógeno, activan ambos efectos en el sistema inmune. (Yamamoto *et al.* 1991). En otros reportes se observó que las hembras tienen mayor resistencia que los machos por que el estrógeno inhibe la producción de IL-10, interleucina responsable de los procesos inflamatorios, procesos necesarios en el mecanismo de invasión de *Salmonella* (Morishita, *et al.* 1999).

La reducción de la infección por *S. enterica* serovar Typhimurium st^f en ratones BALB/c de ocho semanas debida al consumo de la cepa P45 en un periodo de siete días fue: en el bazo de ratones machos de 2×10^5 UFC/mL a 7×10^3 UFC/mL, dos ordenes de magnitud y en el hígado fue de 4×10^6 UFC/mL a 1×10^4 UFC/mL, igualmente dos ordenes de magnitud. En el caso de las hembras fue de 1×10^5 UFC/mL a 2×10^4 UFC/mL en el hígado y de 5×10^4 UFC/mL a 6×10^3 UFC/mL en la bazo, en este caso la reducción fue tan solo un orden de magnitud esto debido a que como se mencionó anteriormente el sistema inmune responsable de la eliminación de bacterias es diferente en machos y hembras debido a las hormonas liberadas. Estos resultados sugieren que la administración de esta bacteria, tiene un efecto inhibitorio contra la infección de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium st^f, que puede ser atribuida a la adhesión de *L. mesenteroides* en la superficie de las células epiteliales. Ya que en el mecanismo de invasión de *Salmonella* el primer paso es la interacción del patógeno con estas células, por lo tanto, al no haber lugares de contacto entre el patógeno y las células epiteliales este no puede propagarse y desarrollar la infección.

Se ha demostrado también que la administración masiva de una bacteria a la microbiota intestinal genera la proliferación de bacterias similares en el tracto gastrointestinal debido a que se forman microambientes que favorecen el crecimiento de bacterias con requerimientos similares (Stecher *et al.* 2010). Es decir que la administración de la BAL como P45 favorece el desarrollo de BAL en el intestino, estas bacterias son productoras de ácidos orgánicos, disminuyendo el pH del intestino, limitando de esta manera el crecimiento de microorganismos que no sean capaces de crecer en estas condiciones. Además las BAL pueden crecer a bajas concentraciones de O₂, generando una atmósfera reductora que inhibe a muchas otras bacterias.

Además de la adhesión de la cepa P45 y exclusión competitiva de *S. enterica* serovar Typhimurium a las células epiteliales en el intestino del ratón, también se ha observado que las BAL activan el sistema inmune, aumentando así su funcionamiento, y mejorando la respuesta a la invasión de patógenos.

No están claros los mecanismos por lo que las bacterias probióticas tienen un efecto en el sistema inmune. Sin embargo Gill (1998) reportó que existe suficientes evidencias para sugerir que las BAL promueven efectos inmunes aumentando tanto las respuestas no específicas (función de fagocitos, activación de NK) así como las respuestas específicas; producción de anticuerpos, producción de citocinas, proliferación de linfocitos e hipersensibilidad de tipo retardado.

La comunicación entre células inmunes depende de la secreción de mediadores como lo son las citocinas. Bacterias inductoras de estrés producen citocinas inflamatorias que activan las respuestas inmunes antimicrobianas.

Muchos estudios se han enfocado a la producción de citocinas en células inmunes de animales, como lo son las células periféricas sanguíneas mononucleares, por estimulación de las BAL. Kekkonen et al, (2008) encontró que *Streptococcus pyogenes* y *L. mesenteroides* ssp. *cremoris* tienen una potente actividad inductora de IL-12, IFN- γ (interferón gama) así como TNF- α (factor de necrosis tumoral) en células rojas periféricas mononucleares, incluso mayor que varias cepas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, y *Lactococcus*. Encontrando también la producción de IL-10 producida por la estimulación de las cepas de *Bifidobacterium longum*, *animalis* y *breve* y *L. mesenteroides* ssp *cremoris*.

TNF- α es un potente inductor de muchas moléculas inflamatorias, incluyendo otras citocinas. IL-12 producida por las células presentadoras de antígenos, las células T, promueven el desarrollo de respuestas inmunes tipo Th1, así como también estimulan células NK (asesinas naturales) y la producción de IFN- γ . Todas estas son respuestas a la activación de Th1, células T helper encargadas de fagocitar bacterias y virus, que principalmente generan respuestas de inflamación; importantes en el inicio de la infección debido a que disminuyen el tiempo y la intensidad de ésta, pero que si no son reguladas llevan a cuadros de inflamación crónicos que pueden ser perjudiciales.

Los probióticos pueden desencadenar la liberación de citocinas como IL-12, TNF- α , etc. y llevar a la activación del sistema inmune porque interactúan con la células epiteliales del intestino, uniéndose a los receptores en la superficie de la célula activando procesos de señalización y llevando a la producción de citocinas que afectan la función de la mucosa de los linfocitos.

Así mismo las células M residen a lo largo del intestino como folículos asociados al epitelio, que cubre los folículos linfoides como son las placas de Peyer, y pertenecen a las unidades funcionales que constituyen sitios inductivos de la mucosa a respuestas inmunes (Lu y Walker, 2001).

También se ha observado que la adhesión e ingestión de los microorganismos por las células M permite un muestreo eficiente de antígenos extraños por inducción de sitios en la mucosa del sistema inmune, resultando en la secreción de inmunoglobulina A, anticuerpo encargado de prevenir la ingestión de antígenos, limitando la intensidad y la duración de la enfermedad por un posible patógeno (Lu y Walker, 2001).

Por todos estos reportes se cree que la disminución de la infección por el patógeno en bazo e hígado no solo se debe a lo anteriormente mencionado (Adhesión y consecuente exclusión del patógeno) sino también a una estimulación en la secreción de interleucinas y por lo tanto a un mejoramiento en el sistema inmune del hospedero que permite eliminar con mayor efectividad al patógeno.

Es importante recordar que muchos de los estudios de secreción de citocinas se hacen con las células periféricas sanguíneas mononucleares, las cuales no se encuentran en contacto directo con los microorganismos ingeridos por el tracto gastrointestinal, por lo tanto mucho de estos estudios son solo modelos, para poder determinar con mayor precisión el efecto de los probióticos en la liberación de citocinas sería más conveniente, medir estas moléculas directamente en el intestino.

Ensayo de inhibición de patógenos por difusión en agar.

Para esclarecer un poco más los mecanismos de inhibición por el cual P45 pudiera estar atenuando la invasión de *Salmonella*, se buscó la presencia de agentes bactericidas dentro sobrenadantes de un cultivo de 12, 24 y 48h. Para esto se concentró el sobrenadante de un

cultivo de 5mL porque no se observó actividad de este, esto seguramente porque no tenía la concentración adecuada.

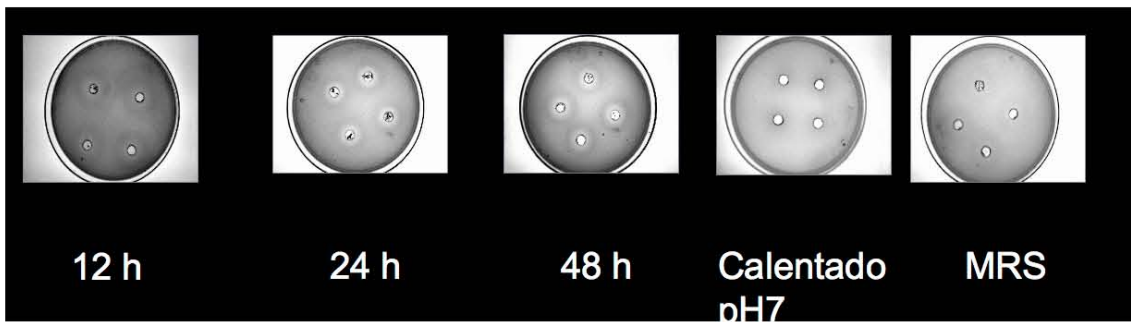
Anterior a estas pruebas se realizó un experimento con el fin de observar si existía una actividad inhibitoria, primero contra patógenos estándar utilizados para antibióticos; *E. coli* (Gram-negativa) y *Staphylococcus epidermis* (Gram-positiva), utilizando la metodología para determinar la concentración mínima inhibitoria, para esto se utilizó el sobrenadante de un medio de cultivo de 5mL de la cepa P45. Se observó actividad inhibitoria solo en la primera dilución para el caso de *Staphylococcus epidermis*, y un efecto más evidente en *E. coli* donde la inhibición se observó en la segunda dilución. Estos experimentos son más sensibles que los ensayos de difusión en agar, por lo que se llegó a la conclusión de que la concentración de la posible bacteriocina no era la adecuada para presentar actividad. Y por tanto se prosiguió a concentrar el sobrenadante 1.6 veces.

Para poder comparar los resultados del sobrenadante concentrado se usó un control; medio de cultivo concentrado. Esto con la finalidad de descartar una actividad inhibitoria por efecto osmótico.

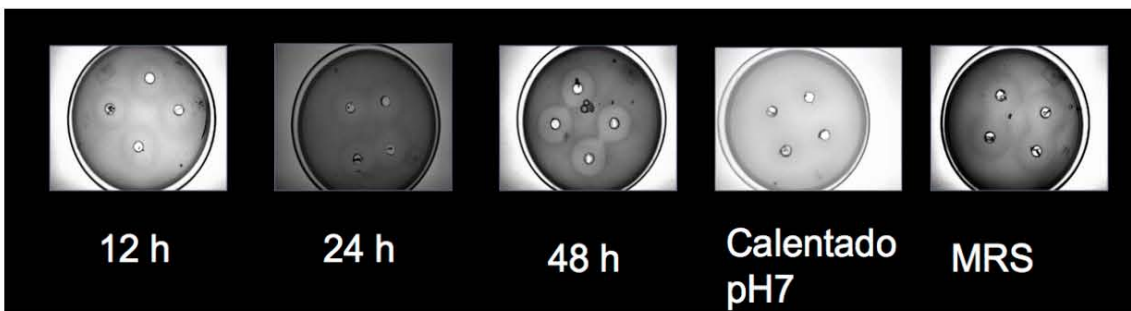
Existen diversos estudios que demuestran que la producción de compuestos inhibitorios depende del medio de cultivo utilizado, del pH y de la temperatura (Todorov y Dicks 2005), así como de la etapa de crecimiento a la que se prueba la actividad, por esta razón se utilizaron cultivos en diferentes tiempos.

Lin *et al.* (2009), demostraron que la actividad de sobrenadantes de 10 BAL tienen una actividad inhibitoria más eficiente, cuando se utilizan sobrenadantes de un medio de cultivo de 24 y 48 horas, lo que sugiere que estos compuestos se producen en la fase estacionaria.

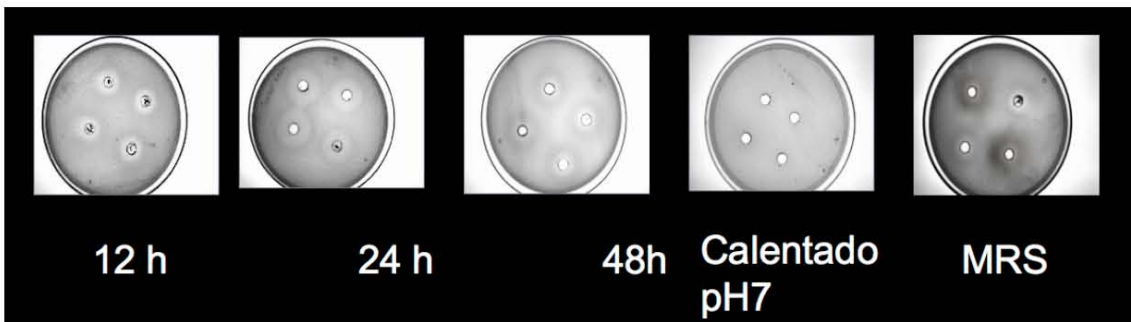
Al concentrar el medio y la posible bacteriocina también se concentran los ácidos producidos por la bacteria, disminuyendo drásticamente el pH, lo que inhibiría de esta manera a los patógenos. Se sabe que *Salmonella* resiste pH bajos de hasta 3.5, por esto se midió el pH del sobrenadante concentrado; obteniendo un pH de 5.4, que no es suficientemente bajo para inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas, aun así para descartar la posibilidad de explicar la inhibición por un factor de pH, se neutralizó el sobrenadante, aunado a esto se trató el medio neutralizado con calor; 95°C durante 5 minutos, los resultados se observan en la figura 20.



A.



B.



C.

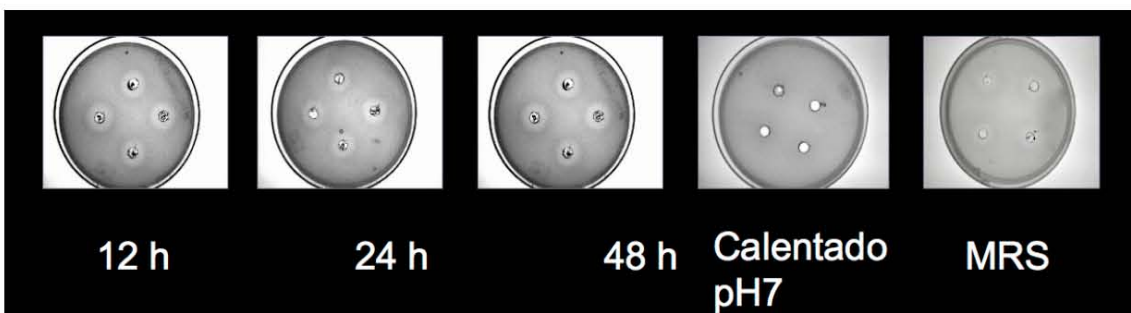


Figura D.

Figura 21. Halo de inhibición del sobrenadante concentrado de la cepa P45, a pH 7 contra cada uno de los cuatro patógenos. A) *Listeria monocytogenes*; B) *Escherichia coli*; C) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium D) *Samonella enterica* serovar Typhi.

Como se puede apreciar en la figura 20 no existe actividad inhibitoria en el sobrenadante concentrado del medio MRS sin inoculo por lo tanto la actividad inhibitoria no es un efecto osmótico.

En general existe una actividad más evidente en los concentrados de 24 y 48h que en el de 12h, pero el efecto es el mismo entre estos dos.

Se puede observar que la actividad inhibitoria de la cepa P45 contra *L. monocytogenes* es baja, opuestamente a varios trabajos en los que se observan una mejor actividad inhibitoria de *L. mesenteroides* contra este microorganismo. La inhibición contra *E. coli* es la que presenta un halo mayor; resultado congruente con los resultados de la tabla 12.

Como se mencionó anteriormente todos los sobrenadantes fueron neutralizados para descartar la acción inhibitoria a la presencia de ácidos, así como utilizar un control (medio de cultivo concentrado) descartando un posible efecto osmótico. Finalmente se aplicó un tratamiento térmico del medio de cultivo de 48h. Este sobrenadante no presentó actividad, sugiriendo de manera más evidente que la actividad se debe posiblemente a la presencia de un péptido, que se desnaturaliza por acción del calor, perdiendo así su actividad.

Se sugiere que la actividad antimicrobiana de la cepa P45 es por la producción de una bacteriocina, evidentemente no se puede asegurar que este sea el mecanismo, ya que también se han reportado otros compuestos no proteicos con actividad inhibitoria sensibles al calor (Rani y Agrawal 2007), sin embargo existen reportados extensas caracterizaciones de diversas bacteriocinas de especies de *Leuconostoc*, pero hacen falta más estudios para poder asegurar con más datos la presencia de está en la cepa P45.

Análisis por HPLC del sobrenadante de un cultivo de 12, 24 y 48 h de la cepa P45

Para conocer algunos de los posibles metabolitos que la célula podría producir en el tracto gastro intestinal, y así comprender un poco más la interacción de esta cepa en el intestino de los ratones; se utilizaron los sobrenadante de la cepa P45 crecida a 37°C para realizar un análisis por HPLC del sobrenadante a diversas condiciones como se muestra en la figura 13. Los resultados se muestran en la tabla 13. Es importante mantener presente que la producción de estos metabolitos depende de los nutrientes que tenga el medio de cultivo, así como de las condiciones en las que se encuentran. En el caso de tracto gastrointestinal, existe una baja concentración de O₂, atmosfera reductora, y una gran escasees de alimentos por la gran

diversidad de microorganismos, además estas bacterias han estado sometidos a cambios drásticos de pH. Por lo que la activación de los genes involucrados en la tolerancia a estas condiciones modifica el metabolismo de la cepa y por consiguiente los productos finales de éste. Para poder tener una mejor caracterización se tendría que caracterizar la producción de metabolitos bajo condiciones más reales, por el momento, este es un panorama general de lo que podría estar pasando cuando se suministra la cepa P45 como posible microorganismo preventivo en la infección de *S. enterica* serovar Typhimurium en ratones BALB/c de ocho semanas.

En la tabla 13 podemos observar que la producción de ácido acético por la cepa P45 se lleva a cabo dentro de las primeras 24h, puesto que los valores a las 48h difieren muy poco del obtenido del sobrenadante de 24h. Lo mismo sucede con la producción de ácido fórmico y etanol, observando una disminución no significativa en el valor de ácido fórmico a las 48h de acuerdo a la desviación estándar. La producción más significativa de ácido láctico se da también dentro de las primeras 24h, pero en este caso a las 48h se ve un ligero aumento en la producción de este, lo que indica que el ácido láctico se sigue produciendo en la fase estacionaria de crecimiento.

Tabla 13. Concentración de ácido acético, láctico, fórmico y etanol en los sobrenadantes de 24 y 48h de la cepa P45.

Sobrenadante	Acético	Etanol	Fórmico	Láctico
24 h.	4.358±0.033	3.093±0.181	0.3785±0.148	9.495±0.006
48 h.	4.607±0.033	3.356±0.181	0.245±0.148	10.090±0.006
24 h concentrado	6.689±0.033	0.343±0.181	0.3665±0.148	16.325±0.006
48 h concentrado	9.252±0.033	0.060±0.181	0.9065±0.148	22.600±0.006
24 h Concentrado pH 7	8.127±0.033	-	0.0255±0.148	12.611±0.006
48 h concentrado pH 7	9.472±0.033	0.195±0.181	0.914±0.148	22.654±0.006

Los valores son un promedio de dos experimentos

Al concentrar el sobrenadante evidentemente aumenta la concentración de los tres ácidos, en el caso de los sobrenadantes del medio de cultivo de 24 horas los valores son los esperados, ya que los sobrenadantes se concentraron 1.6 veces, por lo tanto se espera que la concentración de los ácidos aumente en esa proporción. En el caso del ácido acético se espera un valor de 6.973, el obtenido es un poco menor 6.689, esto debido al proceso de

concentración del sobrenadante, que pudo generar que una parte se volatilizara. Para el caso del ácido láctico el valor obtenido (16.325) es ligeramente mayor al valor esperado que es de 15.192. En el caso del ácido fórmico no se obtiene lo esperado (0.6056), el valor es menor incluso que en el sobrenadante sin concentrar (0.3665). El ácido fórmico de los tres ácidos es el que tiene una temperatura de ebullición menor (101°C) por lo tanto después del etanol sería el siguiente ácido que se volatilizaría, explicando la disminución del resultado. Así mismo el que tiene un punto de ebullición más alto es el ácido láctico, esto se ve reflejado en la mayor cantidad obtenida después de la concentración.

El etanol tiene el punto de ebullición más bajo 78°C, por lo tanto se volatiliza casi completamente (0.343) en el proceso de concentración utilizado.

Los ácidos orgánicos son utilizados en la industria alimentaria como conservadores en muchos alimentos como son; pan, salsas y productos lácteos, debido a que poseen actividad antimicrobiana. Actividad que resulta de la afinidad por los lípidos de los ácidos no disociado que penetran la membrana hacia el plasma, donde el pH es más alto, generando su disociación, liberando protones y bases conjugadas, alterando así la fuerza protón motriz y por lo tanto desacoplando el rendimiento energético y los procesos de transporte dependiente de estos. Por lo tanto el efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos depende de su pKa, y el valor de pH del medio externo.

El pKa del ácido láctico es 3,86 y el del ácido acético es 4.75, por lo tanto en un pH moderado como lo son los sobrenadantes de estas cepas; que tienen un pH de alrededor de 5, estos ácidos son potentes antimicrobianos, ya que existe una mayor proporción sin disociar.

Corsetti *et al.* (1998) realizaron un experimento para observar la actividad inhibitoria de diferentes ácidos orgánicos aislados de *Lactobacillus sanfrancisco* CB1 contra *Fusarium graminearum*, encontrando que el ácido acético es uno de los ácidos orgánicos que le confiere mayor actividad inhibitoria al sobrenadante de este microorganismo, además de que este efecto se veía potenciado por la presencia de ácido láctico. Por lo tanto la gran producción de ácido acético en combinación con el ácido láctico por la cepa P45 es un factor importante en actividad inhibitoria contra *Salmonella enterica* serovar Typhimurium así como contra los 3 otros patógenos probados.

Identificación de la cepa P45 por secuenciación del operón ribosomal.

Finalmente se buscó identificar con mayor precisión la cepa P45 utilizada en este trabajo, para esto, se secuenció el operón ribosomal completo, que incluye los genes que codifican para los genes ARNr 16S, 23S y 5S. Para este fin, se diseñaron primers para amplificar segmentos de 800 pb aproximadamente, hasta cubrir todo el operón (5000pb). Una vez obtenidas se verificó que tuvieran el tamaño deseado mediante un gel de agarosa al 1%.

Una vez obtenidos todos los fragmentos se secuenciaron en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología, Cuernavaca. Una vez obtenida la secuencia del operon ribosomal aislada de la cepa P45 se analizó la calidad de las secuencias forward y reverse, se ensambló manualmente la secuencia completa (Figura 22). Se realizó un alineamiento de esta secuencia con dos secuencias de referencia de *L. citreum* KM20 NC_010471 y *L. mesenteroides ssp. mesenteroides* ATCC 8293 NC_008531, en el programa Clustal W del programa BioEdit Sequence Alignment Editor V 7.0.5.3 (Hall 1999). El alineamiento indico que existe un 92% de similitud de la cepa P45 con *L. mesenteroides ssp. mesenteroides* ATCC 8293 y un 90% de identidad de la cepa P45 con *L. citreum* KM20

Se observaron dos inserciones de 39 pb en la región que va de 789 a 819, y otra más grande de 85 pb en la región que va de 1700-1785. Así mismo se observaron dos deleciones, una de 77pb en la región de 2507 a 2584 y una de 10pb en la región de 3290 a 3300, así como una región variable en las últimas 265 pb, variabilidad que también se observa entre las cepas de referencia y las diversas especies de *Leuconostoc*, lo que sugiere que es una zona que varía dependiendo de la subespecie. Estas deleciones e inserciones y la zona variable de la cepa P45, además de las diferencias en el comportamiento con respecto a *L. mesenteroides* indican que es muy probable que esta cepa pertenezca a otra subespecie.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
Leuconostoc mesenteroides p45 TTGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGACCTTTCAAGTGAGTGG
Leuconostoc citreum GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCACAGCGAGAGGTGCTTGACCTTTCAAGCGAGTGG
Clustal Consensus
          *****

```

Fw 1-800; Fw 1-224

```

     110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
Leuconostoc mesenteroides p45 CGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTTCGCATGACACAA
Leuconostoc citreum CGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGATTCGCATGATATCA
Clustal Consensus
          *****

```

```

     210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
Leuconostoc mesenteroides p45 AGTTAAAAGGCGCTTCGGGTGCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCATCAAGACCAATGATGCATAGCCGAGTTG
Leuconostoc citreum AGTTAAAAGGCGCTTCGGGTGCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCATCAAGACCAATGATGCATAGCCGAGTTG
Clustal Consensus
          *****

```

Rv 1-224

```

     310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
Leuconostoc mesenteroides p45 AGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAA
Leuconostoc citreum AGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAA
Clustal Consensus
          *****

```

```

     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
Leuconostoc mesenteroides p45 CGCCCGTGTGATGAAGGCTTTTCGGTTCGTAAGCAGCTGTTGATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATACCAGA
Leuconostoc citreum CGCCCGTGTGATGAAGGCTTTTCGGTTCGTAAGCAGCTGTTGATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATACCAGA
Clustal Consensus
          *****

```

```

     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
Leuconostoc mesenteroides p45 AAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCGCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCCGAGACGGTTTATTAAG
Leuconostoc citreum AAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCGCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCCGAGACGGTTTATTAAG
Clustal Consensus
          *****

```

```

        610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Leuconostoc mesenteroides TCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACCTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACCCATGTGTAGCGGTGGAAT
p45 TCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACCTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACCCATGTGTAGCGGTGGAAT
Leuconostoc citreum TCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACCTGGTTAACTTGAGTGTGTAGAGGTAAGTGGAACCCATGTGTAGCGGTGGAAT
Clustal Consensus *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****

```

```

        710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Leuconostoc mesenteroides GCGTAGATATATGGAAGAACACCCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAG
p45 GCGTAGATATATGGAAGAACACCCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGTTGAGGCTCGAA
Leuconostoc citreum GCGTAGATATATGGAAGAACACCCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAG
Clustal Consensus *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****

```

Fw 700-1725

Rv 1-800; Fw 776-1616

```

        810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Leuconostoc mesenteroides GATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCCTCTTAGTGCCTGAAGCTAAC
p45 AGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCCTCTTAGTGCCTGAAGCTAAC
Leuconostoc citreum GATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCCTCTTAGTGCCTGAAGCTAAC
Clustal Consensus *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****

```

```

        910      920      930      940      950      960      970      980      990     1000
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Leuconostoc mesenteroides GCATTAAGTGTTCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
p45 GCATTAAGTGTTCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
Leuconostoc citreum GCATTAAGTGTTCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
Clustal Consensus *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****

```

```

       1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090     1100
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Leuconostoc mesenteroides CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTCTCTTCGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTCGTCGT
p45 CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTCTCTTCGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTCGTCGT
Leuconostoc citreum CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTCTCTTCGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTCGTCGT
Clustal Consensus *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****

```

```

       1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Leuconostoc mesenteroides CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGACGAGCGCAACCCATTATTGTTAGTTGCCAGCATTTCAGATGGGCACCTAGCAGACTGCCGGTG
p45 CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGACGAGCGCAACCCATTATTGTTAGTTGCCAGCATTTCAGATGGGCACCTAGCAGACTGCCGGTG
Leuconostoc citreum CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGACGAGCGCAACCCATTATTGTTAGTTGCCAGCATTTCAGATGGGCACCTAGCAGACTGCCGGTG
Clustal Consensus *****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****|*****

```

```

       1210     1220     1230     1240     1250     1260     1270     1280     1290     1300
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Leuconostoc mesenteroides ACAAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCG
p45 ACAAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCG
Leuconostoc citreum ACAAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCTG

```

```

Clustal Consensus      *****
                        1310      1320      1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Leuconostoc mesenteroides CGAGGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCCTCAGTTCCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGC
p45                      CGAGGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCCTCAGTTCCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGC
Leuconostoc citreum      CGAAGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCCTCAGTTCCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGC
Clustal Consensus      *** *****

                        1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Leuconostoc mesenteroides CGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTTTTAGGAAGGAGCCGT
p45                      CGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTTTTAGGAAGGAGCCGT
Leuconostoc citreum      CGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTTTCGGGAGGAGCCGT
Clustal Consensus      *****

                        1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Leuconostoc mesenteroides CTAAGGCAGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCCTGCCGCTGGATCACCTCCTTTC TAAGGATAATCGGAAAGCGACA
p45                      CTAAGGCAGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCCTGCCGCTGGATCACCTCCTTTC TAAGGATAATCGGAAAGCGACA
Leuconostoc citreum      CTAAGGCAGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCCTGCCGCTGGATCACCTCCTTTC TAAGGATAATCGGAAAGTGACA
Clustal Consensus      *****

                        1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680      1690      1700
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Leuconostoc mesenteroides GGGACTTAAGTGTCAATTTGTTTGTTCAAAGTTTTGTTTGTAGTTTTGAGTGTGATACTTTAAATAGGTATCATGGTCTCAAAGTGATCCTATGGGGAATTA
p45                      GGGACTTAAGTGTCAATTTGTTTGTTCAAAGTTTTGTTTGTAGTTTTGAGTGTGATACTTTAAATAGGTATCATGGTCTCAAAGTGATCCTATGGGGAATTA
Leuconostoc citreum      GTGCATTAGATTGCAAGTTCAAATGTTCAAAGTTTTGTTTGTAGTTTTGAGTGTGGTACTGTAAATAGGTATCATGTTCAAAGATGATCCTATGGGGAATTA
Clustal Consensus      * * * * *

                        1710      1720      1730      1740      1750      1760      1770      1780      1790      1800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Leuconostoc mesenteroides -----GCTCAGCTGGGAGA
p45                      CCTCAGCAATAGACACCTGTTTCATCAGTTTGTAGTGTGATACCTTAATAGGTATCATGGTCTCAAAGTGATCCTATGGGGAATTAGCTCAGCTGGGAGA
Leuconostoc citreum      -----GCTCAGCTGGGAGA
Clustal Consensus      *****

                        1810      1820      1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890      1900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Leuconostoc mesenteroides GCACCTGCTTTGCAAGCGGGGGTCAGTGGTTCGATCCGTTATTCTCCATAGCTAGTCGAAAGGCTAGCATGTTGTACATTGAAAAC TGAATAGTAAC
p45                      GCACCTGCTTTGCAAGCGGGGGTCAGTGGTTCGATCCGTTATTCTCCATAGCTAGTCGAAAGGCTAGCATGTTGTACATTGAAAAC TGAATAGTAAC
Leuconostoc citreum      GCACCTGCTTTGCAAGCGGGGGTCAGTGGTTCGATCCGTTATTCTCCATAGGCAATCGAAAGATTGCTTTGGTTGTACATTGAAAAC TGAATAGTAAC
Clustal Consensus      *****

```

Rv 776-1616 Fw1591-2400

Rv 700-1725

```

      1910      1920      1930      1940      1950      1960      1970      1980      1990      2000
Leuconostoc mesenteroides p45  AAATTCTTTTAAAAGCAATCGTAAGATTGCACTAAAATGAACCGAGAAACAACACAAAAG--TTCCTTTAAAAGAACCGGTTTAATCGCAGGTCTGAAA
Leuconostoc citreum          AAATTCTTTTAAAAGCAATCGTAAGATTGCACTAAAATGAACCGAGAAACAACACAAAAG--TTCCTTTAAAAGAACCGGTTTAATCGCAGGTCTGAAA
Clustal Consensus          ***** ** * ** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
      2010      2020      2030      2040      2050      2060      2070      2080      2090      2100
Leuconostoc mesenteroides p45  AATGACCAACTCATAAACCTTAACCACAACCTTCGGTTGTATAGGTTAAGTTAATAAGGGCGCGTGGTGAATGCCTTGGCACTAGGAGCCGATGAAGGACG
Leuconostoc citreum          AATGACCAACTCATAAACCTTAACCACAACCTTCGGTTGTATAGGTTAAGTTAATAAGGGCGCGTGGTGAATGCCTTGGCACTAGGAGCCGATGAAGGACG
Clustal Consensus          ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
      2110      2120      2130      2140      2150      2160      2170      2180      2190      2200
Leuconostoc mesenteroides p45  TGACTAACTACGATAAGCTTTGGTGAGCGGTAAGTACGCTATGACCCAAAGATTTCCGAATGGGGAAACCCAACCTCGTAA-GAGTTGCTGTATCTGAAT
Leuconostoc citreum          TGACTAACTACGATAAGCTTTGGTGAGCGGTAAGTACGCTATGACCCAAAGATTTCCGAATGGGGAAACCCAACCTCGTAA-GAGTTGCTGTATCTGAAT
Clustal Consensus          ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
      2210      2220      2230      2240      2250      2260      2270      2280      2290      2300
Leuconostoc mesenteroides p45  ACATAGGATATTTGACGGAAATACGCTGTGAACCTGAAACATCTCATTAGCAGCAGGAGCAGAAAGAAAAATCGATTCCCTAAGTAGCGGCGAGCGAACGGG
Leuconostoc citreum          ACATAGGATATTTGACGGAAATACGCTGTGAACCTGAAACATCTCATTAGCAGCAGGAGCAGAAAGAAAAATCGATTCCCTAAGTAGCGGCGAGCGAACGGG
Clustal Consensus          ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
      2310      2320      2330      2340      2350      2360      2370      2380      2390      2400
Leuconostoc mesenteroides p45  GAAAGAGCCCAAACCAACGTGCTTGCACTGTTGGGGTTGTAGGACTGATATAAAGAGTTACAAAAGTGTTTTATAGCAGAACCAAGTTGGGAAACTTGGCTA
Leuconostoc citreum          GAAAGAGCCCAAACCAACGTGCTTGCACTGTTGGGGTTGTAGGACTGATATAAAGAGTTACAAAAGTGTTTTATAGCAGAACCAAGTTGGGAAACTTGGCTA
Clustal Consensus          *** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
      2410      2420      2430      2440      2450      2460      2470      2480      2490      2500
Leuconostoc mesenteroides p45  TAGAGGGTGATAGCCCCGTAAAGCGAAATGAGCACACTCTTTTCAGGATCCTGAGTACGGCCGGACCGTGAAATCCGGTCGGAATCTGCGGGGACCATC
Leuconostoc citreum          TAGAGGGTGATAGCCCCGTAAAGCGAAATGAGCACACTCTTTTCAGGATCCTGAGTACGGCCGGACCGTGAAATCCGGTCGGAATCTGCGGGGACCATC
Clustal Consensus          * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

```

                2510      2520      2530      2540      2550      2560      2570      2580      2590      2600
Leuconostoc mesenteroides
p45      CCGTAAGGCTAAATACTCCCTAGTGACCGATAGTGAACCAGTACCGTGAGGGAAAGGTGAAAAGCACCCCGGAAGGGGAGTGAAATAGTTCTGAAACCA
Leuconostoc citreum
Clustal Consensus      CCGTAA
                        CCGTAAGGCTAAATACTCCCTAGTGACCGATAGTGAACCAGTACCGTGAGGGAAAGGTGAAAAGCACCCCGGAAGGGGAGTGAAATAGTTCTGAAACCA
                        *****

```

Rv 1591-2400; Fw 3175-4000

```

                2610      2620      2630      2640      2650      2660      2670      2680      2690      2700
Leuconostoc mesenteroides
p45      CGACGCCACAGAAGTCAGAGCCCGTTAATGGGTGATGGCGTGCCTTTTGTAGAATGAACCGGCGAGTTACGGTATCGTCCGAGGTTAAGGTGGAAGA
Leuconostoc citreum
Clustal Consensus      CGACGCCACAGAAGTCAGAGCCCGTTAATGGGTGATGGCGTGCCTTTTGTAGAATGAACCGGCGAGTTACGGTATCGTCCGAGGTTAAGGTGGAAGA
                        *****

```

```

                2710      2720      2730      2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800
Leuconostoc mesenteroides
p45      CCGGAGCCGCAGCGAAAGCGAGTGTGAATAGCGGAAATAGACGATGCTGAGACCCCGAAACCAAGTGACCTACCCATGGTCAGGATGAAGGTGAGGTAA
Leuconostoc citreum
Clustal Consensus      CCGGAGCCGCAGCGAAAGCGAGTGTGAATAGCGGAAATAGACGATGCTGAGACCCCGAAACCAAGTGACCTACCCATGGTCAGGATGAAGGTGAGGTAA
                        *****

```

Rv 2300-2600

```

                2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870      2880      2890      2900
Leuconostoc mesenteroides
p45      AACTTACTGGAGGTCCGAACCGGTGCATGTTAAAAAATGCTCGGATGAACCTGTGGGTAGCGGTGAAATTCCAAACGAACTTGGAGATAGCTGGTTCTCTC
Leuconostoc citreum
Clustal Consensus      AACTTACTGGAGGTCCGAACCGGTGCATGTTAAAAAATGCTCGGATGAACCTGTGGGTAGCGGTGAAATTCCAAACGAACTTGGAGATAGCTGGTTCTCTC
                        *****

```

```

                2910      2920      2930      2940      2950      2960      2970      2980      2990      3000
Leuconostoc mesenteroides
p45      CGAAATAGCTTTAGGGCTAGCCTCATTATAAGCATACTGGAGGTAGAGCACTGTTAAGCCTAGGGGCCCATCTCGGGTTACCAAAGTTTGATAAACTCCG
Leuconostoc citreum
Clustal Consensus      CGAAATAGCTTTAGGGCTAGCCTCATTATAAGCATACTGGAGGTAGAGCACTGTTAAGCCTAGGGGCCCATCTCGGGTTACCAAAGTTTGATAAACTCCG
                        *****

```

```

                3010      3020      3030      3040      3050      3060      3070      3080      3090      3100

```

```

...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Leuconostoc mesenteroides AATGCCAGATATGTATGAA TGGGAGTCAGACGATGAGTGATAAGATCCACCGTCGAAAGGGGAACAGCCCAGATCGCCAGTTAAGGTCCCTAAATATATG
p45 AATGCCAGATATGTATGAA TGGGAGTCAGACGATGAGTGATAAGATCCACCGTCGAAAGGGGAACAGCCCAGATCGCCAGTTAAGGTCCCTAAATATATG
Leuconostoc citreum AATGCCAGATATGTATGAA TGGGAGTCAGACGATGAGTGATAAGATCCACCGTCGAAAGGGGAACAGCCCAGATCGCCAGTTAAGGTCCCTAAATATATG
Clustal Consensus *****

```

3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200

```

...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Leuconostoc mesenteroides TTAAGTGGAAAACGATGTGATAGTGCATAGACAAC TAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCACCATTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTAGTCGAGTGCCA
p45 TTAAGTGGAAAACGATGTGATAGTGCATAGACAAC TAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCACCATTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTAGTCGAGTGCCA
Leuconostoc citreum TTAAGTGGAAAACGATGTGATAGTGCATAGACAAC TAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCACCATTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTAGTCGAGTGCCA
Clustal Consensus *****

```

3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300

```

...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Leuconostoc mesenteroides TTGCGCGGAAAATGTACCGGGCTAAACATATTACCGAAACTGCGGGTGACGTAAGTGCGCATAGGAGAGCGTTGTAAGGGCGACGAAGGTAGATCGT
p45 TTGCGCGGAAAATGTACCGGGCTAAACATATTACCGAAACTGCGGGTGACGTAAGTGCGCATAGGAGAGCGTTGTAAGGGCGACGAA-----
Leuconostoc citreum TTGCGCGGAAAATGTACCGGGCTAAACATATTACCGAAACTGCGGGTGACGTAAGTGCGCATAGGAGAGCGTTGTAAGGGCGACGAAGGTAGACCGT
Clustal Consensus *****

```

Fw 3120-4045

3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400

```

...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Leuconostoc mesenteroides AAGGACTGCTGGAGCGCTTACAAGTGAGAA TGCCGGTATGAGTAGCGAAAGACAGGTTGAGAATCCTGTCCACC GAATGACTAAGGTTTCCTGGGGAAGGC
p45 AAGGACTGCTGGAGCGCTTACAAGTGAGAA TGCCGGTATGAGTAGCGAAAGACAGGTTGAGAATCCTGTCCACC GAATGACTAAGGTTTCCTGGGGAAGGC
Leuconostoc citreum GAGGACTGCTGGAGCGCTTACAAGTGAGAA TGCCGGTATGAGTAGCGAAAGACAGGTTGAGAATCCTGTCCACC GAATGACTAAGGTTTCCTGGGGAAGGC
Clustal Consensus *****

```

Rv 1591-2400; Fw 3175-4000

3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500

```

...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Leuconostoc mesenteroides TCGTCCACCCAGGGTTAGTCGGGACCTAAGGCGAGGCTGAGAAGCGTAGTCGATGGATAACAGGTTGAGATTCTGTACCAGTTGTAATGCGTTATTACC
p45 TCGTCCACCCAGGGTTAGTCGGGACCTAAGGCGAGGCTGAGAAGCGTAGTCGATGGATAACAGGTTGAGATTCTGTACCAGTTGTAATGCGTTATTACC
Leuconostoc citreum TCGTCCACCCAGGGTTAGTCGGGACCTAAGGCGAGGCTGAGAAGCGTAGTCGATGGATAACAGGTTGAGATTCTGTACCAGTAGTAATGCGTT-TGACC
Clustal Consensus *****

```

3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600

```

...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Leuconostoc mesenteroides GATGGAGGGACGCAGGAGGCTACCAGATGCGCACTGATGGATATGTGCGTGCAAGCAGTAAGTCTTGAAAAGAGTGAAATGCTTTTTTCTATAAGGACAA
p45 GATGGAGGGACGCAGGAGGCTACCAGATGCGCACTGATGGATATGTGCGTGCAAGCAGTAAGTCTTGAAAAGAGTGAAATGCTTTTTTCTATAAGGACAA
Leuconostoc citreum GATGGAGGGACGCAGGAGGCTACCAGATGCGCACTGATGGATATGTGCGTGCAAGCAGTAAGTCTTGAAAAGAGTGAAATGCTTTTCTACTATAAGGACAA
Clustal Consensus *****

```

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700

```

...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.

```

Leuconostoc mesenteroides p45
Leuconostoc citreum
Clustal Consensus

```
GCTGTGATGCGGATCGAAATAAAGTAGAGAAGTCTGAGACGTCACACCTGCCGAGAAAAGCTTCTAGGAAGTATTACACTGCCCGTACCGCAAACCGACAC
GCTGTGATGCGGATCGAAATAAAGTAGAGAAGTCTGAGACGTCACACCTGCCGAGAAAAGCTTCTAGGAAGTATTACACTGCCCGTACCGCAAACCGACAC
GCTGTGATGCGGATCGAAATAAAGTAGAGAAGTCTGAGACTCACACCTGCCGAGAAAAGCTTCTAGGAAGTATTACACTGCCCGTACCGCAAACCGACAC
*****
```

3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800

Leuconostoc mesenteroides p45
Leuconostoc citreum
Clustal Consensus

```
AGGTAGTCGAGTGGAGAACACTAAGGTGAGCGAGAGAACCCTCGTTAAGGAATCCGGCAAATGACCCCGTAACTTCCGGGAGAAGGGGTGCTCATGGTAA
AGGTAGTCGAGTGGAGAACACTAAGGTGAGCGAGAGAACCCTCGTTAAGGAATCCGGCAAATGACCCCGTAACTTCCGGGAGAAGGGGTGCTCATGGTAA
AGGTAGTCGAGTGGAGAACACTAAGGTGAGCGAGAGAACCCTCGTTAAGGAATCCGGCAAATGACCCCGTAACTTCCGGGAGAAGGGGTGCTCATGGCAA
*****
```

3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900

Leuconostoc mesenteroides p45
Leuconostoc citreum
Clustal Consensus

```
AACTAGAGCCGAGTGAATAGGCCAGGCGACTGTTTATCAAAAACACAGGTTTCTGC AAAATCGTAAGATGAAGTATAGGGGCTGACGCTGCCCGGTG
AACTAGAGCCGAGTGAATAGGCCAGGCGACTGTTTATCAAAAACACAGGTTTCTGC AAAATCGTAAGATGAAGTATAGGGGCTGACGCTGCCCGGTG
--CATGAGCCGAGTGAATAGGCCAGGCGACTGTTTATCAAAAACACAGGTTTCTGC AAAATCGTAAGATGAAGTATAGGGGCTGACGCTGCCCGGTG
*****
```

3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000

Leuconostoc mesenteroides p45
Leuconostoc citreum
Clustal Consensus

```
CTGGAAGGTTAAAAGGAGTGCTTAGCTTCGCGAAGGTACGAAATTGAAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCC
CTGGAAGGTTAAAAGGAGTGCTTAGCTTCGCGAAGGTACGAAATTGAAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCC
CTGGAAGGTTAAAAGGAGTGCTTAGCTTCGCGAAGGTATGAAATTGAAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCC
*****
```

4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100

Leuconostoc mesenteroides p45
Leuconostoc citreum
Clustal Consensus

```
TTGTGCGGTTAAGTCCGACCCGCACGAAAGCGTAACGATCTGGGCACGTCTCAACGAGGGACTCGGTGAAATTTAAATACCCGTGAAGATGCGGGTTA
TTGTGCGGTTAAGTCCGACCCGCACGAAAGCGTAACGATCTGGGCACGTCTCAACGAGGGACTCGGTGAAATTTAAATACCCGTGAAGATGCGGGTTA
TTGTGCGGTTAAGTCCGACCCGCACGAAAGCGTAACGATCTGGGCACGTCTCAACGAGGGACTCGGTGAAATTTAAATACCCGTGAAGATGCGGGTTA
*****
```

4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200

Leuconostoc mesenteroides p45
Leuconostoc citreum
Clustal Consensus

```
CCCGCGACAGGACGGAAGAACCACATGGAGCTTTACTGTAGCCTGATACTGAAATGTTGTGCTTGTACAGAATAGGTAGGAGACGTAGAAGATTGGA
CCCGCGACAGGACGGAAGAACCACATGGAGCTTTACTGTAGCCTGATACTGAAATGTTGCTTGTACAGAATAGGTAGGAGACGTAGAAGATTGGA
CCCGCGACAGGACGGAAGAACCACATGGAGCTTTACTGTAGCCTGATACTGAAATGTTGTGCTTGTACAGCATAGGTAGGAGACGTAGAAGTTTGG
*****
```

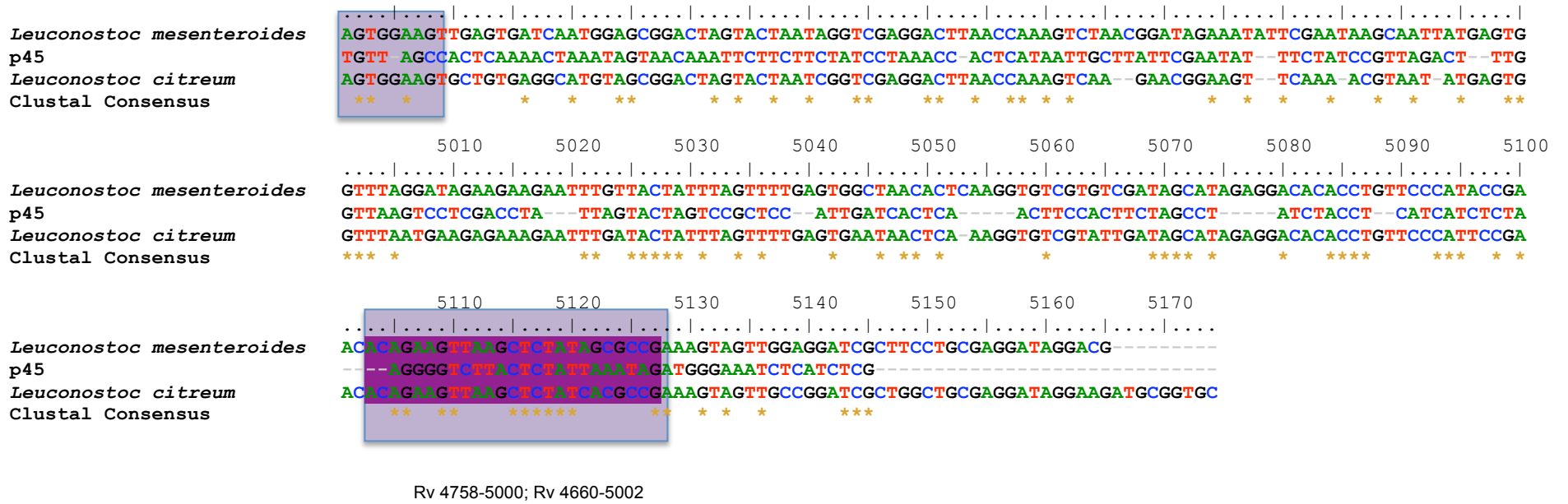
Rv 3120-4045

Rv 3175-4782; Fw 3975-4782

4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300

Leuconostoc mesenteroides p45
Leuconostoc citreum
Clustal Consensus

```
CGCTAGTCTAGTCGGAGTCGCACGGTGGGATACTACCCTCGTTGATGAACATTCTAACACTGGTCACTCAACGTGATCGTGGACAGTGTCTGGCGGGCA
CGCTAGTCTAGTCGGAGTCGCACGGTGGGATACTACCCTCGTTGATGAACATTCTAACACTGGTCACTCAACGTGATCGTGGACAGTGTCTGGCGGGCA
CGCCAGTCTAGACGGAGTCGCACGGTGGGATACTACCCTCGTTGATGAACATTCTAACACTGGTCGCTTATCGCGATCGTGGACAGTGTCTGGCGGGCA
*** *****
```

- Forward y Reverse del primer diseño de primers.
- Forwrad del segundo diseño de primers
- Rverse del segundo siseño de Primers.

Figura 22. Secuencia del operón ribosomal de la cepa P45 y las cepas de referencia.

4. Conclusiones:

De las 13 cepas aisladas del pulque por Campos (2010), se obtuvo que las cepas que crecen mejor en medio MRS Difco™ a las 17 h, son la cepa P31 P49 y P45. Estandarizando la cantidad de microorganismos a un determinado tiempo se realizó un ensayo cuantitativo del efecto microbiano de las 13 bacterias lácticas a una concentración de 1×10^9 UFC/mL contra los microorganismos *Escherichia coli* EPEC, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella entérica* serovar Typhi y *Typhimurium*, encontrando que las cepas P9, P49 y P45 presentan la mejor actividad inhibitoria con halos de inhibición de 0.4 hasta 0.8 cm en medio APT Difco™ incubadas por 24h.

Con los datos de Campos (2010) respecto al crecimiento de las 13 cepas en condiciones ácidas así como también en altas concentraciones de sales biliares y los valores de crecimiento y halos de inhibición realizados en este trabajo, se escogió la cepa P45 por presentar las siguientes características:

1. Buen crecimiento a 37°C en pH de 3 y a una concentración de 0.3% de sales biliares (Campos 2010)
2. Un buen crecimiento a las 17h en medio MRS Difco™ (1.24×10^{10} UFC/mL).
3. Una buena actividad inhibitoria contra *Salmonella enterica* serovar Typhi (halo de 0.6cm) y *Typhimurium* (halo de 0.7cm), *E coli* EPEC (halo de 0.6cm) y *Listeria monocytogenes* (halo de 0.4 cm).

La cepa P45 administrada oralmente por 7 días presentó en hígado y bazo una disminución de uno o dos ciclos logarítmicos en la infección por *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium* st^f; en 18 ratones BALB/c de ocho semanas, hembras y machos, presentando una mejor resistencia a la infección en las hembras que en los machos.

Así mismo se observó la producción heterogénea de ácidos orgánicos que ayudan a la inhibición contra patógenos. De los ácidos orgánicos probados, la cepa P45 produce a las 48h en medio MRS Difco™ principalmente ácido láctico (10.9g/L), seguido de ácido acético (4.607) y ácido fórmico (0.3785). Aunque los resultados obtenidos en este trabajo no permiten asociar el nivel de producción de estos ácidos con la actividad antimicrobiana observada.

Se observó también actividad inhibitoria del sobrenadante de la cepa P45 concentrado 1.6 veces de un cultivo en medio MRS Difco™ de 48h contra los cuatro patógenos antes

mencionados, inhibición que no se observa si el sobrenadante recibe un tratamiento térmico (95°C por 5 min.) comprobando así la inhibición por acción de una sustancia sensible al calor, atribuyendo esto a la posible producción de una bacteriocina termosensible.

Finalmente, la secuenciación del operón ribosomal de la cepa P45 permitió identificar a esta cepa como un *Leuconostoc*, con gran parecido (92%) a la cepa *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8233, pero presentando regiones significativamente diferentes, sugiriendo así una nueva subespecie.

5. Perspectivas.

Para poder asegurar con más fundamentos el mecanismo de acción de la cepa P45, es importante poder comprobar que esta cepa es capaz de adherirse al intestino, para esto existen experimentos *in vitro* e *in vivo*. En los experimentos *in vitro* se trabajan con líneas celulares como son la Caco-2, HL-60, U397, etc., que determinan la adhesión de las bacterias a células epiteliales. En estos experimentos se incuban la bacteria de interés (a veces se usan bacterias marcadas con radiación, en otros trabajos solo se observa la adhesión con tinciones de Gram) sobre una placa con la línea celular, se incuban por 24h, después las placas se lavan y observadas al microscopio o cualquiera que sea el método de detección.

En las pruebas *in vivo* se utilizan ratones. A los cuales se les administra por un cierto tiempo una dosis conocida de la bacterias de interés, una vez terminada la administración se disecta intestino, y mediante FISH (hibridación fluorescente *in situ*; por sus siglas en inglés) se detecta si se adhirieron o no.

Han existido reportes de que varias bacterias probióticas inhiben el crecimiento de *Helicobacter pylori*, enfermedad causante de la gastritis en humanos (Lin, 2009). Por lo tanto es de nuestro interés determinar *in vitro* si la cepa P45 es capaz de inhibir el crecimiento de esta cepa patogénica, así como determinar el espectro de inhibición completo de esta cepa.

Para poder observar el efecto inmunológico de la administración de la cepa P45, se deben realizar la cuantificación e identificación de las citocinas producidas por células epiteliales activadas por la cepa. Igualmente se han reportado metodologías *in vitro* e *in vivo* para esto. En las técnicas *in vitro* se usan líneas celulares de células con respuestas

inmunológicas y en los experimentos *in vivo* se disectan secciones del intestino administrado con diferentes dosis de la cepa a probar.

Finalmente faltan pruebas para caracterizar la posible bacteriocina producida por la cepa P45, como son; naturaleza química, estabilidad, modo de acción, determinación genética, espectro de inhibición, sensibilidad a varias proteasas, modo de síntesis y toxicidad a nivel animal.

Una vez hechas estas determinaciones con resultado satisfactorios, probar esta cepa como posible cepa probiótica; realizar ensayos de doble ciego con placebos como control en humanos, en el tratamiento de infecciones por *Salmonella* o enfermedades concretas, con un número significativo de pacientes para así poder asegurar un beneficio específico de la cepa.

Para poder aprobar una cepa como probiótico la FAO creó una guía para la evaluación de los probióticos (Figura 21) guía que debe encaminar los experimentos que faltan por realizarse para poder clasificar esta cepa como una cepa probiótica.

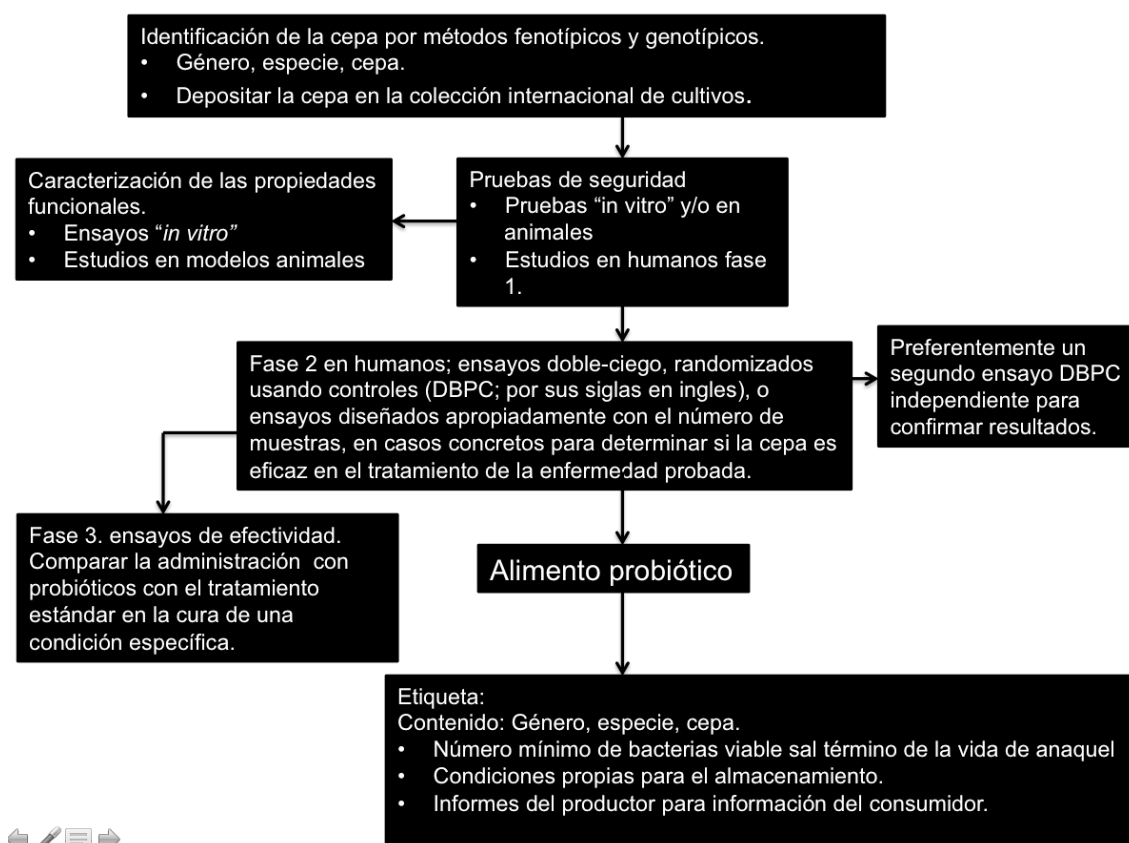


Figura 21. Guía creada por la FAO para la evaluación de los probióticos para ser utilizados en alimentos. Disponible en:

http://who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf

Bibliografía.

- Anukam K., Osazuwa E., Ahonkhai I., Ngwu M., Osemene G., Bruce A. W., y Reid G.. 2006. Augmentation of antimicrobial metronidazole therapy of bacterial vaginosis with oral probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14: randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Microbes Infect* 8 (6):1450-4.
- Bär N., 2010. *Genoma del ratón*. Pro Diversitas 2006 [citado en Julio 9 2010]. disponible en: <http://www.prodiversitas.bioetica.org/prensa40.htm>.
- Begley M., Gahan G. M., y Hill C., 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews* 29 (4):625-651.
- Campos I., 2010. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas del pulque con capacidad probiótica, Tesis de Licenciatura, Facultad de química, Universidad Autónoma de México, México Distrito Federal.
- Chiang, B. L., Sheih Y. H., Wang L. H, Liao C. K., y Gill H. S., 2000. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. *Eur J Clin Nutr* 54 (11):849-55.
- Chitapanarux, I., Chitapanarux T., Traisathit P., Kudumpee S., Tharavichitkul E. y Lorvidhaya V., 2010. Randomized controlled trial of live *Lactobacillus acidophilus* plus *Bifidobacterium bifidum* in prophylaxis of diarrhea during radiotherapy in cervical cancer patients. *Radiat Oncol* (5):31.
- Chiu, H., Tsai C., Hsieh H. Y., y Tsen H. Y.. 2008. Screening from pickled vegetables the potential probiotic strains of lactic acid bacteria able to inhibit the *Salmonella* invasion in mice. *J Appl Microbiol* 104 (2):605-12.
- Corcoran B., Stanton M., Fitzgerald G., y Ross R., 2005. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl Environ Microbiol* 71 (6):3060-7.
- Corsetti A., Gobbetti M., Rossi J. y Damiani P., 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl Microbiol Biotechnol* 50 (2):253-6.
- Darwin K., y Miller V., 1999. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (3):405-428.
- Escalante, A., Giles M., Hernandez G., Cordova M. S., Lopez A., Gosset G., y Bolivar F., 2008. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int J Food Microbiol* 124 (2):126-34.
- Escalante, A., Rodriguez M. E., Martinez A., Lopez-Munguia A., Bolivar F., y Gosset G. 2004. Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett* 235 (2):273-9.

- Figueroa M. y Rodríguez A., 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47 (1-2):24-42.
- Flores A., Escovedo R., y Aguilar L., 2008. Evaluación fisicoquímica del aguamiel de tres variedades de maguey pulquero. *Revista Salud Pública y Nutrición* (8).
- Fotiadis, C. I., Stoidis C. N., Spyropoulos B. G., y Zografos E. D.. 2008. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 14 (42):6453-7.
- Franceschi, F., Cazzato A., Nista E. C., Scarpellini E., Roccarina D., Gigante G., Gasbarrini G., y Gasbarrini A., 2007. Role of probiotics in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 12 Suppl 2:59-63.
- Frederic A., Omar N., Moizan C., Wachter C., y Guyot J., 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (12):5464-5473.
- Hall T.A. 1999. A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser* 41:95-98.
- Hapfelmeier S. y Hardt W. D., 2005. A mouse model for *S. typhimurium*-induced enterocolitis. *Trends Microbiol* 13 (10):497-503.
- Hechard Y., Derijard B., Letellier F. y Cenatiempo Y., 1992. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-Listeria bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Gen Microbiol* 138 (12):2725-2731.
- Holzappel, W. H., 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* 75 (3):197-212.
- Holzappel W. H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. y Schillinger U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73 (2):365S-373S.
- Hueck C., 1998. Type iii protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (2):379-433.
- Ibnou-Zekri N., Blum S., Schiffrin J., y Weid T., 2003. Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties *in vitro*. *Infect. Immun.* 71 (1):428-436.
- Infectología, Comité Nacional del 2006. Gastroenteritis por rotavirus y su prevención. In *Archivos argentinos de pediatría*: scielo.ar.
- Jones K., 2010. Probiotics: preventing antibiotic-associated diarrhea. *Journal for Specialists in Pediatric Nursing* 15 (2):160-162.
- Kajander K., Hatakka K., Poussa T., Farkkila M., y Korpela R., 2005. A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention. *Aliment Pharmacol Ther* 22 (5):387-94.

- Kekkonen R. A., Kajasto E., Miettinen M., Veckman V., Korpela R. y Julkunen I., 2008. Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN-gamma production. *World J Gastroenterol* 14 (8):1192-203.
- Lappe P., Moreno R., Arrizon J., Herrera T., Garcia A. y Gschaedler A. 2008. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Res* 8 (7):1037-52.
- Lim L., Li H., Huang C., Lee B., Lee Y. y Chua K., 2009. The effects of heat-killed wild-type *Lactobacillus casei* Shirota on allergic immune responses in an allergy mouse model. *Int Arch Allergy Immunol* 148 (4):297-304.
- Lin W., Lin C., Sheu S., Hwang C., Ye W., Hwang W. y Tsen H.. 2009. Antagonistic activity of spent culture supernatants of lactic acid bacteria against *Helicobacter pylori* growth and infection in human gastric epithelial AGS cells. *J Food Sci* 74 (6):225-30.
- Loyola E., 1956. *La industria del pulque*. México: Banco de México.
- Martin F., Verdu E., Wang Y., Dumas M., Yap I., Cloarec O., Bergonzelli G., Corthesy-Theulaz I., Kochhar S., Holmes E., Lindon J., Collins S. y Nicholson J., 2006. Transgenomic metabolic interactions in a mouse disease model: An interactions of *Trichinella spiralis* infection with dietary *Lactobacillus paracasei* supplementation. *Journal of Proteome Research* 5 (9):2185-2193.
- Martinez R. y Martinis E., 2006. Effect of *Leuconostoc mesenteroides* 11 bacteriocin in the multiplication control of *Listeria monocytogenes* 4b. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26:52-55.
- Mathur S. y Singh R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria a review. *International Journal of Food Microbiology* 105 (3):281-295.
- Matsuzaki T. 1998. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Int J Food Microbiol* 41 (2):133-40.
- Matsuzaki T., Nagata Y., Kado S., Uchida K., Kato I., Hashimoto S. y Yokokura T., 1997. Prevention of onset in an insulin-dependent diabetes mellitus model, NOD mice, by oral feeding of *Lactobacillus casei*. *APMIS* 105 (8):643-9.
- Monack D., Mueller A. y Falkow S.. 2004. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol* 2 (9):747-65.
- Monroy, M.C., Barrera T., Perrino F. y Reyes L.. 2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contacto S* 73:63-72.
- Montemayor C., 2004. El maguey, el pulque y la leyenda. *La jornada* Jueves 24 de febrero.
- Monterrubio A., 2007. *Las Haciendas pulqueras de México*. México Distrito Federal: UNAM coordinación de Estudios de Posgrados, programa de posgrado en arquitectura.
- Morishita M., Miyagi M. y Iwamoto Y., 1999. Effects of sex hormones on production of interleukin-1 by human peripheral monocytes. *Journal of Periodontology* 70 (7):757-760.
- Muyanja, C. M., Narvhus J. A., Treimo J. y Langsrud T.. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology* 80 (3):201-210.

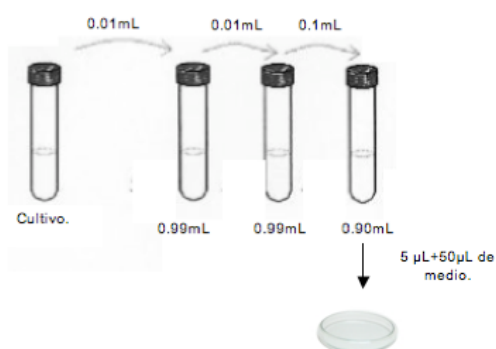
- Myron M., Levine R., Nalin D. B., Hornick J., Bergquist H., Waterman D., Young C., Sotman S., y Rowe B., 1978. *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive *The Lancet* 311 (8074):1119-1122.
- NCCAM. 2010. *An introduction to Probiotics*. PubMed 2008 [consultado el 10 de Junio 2010]. Disponible en: <http://nccam.nih.gov/health/probiotics/#references>.
- Nomoto K., 2005. Prevention of infections by probiotics. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (6):583-592.
- Olaiz G., Shamah T., Rojas R., Villalpando S., Hernández M., SÉpulveda J., Rivera J., 2006. *Encuesta nacional de salud y nutrición 2006*. Edited by O. A. Carlos, Rivero Vázquez Samuel Cuernavaca México: Intituto Nacional de Salud pública.
- Olvera M., 2000. La contribución de Lucio Mendieta y Núñez a la institucionalización de la sociología mexicana y la formación de sus primeras comunidades disciplinarias 1940.1965, UNAM, México Distrito Federal.
- Ouwehand A. C., Bergsma N., Parhiala R., Lahtinen S., Gueimonde M., Finne-Soveri H., Strandberg T., Pitkala K. y Salminen S., 2008. *Bifidobacterium* microbiota and parameters of immune function in elderly subjects. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53 (1):18-25.
- Paz, José 1935. *En defensa del pulque: 668,677 personas viven de la industria pulquera; el medio de vida de estos proletarios debe respetarse*, México: s/e, 193p.
- Perdigon G., Alvarez S., Rachid M., Agüero G, y Gobbato N., 1995. Immune system stimulation by probiotics. *Journal of dairy science* 78 (7):1597-1606.
- Pongtharangkul T., y Demirci A., 2004. Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. *Appl Microbiol Biotechnol* 65 (3):268-72.
- Ramírez R., 2004. El maguey y el pulque: memoria y tradición convertidos en historia, 1884-1993, Tesis de Licenciatura, Facultad de Filosofía y Letras, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.
- Rendón R., 1990. *Dos haciendas pulqueras en Tlaxcala 1857-1884*. Estado de Tlaxtala México: Universidad Iberoamericana
- Resta-Lenert, S. C y Barrett K.E., 2009. Modulation of intestinal barrier properties by probiotics: role in reversing colitis. *Ann N Y Acad Sci* 1165:175-82.
- Rinne M., Kalliomaki M., Arvilommi H., Salminen S. y Isolauri E., 2005. Effect of probiotics and breastfeeding on the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus/Enterococcus* microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr* 147 (2):186-91.
- Rivera Y. y Gallardo Y.. 2010. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol* 27 (1):1-11.
- Ruiz F., 2008. Bacteriocinas para la estabilización microbiológica y reducción de la dosis de SO2. Artículo presentado In *Microsafetywine*. Villa Franca del Penedés (Barcelona).
- SAGE. 2009. *Ace Animal, Inc SAGE LABS*. Sigma-Aldrich, 2010 2010 [Consultado en Diciembre 2009]. Available from <http://www.aceanimals.com/index.html>.

- Salazar O.C., 2004. Memoria gráfica de la historia del pulque en México, Tesis de Licenciatura, Departamento de diseño gráfico, Universidad de las Américas de Puebla Cholula, Puebla.
- Sánchez M. M., Cardona N. M., 2003. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio* 7 no.1:22-29.
- Sarker S. A., Sultana S., Fuchs G. J., Alam N. H., Azim T., Brussow H. y Hammarstrom L., 2005. *Lactobacillus paracasei* strain ST11 has no effect on rotavirus but ameliorates the outcome of nonrotavirus diarrhea in children from Bangladesh. *Pediatrics* 116 (2):221-8.
- Savado O., Bassole I. H., y Traore A., 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria- a minireview. *African Journal of Biotechnology* 5 (9):678-683.
- Shoba R. y Renu A., 2007. Volatile compounds of therapeutic importance produced by *Leuconostoc paramesenteroides*, a native laboratory isolate. *Turk. J. Biol.* 31:35-40.
- Stack H. M., Kearney N., Stanton C., Fitzgerald G. F. y Ross R. P., 2010. Association of beta-glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal *Lactobacilli*. *Appl Environ Microbiol* 76 (2):500-7.
- Stecher B., Chaffron S., Käppli R., Hapfelmeier S., Friedrich S., Weber T.C., Kirundi J, Suar M., McCoy K.D., Mering C., Macpherson A. J., y Hardt W. D., 2010. Like will to like: abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal colonization by pathogenic and commensal bacteria. *PLoS Pathog* 6 (1):e1000711.
- Szymański H., Pejcz J., Jawień M., Chmielarczyk A., Strus M. y Heczko P. B., 2006. Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three *Lactobacillus rhamnosus* strains – a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 23 (2):247-253.
- Takagi A., Matsuzaki T., Sato M., Nomoto K., Morotomi M. y Yokokura T., 1999. Inhibitory effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis in mice. *Med Microbiol Immunol* 188 (3):111-6.
- Tannock W. 2010. Analysis of Bifidobacterial Populations in Bowel Ecology Studies. In *Bifidobacteria Genomics and Molecular Aspects*, edited by B. Mayo and D. v. Dinderen. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Todd L. E., Canseco C., y Morantes C., 2009. *Breve Historia de la Ciencia en México*, Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Nuevo Leon.
- Todorov S. D., y Dicks L. M. T., 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* 36 (2-3):318-326.
- Topping D. y Clifton P., 2001. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.* 81 (3):1031-1064.
- Tuohy K. M., Pinart-Gilberga M., Jones M., Hoyles L., McCartney A. L. y Gibson G. R., 2007. Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *J Appl Microbiol* 102 (4):1026-32.

- White K., 2007. Las dinámicas de raza y recordatorio sobre una sociedad "daltónica" en caso de estudio sobre los paradigmas raciales y la educación en archivnomía en México. *VII Congress if Archivología of MERCOSUR, Viña del Mar Chile.*
- Wright A., 2009. "La bebida nacional" Pulque and mexicanidad, 1920-46. *Canadian Journal og History.*
- Yamamoto Y., Saito H., Setogawa T. y Tomioka H., 1991. Sex differences in host resistance to *Mycobacterium marinum* infection in mice. *Infect Immun* 59 (11):4089-96.

Cálculos

Ejemplo del primer dato de cuenta en placa donde se obtuvo 450 UFC en la primera caja, inoculada a partir de la dilución 5, como se observa en la siguiente figura.



Análisis estadístico

$$UFC=450.$$

$$UFC/mL = \frac{450UFC}{0.005mL} = 9 \times 10^4 UFC/mL$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C_1 = x \quad C_2 = 9 \times 10^4 UFC/mL$$

$$V_1 = 0.1mL \quad V_2 = 1mL$$

$$C_1 = \frac{[1mL][9 \times 10^4 UFC/mL]}{0.1mL} = 9 \times 10^5 UFC/mL$$

$$C_1 = \frac{[1mL][9 \times 10^4 UFC/mL]}{0.01mL} = 9 \times 10^7 UFC/mL$$

$$C_1 = \frac{[1mL][9 \times 10^7 UFC/mL]}{0.01mL} = 9 \times 10^9 UFC/mL$$

Para el cálculo de parámetros estadísticos de unidades formadoras de colonia (UFC/mL), los datos se deben transformar a logaritmos en base 10 para normalizar la distribución. A estos valores normalizados se determina la desviación estándar que es una expresión cuantitativa de la precisión.

Cepa	Log10 UFC/mL	Log10 UFC/mL	Log10 UFC/mL	Log10 UFC/mL	Promedio	Desviación estándar
3H38	9.954	10.010	8.964	8.778	9.427	0.646
3H52	8.982	9.086	8.748	8.699	8.879	0.185
6H15	8.748	8.699	8.881	8.643	8.743	0.101
6H39	8.881	8.833	8.944	8.964	8.905	0.060
6H74	9.868	9.801	9.889	9.862	9.855	0.038
P22	9.647	9.771	8.531	8.763	9.178	0.622
P31	9.954	10.010	9.857	9.870	9.923	0.072
P4	9.766	9.676	8.447	8.681	9.143	0.676
P45	10.230	10.240	9.886	9.868	10.056	0.207
P49	9.973	10.072	10.123	10.250	10.104	0.115
P59CH	9.580	9.477	9.422	9.350	9.457	0.097
P59G	9.350	9.241	8.973	8.924	9.122	0.206
P9	9.926	9.827	9.778	9.863	9.849	0.062

MACHOS HÍGADO

MACHOS HÍGADO										Desviación
Controles	Hígado 1	Hígado 2	Hígado 2	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	estándar.
1	6752	5000	9798	1x10 ⁶	1x10 ⁶	2X10 ⁶	6.13	6.00	6.29	0.15
2	1400	1454	1600	3X10 ⁵	3X10 ⁵	3X10 ⁵	5.45	5.46	5.51	0.03
3	7398	6698	7567	1X10 ⁶	1x10 ⁶	2X10 ⁶	6.17	6.13	6.18	0.03
4	15698	17896	9866	3X10 ⁶	4X10 ⁶	2X10 ⁶	6.50	6.55	6.30	0.14
5	8639	9684	7563	2X10 ⁶	2X10 ⁶	2X10 ⁶	6.24	6.29	6.18	0.05
MACHOS HÍGADO										Desviación
Muestras	Hígado 1	Hígado 2	Hígado 2	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	estándar.
1	578	987	639	1X10 ⁴	2X10 ⁴	1X10 ⁴	4.06	4.30	4.11	0.12
2	698	455	1548	1X10 ⁴	9X10 ³	3X10 ⁴	4.14	3.96	4.49	0.27
3	256	185	475	5X10 ³	4X10 ³	1X10 ⁴	3.71	3.57	3.98	0.21
4	1180	760	896	2X10 ⁴	2X10 ⁴	2X10 ⁴	4.37	4.18	4.25	0.10
5	280	410	570	6X10 ³	8X10 ³	1X10 ⁴	3.75	3.91	4.06	0.15
6	870	760	690	2X10 ⁴	2X10 ⁴	1X10 ⁴	4.24	4.18	4.14	0.05
7	250	660	620	5X10 ³	1X10 ⁴	1X10 ⁴	3.70	4.12	4.09	0.24
8	771	681	745	2X10 ⁴	1X10 ⁴	1X10 ⁴	4.19	4.13	4.17	0.03
9	80	170	500	2X10 ³	3X10 ³	1X10 ⁴	3.20	3.53	4.00	0.40

MACHOS BAZO

MACHOS BAZO											Desviación
Controles	Bazo 1	Bazo 2	Bazo 3	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	estándar	
1	878	516	915	2X10 ⁵	1X10 ⁵	2X10 ⁵	5.24	5.01	5.26	0.14	
2	401	614	308	8X10 ⁴	2X10 ⁵	6X10 ⁴	4.90	5.09	4.79	0.15	
3	831	341	543	2X10 ⁵	7X10 ⁴	1X10 ⁵	5.22	4.83	5.04	0.19	
4	987	569	659	2X10 ⁵	2X10 ⁵	1X10 ⁵	5.30	5.06	5.12	0.12	
5	639	785	963	1X10 ⁵	2X10 ⁵	2X10 ⁵	5.11	5.20	5.28	0.09	
MACHOS BAZO											Desviación
Muestras	Bazo 1	Bazo 2	Bazo 3	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	estándar	
1	134	178	112	3X10 ³	4X10 ³	2X10 ³	3.43	3.55	3.35	0.10	
2	234	350	270	5X10 ³	7X10 ³	5X10 ³	3.67	3.85	3.73	0.09	
3	271	359	384	5X10 ³	7X10 ³	8X10 ³	3.73	3.86	3.89	0.08	
4	130	90	123	3X10 ³	2X10 ³	2X10 ³	3.41	3.26	3.39	0.09	
5	87	105	287	2X10 ³	2X10 ³	6X10 ³	3.24	3.32	3.76	0.28	
6	210	70	300	4X10 ³	1X10 ³	6X10 ³	3.62	3.15	3.78	0.33	
7	67	98	78	1X10 ³	2X10 ³	2X10 ³	3.13	3.29	3.19	0.08	
8	245	165	189	5X10 ³	3X10 ³	2X10 ³	3.69	3.52	3.58	0.09	
9	14	54	34	3X10 ²	1X10 ³	7X10 ²	2.45	3.03	2.83	0.30	

HEMBRAS HÍGADO

HEMBRAS HÍGADO										Desviación
Controles	Hígado 1	Hígado 2	Hígado 2	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	estándar.
1	130	120	100	3X10 ⁴	2X10 ⁴	2X10 ⁴	4.41	4.38	4.30	0.06
2	140	147	160	3X10 ⁴	3X10 ⁴	3X10 ⁴	4.45	4.47	4.51	0.03
3	245	367	597	5X10 ⁴	7X10 ⁴	1X10 ⁵	4.69	4.87	5.08	0.19
4	354	548	366	7X10 ⁴	1X10 ⁵	7X10 ⁴	4.85	5.04	4.86	0.11
5	589	487	639	1X10 ⁵	1X10 ⁵	1X10 ⁵	5.07	4.99	5.11	0.06
Muestras	Hígado 1	Hígado 2	Hígado 2	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	Desviación
1	87	76	69	2X10 ³	2X10 ³	1X10 ³	3.24	3.18	3.14	estándar.
2	771	681	745	2X10 ⁴	1X10 ⁴	1X10 ⁴	4.19	4.13	4.17	0.03
3	80	170	5	2X10 ³	3X10 ³	1.E+02	3.20	3.53	2.00	0.81
4	25	66	62	5X10 ²	1X10 ³	1X10 ³	2.70	3.12	3.09	0.24
5	19	2	27	4X10 ²	4X10 ¹	5X10 ²	2.58	1.60	2.73	0.61
6	13	33	18	3X10 ²	7X10 ²	4X10 ²	2.41	2.82	2.56	0.21
7	25	43	56	5X10 ²	9X10 ²	1X10 ³	2.70	2.93	3.05	0.18
8	564	653	123	1X10 ⁴	1X10 ⁴	1X10 ³	4.05	4.12	3.39	0.40
9	789	43	123	2X10 ⁴	9X10 ²	1X10 ³	4.20	2.93	3.39	0.64

HEMBRAS BAZO

Log											
Controles	Bazo 1	Bazo 2	Bazo 3	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	(CFU/mL)	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	Desviación estándar
1	81	79	61	2X10 ⁴	2X10 ⁴	1X10 ⁴	4.21	4.20	4.09	0.07	
2	30	21	11	6X10 ³	4X10 ³	2X10 ³	3.78	3.62	3.34	0.22	
3	47	68	65	9X10 ³	1X10 ⁴	1X10 ⁴	3.97	4.13	4.11	0.09	
4	115	98	78	2X10 ⁴	1X10 ⁴	2X10 ⁴	4.36	4.29	4.19	0.08	
5	254	98	45	5X10 ⁴	2X10 ⁴	9X10 ³	4.71	4.29	3.95	0.38	
Log											
Muestras	Bazo 1	Bazo 2	Bazo 3	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	(CFU/mL)	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)	Desviación estándar
1	10	12	16	2X10 ²	2X10 ²	3X10 ²	2.30	2.38	2.51	0.10	
2	251	302	209	5X10 ³	6X10 ³	4X10 ³	3.70	3.78	3.62	0.08	
3	10	19	13	2X10 ²	4X10 ²	3X10 ²	2.30	2.58	2.41	0.14	
4	23	12	15	5X10 ²	2X10 ²	3X10 ²	2.66	2.38	2.48	0.14	
5	11	4	2	2X10 ²	8X10 ¹	4X10 ¹	2.34	1.90	1.60	0.37	
6	5	3	13	2X10 ²	6X10 ²	3X10 ²	2.00	1.78	2.41	0.32	
7	20	10	13	4X10 ²	2X10 ²	3X10 ²	2.60	2.30	2.41	0.15	
8	134	128	80	3X10 ³	3X10 ³	2X10 ³	3.43	3.41	3.20	0.12	
9	234	256	139	5X10 ³	5X10 ³	3X10 ³	3.67	3.71	3.44	0.14	