



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETECCIÓN DE LACTOBACILOS AISLADOS DEL PULQUE CON CAPACIDAD
PROBIÓTICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ELISA KAREN GUTIERREZ RODRIGUEZ



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Olga del Carmen Velázquez Madrazo

VOCAL: Profesor: José Adelfo Escalante Lozada

SECRETARIO: Profesor: Martha Giles Gómez

1er. SUPLENTE: Profesor: Norma Angélica Camacho de la Rosa

2° SUPLENTE: Profesor: Oscar Hernández Meléndez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: CEPARIO DEL DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M. en B. Martha Giles Gómez

SUSTENTANTE (S):

Elisa Karen Gutierrez Rodríguez

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM <IN207914>
<Análisis de la diversidad de bacterias lácticas del pulque enfocado al estudio de su genómica y metabolismo>

Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida

ÍNDICE

A. ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
B. ÍNDICE DE TABLAS.....	9
1. RESUMEN.....	10
2. INTRODUCCIÓN.....	11
3. ANTECEDENTES.....	14
3.1 Pulque.....	14
3.1.1 Definición y elaboración.....	14
3.1.2 Historia del pulque.....	16
3.2 Microbiología.....	19
3.2.1 Microbiota del pulque.....	19
3.2.2 Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	22
3.2.2.1 Lactobacilos.....	23
3.3 Probióticos.....	24
3.3.1 Microorganismos probióticos.....	24
3.3.2 Beneficios asociados al consumo de probióticos.....	25
3.3.3 Mecanismos de acción de los probióticos.....	27
3.3.3.1 Modulación de la microbiota intestinal e inhibición de patógenos.....	28
3.3.3.2 Mejora de la función de barrera intestinal.....	29
3.3.3.3 Modulación de la respuesta inmune.....	29
3.3.4 Criterios para la selección de microorganismos potencialmente probióticos.....	30
3.3.5 Consumo de probióticos.....	31
3.3.6 Probióticos en alimentos fermentados tradicionales.....	32
3.3.7 Microorganismos probióticos en el pulque.....	33
4. JUSTIFICACIÓN.....	34
5. HIPÓTESIS.....	34
6. OBJETIVOS.....	35
7. MATERIAL Y METODOLOGÍA.....	36
7.1 Muestreo y medición de parámetros fisicoquímicos.....	36
7.2 Cuantificación de bacterias ácido lácticas.....	36

7.3 Selección de cepas por características morfológicas y análisis microscópico.....	36
7.4 Purificación, tinción de Gram y prueba de la catalasa.....	37
7.5 Aislamiento de la bacteria láctica de referencia.....	37
7.6 Conservación a mediano y largo plazo de BAL.....	38
7.7 Evaluación cualitativa de resistencia a condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i> , en presencia de sales biliares y condiciones de acidez.....	38
7.8 Evaluación de la actividad antibacteriana de las BAL contra patógenos.....	39
7.8.1 Cultivo, conservación y activación de cepas patógenas de prueba.....	39
7.8.2 Selección de cepas con actividad antibacteriana.....	40
7.9 Evaluación cuantitativa de resistencia a medio ácido con sales biliares de las cepas que mostraron mejor potencial probiótico.....	41
7.10 Identificación de cepas con potencial probiótico.....	42
7.10.1 Identificación molecular por análisis de secuencias de ADNr 16S.....	42
7.10.1.2 Extracción de ADN cromosomal y electroforesis en gel de agarosa.....	42
7.10.1.3 Amplificación del ADNr 16S por PCR.....	42
7.10.1.4 Purificación y secuenciación del ADNr 16S.....	44
7.10.2 Identificación bioquímica por el sistema API® 50 CH.....	44
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
8.1 Muestreo y medición de parámetros fisicoquímicos.....	45
8.2 Cuantificación de bacterias ácido-lácticas.....	46
8.3 Selección de cepas por características morfológicas y análisis microscópico.....	47
8.4 Descripción colonial, tinción de Gram y prueba de la catalasa.....	50
8.5 Evaluación cualitativa de resistencia a condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i> , en presencia de sales biliares y condiciones de acidez.....	52
8.6 Selección de cepas con actividad antibacteriana contra patógenos.....	55
8.7 Evaluación cuantitativa (UFC/mL) de resistencia a medio ácido con sales biliares de las cepas que mostraron mejor potencial probiótico.....	63
8.8 Identificación de cepas con potencial probiótico.....	64
8.8.1 Identificación molecular por análisis de secuencias de ADNr 16S.....	64
8.8.1.1 Extracción de ADN cromosomal y electroforesis en gel de agarosa.....	64
8.8.1.2 Amplificación del ADNr 16S por PCR.....	65
8.8.1.3 Análisis de secuencias de ADNr 16S.....	67

8.8.2 Identificación bioquímica por el sistema API® 50CH.....	71
9. CONCLUSIONES.....	74
10. PERSPECTIVAS.....	75
11. REFERENCIAS.....	76
12. ANEXOS.....	84

A. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos utilizados por los probióticos para ejercer un efecto benéfico en el hospedero.....	27
Figura 2. Tinciones simples de las colonias seleccionadas a partir de las placas de AMRS.....	48
Figura 3. Proporción de bacilos encontrada en las tres muestras de pulque de Huitztlac, Morelos.....	49
Figura 4. Cepas aisladas a partir del pulque. Tinción de Gram.....	51
Figura 5. Halos de inhibición generados sobre el desarrollo de EPEC por los lactobacilos: <i>L. casei</i> Shirota®, 2S1.9, 2S1".12 b y 2S1.37 b.....	58
Figura 6. Halos de inhibición generados sobre el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> por los lactobacilos: <i>L. casei</i> Shirota®, 2S1.9, 2S1".12 b y 2S1.37 b.....	59
Figura 7. Halos de inhibición generados sobre el desarrollo de <i>S. Tiph</i> y por los lactobacilos: <i>L. casei</i> Shirota®, 2S1.9, 2S1".12 b y 2S1.37 b.....	60
Figura 8. Halos de inhibición generados sobre el desarrollo de <i>S. Enteritidis</i> por los lactobacilos: <i>L. casei</i> Shirota®, 2S1.9, 2S1".12 b y 2S1.37 b.....	61
Figura 9. Halos de inhibición generados sobre el desarrollo de <i>V. cholerae</i> por los lactobacilos: <i>L. casei</i> Shirota®, 2S1.9, 2S1".12 b y 2S1.37 b.....	62
Figura 10. DNA cromosomal de los lactobacilos aislados a partir del pulque. Electroforesis en gel de agarosa.....	65
Figura 11. Amplificación del gen ADNr 16S de las cepas aisladas del pulque. Electroforesis en gel de agarosa.....	66
Figura 12. Árbol filogenético elaborado con las secuencias del ADNr 16 S.....	70
Figura 13. Identificación bioquímica por el sistema API® 50 CH. Patrones de fermentación de las cepas 2S1.9 y <i>Lactobacillus casei</i> Shirota®.....	71

B. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos comúnmente usados como probióticos.....	25
Tabla 2. Efectos benéficos demostrados para ciertas cepas probióticas.....	26
Tabla 3. Bebidas tradicionales fermentadas que contienen microorganismos con potencial probiótico.....	32
Tabla 4. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación del ADNr 16S por PCR.....	43
Tabla 5. Condiciones utilizadas para la reacción de amplificación con la enzima Taq DNA polimerasa.....	43
Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos de las tres muestras de pulque.....	45
Tabla 7. Valor estimado del número de colonias presente en las muestras de pulque.....	46
Tabla 8. Características morfológicas de las cepas aisladas, tinción de Gram y prueba de la catalasa.....	50
Tabla 9. Resultados de resistencia a condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i> de las cepas.....	53
Tabla 10. Actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas seleccionadas sobre diversos patógenos.....	56
Tabla 11. Resistencia de las cepas con potencial probiótico a sales biliares y ácido, en términos de células viables.....	63
Tabla 12. Concentración de ADN en productos de PCR.....	67
Tabla 13. Identidad de los aislados con base en el análisis de las secuencias de ADNr 16S.....	68
Tabla 14. Identidad de los aislados con base en la identificación bioquímica con API® 50 CH.....	72
Tabla 15. Resumen comparativo de caracterización e identificación.....	73

1. RESUMEN

El pulque es una bebida mexicana fermentada alcohólica, elaborada a partir de la savia de diversas especies de maguey, con una larga historia de tradición y a la que se le han asociado diversas cualidades medicinales y nutricionales desde épocas prehispánicas. Dadas las condiciones de su producción presenta una gran diversidad microbiana, dentro de la cual se presentan bacterias ácido lácticas homo- y heterofermentativas.

A partir de muestras de esta bebida provenientes del municipio de Huitzilac, Edo. Morelos, se realizó el aislamiento de lactobacilos con el uso de un medio selectivo (AMRS con clindamicina y ciprofloxacino) y condiciones de anaerobiosis. Se obtuvo una población de setenta y cinco aislados con carácter Gram-positivo, catalasa-negativo y microscopía bacilar; de entre los cuales, con los resultados obtenidos en el presente trabajo se demuestra la presencia de lactobacilos con potencial probiótico en el pulque.

Del total de aislados, dieciocho fueron seleccionadas por presentar una alta resistencia, evaluada cualitativamente, a las condiciones gastrointestinales *in vitro* (medio a pH=3.5, con 0.3 % de sales biliares). Con éstos se realizó el ensayo de antibiosis posterior y catorce mostraron una mejor actividad antagónica contra los patógenos *Salmonella enterica* serovar Tiphya ATCC 9992, *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *S. enterica* serovar Enteritidis, *Listeria monocytogenes* y *Vibrio cholerae*. Estos lactobacilos fueron identificados por medio del análisis de secuencias del gen ADNr 16S. Los resultados demostraron que trece pertenecían al género/especie *Lactobacillus brevis* y uno de ellos a *L. plantarum* (etiquetado como 2S1.9).

El mejor potencial probiótico fue observado para la cepa 2S1.9 que mostró una mayor inhibición del desarrollo de los patógenos con respecto a los demás aislados y mayor incluso que el observado para la cepa de referencia como control positivo: *L. casei* Shirota®. Así mismo, esta cepa exhibió mejor sobrevivencia (evaluada en términos de UFC/mL), con respecto al control, al medio de simulación del paso gastrointestinal.

2. INTRODUCCIÓN

El pulque es una bebida tradicional mexicana, de naturaleza alcohólica, que se obtiene a partir de la fermentación de la savia de diversas especies de maguey, a la que se le conoce como aguamiel.

Debido a que la producción tradicional del pulque se desarrolla en condiciones no asépticas, en éste se encuentra una gran diversidad microbiana conformada por microorganismos naturalmente asociados al aguamiel durante su acumulación en el maguey, aquellos provenientes de la semilla (inóculo) y los que son incorporados al proceso como resultado de la manipulación por parte del productor. Entre ellos, los reportados con mayor frecuencia como parte de la microbiota del pulque incluyen: levaduras y varias especies de bacterias como *Zymomonas mobilis*, productora de alcohol, bacterias ácido lácticas (BAL) hetero- fermentativas como *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, y homo- fermentativas como *Lactobacillus acidophilus*. En un principio se consideraba a *Saccharomyces* sp., *Z. mobilis* y *L. mesenteroides* como aquellos microorganismos esenciales para la fermentación del pulque; sin embargo, Escalante *et al.* (2008), mostró por medio del análisis de secuencias de ADNr 16S, amplificado del ADN bacteriano total, la abundancia de diversas cepas de lactobacilos, entre ellas: *L. plantarum*, *L. hilgardii*, *L. paracollinoides*, *L. sanfranciscensis* y *L. acidophilus*; ésta última, de acuerdo con este estudio, se determinó como la bacteria más abundante al final de la fermentación.

El pulque se ha consumido en México desde tiempos prehispánicos y desde entonces se le han otorgado, empíricamente, propiedades curativas, principalmente en enfermedades digestivas (Escalante *et al.*, 2012). Actualmente los efectos terapéuticos atribuidos al pulque pueden asociarse a la presencia de BAL homo- y hetero- fermentativas. Algunas especies que pertenecen a este grupo se encuentran comúnmente en el tracto gastrointestinal en humanos y en la mayoría de los animales y actualmente son ampliamente usadas como probióticos (Tumologlu *et al.*, 2013), los cuales se definen, de acuerdo con la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS), como microorganismos vivos que administrados en las cantidades adecuadas

confieren un efecto benéfico al hospedero. Algunos de los efectos benéficos que han sido atribuidos incluyen: actividad antimicrobiana, mejoramiento del metabolismo de la lactosa, reducción del colesterol, propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas, estimulación del sistema inmune y prevención de infecciones gastrointestinales. Por lo anterior, entre otros beneficios que han sido sustentados científicamente y que ofrecen a los consumidores, los probióticos han adquirido relevancia en el mercado de los alimentos funcionales en los últimos años (Soccol *et al.*, 2012; Saad *et al.*, 2013).

En México, el consumo de probióticos se encuentra limitado a unos cuantos productos que en su mayoría son lácteos. El aislamiento y caracterización de bacterias potencialmente probióticas en el pulque podría representar una alternativa para el hallazgo de cepas probióticas que puedan ser usadas en el desarrollo de productos que no requieran de un lácteo como vehículo y permitiría además tener un conocimiento más amplio de la diversidad de la microbiota presente en la bebida, así como contribuir a explicar las propiedades terapéuticas atribuidas a ésta en la prevención y tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

En el 2010, Campos estudió las posibles propiedades probióticas de las bacterias lácticas involucradas de forma natural en el desarrollo de la fermentación del pulque y demostró con sus resultados la presencia de diversas cepas con potencial probiótico. Posteriormente, una de esas cepas logró relacionarse (92 % de similitud) con *Leuconostoc mesenteroides* (Matus, 2011). Hasta el momento, sin embargo, el aislamiento de especies del género *Lactobacillus* (y por tanto evaluación del potencial probiótico) a partir del pulque no se ha logrado en investigaciones anteriores; a pesar de que, como se mencionó anteriormente, se sabe que se encuentran de manera abundante en la bebida.

La capacidad probiótica de bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*, ampliamente estudiada en otros trabajos, por medio de ensayos *in vitro* e *in vivo*, ha sido demostrada para un gran número de cepas que cumplen con la mayoría de los criterios considerados importantes para ser usadas como probióticos y por ello actualmente son uno de los grupos de microorganismos más utilizados con este fin (Zamudio y Zavaleta, 2003; Argyri *et al.*, 2012).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo consistió en llevar a cabo el aislamiento de lactobacilos y la posterior evaluación preliminar de su potencial probiótico por medio de ensayos *in vitro* de resistencia a un pH bajo y sales biliares y de actividad antimicrobiana, de acuerdo a lo recomendado por la literatura (FAO/OMS, 2001; Monteagudo *et al.* 2012).

3. ANTECEDENTES

3.1 Pulque

3.1.1 Definición y elaboración

El pulque es una bebida alcohólica (4-7° G.L), no destilada, que se produce y consume principalmente en los estados del centro de México: Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Estado de México, Distrito Federal y Querétaro; sin olvidar cierta presencia en Guanajuato, Michoacán, el sur de Jalisco, parte de Veracruz, Guerrero, Coahuila, San Luis Potosí y Oaxaca (Campos, 2010; Aldama *et al.*, 2012).

La obtención del pulque se lleva a cabo a partir de la fermentación del aguamiel, el cual es un líquido azucarado, incoloro, con cierto olor herbáceo y sabor dulce; extraído comúnmente de las especies de maguey: *Agave salmiana*, *A. mapisaga*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. hookeri* y *A. americana* (García-Garibay y López-Munguía, 1993).

La extracción del aguamiel es realizada cuando la planta ha alcanzado la madurez, lo cual sucede en un periodo de seis a quince años dependiendo del clima, la tierra y la humedad (Aldama *et al.*, 2012); el maguey es entonces “capado” o “quebrado” con lo que se elimina el corazón o “meyolote” evitando así el desarrollo de la inflorescencia llamada “quiote” que impide la producción del aguamiel. Esta operación es efectuada, utilizando una herramienta conocida como barreta, a principios de primavera o a fines del otoño y debe efectuarse en un tiempo preciso ya que si se realiza anticipadamente el rendimiento de aguamiel será menor (Monterrubio, 2007).

Concluida la “capazón” la cavidad producida es cubierta con las hojas del maguey y con una piedra para evitar su exposición al ambiente, después de lo cual se deja transcurrir un tiempo de seis a ocho meses en el que las hojas centrales de la planta maduran y se concentra una mayor cantidad de azúcares. Posteriormente se procede a efectuar la “picazón”, procedimiento que consiste en agrandar la cavidad donde se acumulará el aguamiel, formando el “cajete”. Tres o cuatro meses después se inicia la “raspa”, en la que se tallan las paredes

del “cajete” y cuyo objetivo es abrir los vasos para que el aguamiel fluya; lo que sucede al cabo de uno o dos días. La recolección del aguamiel se realiza dos veces al día, por la mañana y por la tarde, utilizando un utensilio conocido como “acocote” (calabaza alargada que es perforada en sus dos extremos). La extremidad más angosta se introduce en el líquido acumulado en el “cajete” y por la otra el “tlachiquero” que es la persona dedicada a las tareas de cuidado del maguey, succiona con la boca para hacer el vacío y provocar la ascensión del líquido; el aguamiel succionado es vertido en castañas, bolsas de cuero de animal o recipientes de plástico para el transporte al tinacal (*tina*: recipiente; *calli*: casa), donde se lleva a cabo la fermentación tradicional (Campos, 2010). En un principio el material de estos recipientes era cuero de res y madera, recientemente se usa también plástico y fibra de vidrio, aunque el pulque producido se considera de menor calidad (Monterrubio, 2007).

La fermentación del pulque empieza, de forma natural, desde el momento en el que el aguamiel es acumulado en el “cajete” y se continúa de forma intencional en los tinacales con la adición de la “semilla” que es una fracción de pulque previamente producido. El inóculo o “semilla” se elabora a partir de una pequeña cantidad de aguamiel (10-15 L), preferentemente con una densidad y sabor adecuados, que es fermentado en una tina de manera espontánea hasta que se detectan notas ácidas y alcohólicas o hasta que se forma en la superficie una capa blanca denominada “zurrón”. El proceso se realiza a temperatura ambiente y dura varias semanas dependiendo de la estación: una semana en verano y de dos a tres semanas en invierno. La producción del pulque es entonces llevada a cabo mezclando la cantidad adecuada del inóculo y de aguamiel fresco, que de acuerdo con una regla empírica debe hacerse con una menor cantidad de inóculo que de aguamiel en la época de calor y una mayor cantidad de inóculo que de aguamiel en época de frío. El proceso de fermentación dura de seis a catorce horas dependiendo de la calidad del aguamiel y de la semilla, el contenido microbiano y las condiciones ambientales; para determinar el momento en el que ha de detenerse este proceso se verifica organolépticamente que se ha alcanzado el adecuado grado de viscosidad y contenido alcohólico (Escalante *et al.*, 2012).

3.1.2 Historia del pulque

Si bien es conocido que desde la época prehispánica el maguey fue una de las primeras plantas cultivadas, existen evidencias de su utilización por los pueblos indígenas desde el siglo VI a. C., las fuentes históricas sobre el origen del pulque difieren entre sí; sin embargo, diversas leyendas apuntan a que el descubrimiento se dio en la civilización Tolteca, en *Tollan*, sitio arqueológico ubicado en lo que actualmente es el municipio de Tula de Allende Hidalgo (Escalante *et al.*, 2012; Aldama *et al.*, 2012).

La leyenda más conocida sobre el origen del pulque es la relacionada a *Mayahuel*, diosa del pulque y de la fertilidad, a la cual se le representó como una mujer de 400 pechos que emergía de un maguey. De acuerdo con la leyenda, de *Mayahuel* se originó la planta y es ésta diosa quién descubrió el aguamiel, más tarde *Pachtécatl* o *Pantécatl*, uno de los 400 dioses de los borrachos, descubrió el proceso de fermentación y *Tepoztécatl*, *Cuatlapanqui*, *Tilhua* y *Papaztac* lo perfeccionaron (Monterrubio, 2007).

La palabra “pulque” se deriva probablemente de la palabra náhuatl *poliuhqui*, que significa descompuesto, por tanto es éste un término mal empleado y adaptado al castellano para la denominación de la bebida. El nombre original en esta lengua es *octli* que significa vino, y algunas variantes son *neutli* (aguamiel), *iztacoctli* (pulque blanco), *octipoliuhqui* (pulque descompuesto), *teoctli* (vino divino) y *tlalocctli* que significa vino de la tierra (Aldama *et al.*, 2012).

En la época prehispánica el pulque era concebido como una bebida sagrada, su consumo estaba limitado y era casi exclusivo de sacerdotes y guerreros aunque por sus reconocidos beneficios nutricionales y propiedades curativas se permitía también a los niños, a los ancianos y a las mujeres durante el embarazo o la lactancia para incrementar la producción de leche.

El periodo colonial cambió rotundamente la concepción social del pulque, pasando de ser una bebida mística y religiosa a una bebida popular, y a pesar del desacuerdo por parte de la Iglesia católica que manifestó su repudio hacia la bebida bajo el argumento de que la embriaguez atentaba contra los valores cristianos e impedía que los fieles acudieran a las celebraciones religiosas, el consumo fue incrementándose, lo que llevó a que en 1652 se estableciera el

primer impuesto al pulque introducido a la capital y más tarde se permitiera la instalación de pequeños puestos para la distribución y consumo de la bebida, actividades que prosperaron con el posterior desarrollo de las haciendas pulqueras a finales del siglo XVIII; de esta forma la comercialización del pulque llegó a convertirse en una de las actividades económicas más importantes en la Nueva España. Durante la época independentista, la producción de pulque se vio disminuida y las medidas de seguridad contra las pulquerías aumentaron por el temor a que se convirtieran en centros de reunión política y propagación de ideas liberales, a pesar de lo cual no fueron prohibidas debido a que el pulque producía importantes ingresos a la Real Hacienda y a los hacendados. Posteriormente a la guerra de Independencia el consumo de pulque siguió aumentando dado el rápido crecimiento poblacional, y con la instauración de la República en 1854 comenzó una nueva proliferación de la bebida en los barrios bajos, al ordenarse el traslado de las pulquerías a la periferia con el intento de erradicar los “vicios nacionales”, situación que el gobierno no logró controlar. Sin embargo, en este tiempo el alcance de la distribución del pulque era muy corto debido a su rápida fermentación por lo que fue hasta 1867, con la introducción del ferrocarril, que los empresarios pulqueros vieron la oportunidad de contar con un medio rápido y efectivo para la distribución y el pulque comenzó a transportarse de esta forma. En este contexto, que corresponde a la época del Porfiriato, la industria pulquera alcanzó su mayor apogeo con una producción anual de 500 millones de litros, obtenidos de alrededor de 140 millones de plantas de maguey (Escalante *et al.*, 2012). Los grandes beneficios económicos recibidos por la expansión del negocio permitieron a los empresarios invertir en la generación de sociedades para organizar la producción y distribución del pulque; tal fue el caso de la creación de la “Compañía expendedora de Pulque” en 1909 (Aldama *et al.*, 2012).

En 1910, con el movimiento revolucionario, la industria pulquera se vio afectada. La inestabilidad social junto con el impulso de la cerveza y las campañas que habían sido gestadas en su contra, en las que se asociaba al pulque con la miseria y la degradación, tuvieron un impacto negativo en esta agroindustria. Para 1914, con la Reforma Agraria, se inició el fraccionamiento de los campos de cultivo y en 1917 con la promulgación de una nueva Constitución que

promovió la redistribución de la tierra se disminuyó drásticamente la producción. Más tarde, durante el Cardenismo, se promovieron diversas campañas antialcoholismo, particularmente contra el pulque pues por la falta de control en el proceso se consideraba antihigiénico y se produjeron reclamos en contra de las adulteraciones realizadas a la bebida; lo anterior explica el nulo apoyo que tuvo la industria pulquera en esta época. Durante el gobierno sucesor, el sexenio de Miguel Ávila Camacho, se reordenó y otorgó licencia para la comercialización del pulque en la ciudad, lo que generó la necesidad de contar con un Sindicato de Trabajadores de Expendios de Pulque y otras organizaciones creadas fueron el “Sindicato Revolucionario de Expendedores del Pulque del DF” y el “Sindicato Único de Barrileros y Maniobristas de la Industria del Pulque en el Distrito Federal”.

En las décadas siguientes, a pesar de las campañas realizadas en defensa del pulque por los comerciantes de este ramo, el mercado de la bebida se vio seriamente afectado tras la serie de políticas opuestas a su consumo emanadas desde el gobierno local y federal, así como por la disminución en la demanda de los consumidores que bajo una influencia cultural del “estilo de vida americano” despreciaron un producto tradicional frente a un producto industrializado, la cerveza (Aldama *et al.*, 2012).

A finales del siglo pasado e inicios del siglo en curso la disminución en la producción del pulque se vio reflejada, de acuerdo con un censo agronómico de 1998-2002, en la reducción de la superficie destinada a la plantación del agave pulquero. La situación poco favorable de la industria del pulque era entonces consecuencia también de la pérdida de plantación de agave y la falta de tecnología adecuada para su producción (Escalante *et al.*, 2012).

Actualmente, salvo por algunas pulquerías de la Ciudad de México, el pulque es consumido principalmente en zonas rurales del país como parte de la dieta diaria y parte de las festividades; también es común que la producción se lleve a cabo con la finalidad de consumo personal por parte de los dueños de plantaciones. Por otro lado, se realizan esfuerzos importantes para evitar su desaparición, entre ellas se encuentran la promoción de la bebida en restaurantes mexicanos y festividades gastronómicas, así como la recuperación de las pulquerías tradicionales. A pesar de ello, la producción del pulque, se mantiene

predominantemente a pequeña escala y de forma artesanal (Escalante *et al.*, 2012); por tanto, no se cuenta con datos exactos acerca de la magnitud de la misma. Sin embargo, la Secretaría de la Agricultura estima que en Tlaxcala hay una superficie sembrada con maguey pulquero de 668 hectáreas, las cuales cuentan con alrededor de un millón, 336 mil plantas; y de acuerdo con datos del INEGI, en el 2005 en el estado de Hidalgo, existía una superficie sembrada de magueyes pulqueros de 5 mil 731 hectáreas (Durán, 2011).

3.2 Microbiología

3.2.1 Microbiota del pulque

El pulque, al ser producido tradicionalmente en condiciones no asépticas, contiene una gran diversidad microbiana conformada por microorganismos naturalmente asociados al aguamiel durante su acumulación en el maguey, entre los que pueden encontrarse los presentes en las paredes del *cajete*, el polvo y los que son incorporados por parte de insectos como *Drosophila* spp.; aquéllos provenientes de la *semilla* y los que son añadidos al proceso como resultado de la recolección, transporte y manipulación por parte del productor.

La microbiota presente en esta bebida ha sido analizada por diversos estudios a partir de los cuales, en un principio, se propuso a *Lactobacillus* spp., *L. mesenteroides*, *Z. mobilis* y *S. cerevisiae* como los microorganismos principales de la fermentación del pulque. Posteriormente, Escalante *et al.* (2004; 2008) y Lappe-Oliveras *et al.* (2008), demuestran la complejidad de la diversidad microbiana, integrada por bacterias y levaduras, presente en el aguamiel y el pulque. Los microorganismos hallados en estos últimos estudios se mencionan, agrupados de acuerdo a su taxonomía, a continuación:

1. Firmicutes:

- Bacillales: *Bacillus* sp. , *B. lichenformis*
- Lactobacillales: *Lactobacillus* cepa ASF360, *L. spp* AC07, *L. spp* Y10, *L. acidophilus*, *L. kefir*, *L. acetotolerans*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*, *L. paracollinoides*, *L. sanfranciscencis*, *Lactococcus* spp., *L. lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc kimchii*, *L. citreum*, *L. gasicomitatum*, *L.*

mesenteroides, *L. pseudomesenteroides*, *Pediococcus urinaeequi*,
Streptococcus devriesei.

2. Subdivisión alfa Proteobacteria:

- Rhodospiriales: *Acetobacterium malorum*, *Acetobacter pomorium*,
Acetobacter orientales.
- Sphingomonadales: *Z. mobilis* subsp. *pomaceae*

3. Subdivisión gama Protobacteria:

- Enterobacteriales: *Citrobacter* spp., *Enterobacter agglomerans*, *E. spp.*,
Erwinia rhapontici, *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cochleae*, *Providencia* spp.,
Serratia grimensii
- Pseudomonadales: *Acinetobacter radioresistens*
- Xanthomonadales: *Sterotrophomonas* spp.

4. Flavobacterias: *Chryseobacterium* spp.

5. Eucariotas: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *Candida* spp., *C. parapsilosis*, *Clavispora lusitania*

Los microorganismos mencionados arriba se encuentran diferencialmente distribuidos dependiendo la etapa de fermentación y otro de los aspectos que tiene influencia es la región de la cual proviene la bebida. En el estudio realizado por Escalante *et al.* (2004), en el que se analizó la diversidad bacteriana de tres muestras de distintas localidades de los estados de: México, Morelos e Hidalgo, se encontró la presencia de especies comunes independientemente de la región geográfica, entre ellas diversas bacterias pertenecientes al grupo de BAL como *Lactobacillus* spp., *L. acidophilus* y *L. mesenteroides*. Sin embargo, también se reportó en este trabajo la presencia de bacterias distribuidas de manera distinta en las tres muestras como la bacteria *Z. mobilis* presente únicamente en las muestras de Hidalgo y Morelos; la bacteria *L. hilgardii* en la muestra de Morelos y *L. plantarum* en la muestra de Hidalgo.

Al momento de definir las especies que son esenciales para el desarrollo de la fermentación es importante considerar a todas aquéllas que conforman la microbiota, su proporción, sus propiedades, así como la interacción que tienen entre ellos. Hasta el momento se ha propuesto el papel que desarrollan algunos en la serie de procesos fermentativos que se llevan a cabo y caracterizan al pulque: una fermentación alcohólica, una fermentación ácida y una fermentación viscosa. En la fermentación alcohólica, definida por la producción de etanol se reconoce el papel que desarrollan el grupo de levaduras presentes del género *Saccharomyces* y la α -Proteobacteria *Z. mobilis*. En la fermentación ácida, definida por la producción de ácido láctico y acético participan, entre otras, *L. mesenteroides*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. acetotolerans*, *L. hilgardii* y *L. kefir*; mientras que la fermentación viscosa, en la que se producen polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa, es atribuida a bacterias lácticas del género *Leuconostoc*, principalmente a *L. mesenteroides*.

Así mismo, se ha propuesto el papel de las bacterias: *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* y *Citrobacter* spp. en el desarrollo de las características sensoriales del pulque y el posible impacto en el sabor por la presencia de las bacterias *L. hilgardii* y *L. kefir* que además de producir ácido láctico, etanol y dióxido de carbono como productos mayoritarios también producen diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol. Por otro lado, se propone que las especies homofermentativas de lactobacilos probablemente desempeñan un papel importante durante el proceso de fermentación debido a la abundancia de estas bacterias en la bebida. Entre ellas se encuentran especies de *Lactobacillus* spp. y relacionadas a *L. acidophilus* que de acuerdo con los estudios anteriormente mencionados, es la bacteria más abundante al final de la fermentación, encontrándose en un porcentaje de alrededor del 88% del total de los microorganismos detectados por medio del análisis de secuencias del ADNr 16S, amplificado del ADN bacteriano total (Escalante *et al.*, 2004; 2008).

3.2.2 Bacterias Ácido Lácticas

Las BAL, pertenecientes al Phylum Firmicutes, conforman un grupo diverso de microorganismos que tienen en común la producción de ácido láctico como metabolito mayoritario en la fermentación de azúcares. Son bacterias Gram-positivas con requisitos nutricionales complejos en cuanto a carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y minerales; algunas requieren además algunos factores especiales de crecimiento como jugo de tomate, trigo, etc.

Con base en la vía de utilización de la glucosa, las BAL se dividen en dos grupos fermentativos: homo- y heterofermentativos. Las BAL homofermentativas utilizan la vía Embden-Meyerhof-Parnas (glucólisis) y las BAL heterofermentativas usan la vía de la fosfoctolasa. La vía glucolítica es usada por miembros de la familias *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae* y *Streptococcaceae* y en ésta, la glucosa es convertida a ácido láctico en una proporción de 2 moléculas de ácido láctico por molécula de glucosa consumida, de aquí la definición de fermentación homoláctica. En cambio, por medio de la vía de la fosfoctolasa, utilizada por miembros de la familia *Leuconostocaceae*, se producen cantidades significativas de otros productos terminales además del ácido láctico, en teoría una molécula de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono por molécula de glucosa consumida. En cuanto a la ganancia de ATP, en la fermentación homoláctica se producen dos moléculas a partir de una molécula de glucosa y en la heteroláctica la ganancia neta es de una molécula por molécula de glucosa consumida (Endo y Dicks, 2014).

Las BAL presentan en la actualidad un inmenso potencial biotecnológico, están involucradas de forma predominante en diversos procesos de fermentación (industriales y artesanales, de productos vegetales, cárnicos y lácteos) y son habitantes naturales del tracto gastrointestinal, se piensa que colonizan de forma dominante el intestino delgado (Jensen *et al.*, 2012). Lo anterior está relacionado con el hecho de que la mayor parte de las bacterias utilizadas como probióticos actualmente son BAL y entre éstas, los lactobacilos representan uno de los grupos microbianos fundamentales (Argyri *et al.*, 2013).

3.2.2.1 Lactobacilos

Los lactobacilos se encuentran distribuidos en diversos nichos ecológicos; entre ellos se puede mencionar su presencia en el tracto genital y gastrointestinal de humanos y algunos animales, constituyendo una parte importante de la microbiota asociada naturalmente a los mismos.

Estos microorganismos se caracterizan por ser bacilos que varían de largos y delgados a cortos y doblados, con frecuencia se observan también cocobacilos corineformes; la formación de cadenas es común. Son Gram-positivos, no formadores de esporas y generalmente no presentan movilidad, cuando se observa es por medio de flagelos peritricos. Son aerotolerantes, por lo que el desarrollo requiere baja tensión de oxígeno y las condiciones aeróbicas estrictas generalmente lo inhiben, en cambio se ve mejorado con un bajo porcentaje de CO₂ (5-10 %). Tienen además requerimientos de crecimiento complejos, entre ellos, carbohidratos fermentables, proteínas y sus productos de degradación, vitaminas del complejo B, derivados de ácidos nucleicos, ácidos grasos no saturados y algunos minerales tales como magnesio, manganeso y hierro (Gomes y Malcata, 1999). El crecimiento se da en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6.4-4.5 y con un óptimo desarrollo entre 5.5 y 6.2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4,0 hasta 3.6. Además, estos microorganismos comúnmente no reducen nitratos, no licúan la gelatina y son catalasa-negativos.

Estas bacterias raramente se asocian a casos de infecciones y más allá de eso las especies del género *Lactobacillus* han sido utilizadas por siglos para la producción de alimentos fermentados y actualmente también con fines tecnológicos por su reputación como promotores de la salud, especialmente para el tracto gastrointestinal. Los efectos benéficos más ampliamente reportados en cuanto a este aspecto incluyen: estimulación del sistema inmune, prevención y reducción de la intensidad y duración de diarrea, así como disminución de la intolerancia a la lactosa (Turpin *et al.*, 2010).

3.3 Probióticos

3.3.1 Microorganismos probióticos

La definición de probiótico (griego: *pro*: a favor de; *biótico*: vida), ha ido evolucionando al paso de los años. Se utilizó por primera vez el término probiótico por Lilly y Stillwell (1965), refiriéndose a “sustancia que estimula el crecimiento de otros microorganismos”; este término se redefinió posteriormente como “agente microbiano viable que al utilizarse en animales o en el hombre aporta efectos benéficos en el huésped mejorando el balance de la microbiota intestinal” (Salminen *et al.*, 1998). Fue en el 2002 cuando el informe conjunto de la FAO/OMS definió el término probiótico como “microorganismo vivo que ingerido en las cantidades adecuadas confiere un efecto benéfico a la salud del huésped”; definición más aceptada hasta la actualidad.

Como se mencionó anteriormente, los microorganismos probióticos más comúnmente usados pertenecen al grupo heterogéneo de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, etc.) y al género *Bifidobacterium* (Holzapfel *et al.*, 2001). El género *Lactobacillus*, uno de los grupos microbianos fundamentales que son usados como probióticos, contiene en esa categoría especies como *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri* y *L. plantarum*, cuyos efectos probióticos han sido estudiados *in vitro* e *in vivo* (Zamudio y Zavaleta, 2003). Otros menos comúnmente usados son cepas de: *Streptococcus*, *E. coli*, *Bacillus* y *Saccharomyces* (Saad, *et al.*, 2013).

En la Tabla 1 se presenta un resumen de las cepas más conocidas y utilizadas pertenecientes a los grupos mencionados. Los productos que contienen dichos microorganismos entran en la categoría de alimentos funcionales, que se describen como aquéllos que tienen un efecto positivo en la salud; término usado por primera vez en Japón en la década de los ochentas para productos alimenticios fortificados con constituyentes especiales que ocasionaran un efecto fisiológico ventajoso (Saad *et al.*, 2013).

Tabla 1. Microorganismos comúnmente usados como probióticos (Saad et al., 2013, Tripathi y Giri, 2014).

Lactobacillus	Bifidobacterium	Otras bacterias ácido lácticas	Otros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>E. faecalis</i>	Nissle
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconstoc</i>	<i>S. boulardii</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>mesenteroides</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>thermophilis</i>	
<i>L. johnsonii</i>		<i>S. diacetylactis</i>	
<i>L. paracasei</i>		<i>S. intermedius</i>	
<i>L. plantarum</i>		<i>S. cremoris</i>	
<i>L. reuteri</i>		<i>S. salivaris</i>	
<i>L. rhamnosus</i>			
<i>L. cellobiosus</i>			
<i>L. lactis</i>			
<i>L. brevis</i>			

3.3.2 Beneficios asociados al consumo de probióticos

El consumo de probióticos confiere un gran número de efectos benéficos en la salud del hospedero, entre ellos: balance de la microbiota intestinal, disminución del riesgo de padecer enfermedades gastrointestinales y mitigación de diarrea causada por bacterias, antibióticos o virus, mejora de la digestión de la lactosa, incremento de la biodisponibilidad de los nutrientes, reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer de colon, hígado y mama; disminución de la prevalencia de alergias en individuos susceptibles y de los síntomas del síndrome del intestino irritable, colitis, hepatopatía alcohólica y constipación. Otros de los beneficios incluyen la erradicación de infección por *Helicobacter pylori*, efectos de inmunomodulación, antimutagénicos y antipertensivos (Argyri et al., 2012). Por lo anterior, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado explotar el potencial terapéutico de los microorganismos probióticos (Alvarado y Díaz, 2009); sin embargo es importante considerar que aunque la mayoría de los efectos benéficos asociados al consumo de estos microorganismos han sido establecidos como un resultado de estudios clínicos otros se han establecido basándose en ensayos *in vitro* que requieren la interpolación a estudios *in vivo* con el objetivo de ser validados.

En la Tabla 2 se presentan algunos de los efectos benéficos demostrados para ciertas cepas probióticas.

Tabla 2. Efectos benéficos demostrados para ciertas cepas probióticas (Mombelli y Gismondo, 2000, Saad et al., 2013).

Microorganismo probiótico	Beneficio a la salud del hospedero
<i>L. plantarum</i> 299v	Mitigación del síndrome de intestino irritable Reducción del colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad) Disminución de diarrea causada por <i>Clostridium difficile</i>
<i>L. casei</i> Shirota	Disminución de los síntomas causados por la enfermedad inflamatoria intestinal mediante la regulación de la producción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-6 e IFN- γ
<i>L. acidophilus</i> La5	Disminución de diarrea causada por antibióticos y rotavirus
<i>L. salivarius</i> UCC118	Disminución de los síntomas causados por la enfermedad inflamatoria intestinal
<i>L. reuteri</i> DSM 12246	Modulación de la microbiota intestinal Disminución de la diarrea causada por rotavirus
<i>L. johnsonii</i> <i>Bifidobacterium breve</i>	Disminución del colesterol en sangre Activación y modulación del sistema inmune Reducción de síntomas causados por el síndrome de intestino irritable
<i>B. animalis</i> <i>B. longum</i> BB536 <i>B. lactis</i> Bb12	Incremento de la secreción de IgA Tratamiento de alergias Reducción de la frecuencia de diarrea causada por rotavirus y diarrea del viajero Efecto inhibitorio contra <i>H. pylori</i>
<i>B. infantis</i> 35624	Disminución de los síntomas causados por el síndrome de intestino irritable
<i>E. coli</i> Nissle 1917	Inmunomodulación Recuperación en la colitis ulcerativa Inhibición de <i>E.coli</i> patogénica
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Reducción de diarrea asociada al consumo de antibióticos Prevención de diarrea causada por <i>C. difficile</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Mejora en la digestión de la lactosa Prevención de diarrea causada por rotavirus
<i>Enterococcus faecium</i> M-74	Reducción del colesterol en sangre y prevención de enfermedades cardiovasculares

3.3.3 Mecanismos de acción de los probióticos

Los mecanismos por los cuales los probióticos ejercen su efecto benéfico en el hospedero se pueden dividir en tres categorías (Monteagudo *et al.*, 2012; Saad *et al.*, 2013):

- 1) Modulación de la microbiota intestinal, inhibición de patógenos. Mediante la competencia por nutrientes limitados, producción de sustancias antimicrobianas o la acidificación del medio.
- 2) Mejora de la función de la barrera intestinal. Los probióticos evitan la translocación de bacterias patógenas a través de la pared intestinal mediante la inhibición de adherencia e invasión.
- 3) Modulación de la respuesta inmune. Inmunoestimulación o regulación de procesos inflamatorios.

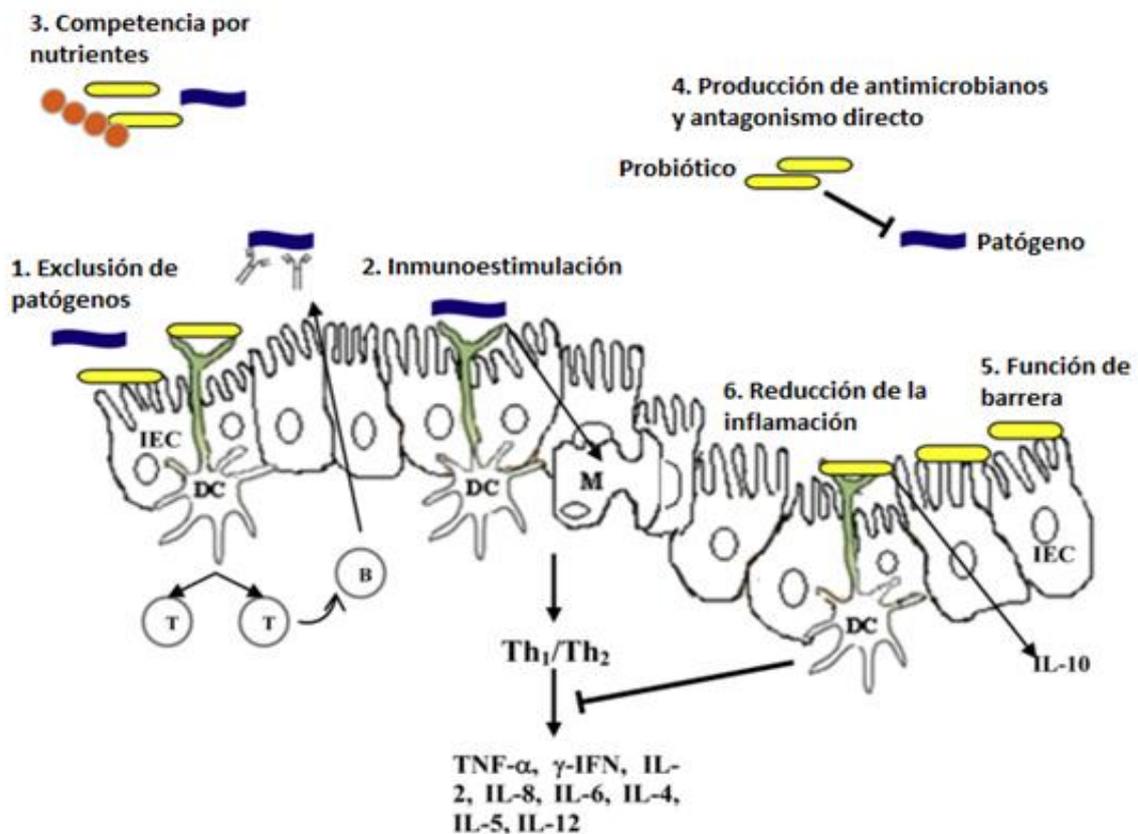


Figura 1. Mecanismos utilizados por los probióticos para ejercer un efecto benéfico en el hospedero. 1) Exclusión de patógenos, 2) Estimulación de la respuesta inmune innata, 3) Competencia por nutrientes y productos de la fermentación de prebióticos, 4) Producción de sustancias antimicrobianas y antagonismo de patógenos, 5) Protección de la integridad de barrera intestinal y 6) Regulación de citoquinas anti-inflamatorias e inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias. IEC: Células epiteliales del intestino, DC: Células dendríticas, IL: interleucinas, M: células M (Saad *et al.*, 2013).

La eficacia de los mecanismos anteriores, desglosados en las siguientes secciones e ilustrados en la Figura 1, con frecuencia depende de la interacción con la microbiota específica del hospedero o con las células inmunocompetentes de la mucosa intestinal.

3.3.1 Modulaci3n de la microbiota intestinal e inhibici3n de pat3genos

Se han propuesto diversos mecanismos por los cuales los probi3ticos ejercen el efecto antibacteriano, entre ellos se encuentran los siguientes:

- Competencia por nutrientes limitados.
- Producci3n de sustancias antimicrobianas

Incluye la producci3n de 3cidos org3nicos como 3cido ac3tico y l3ctico, la producci3n de per3xido de hidrogeno y bacteriocinas.

- ✓ 3cido l3ctico. La mayor3a de los probi3ticos son productores, 3ste inhibe el crecimiento de bacterias sensibles a condiciones 3cidas y penetra en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas lo que potencia el efecto de otras sustancias antimicrobianas (Servin y Coconnier, 2003).
- ✓ Bacteriocinas. Diversas bacterias 3cido l3cticas producen p3ptidos antimicrobianos conocidos como bacteriocinas que eliminan las bacterias susceptibles por medio de la permeabilizaci3n de membrana o de la interferencia con enzimas esenciales, las bacterias Gram-negativas son insensibles; sin embargo, han mostrado ejercer amplio espectro contra bacterias Gram-positivas, entre ellas se encuentran la lactacina B producida por *L.acidophilus*, la plantaricina producida por *L. plantarum* y la nisina producida por *Lactococcus lactis* (Wohlgemuth *et al.*, 2010).
- Inducci3n de la producci3n de defensinas.

Las defensinas son p3ptidos antimicrobianos sintetizados por las c3lulas de Paneth para evitar la adherencia e invasi3n de bacterias; recientemente se ha observado su inducci3n por probi3ticos como *Escherichia coli* Nissle 1917 (Schlee *et al.*, 2007).

3.3.3.2 Mejora de la función de barrera intestinal

- Inhibición de la adherencia de microorganismos patógenos a la mucosa intestinal.

Existe un gran número de reportes que indican que los probióticos son capaces de inhibir la adherencia de patógenos a través de la habilidad de incrementar la producción de mucinas.

- Inhibición de la invasión epitelial por patógenos.

A pesar de que la adhesión de bacterias a las células epiteliales del intestino nunca ha sido mostrada *in vivo*, se ha observado que los probióticos pueden competir con las bacterias patógenas por sitios de unión en el epitelio y de esta forma prevenir la colonización por especies como *Bacteroides vulgatus*, *Clostridium histolyticum*, *C. difficile*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* serovar Choleraesuis, *Staphylococcus aureus* y ciertas cepas de *E. coli*. La exclusión competitiva basada en la unión al mismo receptor glicoconjugado en la superficie epitelial es uno de los mecanismos por medio del cual se explican estas observaciones (Servin y Coconnier, 2003; Wohlgemuth *et al.*, 2010).

3.3.3.3 Modulación de la respuesta inmune

- Inmunoestimulación

Los probióticos pueden estimular la respuesta inmune innata o adaptativa mediante diversos mecanismos como la unión a receptores expresados en la superficie de las células epiteliales del intestino, lo que desencadena una serie de procesos inmunológicos de defensa, o por medio del transporte transepitelial en enterocitos y células M o por la interacción con las células dendríticas en la *lamina* propia que pueden extenderse a través de las uniones estrechas del epitelio y procesar directamente el probiótico en el lumen intestinal.

Con respecto a la inmunidad innata, los probióticos pueden mejorar algunas funciones como la actividad fagocítica de neutrófilos y la actividad citotóxica de células Natural Killers (NK), así como incrementar la secreción de IL-10 (citocina con propiedades anti-inflamatorias) por los macrófagos, a través de receptores fagocíticos de superficie como los receptores tipo Toll (TLR's).

En relación a la estimulación de la inmunidad adaptativa, las bacterias probióticas tienen la capacidad de estimular la secreción de IgAs por las células

B y de activar los linfocitos T colaboradores y macrófagos por medio de la estimulación en la producción de citoquinas, las cuales son moléculas que participan en la comunicación entre linfocitos, macrófagos y otras células involucradas en la respuesta inmune y reacciones inflamatorias (Kotzampassi y Giamarellos-Bourboulis, 2012).

- Regulación de la inflamación

La interacción directa con células del sistema inmune como macrófagos, a través de TLR's, y células dendríticas, regula la producción y expresión de citoquinas pro y anti-inflamatorias. Se ha observado que en el uso de microorganismos probióticos para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales se presenta la regulación de la producción de IL-6 e IL-2, remoción de citoquinas proinflamatorias IL-8 e IL-12 y el incremento, como se mencionó anteriormente de la IL-10. Así mismo se ha observado que algunos probióticos son capaces de inhibir la respuesta inflamatoria a través de la inhibición de la activación del Factor nuclear kappa B, conocido como NF-kB (Aureli *et al.*, 2011).

3.3.4 Criterios para la selección de microorganismos potencialmente probióticos

Idealmente los microorganismos considerados como probióticos deben presentar ciertas características que les permitan ejercer beneficios comprobables a la salud, así mismo deben poseer propiedades para su uso tecnológico, entre ellas: mantener la viabilidad en los productos donde se incorporen, durante el procesamiento y venta al consumidor, atendiendo a la importancia de mostrar un buen crecimiento en el tracto gastrointestinal. Se requiere que los alimentos probióticos contengan una cantidad adecuada de microorganismos viables, al menos 10^6 - 10^7 UFC/mL (Argyri *et al.*, 2013).

En los últimos años, debido al auge del consumo de probióticos, comenzaron a incorporarse rápidamente nuevos productos al mercado sin una normativa previamente aceptada, es decir, en ausencia de un consenso internacional sobre la metodología para evaluar la eficacia y la inocuidad de estos productos; por esa razón, la FAO en conjunto con la OMS, publicaron en mayo de 2002 una guía para la evaluación sistemática de probióticos en alimentos tomando en

cuenta los requisitos que deben cubrir para ser considerados como tal; dicha guía incluye los siguientes aspectos:

- Identificación del género, especie y cepa probiótica ya que las características de cada probiótico son específicos de la cepa.
- Pruebas *in vitro* para la selección de probióticos de uso humano, donde se incluyen ensayos de:
 - 1) Resistencia a acidez gástrica y sales biliares pues los microorganismos probióticos deben sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal, para lo cual requieren sistemas de protección.
 - 2) Adherencia al mucus intestinal ya que este aspecto les permite colonizar esta superficie y como consecuencia producir el efecto de inmunomodulación y la prevención de la adherencia de microorganismos patógenos por exclusión competitiva.
 - 3) Actividad antagónica contra patógenos.
- Inocuidad de los probióticos, donde se incluyen estudios *in vivo* utilizando animales y humanos y evaluación de resistencia a antimicrobianos.

3.3.5 Consumo de probióticos

A lo largo de la historia los microorganismos han sido usados para producir y preservar alimentos. Culturas ancestrales como los babilonios, egipcios y griegos percibieron los beneficios del proceso de fermentación y asociaron ciertos productos a la salud humana; tales como kéfir, kimchi, tofu, natto, tempeh, salsa de soya, quesos madurados, etc. (Soccol *et al.*, 2012).

En los últimos años, de la mano del incipiente interés en el consumo de alimentos que contienen microorganismos beneficiosos para la salud, ha ido creciendo la visión comercial de explotar sus atributos, lo que ha contribuido significativamente en la expansión de este sector del mercado (Rodríguez, 2009). Este tipo de productos entre el grupo de alimentos funcionales, es económicamente relevante y representa una gran parte de las ventas mundiales. El mercado global de probióticos era de 15.9 billones de dólares en el 2008 y se esperaba que alcanzase 19.6 billones para el 2013 (Soccol *et al.*, 2012).

Así mismo se ha incrementado la disponibilidad de probióticos en una gran variedad de productos comerciales: lácteos, alimentos para niños y bebés,

zumos, cereales, productos farmacéuticos (tabletas y/o capsulas) y alimentos para animales. Actualmente, uno de los mercados más prometedores consiste en la incorporación de cepas probióticas en matrices no lácteas ya que estas no contienen alérgenos, como la lactosa, ni la alta proporción de colesterol (Peres *et al.*, 2014).

3.3.6 Probióticos en alimentos fermentados tradicionales

Los alimentos fermentados tradicionales son una vasta fuente de microorganismos, entre los cuales, algunos de ellos han mostrado características de probióticos (Argyri *et al.*, 2013). Como parte de estos alimentos, las bebidas fermentadas juegan un papel importante en la dieta humana alrededor del mundo y existe una gran diversidad de las mismas con características probióticas presuntivas (Soccol *et al.*, 2012). En la Tabla 3 se presentan algunas:

Tabla 3. Bebidas tradicionales fermentadas que contienen microorganismos con potencial probiótico (Modificada de Soccol et al., 2012).

Producto tradicional	Origen	Microorganismos	Sustratos
Boza	Región Balcánica	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , levaduras	Cereales (trigo, centeno, mijo)
Hardaliye	Turquía	<i>Lactobacillus</i> , levaduras	Uva roja, semillas de mostaza
Kombucha	Asia	<i>Acetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Lactobacillus</i> , levaduras	Té negro o verde
Mahewu	África	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i>	Harina de maíz
Togwa	África	Bacterias ácido lácticas y levaduras	Cereales (maíz, mijo)
Pozol	México	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , levaduras	Cacao y maíz
Pulque	México	<i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Zymomonas</i> , levaduras	Aguamiel (savia de maguey)

3.3.7 Microorganismos probióticos en el pulque

En el estudio de las bacterias ácido lácticas presentes como parte de la fermentación del pulque, se sugiere la presencia de cepas con características para ser consideradas como probióticos.

En el 2010 Campos aisló 13 bacterias, pertenecientes al género *Leuconostoc*, resistentes a condiciones *in vitro* simuladoras del tracto gastrointestinal (pH 3.5 y 0.3% sales biliares) y con capacidad antagónica contra las bacterias patógenas *E. coli* EPEC, *L. monocytogenes*, *S. enterica* serovar Typhi y *S. enterica* serovar Typhimurium. Posteriormente, Matus (2011) trabajó con los 13 aislados de Campos (2010) y seleccionó de entre los mismos la cepa P45, que fue identificada como *L. mesenteroides* (92 % de similitud) y que presentó las mejores características probióticas, para el estudio *in vivo* de la actividad contra infección por *S. enterica* serovar Typhimurium st^f. En este ensayo administró oralmente, por siete días, la cepa P45 a 18 ratones BALB/c de ocho semanas, tras lo cual encontró una disminución de uno o dos ciclos logarítmicos en la infección en hígado y bazo.

Matus (2011) determinó además la actividad inhibitoria del sobrenadante de la cepa en el desarrollo de los 4 patógenos a su vez utilizados por Campos (2010), mencionados anteriormente; y sugirió que la actividad antimicrobiana de la cepa era posiblemente debida a la producción de un péptido.

Cerón (2014), a partir de la secuencia del genoma de la P45, detectó la presencia de genes que codifican para una prebacteriocina, una lisozima (1,4- β -N-acetylmuramidasa) y una peptidoglicano amidasa (N-acetylmuramoyl-L-alanina amidasa; murein_hidrolasa); y corroboró también la actividad antimicrobiana del sobrenadante de la cepa. A partir de una fracción purificada de este sobrenadante determinó, con el uso de zimogramas, que la inhibición observada era debida a péptidos con un tamaño (determinado por electroforesis en gel SDS-PAGE) de 10 kDa, peso que corresponde a la bacteriocina que fue identificada en la secuencia del genoma de la cepa. Por otro lado, llevó a cabo la evaluación de la adhesión celular *in vitro* de la cepa a las líneas celulares Caco-2, Hep-2, HeLa y HT-29; observando una adherencia moderada a las dos primeras líneas.

4. JUSTIFICACIÓN

El aislamiento de lactobacilos a partir del pulque, una de las bebidas mexicanas fermentadas de mayor tradición, no había sido logrado en investigaciones realizadas anteriormente y constituye una aproximación más en el camino a comprender el mecanismo de fermentación desarrollado en la misma; así como en el entendimiento del papel que juegan estos microorganismos con respecto a los beneficios atribuidos a la bebida para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales; las cuales desafortunadamente en nuestro país tienen una alta incidencia.

Desde esta perspectiva, el presente trabajo tiene relevancia por tanto, en la búsqueda de nuevas alternativas de microorganismos probióticos que por la fuente de su aislamiento podrían ser útiles para incorporarse en matrices no lácteas para su consumo.

Por otro lado, el conocimiento más a fondo de esta bebida puede ayudar a eliminar los mitos que históricamente han sido generados en torno a su consumo con la finalidad de desprestigiarla.

5. HIPÓTESIS

Considerando que en el pulque se ha demostrado la abundancia de especies del género *Lactobacillus* y que se han encontrado bacterias ácido lácticas con ciertas características probióticas; las cepas de lactobacilos que se logren aislar en este trabajo podrían mostrar así mismo características que demuestren su potencial probiótico.

6. OBJETIVOS

Objetivo general

- Llevar a cabo el aislamiento de lactobacilos con potencial probiótico a partir de muestras de pulque proveniente de la localidad de Huitzilac Morelos.

Objetivos particulares

- Establecer las bases para el aislamiento de lactobacilos en el pulque mediante el uso de un medio selectivo.
- Conservar a mediano y largo plazo los lactobacilos aislados para futuras investigaciones.
- Realizar la caracterización preliminar del potencial probiótico de los lactobacilos aislados por medio de ensayos *in vitro* para evaluar la resistencia al paso gastrointestinal y la actividad antagónica contra los patógenos: *S. enterica* serovar Tiphya ATCC 9992, *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *S. enterica* serovar Enteritidis, *L. monocytogenes* y *V. cholerae*.
- Identificar las cepas aisladas por medio del análisis de secuencias del gen ADNr 16S y de sistemas miniaturizados para caracterización bioquímica (API® 50 CH).

7. MATERIAL Y METODOLOGIA

7.1 Muestreo y medición de parámetros fisicoquímicos

Las muestras de pulque utilizadas para este estudio se obtuvieron de la población de Huitzilac en el Estado de Morelos, a partir de tres diferentes productores. Se les asignó el nombre de S1, F2 y F3 por las características de la muestra, siendo la primera (S1) un pulque “suave”, es decir, con un menor nivel de fermentación que las muestras de pulque “fuerte” (F2 y F3) que de acuerdo con los productores contenían un grado alcohólico más elevado. Las muestras fueron colocadas en bolsas estériles para su transporte al laboratorio, donde posteriormente a todas se les midió la temperatura y el pH.

7.2 Cuantificación de bacterias ácido-lácticas

Se realizaron por duplicado diluciones decimales seriadas en agua peptonada estéril al 0.1 % p/v hasta 10^{-4} . Se inoculó 0.1 mL por extensión superficial en placa de agar, utilizando el medio selectivo Agar de Man, Rogosa y Sharpe (AMRS) (Difco™) con clindamicina (Sigma-Aldrich) al 0.005 % y ciprofloxacino (Sigma-Aldrich) al 0.2 %, descrito previamente en la ISO 20128:2006 (IDF 192: 2006) para la cuantificación específica de *Lactobacillus acidophilus* en productos lácteos. Las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis utilizando una jarra anaeróbica y sobres generadores de atmosfera rica en CO₂, Gaspak™ EZ (BD), a una temperatura de 28 °C por 48 h; al cabo de este tiempo se contaron las unidades formadoras de colonias que no tuvieran características típicas de levaduras en las placas de la dilución 10^{-4} .

7.3 Selección de cepas por características morfocoloniales y análisis microscópico

A partir de las placas de la dilución 10^{-4} , en las que se obtuvo un número mayor de colonias aisladas, se llevó a cabo la selección de las mismas por sus características morfocoloniales para el análisis microscópico. Al igual que para

la cuantificación de bacterias ácido lácticas se consideró elegir aquellas colonias que no presentaran características típicas de levaduras y que además se observaran planas o convexas, de una coloración blanca a cremosa y un tamaño de 1 a 3 mm de diámetro; éstas se reinocularon por estriado en placas de AMRS con los antibióticos mencionados anteriormente y se incubaron a 37 °C en condiciones de anaerobiosis por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, mediante una tinción simple con cristal-violeta, se realizó la selección de bacterias con forma bacilar.

7.4 Purificación, tinción de Gram y prueba de la catalasa

La purificación de cepas se llevó a cabo en placas de AMRS incubando nuevamente por 24 horas, a 37 °C y en condiciones de anaerobiosis; se utilizó la técnica de estriado por agotamiento en cuadrante radial y la pureza fue corroborada observando las características morfológicas a partir del desarrollo obtenido en este medio y mediante tinción de Gram. La técnica anterior fue utilizada además como segundo paso para la selección de cepas, eligiendo aquellas con carácter Gram-positivo; y para el mismo fin de selección se sometieron posteriormente a la prueba de la catalasa debido a que se sabe que las bacterias lácticas carecen de esta enzima (Rodríguez, 2009; Parra, 2010). Ésta última se realizó tomando una asada de una colonia pura, la cual se colocó en un portaobjetos limpio y desengrasado y posteriormente se depositó una gota de peróxido de hidrógeno sobre la muestra.

7.5 Aislamiento de la bacteria láctica de referencia

Como cepa de referencia (control positivo), en este trabajo, se utilizó a la cepa *Lactobacillus casei* Shirota®, a partir de la bebida láctea fermentada Yakult®. Para el aislamiento de la misma se tomaron tres asadas del producto comercial y se extendió el inoculó por medio de la técnica de estriado por agotamiento en placa de Agar MRS. Se incubó a 37 °C/24 h, en anaerobiosis y a las colonias aisladas obtenidas se les realizó una tinción de Gram. Una vez verificado el carácter Gram-positivo de las mismas se llevó a cabo la verificación de pureza

como se describió en la sección 7.4 para la purificación de los aislados y se continuó con la metodología que se describe en las secciones posteriores.

7.6 Conservación a mediano y largo plazo de BAL

Las cepas microscópicamente observadas como bacilos Gram-positivos fueron conservadas por subcultivo en medio semisólido MRS con 0.5 % de agar bacteriológico y trazas de carbonato de calcio (aproximadamente 0.1 g por tubo) para neutralizar el medio por la generación de acidez durante el almacenamiento. Después de 24 horas de incubación a 37 °C y en anaerobiosis, se almacenaron a 4°C para su conservación a mediano plazo.

A largo plazo se conservaron por ultracongelación a -70 °C, para lo cual se hizo una suspensión, a partir de un cultivo puro de 24 horas de desarrollo en caja de AMRS, en 3 mL de caldo MRS y en un tubo de microcentrífuga se colocaron 500 µL de ésta y 500 µL de solución de glicerol al 50 % m/v.

La cepa de referencia utilizada como control positivo en el reto ácido/sales biliares y en el reto antimicrobiano (*L. casei* Shirota®) fue conservada a mediano y largo plazo con la misma metodología.

7.7 Evaluación cualitativa de resistencia a condiciones gastrointestinales *in vitro*, en presencia de sales biliares y condiciones de acidez

Para evaluar la resistencia a sales biliares y pH bajo de las cepas purificadas y conservadas en refrigeración, éstas fueron reactivadas de ultracongelación por medio de la resuspensión de una asada en 3 mL de caldo MRS e incubación bajo las condiciones utilizadas a lo largo de la metodología. Posteriormente, con 500 µL de un cultivo de 24 horas en el mismo medio (CMRS) se inoculó el medio de estrés, CMRS con 0.3% p/v de sales biliares (OXOID) y pH 3.5 ± 0.03 (acidificación con HCl 5 N); e incubó a 37 °C en condiciones de anaerobiosis, durante 24 horas. Después de este periodo se observó el desarrollo en este medio como la presencia e intensidad de turbidez, con respecto al observado para el medio de estrés sin inocular, y se depositaron 20 µL del mismo en cajas de Petri con agar MRS, se incubó nuevamente en anaerobiosis, 37 °C durante

24 horas. La metodología anteriormente descrita se llevó a cabo por duplicado para cada cepa y el resultado en ambos medios se reportó de acuerdo a la intensidad de desarrollo: desarrollo escaso (+), desarrollo medio (++) y desarrollo abundante (+++).

7.8 Evaluación de la actividad antibacteriana de las BAL contra patógenos

Las cepas seleccionadas por su resistencia a las condiciones gastrointestinales *in vitro* fueron sometidas a retos microbianos cualitativos con la finalidad de evaluar la actividad antibacteriana contra los patógenos *S. enterica* serovar Tiphya ATCC 9992, *E. coli* enteropatógena (EPEC) cepa E2348/69 y *S. enterica* serovar Enteritidis, *L. monocytogenes* y *V. cholerae* de la colección del cepario de la Facultad de Química, UNAM.

Para llevar a cabo los retos, las BAL aisladas y las cepa utilizada como referencia (*L. casei* Shirota®) fueron reactivadas, al igual que se describe en la sección 7.7, por medio de la resuspensión de una asada del cultivo en conservación en 3 mL de caldo MRS e incubación bajo las condiciones utilizadas a lo largo de la metodología (37 °C/anaerobiosis); posteriormente, con cultivos de 24 horas, se prosiguió a realizar el ensayo.

7.8.1 Cultivo, conservación y activación de cepas patógenas de prueba

Las cepas patógenas utilizadas para los retos microbianos fueron cultivadas a lo largo de la metodología, a 37 °C en caldo o Agar Luria, en el caso de EPEC, *S. Tiphya* y *S. Enteritidis*, y en caldo o Agar BHI (Infusión Cerebro Corazón) en el caso de *L. monocytogenes* y *V. cholerae*.

La conservación de las cepas se llevó a cabo, al igual que para las BAL, a mediano y largo plazo. A mediano plazo se realizó por subcultivo en medio Agar Cistina Tripticaseína (CTA); se sembró por picadura en el medio y después de 24 horas de incubación a 37 °C, se almacenó en refrigeración a 4 °C. A largo plazo se conservaron por ultracongelación a -70 °C, para lo cual, a partir de un cultivo puro de 24 horas del desarrollo de cada patógeno en caja de Agar Luria

o BHI, según el caso; se hizo una suspensión en caldo (mismos medios) y posteriormente se colocaron en un tubo de microcentrifuga 500 µL de esta suspensión y 500 µL de solución de glicerol al 50 % m/v.

La reactivación se realizó por medio de la resuspensión de una asada del cultivo en conservación en 3 mL de caldo Luria o BHI y para los retos microbianos (sección 7.8) las cepas fueron cultivadas por 24 h/37 °C en placas de agar de los mismos medios.

7.8.2 Selección de cepas con actividad antibacteriana

Para llevar a cabo el ensayo se sembró a las bacterias aisladas y la cepa de referencia (*L. casei* Shirota®) en placa de Agar APT (“All Purpose Tween”) por estriado en un área de 0.5 cm x 0.5 cm, colocando por caja cuatro puntos equidistantes. La incubación se realizó bajo las mismas condiciones utilizadas a lo largo de la metodología: anaerobiosis, 24 h /37 °C.

Pasado el tiempo de incubación se procedió a preparar, con un cultivo de 24 horas del patógeno sobre el cual se probaría la inhibición, una suspensión estandarizada (0.2 DO. 600 nm) del mismo en solución salina isotónica. De ésta última se adicionaron 800 µL a 8 mL de agar suave (caldo Luria o BHI con 0.3 % de agar) fundido y la mezcla fue vertida sobre la placa de APT con las bacterias ácido lácticas previamente desarrolladas (siembra e incubación descrita en el párrafo anterior). Después de colocar la sobrecapa con el patógeno, las cajas se incubaron nuevamente por 24 horas, a 37 °C y en condiciones de anaerobiosis.

El ensayo fue realizado por duplicado para cada cepa de prueba contra cada patógeno y como control negativo se utilizó solución salina isotónica en lugar de la bacteria láctica de prueba. Los resultados fueron reportados, de acuerdo al tamaño de los halos de inhibición observados, utilizando un sistema de cruces (+, ++, +++).

7.9 Evaluación cuantitativa (UFC/mL) de resistencia a medio ácido con sales biliares de las cepas que mostraron mejor potencial probiótico

Las cepas que mostraron mejor potencial probiótico por su resistencia al medio de estrés y por su actividad antimicrobiana contra patógenos fueron sometidas nuevamente al medio de simulación de las condiciones gastrointestinales *in vitro*, con el propósito de llevar a cabo de forma cuantitativa (en términos de UFC/mL) la evaluación de su resistencia a las condiciones ácidas y en presencia de sales biliares como la capacidad de mantenerse viables y de desarrollarse, dado que es ésta una de las características para que los microorganismos probióticos puedan ejercer su efecto en el intestino (Jensen *et al.* , 2012).

Para realizar el ensayo de forma cuantitativa se realizó como primer paso la cuenta en placa del desarrollo de la bacteria láctica en caldo MRS por 24 horas, 37 °C y en anaerobiosis. Para ello se realizaron por duplicado diluciones decimales seriadas en agua peptonada estéril al 0.1 % p/v hasta 10^{-9} y de las últimas tres se inoculó 0.1 mL por extensión superficial en placa de AMRS, pasadas 24 horas de incubación, a las condiciones descritas anteriormente, se llevó a cabo el conteo de unidades formadoras de colonias.

Como segundo paso, con 500 µL del desarrollo obtenido en caldo MRS, se inoculó el medio de estrés (descrito en la sección 7.7) y después de 24 horas de incubación bajo las condiciones descritas con anterioridad se realizó nuevamente el recuento en placa por medio de diluciones decimales seriadas e inoculación por extensión superficial en placa de AMRS.

Por último, se utilizó como medio de recuperación caldo MRS y éste fue inoculado con 500 µL del desarrollo en el medio estrés. Después de 24 horas se realizó de la misma manera la cuenta en placa.

El ensayo fue realizado por duplicado y se utilizó como control positivo la cepa de referencia *L. casei* Shirota®. Los resultados se expresan como el promedio del número de UFC/mL detectado en cada réplica.

7.10 Identificación de cepas con potencial probiótico

7.10.1 Identificación molecular por análisis de secuencias de ADNr 16S

Las cepas de bacterias lácticas resistentes al reto ácido/sales biliares en el ensayo de selección (sección 7.7) y que demostraron cierta actividad antibacteriana contra por lo menos uno de los patógenos evaluados fueron identificadas molecularmente por el análisis de su secuencia del ADNr 16S y con ésta misma técnica fue corroborada la identidad de la cepa utilizada como referencia.

7.10.1.2 Extracción de ADN cromosomal y electroforesis en gel de agarosa

Para llevar a cabo la extracción de ADN cromosomal, las cepas purificadas se sembraron en placa de AMRS por estriado radial y después de incubar a 37 °C, anaerobiosis, durante 24 horas; del desarrollo obtenido se realizó una suspensión en 1.8 mL de caldo MRS y se procedió a la extracción con el sistema comercial UltraClean™ Microbial isolation kit (Mobio), siguiendo las recomendaciones del proveedor (metodología detallada en Anexo 1). La integridad del ADN se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, 100 V, en solución buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) (TRIS base 89 mM pH 8.0, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA). Se cargaron 5 µL de la muestra con 3 µL del buffer de carga con azul de bromofenol y se utilizó el marcador de peso molecular O`GeneRuler 1kb DNA ladder™ de Thermo Scientific. El gel fue visualizado bajo luz ultravioleta, utilizando como revelador de bandas bromuro de etidio al 0.04% p/v.

7.10.1.3 Amplificación del ADNr 16S por PCR

Una vez verificada la extracción del ADN cromosomal y su integridad, este fue utilizado como templado para la amplificación por PCR del ADNr 16S; para ello, se utilizó el par de primers universales fD1 + rD1:

fD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y

rD1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), los cuales están diseñados para amplificar el gen ADNr 16S completo, con un tamaño

esperado de 1.5 kb (Weisburg, *et al.*, 1991). Como control de reactivos se agregó a la mezcla de reacción (Tabla 4) agua grado biología molecular en lugar del templado.

Tabla 4. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación del ADNr 16S por PCR.

Reactivo	Volumen (1 rxn; 50 μ L)	Concentración final
Taq Buffer (KCl)	5.0 μ L	1X
MgCl ₂	5.0 μ L	2.5 mM
dNTPs	1.0 μ L	200 μ M
Primer Fw (fd1)	0.6 μ L	0.12 μ M
Primer Rv (rD1)	0.6 μ L	0.12 μ M
Agua	35.6 μ L	-
Enzima	1.25 μ L	1.25 U
Templado ADN	1 μ L	-

La reacción de amplificación se realizó con la enzima Taq DNA polimerasa recombinante de Thermo Scientific, en un termociclador My Cycler™ (Bio-Rad), bajo las condiciones utilizadas de acuerdo a la metodología descrita por Cervantes (2010) y Juárez (2013) y que se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones utilizadas para la reacción de amplificación con la enzima Taq DNA polimerasa

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	95	1	30 ciclos
Alineamiento	49	1	
Extensión	72	1.5	
Extensión final	72	5	1

Al término de la reacción se analizó el producto amplificado por electroforesis como se describió anteriormente para la electroforesis con ADN cromosomal.

7.10.1.4 Purificación y secuenciación del ADNr 16S

El producto de PCR fue purificado por medio del sistema comercial Pure Link™ PCR Purification kit de Invitrogen (metodología detallada en Anexo 2). Posteriormente, se midió la concentración del ADNr 16S en el equipo NanoDrop™ de Thermo Scientific y se secuenció en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM mediante la técnica de Sanger; para ello la mezcla de reacción a secuenciar se elaboró colocando, en un tubo eppendorf de tapa plana de 0.2 ml para PCR: 12 µL del producto de PCR, 1 µL del primer fD1 o rD1 (10 pmol) y 3 µL de agua grado biología molecular para aforar a 16 µL.

Las secuencias fueron visualizadas con el programa Finch TV (Geospiza) y DNA Chromatogram Explorer Lite (Heracle BioSoft) para llevar a cabo la depuración de zonas de baja calidad de las muestras y resolución de ambigüedades. Para obtener la identidad, éstas se analizaron en la base de datos no redundante GenBank del NCBI (National Center for Biotechnological Information, sitio web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando la aplicación Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). La identidad de la secuencia se determinó de acuerdo al porcentaje de identidad y el valor de expectancia (e value). Con la finalidad de complementar los resultados de identidad obtenidos se realizó, con el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013), un árbol filogenético con el algoritmo Neighbor-joining, el modelo Jukes-Cantor y un análisis bootstrap de 1000 réplicas. Como referencia se incluyeron diversas secuencias de ADNr 16S (alineadas con el programa Clustal W), previamente depositadas en la base de datos, con las que las cepas estudiadas tuvieron una mayor similitud.

7.10.2 Identificación bioquímica por el sistema API® 50 CH

La identificación bioquímica por medio de API® 50 CH fue llevada a cabo con la finalidad de complementar el resultado obtenido de la identificación molecular. Para ello, las cepas puras fueron resembradas en AMRS e incubadas por 24 horas, a las condiciones utilizadas a lo largo de la metodología. Posteriormente, se procedió a realizar una suspensión concentrada del cultivo en solución salina isotónica y ésta fue utilizada para estandarizar otra suspensión; se contó el

número de gotas necesarias para igualar la turbidez al tubo 2 de la escala de McFarland, utilizando el Densimat (bioMérieux). Con ésta solución se procedió a inocular el medio API® 50 CHL (bioMérieux), utilizando el doble de gotas de la solución que las que se utilizaron para estandarizar la misma. El medio se repartió, con una pipeta estéril, en los 50 tubos de la galería y una vez llenos, se incubó a 37 °C. La revisión del resultado se realizó a las 24 y a las 48 horas y la identidad de las cepas se determinó de acuerdo al patrón obtenido con la fermentación de los 50 carbohidratos de la galería API® 50CH, depositando el resultado en la base de datos de APIweb™ (Versión 5.0) de bioMérieux.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Muestreo y medición de parámetros fisicoquímicos

Las tres muestras de pulque, provenientes de la población de Huitzilac, Morelos, se adquirieron como se mencionó en la metodología de tres diferentes productores. La primera muestra fue descrita por el productor como un pulque suave por la combinación con aguamiel mientras que para las otras dos (Fuerte 2 y Fuerte 3) se indicó que el contenido alcohólico era elevado.

A partir de la muestra recolectada de cada productor se determinaron, en el laboratorio, los parámetros fisicoquímicos que se describen en la Tabla 6. Se observó que en las muestras de pulque fuerte (F2 y F3) el pH era más bajo, 3.87 y 3.83 respectivamente, que el pH de la muestra S1, lo que indicó que en estas el proceso de fermentación se encontraba más avanzado generando un ambiente ácido por la adición de productos del metabolismo de los microorganismos como el ácido acético y ácido láctico (Escalante *et al.*, 2008).

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos de las tres muestras de pulque

Muestra	Temperatura (°C)	pH
1. Suave (S1)	22.5	4.06
2. Fuerte (F2)	23	3.87
3. Fuerte (F3)	23	3.83

8.2 Cuantificación de bacterias ácido-lácticas

La cuantificación microbiana se realizó en placa de AMRS suplementada con clindamicina y ciprofloxacino. Después de incubar en anaerobiosis a 28 °C, durante 48 h, a partir de cada una de las muestras analizadas se determinó la concentración de bacterias que se muestra en la Tabla 7.

La cantidad de bacterias lácticas se reportó como un valor estimado ya que el número de colonias en la dilución 10^{-4} excedió del rango que podría considerarse estadísticamente representativo para el conteo (30 a 300 UFC). Sin embargo, la concentración determinada en las muestras de pulque S1 y F2 es similar a la encontrada en el estudio de Escalante *et al.* (2008), en el que se reportó un número de 1.5×10^8 UFC/mL al final del proceso de fermentación del pulque.

Tabla 7. Valor estimado del número de colonias presente en las muestras de pulque.

Muestra	UFC/mL
1. Suave (S1)	12×10^7 (v.e.)
2. Fuerte (F2)	12×10^7 (v.e.)
3. Fuerte (F3)	33×10^6 (v.e.)

*v.e. Valor estimado

A partir de los resultados del conteo, se observó que en la muestra F3 el número de bacterias lácticas fue menor; dado que para esta muestra el valor de pH fue más bajo que el de las muestras S1 y F2 (Tabla 6), se puede considerar que el desarrollo de las mismas se vio afectado por el ambiente ácido generado en la muestra pues a pesar de que este tipo de bacterias son ácido tolerantes, la mayoría crece a un intervalo de pH entre 4.0 y 4.5 (Ramírez *et al.*, 2007). Por otro lado, en la muestra F3 se presentó además una alta concentración de levaduras que no se tomó en cuenta para el conteo y que puede explicarse considerando el mecanismo de la fermentación ya que como se mencionó anteriormente por el pH de la muestra, el proceso probablemente se encontraba más avanzado y como mostró Escalante *et al.* (2008) en su estudio, la concentración de levaduras en el pulque se ve incrementada conforme avanza la fermentación hasta alcanzar un número de 1.47×10^7 UFC/mL al final del mismo.

En las tres muestras, pero predominantemente en la muestra de pulque suave, se observaron colonias con diversas características morfológicas típicas de BAL, entre ellas: colonias blancas, brillantes, convexas y con bordes enteros; colonias planas, de color beige tenue y de aproximadamente un mm de diámetro y colonias de color crema con bordes irregulares.

8.3 Selección de cepas por características morfológicas y análisis microscópico

Para evaluar la morfología microscópica de los microorganismos obtenidos a partir de las colonias seleccionadas de cada muestra en las placas de AMRS con antibiótico, se realizó una tinción simple. En promedio se analizaron microscópicamente 700 colonias y entre las diversas características microscópicas de las mismas (Figura 2), se observó un gran número de levaduras (1) y cocos agrupados en diplococos (2); se observaron también, como una minoría de aproximadamente el 10 % del total de colonias, bacilos de diversos tamaños de manera individual o formando cadenas (3-9).

La abundancia de levaduras y cocos que se observó mediante el análisis microscópico concuerda con lo observado por Escalante *et al.* (2008) en el estudio de la diversidad microbiana presente en el pulque, donde por microscopía electrónica de barrido se distinguió un gran número de cocos organizados en pares o en cadenas cortas, que pertenecen probablemente a especies del género *Leuconostoc*, además de la presencia abundante de levaduras. En este estudio, se determinó también por métodos dependientes del cultivo que las especies del género *Leuconostoc* fueron el grupo detectado en mayor proporción entre la diversidad de bacterias presentes en el pulque. Lo anterior explica la detección de microorganismos con una morfología bacilar como una minoría dentro del número de colonias que se analizaron, demostrándose que la población de este grupo se encuentra enmascarada por la alta proporción de microbiota acompañante existente en la bebida, lo que ha influido en imposibilitar el aislamiento y detección de lactobacilos por métodos dependientes del cultivo a pesar de que por métodos independientes del cultivo

se ha encontrado que la diversidad bacteriana presente se encuentra dominada por estos microorganismos (Escalante *et al.*, 2004).

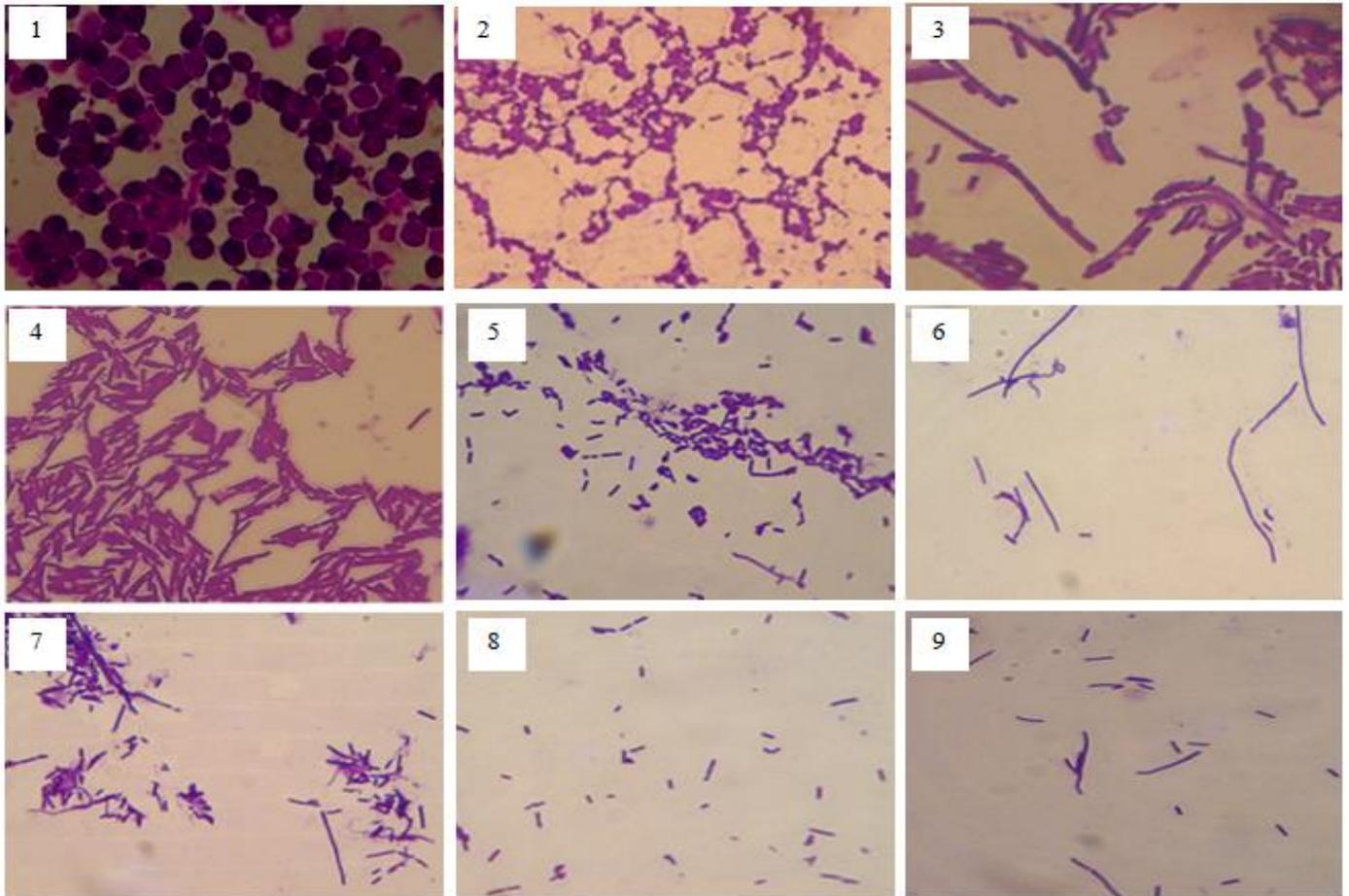
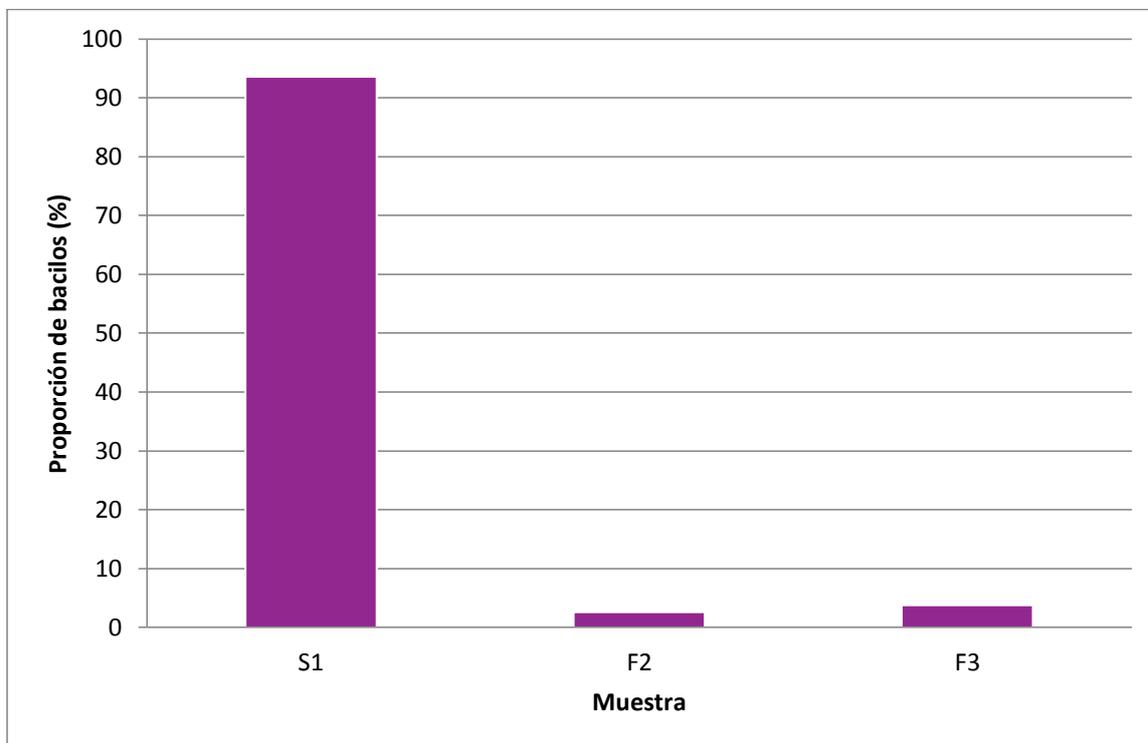


Figura 2. Tinciones simples de las colonias seleccionadas a partir de las placas de AMRS, incubadas en anaerobiosis. Aumento total: 1000 X. 1) Levaduras. Colonia de la muestra F3; 2) Cocos. Colonia de la muestra F2; 3) Bacilos formando largas cadenas. Colonia de la muestra S1; 4) Bacilos largos. Colonia de la muestra S1; 5) Bacilos cortos, algunos en cadenas. Colonia de la muestra F2; 6) Bacilos formando largas cadenas. Colonia de la muestra S1; 7) Bacilos individuales o en cadenas. Colonia de la muestra S1.; 7) Bacilos cortos. Colonia de la muestra F2; 8) Bacilos cortos en cadenas. Colonia de la muestra S1. 9) Bacilos cortos, algunos formando cadenas. Colonia de la muestra S1.

Con la observación microscópica fue posible seleccionar las cepas que por su morfología bacilar podrían corresponder a aquellas de interés en esta investigación, considerando que las especies del género *Lactobacillus*, de acuerdo al Bergey's Manual (2009), se caracterizan por observarse como células en forma de bacilos largos y extendidos, bacilos cortos o coco-bacilos corineformes, que se presentan comúnmente formando cadenas. Se detectaron

78 cepas y del total de la colección, la proporción encontrada de bacilos en las tres muestras se presenta en la Figura 3. Como puede observarse en ésta gráfica, en la muestra S1 se encontró una proporción más alta de bacilos que constituyen la mayor parte de la colección.

Figura 3. Proporción de bacilos encontrada en las tres muestras de pulque de Huitztlac, Morelos



La heterogeneidad en la distribución de bacilos en las tres muestras de pulque podría explicarse por las condiciones intrínsecas de cada una. Se sabe que los lactobacilos son microorganismos con requerimientos complejos para su crecimiento, el medio en el que se desarrollen debe contener los nutrientes esenciales disponibles para que se establezca una microbiota predominante de los mismos y su distribución en un ambiente determinado se va a ver afectada por diversos factores que incluyen pH, disponibilidad de oxígeno, niveles de sustratos específicos y la interacción con otras bacterias (Gomes y Malcata, 1999). Es probable que en la muestra S1 se establecieron preferentemente las condiciones adecuadas para el desarrollo de estos microorganismos, entre ellas: un nivel más alto de carbohidratos fermentables, en comparación con las otras dos muestras, debido a la adición de aguamiel por parte del productor; un valor de pH más propicio para el desarrollo (>4), menor concentración de levaduras y grado alcohólico más bajo.

8.4 Descripción colonial, tinción de Gram y prueba de la catalasa

A partir de las cepas cultivadas entre 24 a 48 horas, a 37 °C y en condiciones de anaerobiosis; se realizó la prueba de la catalasa y tinción de Gram para el reconocimiento y selección de aquellas con características propias de los microorganismos de interés, sabiendo que los lactobacilos son bacterias Gram-positivo y catalasa-negativo (Gomes y Malcata, 1999). En la Tabla 8 se muestran de forma agrupada los resultados obtenidos de las 78 cepas, así como las características distintivas de las colonias desarrolladas en placas de Agar MRS bajo las condiciones anteriormente descritas (Tabla desglosada en Anexo 3).

Tabla 8. Características morfológicas de las cepas aisladas, tinción de Gram y prueba de la catalasa.

Cepas	Descripción colonial	Tinción de Gram	Catalasa
2S1.32, 2S1.34, 1S1.29, 1S1.10, 2S1.9, 2S1.15, 2S1.12, 2S1.44, 1S1'.15, 1S1.27, 1S1.32, 1S1'.16 b, 1S1'.12 b, 1S1.33 bd, 2S1.22, 1S1'.18, 2S1.20, 2S1".22, 2S1".12 b, 1S1.15, 1S1'.8, 2S1.28 b, 1S1".22, 2S1".2, 1S1'.9 b, 2S1".37 t, 2S1.38 b, 1S1'.37, 2S1.37 b, 1F2.36 b, 1F2.21	Colonias blancas con bordes enteros	Bacilos Gram-positivo	Negativo
2S1.39 cbb, 1S1.25, 2S1.10 pt, 2S1.4, 2S1.19, 2S1".5 t, 1S1'.1, 2S1".3 t, 2S1".4 t, 2S1".5b, 2S1.28 t, 2S1.2, 1S1'.16 t, 2S1.38 t, 2S1.29, 2S1.37 t	Colonias color crema con bordes enteros	Bacilos Gram-positivo	Negativo
2S1.11 b, 2S1.7, 1S1.31, 2S1.14, 1S1'.35, 2S1".7, 2S1.40 pb, 2S1".36, 2S1.35, 1S1'.7	Colonias blanquecinas con bordes enteros	Bacilos Gram-positivo	Negativo
2S1.40 gd, 2S1.21 cpr, 2S1.21 cb, 2S1.5, 2S1.23 cb, 1S1".33, 2S1".1, 2S1".37 b, 2S1.1	Colonias blancas con bordes irregulares	Bacilos Gram-positivo	Negativo
2S1.11 ct, 2S1.21 cgd, 2S1.14 td, 1S1.11, 1S1.33 t, 2S1.3, 1S1".11	Colonias color crema con bordes irregulares	Bacilos Gram-positivo	Negativo
2S1.8, 1S1.16	Colonias blanquecinas con bordes irregulares	Bacilos Gram-positivo	Negativo
1F3'.45, 1F3'.30, 1F3'.31	Colonias color crema con textura gomosa	Bacilos Gram-positivo	Positivo

En la tabla anterior, las cepas etiquetadas con el carácter S1 corresponden a la muestra de pulque Suave 1, con el carácter F2 a la muestra de pulque Fuerte 2 y con el carácter F3 a la muestra de pulque Fuerte 3.

Con respecto a la tinción de Gram, se encontró que todos los aislados son bacilos Gram-positivos con características microscópicas distintas que pueden observarse en la Figura 4 y que demuestran la diferencia entre cepas a pesar de que las características macroscópicas en ocasiones se observaron muy similares.

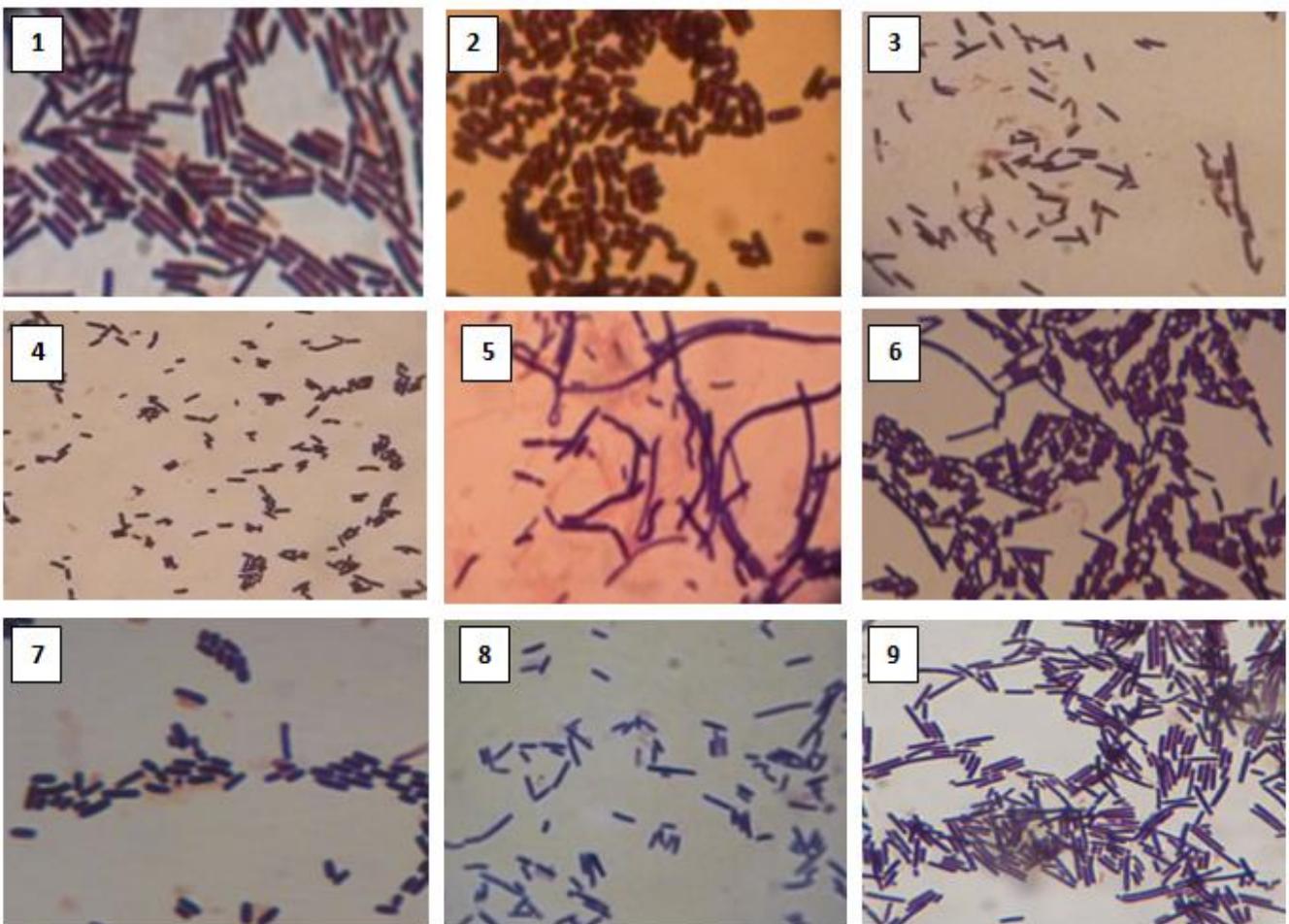


Figura 4. Cepas aisladas a partir del pulque. Tinción de Gram después de incubación a 37 °C en anaerobiosis, 24-48 horas. Aumento total: 1000 X 1) Bacilos delgados Gram-positivo de la cepa 2S1.40 gd; 2) Bacilos cortos y anchos Gram-positivo de la cepa 2S1.44; 3) Bacilos aislados o en cadenas Gram-positivo de la cepa 1S1.11; 4) Bacilos cortos Gram-positivo de la cepa 2S1.11 ct; 5) Bacilos Gram-positivo formando largas cadenas de la cepa 2S1.21 cgd; 6) Bacilos Gram-positivo de la cepa 2S1.34; 7) Bacilos cortos Gram-positivo de la cepa 1S1.25; 8) Bacilos Gram-positivo de la cepa 2S110 pt; 9) Bacilos largos Gram-positivo de la cepa 2S1.5

Las bacterias ácido lácticas (LAB) constituyen un grupo de microorganismos Gram-positivos y catalasa-negativos (Parra, 2010) al que, por el resultado obtenido, probablemente pertenecen 75 de las 78 cepas aisladas, con excepción de los tres aislados de la muestra de pulque F3 (1F3'. 45, 1F3'. 30 y 1F3'.31) que dieron un resultado positivo en la prueba de la catalasa y que por las características de su crecimiento en placas de AMRS se cree que puede tratarse de una especie del género *Bacillus* presente en ésta muestra como contaminante del pulque pues éste microorganismo se encuentra comúnmente en suelos y plantas (Cuervo, 2010). Dado el resultado anterior, las tres cepas de la muestra F3, a pesar de observarse al microscopio como bacilos Gram-positivos, fueron descartadas en pasos subsecuentes de caracterización del potencial probiótico e identificación y se continuó la selección de cepas de interés a partir de las 75 restantes.

8.5 Evaluación cualitativa de resistencia a condiciones gastrointestinales *in vitro*, en presencia de sales biliares y condiciones de acidez

Las 75 cepas aisladas que fueron seleccionadas por sus carácter Gram-positivo y carencia de la enzima catalasa (sección 8.4) se sometieron a condiciones de simulación del tracto gastrointestinal *in vitro* (pH 3.5 y 0.3% sales biliares). Éstas condiciones fueron establecidas con el conocimiento de que el pH en el estómago generalmente oscila en un rango de 2.5 a 3.5 (Holzapfel *et al.*, 1998) y la concentración de sales biliares en el intestino es de aproximadamente 0.35 % p/v (De Castro y Pérez, 2006; Ganong, 1996). Los resultados de resistencia a ácido y sales biliares se presentan en la Tabla 9, de acuerdo a como se indicó en la metodología (sección 7.7), por la intensidad del desarrollo relacionado con la presencia de turbidez en el medio de estrés después de incubación en anaerobiosis, a 37 °C, por 24 horas. En esta tabla se presenta también el desarrollo observado sobre placa de AMRS (mismas condiciones de incubación) que permitió verificar la viabilidad de las cepas después del tratamiento con ácido y sales biliares. En ambos medios se asignó la siguiente simbología: desarrollo escaso (+), desarrollo medio (++) y desarrollo abundante (+++).

Tabla 9. Resultados de resistencia a condiciones gastrointestinales in vitro de las cepas aisladas.

Cepas	Resistencia a medio de estrés (pH 3.5 y 0.3 % sales biliares)	Desarrollo en AMRS (posterior al tratamiento ácido/sales biliares)
2S1.9, 1S1.33 bd, 2S1.10 pt, 2S1.14 td, 2S1.12, 1S1.27, 2S1.37 b, 2S1.4, 2S1.28 b, 2S1.28 t, 2S1.38 b, 1S1'.16 b, 1S1'.15, 1S1'.37, 2S1".12 b, 1S1'.33, 1S1'.18	+++	+++
2S1.7, 1S1.25, 2S1.22, 2S1.5, 1S1'.9 b, 2S1".1	+++	++
2S1.40 gd, 2S1.40 pb, 2S1.19, 2S1.8, 1S1'.8, 1S1'.35 b, 1S1'.7, 2S1".3 t	+++	+
2S1.34, 1S1.10, 2S1.39 cbb, 2S1.14 tb, 1S1.16, 2S1.38 t, 1S1.32, 1S1'.16 t, 2S1.20, 2S1.11 ct	++	+++
2S1.44, 2S1.2, 2S1.23 cb, 1S1'.12 b, 2S1".37 t, 2S1.35, 2S1".4 t, 2S1".22, 1S1'.22	++	++
2S1.15, 2S1.29, 2S1".7, 2S1".36, 2S1".5 t, 1S1.11	++	+
2S1.1	++	-
2S1.37 t, 1F2.36 b	+	+++
2S1".2	+	++
1S1.31, 2S1.3, 1S1".11, 1S1'.1, 2S1".5 t	+	+
2S1.11 b, 2S1.32, 1S1.33 t, 2S1.21 cgd	+	-
1S1.29, 2S1.21 cpr, 2S1.21 cb, 1F2.21	-	-

El tiempo usado en este trabajo, durante el cual se sometió a las cepas al medio de simulación de condiciones gastrointestinales con la finalidad de llevar a cabo la selección de bacterias con potencial probiótico, no es el más comúnmente usado para la evaluación de resistencia a ácido y sales biliares, pues generalmente las cepas se someten al tratamiento durante tres a cuatro horas (Rönka *et al.*, 2003; Penacchia *et al.*, 2004; Alvarado y Diaz, 2009) reflejando el tiempo que pasa el alimento en el estómago y en el intestino delgado, respectivamente (Argyri *et al.*, 2013). Sin embargo, el uso de un tiempo más prolongado (24 horas) aseguró el aislamiento de cepas altamente resistentes a tales condiciones, entre éstas, las 18 seleccionadas que se presentan sombreadas en la Tabla 9 ya que para las mismas se observó un desarrollo abundante, denotado por la presencia de turbidez, en condiciones de acidez y presencia de sales biliares y en el medio posterior al estrés.

Los resultados indicaron por tanto que las 18 cepas anteriores, aisladas de la muestra S1 y que constituyen el 24 % del total de cepas; podrían ejercer un efecto probiótico con eficacia en humanos pues se ha demostrado que el resultado de las pruebas *in vitro* de resistencia a ácido y sales biliares puede correlacionarse con la supervivencia en el tracto gastrointestinal (Conway *et al.*, 1987) y es ésta una de las características más importantes para considerar a un microorganismo como probiótico, de acuerdo con lo establecido en el 2001 por la Consulta mixta FAO/OMS respecto a la evaluación de probióticos.

La resistencia observada por las cepas seleccionadas (identificadas en la sección 8.8.1) se encuentra además en concordancia con resultados obtenidos en investigaciones anteriores donde cepas de *Lactobacillus* aisladas de alimentos, humanos o animales fueron capaces de resistir valores de pH de 2.5-4.0 (Cebeci y Gürakan, 2003; Argyri *et al.*, 2013; Tulumoglu *et al.*, 2013) y una concentración de sales biliares igual a la utilizada en este trabajo (Vinderola *et al.*, 2008; Alvarado y Díaz, 2009; Monteagudo *et al.*, 2012; Tulumoglu *et al.*, 2013).

8.6 Selección de cepas con actividad antibacteriana contra patógenos

Las 18 cepas aisladas que mostraron la mejor resistencia a condiciones gastrointestinales *in vitro*, así como la cepa utilizada de referencia (*L. casei* Shirota®) fueron sometidas a retos antimicrobianos cualitativos, evaluando de esta forma la inhibición de cada una sobre diversos patógenos: *E. coli* enteropatógena (EPEC) cepa E2348/69, *S. enterica* serovar Tiphya ATCC9992, *S. enterica* serovar Enteritidis, *L. monocytogenes* y *V. cholerae*. Los resultados de la actividad antimicrobiana se presentan en la Tabla 10.

A partir de los resultados, se observó que con excepción de las cepas 1S1.33 bd, 2S1.4 y 2S1.38 b, todas las cepas que fueron evaluadas en este ensayo mostraron cierta inhibición contra por lo menos dos de los patógenos sobre los cuales se determinó la actividad antibacteriana; tal es el caso de las cepas 2S1.10 pt y 2S1.12. Además, seis de las cepas generaron halos de inhibición contra todos los patógenos y entre ellas; la 2S1".12 b y 2S1.9 (enmarcadas en la Tabla 10) mostraron los halos de mayor tamaño, presentándose para la 2S1.9 halos más grandes incluso que los generados por la cepa de referencia *L. casei* Shirota®; lo que da una idea del efecto benéfico que podría ejercer el aislado en la prevención y/o tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

Con fines ilustrativos se muestran en las Figuras 5 a 9 las fotografías de los halos de inhibición de las cepas que tuvieron un mejor desempeño en el ensayo (2S1".12 b y 2S1.9), la cepa de referencia y una cepa para la cual se observaron halos de inhibición pequeños (2S1.37 b).

En este ensayo, la actividad antibacteriana de 15 de los 18 aislados fue observada a través de la inhibición *in vitro* del crecimiento de bacterias patógenas, lo cual constituye otro de los aspectos esenciales para establecer, de forma preliminar, la actividad probiótica de las bacterias (Monteagudo *et al.*, 2012).

Tabla 10. Actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas seleccionadas sobre diversos patógenos.

Cepa	Halo de inhibición (cm)				
	EPEC	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> Typhi	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Vibrio cholerae</i>
2S1. 9	+++	+++	+++	+++	+++
1S1.33 bd	-	-	-	-	-
2S1.10 pt	+	-	-	-	+
2S1. 14 td	+	+	-	+	+
2S1.12	-	-	+	-	++
1S1.27	++	+	+	++	++
2S1.37 b	+	+	++	+	+
1S1.16	+	-	+++	++	++
2S1.4	-	-	-	-	-
2S1.28 b	++	+	+++	+	-
2S1.28 t	+	+	++	+	-
2S138 b	-	-	-	-	-
1S1'.16 b	++	+	++	++	+
1S1'.15	+	+	++	-	-
1S1'.37	++	+	+	++	+
2S1". 12	++	+	++	++	++
1S1'.33	++	-	+	++	-
1S1'.18	+	+	++	++	-
<i>L. casei</i> Shirota ®	++	++	++	++	++

(-)=sin inhibición, (+)=halos de inhibición aprox. 0.6-0.8 cm, (++)=halos de inhibición aprox. 0.9-1.2 cm, (+++)= halos de inhibición aprox. 1.3-1.6 cm.

Es importante notar que el mecanismo por el cual se lleva a cabo la actividad antagónica no es elucidado en este trabajo y el efecto puede deberse a la producción de distintas sustancias con actividad antimicrobiana como son: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, dióxido de carbono y otros compuestos.

Al tratarse de BAL del género *Lactobacillus* (identificadas en la sección 8.8.1), es probable que la inhibición se lleve a cabo por la producción de ácidos orgánicos como ácido láctico y acético ya que un gran número de cepas pertenecientes al género inhiben de ésta forma el desarrollo de bacterias patógenas (Servin y Coconnier, 2003) por medio de la disminución del pH local y, en el caso de bacterias Gram-negativas, por medio de la permeabilización de la membrana externa (Alakomi *et al.*, 2000; Servin y Coconnier, 2003; Begley *et al.*, 2005). Sin embargo, es importante considerar también la posible producción de péptidos y enzimas con actividad antimicrobiana: bacteriocinas y péptido glucano hidrolasas. En el 2014, Cerón mostró para la cepa *Leuconostoc mesenteroides* P45, aislada del pulque, y cuya capacidad antimicrobiana contra *S. enterica* Tiphys, *S. enterica* Typhimurium, *E. coli* y *L. monocytogenes* fue demostrada por Campos (2010) y Matus (2011); que la actividad inhibitoria ejercida se debe probablemente a la producción de una bacteriocina detectada a partir del análisis del genoma de la cepa y, de acuerdo a su tamaño, por electroforesis en gel SDS-PAGE.

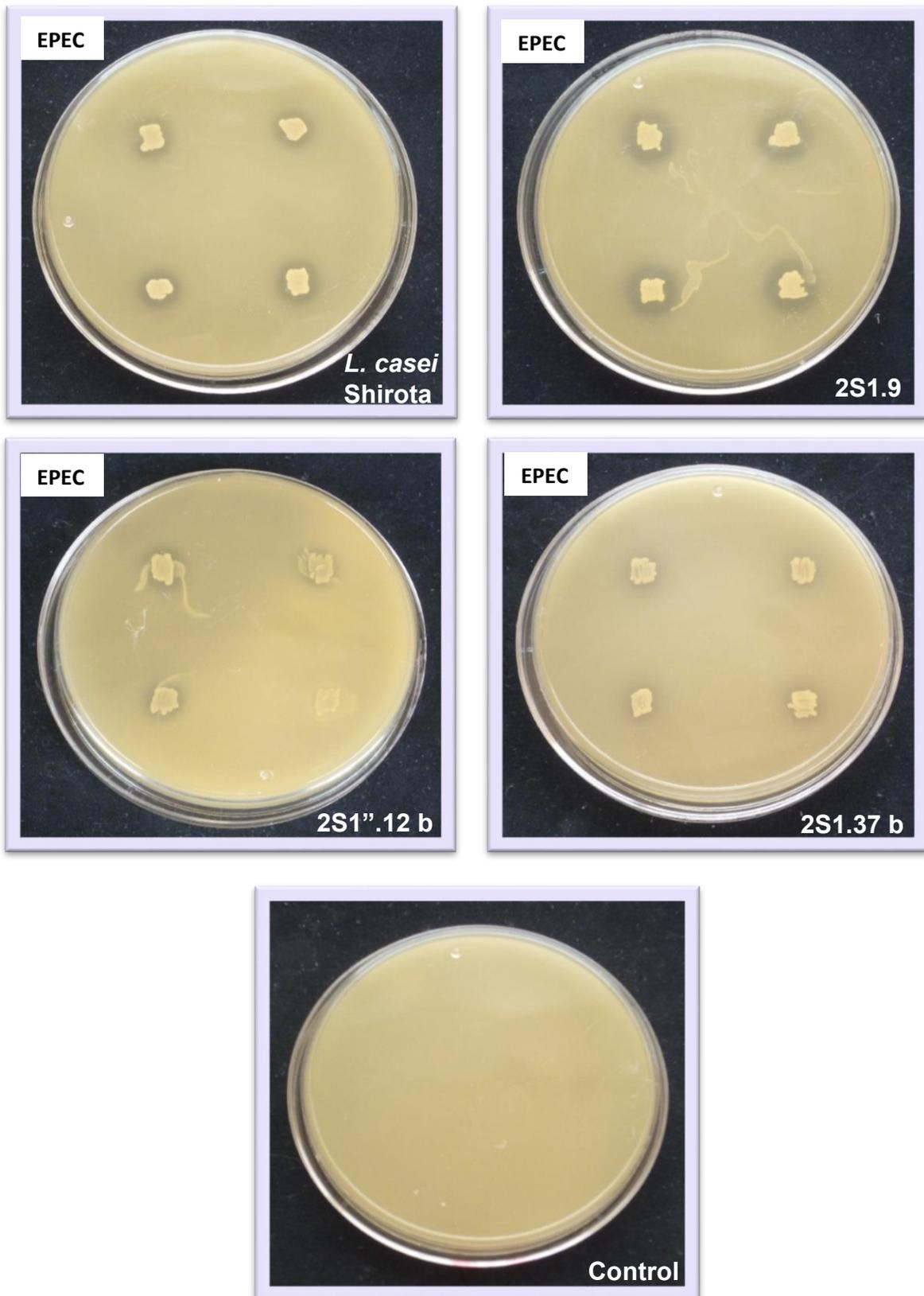


Figura 5. Halos de inhibición generados sobre el desarrollo de EPEC por los lactobacilos: *L. casei* Shirota[®], 2S1.9, 2S1".12 b y 2S1.37 b. La fotografía de la última fila corresponde al control negativo.

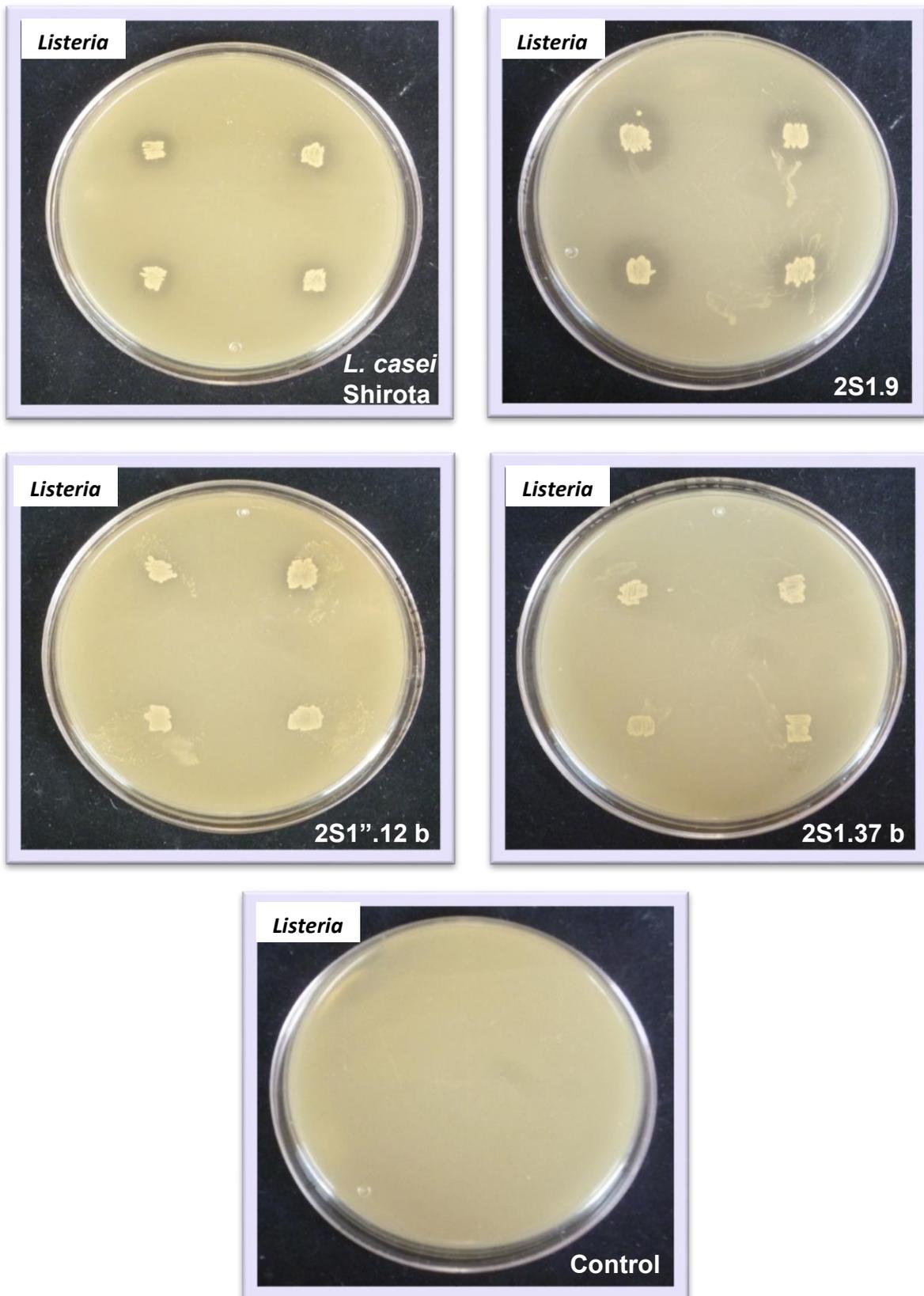


Figura 6. Halos de inhibición generados sobre el desarrollo de *L. monocytogenes* por los lactobacilos: *L. casei* Shirota®, 2S1.9, 2S1''.12 b y 2S1.37 b. La fotografía de la última fila corresponde al control negativo.

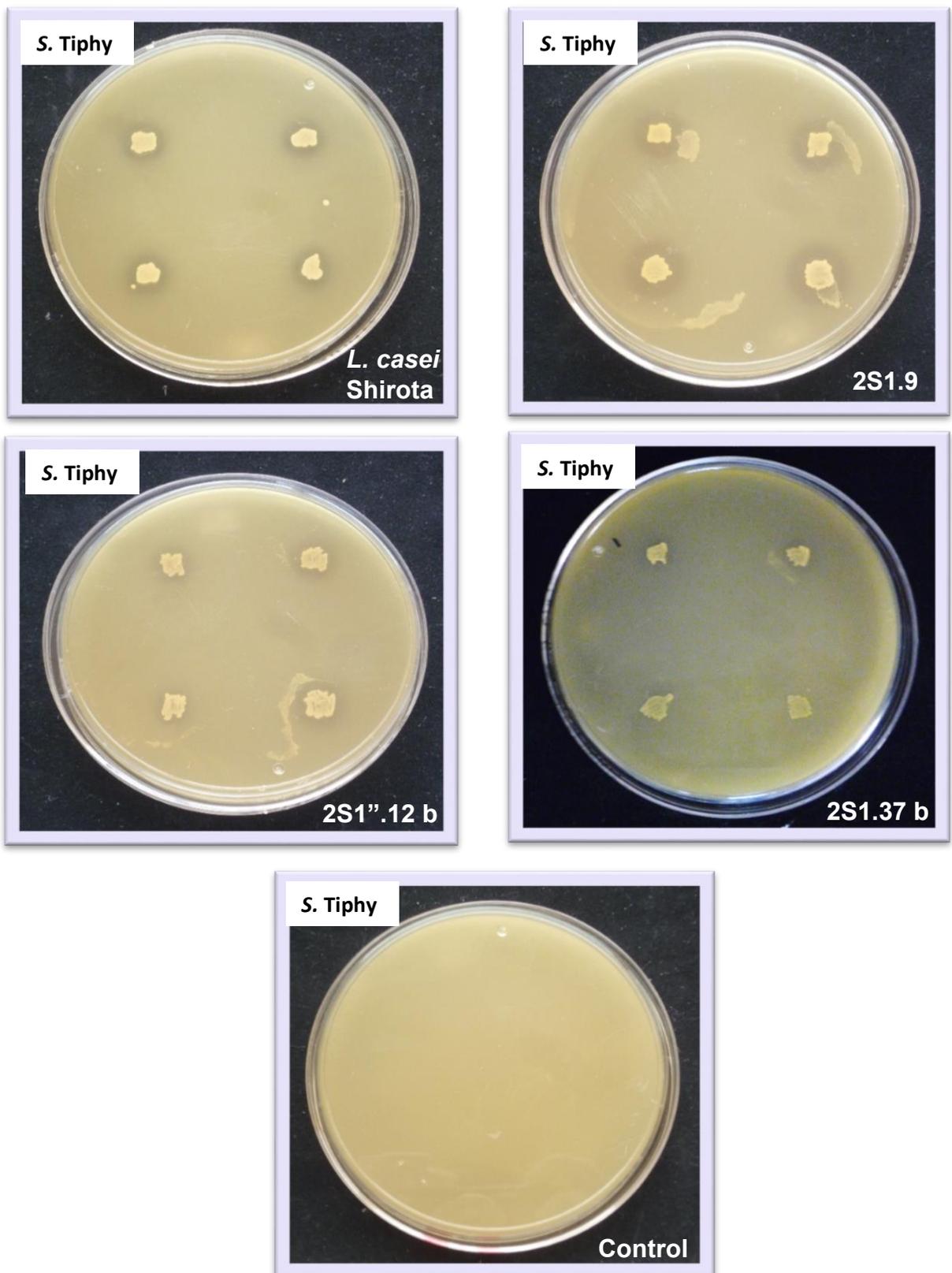


Figura 7. Halos de inhibición generados sobre el desarrollo de *S. Tiphys* por los lactobacilos: *L. casei* Shirota[®], 2S1.9, 2S1".12 b y 2S1.37 b. La fotografía de la última fila corresponde al control negativo.

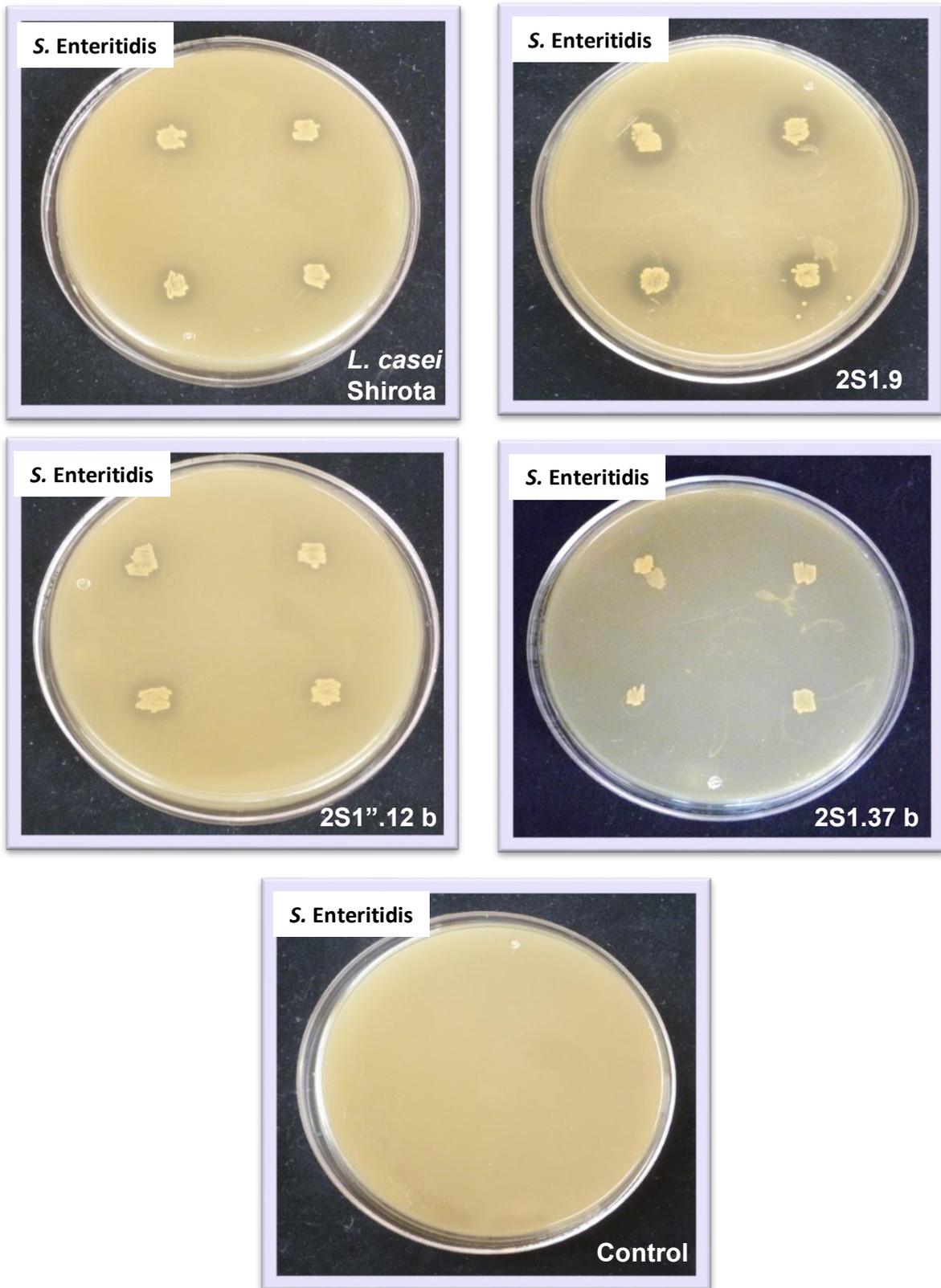


Figura 8. Halos de inhibición generados sobre el desarrollo de *S. Enteritidis* por los lactobacilos: *L. casei* Shirota®, 2S1.9, 2S1".12 b y 2S1.37 b. La fotografía de la última fila corresponde al control negativo.

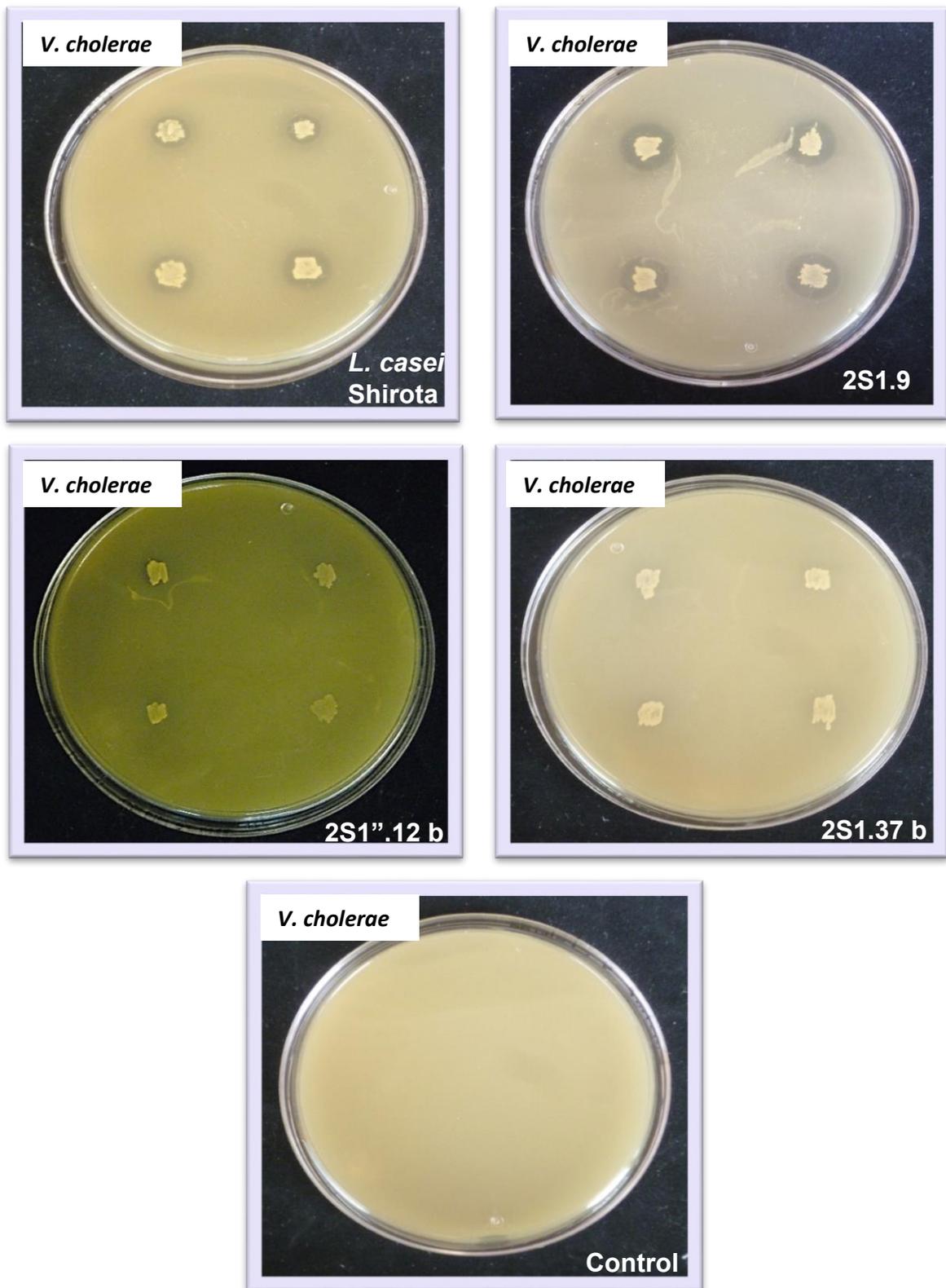


Figura 9. Halos de inhibición generados sobre el desarrollo de *V. cholerae* por los lactobacilos: *L. casei* Shirota®, 2S1.9, 2S1.12 b y 2S1.37 b. La fotografía de la última fila corresponde al control negativo.

8.7 Evaluación cuantitativa (UFC/mL) de resistencia a medio ácido con sales biliares de las cepas que mostraron mejor potencial probiótico

La evaluación de resistencia a las condiciones gastrointestinales *in vitro* de forma cuantitativa, por medio del recuento en placa por extensión superficial, se llevó a cabo para dos de las cepas que mostraron mejor potencial probiótico (2S1.9 y 2S1."12 b) y la referencia, *L. casei* Shirota®. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Resistencia de las cepas con potencial probiótico a sales biliares y ácido, en términos de células viables

Cepa	Cuantificación UFC/mL		
	Antes del reto (24 h en CMRS, 37 °C/ anaerobiosis)	Después del reto (24 h en pH= 3.5 + 0.3 % SB, 37 °C/ anaerobiosis)	Después del medio de recuperación (24 h en CMRS, 37 °C/anaerobiosis)
2S1.9	34 x 10 ⁹	12 x 10 ⁵ (0.004 %)*	39 X 10 ⁸ (11.5 %)*
2S1."12 b	37 X 10 ⁹	65 x 10 ⁵ (0.02 %)*	42 X 10 ⁸ (11.35 %)*
<i>L.casei</i> Shirota®	10 x 10 ⁸	39 (0.000004 %)*	N/D

*Entre paréntesis el porcentaje de sobrevivencia con respecto a la cuenta inicial, antes del reto.

Por medio de este ensayo se determinó, en términos de colonias viables, la sobrevivencia de las cepas aisladas (2S1.9 y 2S1."12 b) al medio de simulación de condiciones gastrointestinales. Por el desarrollo observado para ambas cepas en el medio de estrés, a pesar de que éste se vio disminuido (Tabla 11) de 10⁸ UFC/mL a 10⁵ UFC/mL (0.004 y 0.02 % de sobrevivencia con respecto a la población inicial), es posible asegurar que ambos aislados podrían tener la capacidad de sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal (a través de las condiciones ácidas del estómago y sales biliares al inicio del intestino delgado) e incluso desarrollarse posteriormente, ya que en ambos casos el crecimiento fue abundante (10⁸ UFC/mL) en el medio de recuperación, lo que podría ser determinante al momento de ejercer el efecto benéfico, atendiendo a la importancia de mostrar un buen crecimiento en el intestino ya que de acuerdo

con la definición de probiótico (FAO/OMS, 2002) estos microorganismos deben estar en cantidades adecuadas, típicamente los alimentos que los contienen deben tener al menos 10^6 - 10^7 UFC/mL (Argyri *et al.*, 2013).

La cepa de referencia, *L. casei* Shirota[®], presentó en cambio un desarrollo escaso después de ser sometida al medio de estrés, disminuyendo de 10^8 UFC/mL que había inicialmente a 39 UFC/mL (0.000004 % de sobrevivencia), y después del recuento en placa a partir del medio de recuperación, no fue posible para esta cepa, con el mismo método utilizado para los aislados, detectar ninguna célula viable. El resultado anterior contrasta con lo hallado en investigaciones anteriores en los que la resistencia de *L. casei* Shirota[®] a un pH bajo y en presencia de sales biliares ha sido demostrada mediante ensayos *in vitro* (Guo *et al.*, 2009; Argyri *et al.*, 2013; Peres *et al.*, 2014); sin embargo, es importante notar que en los estudios en los que se evalúa el potencial probiótico, incluidos los de Pennachia *et al.* (2004) y Lacerda-Ramos *et al.* (2013), la resistencia a ambos factores es generalmente determinada por separado y en éste trabajo, en cambio, ambos fueron combinados, lo cual pudo haber afectado la resistencia de la cepa de referencia pero permitió determinar la sobrevivencia de los aislados bajo condiciones más estrictas de tolerancia a condiciones gastrointestinales.

8.8 Identificación de cepas con potencial probiótico

8.8.1 Identificación molecular por análisis de secuencias de ADNr 16S

La identificación molecular fue llevada a cabo para las 14 cepas aisladas que mostraron características propias de microorganismos probióticos en los ensayos anteriores, así como para la cepa utilizada como referencia.

8.8.1.1 Extracción de ADN cromosomal y electroforesis en gel de agarosa

Para verificar la correcta extracción del ADN y evaluar la integridad del mismo se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, los resultados del corrimiento se muestran en la Figura 10.

En bacterias el DNA cromosomal tiene un peso que va de 600 a 10,000 kb (Cole y Saint-Girons, 1999); por lo que en el gel de electroforesis (Figura 10), donde se observó una banda por encima de la banda del peso más alto del marcador (10 kb), fue posible verificar la extracción, a pesar de que la banda se observó muy tenue o apenas visible en algunos casos. Así mismo se verificó su integridad, al observarse una banda única en el gel.



Figura 10. DNA cromosomal de los lactobacilos aislados a partir del pulque. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % con bromuro etidio 0.04%. Velocidad de corrida 100 V. Marcador de peso molecular (MPM): O`GeneRuler 1kb DNA ladder (Thermo Scientific TM): Carril 1. 2S1.9, Carril 2. 2S1.14 td, Carril 3. 2S1.12, Carril 4. 1S1.27, Carril 5. 2S1.37 b, Carril 6. 1S1.16, Carril 7. 2S1.28 b, Carril 8. 2S1.28 t, Carril 9. 1S1'.16 b, Carril 10. 1S1'.15, Carril 11. 1S1'.37, Carril 12. 2S1".12 b, Carril 13. 1S1'.33, Carril 14. 1S1'.18.

8.8.1.2 Amplificación del ADNr 16S por PCR

Para analizar la amplificación del gen ADNr 16S por PCR como se describe en la sección 7.10.1.3, se realizó al igual que para verificar la extracción de ADN cromosomal una electroforesis en gel de agarosa (Figura 11).

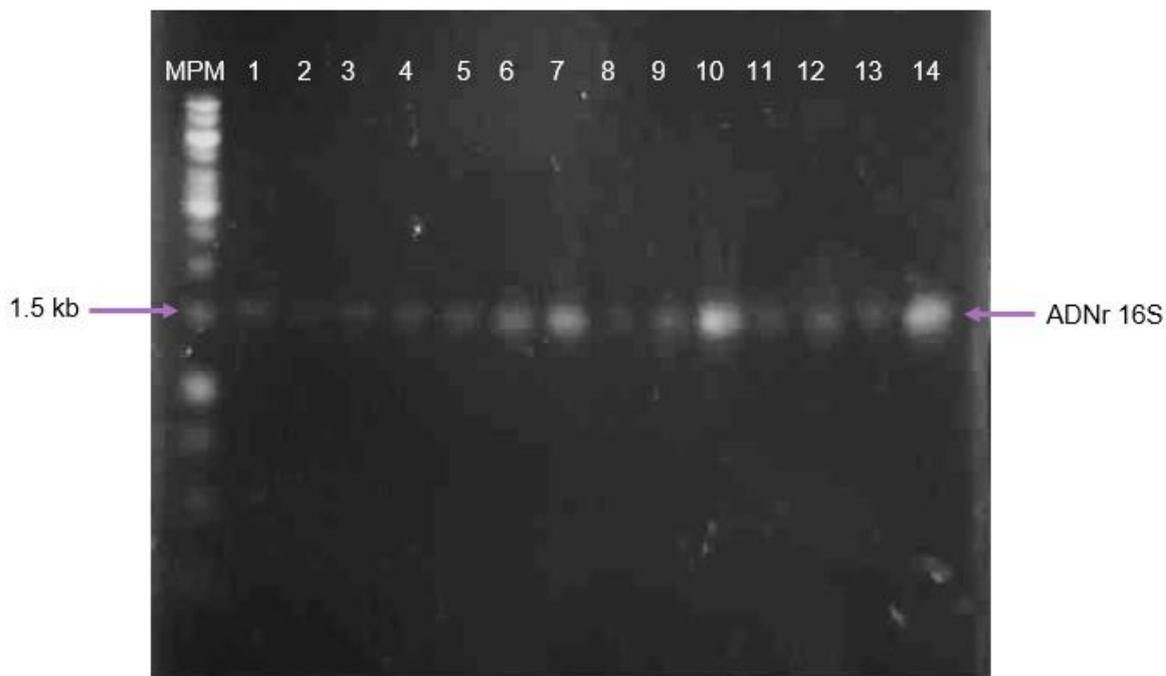


Figura 11. Amplificación del gen ADNr 16S de las cepas aisladas del pulque. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % con bromuro etidio 0.04%. Velocidad de corrida 100 V. Marcador de peso molecular (MPM): O`GeneRuler 1kb DNA ladder (Thermo Scientific™): Carril 1. 2S1.9, Carril 2. 2S1.14 td, Carril 3. 2S1.12, Carril 4. 1S1.27, Carril 5. 2S1.37 b, Carril 6. 1S1.16, Carril 7. 2S1.28 b, Carril 8. 2S1.28 t, Carril 9. 1S1'.16 b, Carril 10. 1S1'.15, Carril 11. 1S1'.37, Carril 12. 2S1''.12 b, Carril 13. 1S1'.33, Carril 14. 1S1'.18.

Se observó que la cantidad obtenida de ADN cromosomal fue suficiente para llevar a cabo la reacción de amplificación por PCR del gen ADNr 16S en todos los casos, lo cual pudo corroborarse mediante el análisis por electroforesis en gel de agarosa (1%). En el gel, se observó la presencia de una banda a la misma altura de la banda que corresponde a un peso de 1.5 kb en el marcador de peso molecular, lo que demuestra la correcta amplificación del gen ribosomal ya que con los primers utilizados, fD1 y rD1, el tamaño esperado del gen amplificado corresponde a 1.5 kb (Weisburg *et al.*, 1991).

La concentración de ADN en los productos de PCR fue determinada además con el equipo NanoDrop™ de Thermo Scientific, los resultados, expresados en ng/ μ L, se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Concentración de ADN en productos de PCR

Cepa	Concentración de DNA (ng/ μ L)
2S1.9	16.1
2S1.14 td	12.4
2S1.12	21.9
1S1.27	21.8
2S1.37 b	23.8
1S1.16	24.9
2S1. 28 b	33.5
2S1. 28 t	35.0
1S1'16 b	22.6
1S1'15	27.8
1S1'.37	24.3
2S1".12 b	31.8
1S1'.33	19.8
1S1'18.	27.2

De acuerdo con la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del IBT de la UNAM (donde se llevó a cabo la secuenciación), la concentración mínima requerida del producto de PCR es de 6.75-7.5 ng/ μ L; por lo que de acuerdo al resultado obtenido fue suficiente para todas las muestras (Tabla 12).

8.8.1.3 Análisis de secuencias de ADNr 16S

El análisis de secuencias se llevó a cabo, como se mencionó en la metodología, por medio de la comparación de las mismas en la base de datos del GeneBank, utilizando el programa BLAST para determinar su identidad.

Los resultados de la identificación se muestran en la Tabla 13. En ésta se presentan, como referencia, las secuencias del gen ADNr 16S de cepas, provenientes de diversas fuentes y que se encontraban previamente depositadas en la base de datos, con las que los aislados tuvieron un mayor porcentaje de identidad (99-100 %).

Tabla 13. Identidad de los aislados con base en el análisis de la secuencias de ADNr 16S.

Cepa	Identidad	Identidad (%)	Valor de expectancia	QC (%)	No. de accesión referencia más cercana
2S1.9	<i>Lactobacillus plantarum</i> IMAU80059	99	0.0	100	GU125481.1
2S1.14 td	<i>Lactobacillus brevis</i> IMAU80062	99	0.0	100	GU125484.1
2S1.12	<i>Lactobacillus brevis</i> IMAUFB036	99	0.0	100	JQ805655.1
1S1.27	<i>Lactobacillus brevis</i> PB117	99	0.0	94	JN792496.1
2S1.37 b	<i>Lactobacillus brevis</i> BSO 464	99	0.0	100	JX398133.1
1S1.16	<i>Lactobacillus brevis</i> JH-1	99	0.0	100	FJ824740.1
2S1. 28 b	<i>Lactobacillus brevis</i> JNB23	100	0.0	100	JQ741972.1
2S1. 28 t	<i>Lactobacillus brevis</i> BIM B-531	100	0.0	100	JF965389.1
1S1'.16 b	<i>Lactobacillus brevis</i> IMAU80121	99	0.0	99	GU125543.1
1S1'.15	<i>Lactobacillus brevis</i> IMAU:80562	99	0.0	99	HM058758.1
1S1'.37	<i>Lactobacillus brevis</i> LAB24	100	0.0	100	KC753454.1
2S1".12 b	<i>Lactobacillus brevis</i> LPf100	99	0.0	100	JF718436.1
1S1'.33	<i>Lactobacillus brevis</i> NM152-1	99	0.0	100	HM218598.1
1S1'.18	<i>Lactobacillus brevis</i> Ni417	100	0.0	100	AB601171.1
<i>L.casei</i> Shirota (Referencia)	<i>L.casei</i> Shirota	99	0.0	100	KC768796.1

Dado que el valor e (e-value), que indica la probabilidad de que la identificación se haya hecho al azar, fue en todos los casos de 0.0, y por el valor de cobertura (*Query Cover*, QC), que indica el grado de unión de la secuencia sometida al análisis con una secuencia determinada, de más de 94 %; el resultado obtenido se consideró confiable. Además, la identidad de los aislados fue corroborada de acuerdo a la posición de las secuencias en el árbol filogenético (Figura 12) realizado, para el cual se seleccionaron tres secuencias del gen ADNr 16S, como referencia, de *Lactobacillus brevis* y tres de *Lactobacillus plantarum*. La agrupación observada en el árbol de las secuencias de aislados y de las referencias utilizadas permitió confirmar los resultados obtenidos del BLAST; la posición de las secuencias utilizadas como grupos externos así como los valores de bootstrap otorgaron robustez al análisis.

Con los resultados anteriores de identificación se cubre otro de los aspectos establecido por la Consulta mixta FAO/OMS (2001) con respecto a la necesidad de conocer el género y la especie de las cepas para ser utilizadas como probióticos. Por medio de la identificación molecular se determinó que 13 de los 14 aislados del pulque pertenecen al género/especie *Lactobacillus brevis* y únicamente la cepa 2S1.9, que mostró el mejor potencial probiótico, a *Lactobacillus plantarum*. Mientras que la detección de éste último ya había sido previamente reportada en el pulque (Escalante *et al.*, 2008), se llevó a cabo por primera vez, en este trabajo, la detección de cepas de *Lactobacillus brevis* en la bebida.

A pesar de que se sabe que el potencial probiótico y el efecto benéfico ejercido en el organismo es específico de la cepa; es importante mencionar que diversas cepas de *L. plantarum* se reportan por varios autores como microorganismos probióticos (De Vries *et al.*, 2006; Candela *et al.*, 2008; Mathara *et al.*, 2008; Georgieva *et al.*, 2008; Zago *et al.*, 2011); y con respecto a *Lactobacillus brevis*, se sabe que aunque este microorganismo no es usado típicamente en productos con probióticos (Lacerda-Ramos *et al.*, 2013), Collins *et al.* (1998) lo menciona en una lista como tal y distintos investigadores han reportado su capacidad probiótica (Rönka *et al.*, 2003; Soo *et al.*, 2008, Ouwehand *et al.*, 2001, Yakabe *et al.*, 2009).

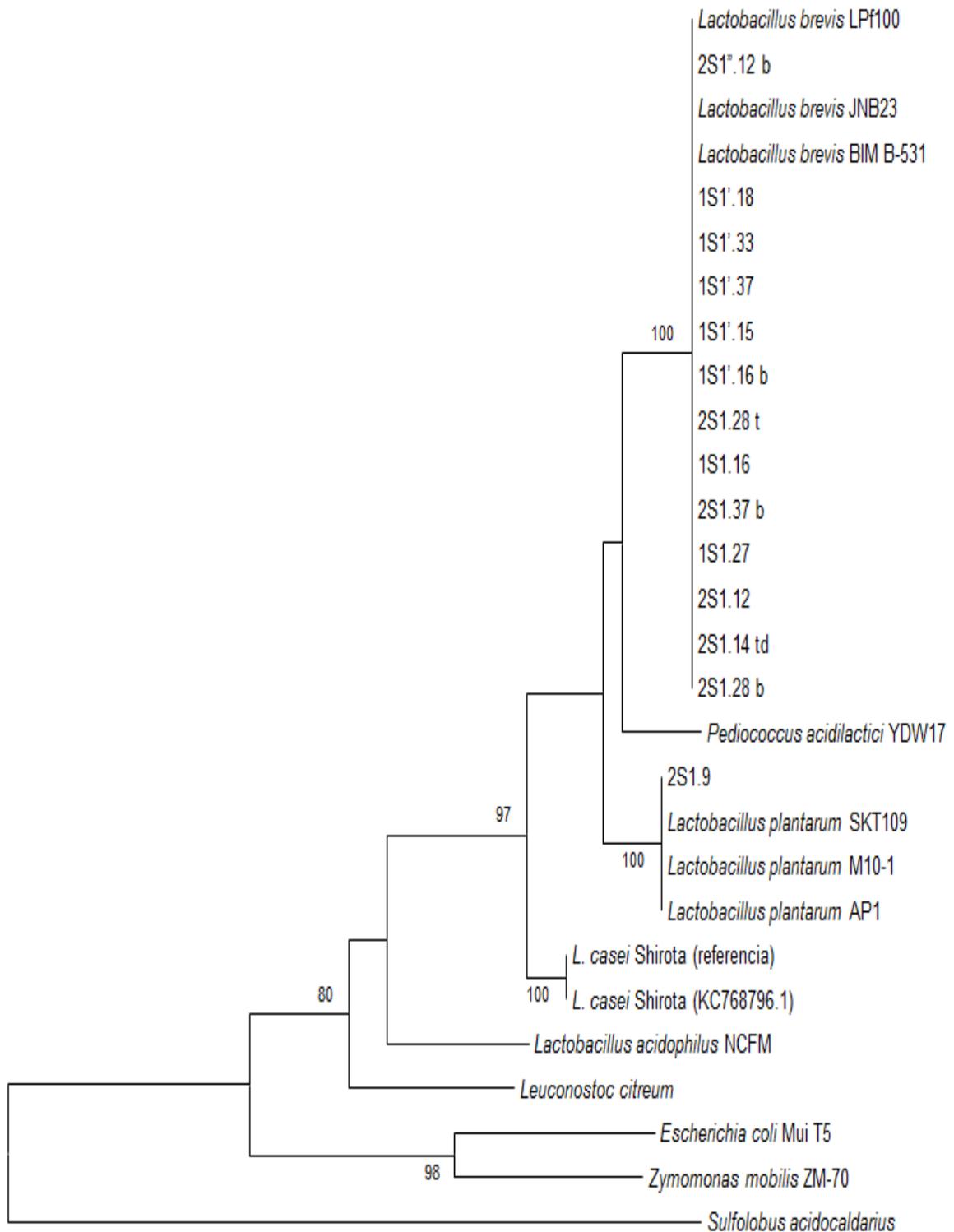


Figura 12. Árbol filogenético elaborado por el método de NJ con las secuencias de 16S rDNA de los aislados de la muestra de pulque S1 y las secuencias con las que se encontró mayor similitud de la base de datos GenBank. *Lactobacillus casei* Shirota (cepa de referencia), *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc citreum*, *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis* y *Sulfolobus acidocaldarius* utilizadas como grupos externos. En las ramas se muestran los valores del análisis bootstrapping mayores a 80.

8.8.2 Identificación bioquímica por el sistema API® 50CH

Con el conocimiento de la capacidad probiótica de las cepas, se seleccionó la mejor (2S1.9) para llevar a cabo la identificación bioquímica por medio del sistema API® 50CH y corroborar su identidad con base en su patrón de fermentación; la técnica también fue utilizada para la identificación de la cepa de referencia. Los patrones fermentativos observados para ambas cepas se muestran en la Figura 13 y se presentan además, junto con la composición de la galería, en el Anexo 5.



Figura 13. Identificación bioquímica por el sistema API® 50 CH. Patrones de fermentación de las cepas 2S1.9 y *Lactobacillus casei* Shirota®, después de 48 horas de incubación a 37 °C.

Los resultados de identificación, obtenidos después de someter los patrones fermentativos a la base de datos de APIweb™ de BioMérieux, se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Identidad de los aislados con base en la identificación bioquímica con API® 50 CH

Cepa	Identificación Fenotípica	% Identificación	Calidad de la identificación
2S1.9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	94.4	Buena
<i>L. casei</i> Shirota®	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99.9	Buena

La identificación bioquímica por este método se correlaciona con el resultado obtenido para ambas cepas en la identificación molecular por medio del análisis de secuencias del ADNr 16S (Tabla 15). De esta forma, se comprobó la identidad del aislado 2S1.9 como un *L. plantarum*; que de acuerdo al perfil de fermentación observado en el API® 50 CH, tiene la capacidad de utilizar carbohidratos como la glucosa, sacarosa y fructosa que probablemente se encontraban en una concentración más alta en el pulque dado que se ha reportado que éstos, junto con la inulina y los fructooligosacáridos (FOS), son aquellos azúcares presentes mayoritariamente en el aguamiel y en los jarabes de agave (Escalante *et al.*, 2012; Mellado-Mojica y G. López, 2015).

Para la cepa de referencia, la identidad determinada por este método (identificación bioquímica por medio del sistema API® 50CH) corresponde a un *Lactobacillus paracasei*, con un 99 % en la identificación. Con éste resultado se comprobó también que la cepa corresponde a la referencia dado que actualmente la bacteria ampliamente conocida por su uso comercial como *Lactobacillus casei* Shirota® ha sido reclasificada como perteneciente a las especies de *Lactobacillus paracasei* (JCICSB, 2008, citado por Sutula *et al.*, 2012). Ambas pertenecen al grupo de *L. casei* y son difícilmente diferenciadas bioquímicamente (Klein *et al.*, 1998).

Tabla 15. Resumen comparativo de caracterización e identificación del aislado del pulque con mejor potencial probiótico y la cepa utilizada de referencia.

Cepa	Características morfológicas	Características microscópicas	Catalasa	Identificación molecular por análisis de secuencias de ADNr 16S	Identificación fenotípica por el sistema API® 50 CH
2S1.9	Colonias planas, de color blanco, con bordes enteros	Bacilos cortos Gram-positivo	Negativo	<i>Lactobacillus plantarum</i> IMAU80059	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>L. casei</i> Shirota®	Colonias puntiformes de color blanco, brillantes	Bacilos cortos Gram-positivo	Negativo	<i>L. casei</i> Shirota	<i>Lactobacillus paracasei</i>

9. CONCLUSIONES

- Se logró el aislamiento de setenta y cinco lactobacilos a partir de dos de las tres muestras de pulque, provenientes de la población de Huitzilac, Morelos; los cuales fueron conservados a mediano y largo plazo por ultracongelación a -70 °C.
- De los setenta y cinco lactobacilos aislados, catorce mostraron características deseables para ser considerados como probióticos, es decir, resistencia a condiciones gastrointestinales *in vitro* y actividad antagónica contra patógenos.
- Entre los catorce aislados, el mejor potencial como probiótico fue observado para la cepa etiquetada como 2S1.9 pues presentó una excelente actividad antibacteriana contra patógenos y capacidad de mantenerse viable (UFC/mL) después de ser sometida al medio de simulación de condiciones gastrointestinales, en ambos casos, mejor a la observada para la cepa de referencia (*L.casei* Shirota®). Por medio del análisis de secuencias de ADNr 16S y la identificación bioquímica con API® 50 CH se determinó que esta cepa (2S1.9) corresponde a un *Lactobacillus plantarum*; mientras que el resto de los aislados (trece de los catorce) pertenecen al género/especie *Lactobacillus brevis*.
- Las cepas aisladas e identificadas en este trabajo demuestran una vez más los beneficios asociados al consumo de pulque y podrían constituir una excelente alternativa como microorganismos probióticos que puedan ser incorporados en matrices no lácteas; sin embargo, será necesario llevar a cabo estudios posteriores.

10. PERSPECTIVAS

- Confirmar la capacidad probiótica de los lactobacilos aislados por medio de ensayos complementarios *in vitro* como la evaluación de adherencia a células epiteliales humanas y por medio de la evaluación de su actividad *in vivo*.
- Realizar estudios para identificar los metabolitos con actividad antimicrobiana producidos por la cepa 2S1.9, que mostró una excelente inhibición del desarrollo de patógenos.
- Realizar la identificación de la población total de lactobacilos aislados con la finalidad de conocer más a fondo la distribución de estos microorganismos en el pulque y si entre estos se encuentra *L. acidophilus* que se ha reportado como el lactobacilo más abundante en la bebida.

11. REFERENCIAS

1. Alakomi H.L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K., Helander I.M. (2000). Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2001–2005.
2. Aldama- Ramírez A. F., Velasco-Pegueros A., Onofre-González B.L., Alemán-Torres M.A., Rodríguez-Tobón N., Jiménez- Báez P.A., Ortega-Aguilar U. (2012). *Los recuerdos del porvenir: Las pulquerías en la Ciudad de México*. México: Colectivo el Tinacal.
3. Alvarado-Rivas C., Díaz-Rivero C. (2009). Estudio preliminar del potencial probiótico de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 51, 8-14.
4. Argyri A. A., Zoumpopoulou G., Karatzas K. G., Tsakalidou E., Panagou E. Z., Tassou C.C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33, 282-291.
5. Aureli P., Capurso L., Castellazzi A. M., Clerici. M., Giovannini, M., Morellif, L., Poli A., Pregliasco F., Salvinii F., Zuccottil, G. V. Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacological Research*, 63, 366-376.
6. Begley M., Gahan C.G., Hill C., 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Letters*, 29, 625-651.
7. Campos I. (2010). *Aislamiento e identificación de bacterias lácticas del pulque con capacidad probiótica*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
8. Candela M., Perna F., Carnevali P., Vitali B., Ciati R., Giochetti P., Rizzello F., Campieri M., Brigidi P. (2008). Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 286-292.

9. Cebeci A., Gürakan C. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology*, 20, 511–518.
10. Cerón I. (2014). *Estudio de la capacidad probiótica in vitro de la cepa de Leuconostoc P45 aislada del pulque*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
11. Cervantes A. (2010). *Identificación de cepas de bacterias lácticas por criterios fenotípicos y análisis de secuencias del gen ADN ribosomal 16S*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
12. Cole S. T., Saint-Girons I. (1999). Bacterial genomes-all shapes and sizes. En: R. L. Charlebois (Ed.), *Organization of the prokaryotic genome* (pp.35-62). Washington, E.E.U.U: American Society for Microbiology.
13. Collins J.K., Thornton K., Sullivan G.O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, 8, 487-490.
14. Conway PL., Gorbach SL., Goldin BR. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 70, 1-12.
15. Cuervo J. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales*. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana.
16. De Castro S., Pérez J.L. (2006). Fisiopatología y patogenia general del aparato digestivo. En De Castro, S. y Pérez, J.L. *Manual de Patología General*. Barcelona España: MASSON, pp 338-345.
17. De Vries M.C., Vaughan E.E., Kleerebezem M., de Vos W.M. (2006). *Lactobacillus plantarum* - survival, functional and potential probiotic properties in the human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 16, 1018-1028.
18. Durán A. (2011). Rescatan bebida de los dioses. *El Universal*. Recuperado de: < <http://www.eluniversal.com.mx/noticias.html> >

19. Endo A., Dicks M.T. (2014). Physiology of the LAB. En W.H. Holzapfel, J.B. Wood (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. UK: WILEY Blackwell.
20. Escalante A., Rodriguez M., Martinez A., Lopez-Munguía A., Bolívar F., Gosset G. (2004). Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235, 273-279.
21. Escalante A., Giles-Gómez M., Hernández G., Córdova-Aguilar M., Lopez-Munguía A., Gosset G., Bolívar F. (2008). Analysis of bacteria community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 126-134.
22. Escalante A., Giles-Gómez M., Esquivel-Flores G., Matus Acuña V., Moreno Terrazas R., López-Munguía A., Lappe-Olivera P. (2012). Pulque Fermentation. En: En Y.H. Hui (Ed.), *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology* (pp. 691-706). Boca Ratón, Estados Unidos: CRC Press.
23. FAO/WHO. (2002). Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada.
24. Ganong W. (1996). Regulación de la función gastrointestinal. En: Ganong, W. *Fisiología Médica*. México D.F: El Manual Moderno, pp: 517-519.
25. García-Garibay M., López Munguía A. (1993). Bebidas alcohólicas no destiladas. En: García-Garibay M, Quintero-Ramírez R, López-Munguía A. (Ed). *Biotecnología Alimentaria* (pp. 263–311). México, D.F.: LIMUSA.
26. Georgieva R., Iliev I., Chipeva V.A., Dimitonova S.P., Samelis J., Danova S. (2008). Identification and vitro characterization of *Lactobacillus plantarum* strains from artisanal Bulgarian white brined cheeses. *Journal of Basic Microbiology*, 48, 234-244.27.
27. Gomes A., Malcata F. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 139-157.

28. Guo Z., Wang J., Yan L., Chen W., Liu X., Zhang H. (2009). In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1640–1646.
29. Holzapfel WH., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis JHJ.(1998) Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 85–101.
30. Holzapfel W. H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., y Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 365S-373S.
31. ISO-IDF (International Organization for Standardization- International Dairy Federation). 2006. Milk products—Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium—Colony-count technique at 37°C. Estandar Internacional ISO 20128:2006 IDF 192:2006(E). ISO, Ginebra, Suiza; IDF, Bruselas, Bélgica.
32. Jensen H., Grimmer S., Naterstad K., Axelsson L. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Food Microbiology*, 153, 216–222.
33. Juárez E. (2013). *Estudio de la diversidad bacteriana no cultivable presente en el suelo de cultivo de caña durante las primeras etapas del ciclo de producción*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
34. Klein G., Pack A., Bonaparte1 C., Reuter G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 103–125.
35. Kotzampassi K., Giamarellos-Bourboulis E. J. (2012). Probiotics for infectious diseases: more drugs, less dietary supplementation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40, 288-296.
36. Lacerda-Ramos C., Thorsen L., Freitas-Schwan R., Jespersen L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiology*, 36, 22-29.

37. Lappe-Oliveras P., Moreno-Terrazas R., Arrizon-Gaviño J., Herrera-Suárez T., García-Mendoza A., Gschaedler- Mathis A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic non distilled and distilled *Agave* beverages. *FEMS Yeast Research*, 8, 1037–52.
38. Mathara J.M., Schillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K., Guigas C., Franz C., Holzapfel W.H. (2008). Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. *Current Microbiology*, 56, 315-321.
39. Matus V. (2011). *Caracterización de la capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas del pulque*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
40. Mellado-Mojica E., López M. (2015). Identification, classification, and discrimination of agave syrups from natural sweeteners by infrared spectroscopy and HPAEC-PAD. *Food Chemistry*, 167, 349–357.
41. Mombelli B., Gismondo M. R. (2000). The use of probiotics in medical practice. *International Journey of Antimicrobial Agents*, 16, 531-536.
42. Monteagudo-Mera A., Rodríguez-Aparicio L., Rúa J., Martínez-Blanco H., Navasa N., García-Armesto M.R., Ferrero M.A. (2012). In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*, 4, 531-541.
43. Monterrubio AL. (2007). *El maguey y el pulque en México*. En: Las haciendas pulqueras de México (pp.41-56). México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
44. Ouwehand A.C., Tuomola E.M., Tölkkö S., Salminen S. (2001). Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 119–126.45.
45. Pennachia C., Ercolini D., Blaiotta G., Pepe O., Mauriello G., Villani F. (2004). Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science*, 67, 309–317.

46. Parra R. (2010). Review. Bacterias Ácido Lácticas: Papel Funcional en los Alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8, 93-105.
47. Peres C. M., Alves M., Hernandez-Mendoza A., Moreira L., Silva S., Bronze M.R., Vilas-Boas L., Cidália P., Malcata F.X. (2014). Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. *LWT-Food Science and Technology*, 59, 234-246.
48. Ramírez J.C., Rosas P., Velázquez M.Y., Ulloa J.A., Arce F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 2, 1-16.
49. Rodríguez M. (2009). *Aislamiento y Selección de cepas del género Lactobacillus con capacidad probiótica e inmunomoduladora*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona.
50. Rönka E., Malinen E., Saarela M., Rinta-Koski M., Aarnikunnas J., Palva A. (2003). Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 63– 74.51.
51. Saad N., Delattre C., Urdaci M., Schmitter J.M., Bressollier P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 1-16.
52. Salminen S., Von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., De Vos W.M., Fonden R., Saxelin M., Collins K., Mongensen G., Birkeland S.E. y Mattila-Sandholm T. (1998). Demonstration of safety of probiotics- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 93-106.
53. Servin A., Coconnier M. (2003). Adhesion of probiotic strains to intestinal mucosa and interactions with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17, 741–754.
54. Schlee M., Wehkamp J., Altenhoefer A., Oelschlaeger T.A., Stange E.F., Fellermann K. (2007). Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infection and Immunity*, 75, 2399–2407.

55. Soccol C.R., De Dea Lindner J., Yamaguishi C.T, Rigon Spier M., Porto de Souza Vandenberghe L., Soccol V. T. (2012). Probiotic Nondairy Beverages. En Y.H. Hui (Ed.), *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology* (pp. 707-728). Estados Unidos: CRC Press.
56. Soo I., Madsen K.L., Tejpar Q., Sydora B.C., Sherbaniuk R., Cinque B., Di Marzio L., Cifone M.G., Desimone C., Fedorak R.N. (2008). VSL#3 probiotic upregulates intestinal mucosal alkaline sphingomyelinase and reduces inflammation. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 22, 237–242.
57. Sutula J., Coulthwaite L., Verran J. (2012) Culture media for differential isolation of *Lactobacillus casei* Shirota from oral samples. *Journal of Microbiological Methods*, 90, 65-71.
58. Tamura K., Stetcher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
59. Tulumoglu S., Yuksekdag ZN., Beyatli Y., Simsek O., Yasar E. (2013). Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. *Anaerobe*, 24, 36-42.
60. Turpin W., Humblot C., Thomas M., Guyot J.P. (2010) *Lactobacilli* as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanism. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 87–102.
61. Vinderola, G., Capellinib, B., Villarreala, F., Suáreza, V., Quiberonia, A., Reinheimera, J. (2008). Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1678–1688.
62. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R, Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K., Whitman, W. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Estados Unidos, NY: Springer.
63. Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D. y Lane, D. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 697-703.

64. Wohlgemuth S., Loh G., Blaut M. (2010). Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 3-10.
65. Yakabe, T., Moore, E.L, Yokota, S., Sui, H., Nobuta, Y., Fukao, M., Palmer, H., Yajima N. (2009). Safety assessment of *Lactobacillus brevis* KB290 as a probiotic strain. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2450–2453.
66. Zago, M., Fornasari M.E, Carminati, D., Burns, P., Vinderola, G., Reinheimer, J., Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheese. *Food Microbiology*, 28, 1033-1040.
67. Zamudio K, Zavaleta A. (2003). Estudio del potencial probiótico de lactobacilos aislados de fuentes naturales. *Ciencia e Investigación*, 6, 30-35.

12. ANEXOS

Anexo 1. Metodología de extracción de ADN cromosomal con el sistema comercial UltraClean™ Microbial isolation kit (Mobio).

1. La suspensión en 1.8 mL de CMRS, de cada cultivo al cual se le extrajo el ADN, se centrifugó a 10,000 xg por 30 segundos, a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó con una punta de micropipeta.
2. El pellet celular se resuspendió en 300 µL de la solución proporcionada por el proveedor: “MicroBead solution” (compuesta de sales y un buffer), cuya función es estabilizar y dispersar homogéneamente las células microbianas antes de la lisis.
3. Se mezcló con ayuda del vórtex y las células resuspendidas se transfirieron al tubo “Microbead Tube” (proporcionado por el proveedor).
4. Se adicionaron 50 µL de la solución “MD1” (compuesta por SDS y otros agentes disruptores) al tubo MicroBead y se mezcló en vórtex a máxima velocidad por 10 minutos. En este paso se crearon las condiciones químico-mecánicas combinadas para llevar a cabo la lisis celular requerida para liberar los ácidos nucleicos.
5. Se prosiguió a centrifugar a 10, 000 xg por 1 minuto, a temperatura ambiente, y el sobrenadante resultante, donde permaneció el ADN, se transfirió a un tubo de colecta de 2 mL.
6. Se adicionaron 100 µL de la solución “MD2” al tubo con el sobrenadante (la solución precipita los contaminantes del ADN, incluyendo restos celulares y proteínas). Se mezcló en vórtex por 5 segundos e incubó a 4 ° C por 5 minutos.
7. El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo de colecta limpio y se agregaron 900 µL de la solución “MD3”, una solución salina concentrada necesaria para la unión del ADN al “Spin Filter” en el siguiente paso.

8. Se cargaron 700 μL de la mezcla anterior (sobrenadante con solución "MD3") en el tubo "Spin Filter"; en éste, el ADN se une selectivamente a la membrana sílica del filtro y los contaminantes pasan a través, eliminándose en el sobrenadante.
9. La operación anterior se repitió de dos a tres veces, descartando el sobrenadante. Posteriormente se adicionaron al "Spin Filter" 300 μL de la solución "MD4" (solución de lavado base etanol para la limpieza del ADN, se remueven sales y otros contaminantes mientras este permanece unido al filtro), se centrifugó a 10, 000 xg por 30 segundos y el líquido remanente se desechó.
10. Se centrifugó nuevamente a 10, 000 xg por 1 minuto para la eliminación de los restos de la solución anterior.
11. El filtro se colocó en un nuevo tubo de colecta y al centro de la membrana se agregaron 50 μL de la solución "MD5" (buffer de elución: Tris 10 mM, pH=8, sin sal).
12. Se centrifugó 30 segundos a 10, 000 xg, a temperatura ambiente, y se desechó el filtro, conservando en el líquido el ADN.
13. El ADN se almacenó, hasta su uso, a -20°C .

Anexo 2. Metodología de purificación de ADN con el sistema comercial Pure Link™ PCR Purification kit (Invitrogen).

1. Al producto de PCR obtenido (50 µL) se le adicionaron cuatro volúmenes del buffer “PureLink™ Binding Buffer” con isopropanol y se mezcló bien. Este buffer crea las condiciones para la unión selectiva del ADN a la membrana de sílica (“Pure Link™ Spin Column”) en presencia de sales caotrópicas.
2. En un tubo de colecta se colocó la columna “Pure Link™ Spin Column” y se añadió la muestra.
3. Se centrifugó a 10, 000 xg por 1 minuto, temperatura ambiente.
4. El líquido que pasó a través de la columna se eliminó y ésta se colocó nuevamente en el tubo de colecta.
5. Se agregaron 650 µL del buffer de lavado con etanol (permite la eliminación de impurezas) a la columna y se centrifugó a 10, 000 xg por 1 minuto, temperatura ambiente. El líquido que atravesó la columna se desechó y ésta se colocó una vez más en el tubo de colecta.
6. Se centrifugó a velocidad máxima de dos a tres minutos y temperatura ambiente, con la finalidad de eliminar cualquier residual del buffer de lavado. El tubo de colecta se descartó.
7. La columna se colocó en un nuevo tubo de colecta de 1.7 mL “PureLink™ Elution Tube” y se añadieron al centro 50 µL del buffer de elución (Tris-HCl 10 mM, pH=8.5) para liberar el ADN.
8. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto, tras lo cual se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos. El ADN purificado se obtuvo en el tubo de colecta y la columna se desechó.
9. El producto purificado se almacenó, hasta su uso, a -20 °C.

Anexo 3. Características morfocoloniales de las cepas aisladas, tinción de Gram y prueba de la catalasa.

Cepa	Catalasa	Tinción de Gram	Descripción colonial
2S1. 11 b	Negativo	Bacilos largos Gram-positivo.	Colonias blanquecinas, circulares convexas, con bordes enteros.
2S1. 11 ct	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo, algunos en cadenas.	Colonias planas pequeñas, de color crema, con bordes ondulados.
2S1. 32	Negativo	Bacilos Gram-positivo, individuales o en cadenas.	Colonias convexas circulares, de color blanco, brillantes y con bordes enteros.
2S1. 34	Negativo	Bacilos Gram-positivo, formando cadenas.	Colonias convexas circulares, de color blanco, brillantes y con bordes enteros.
1S1. 29	Negativo	Bacilos Gram-positivo.	Colonias convexas circulares, de color blanco, brillantes y con bordes enteros.
1S1. 10	Negativo	Bacilos Gram-positivo, cortos y anchos.	Colonias convexas circulares, de color blanco, brillantes.
2S1. 9	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo.	Colonias planas, de color blanco, con bordes enteros.
2S1. 40 gd	Negativo	Bacilos Gram-positivo, delgados, algunos en cadenas.	Colonias grandes, con centro blanco y bordes transparentes crenados.
2S1.7	Negativo	Bacilos Gram-positivo, algunos formando largas cadenas.	Colonias convexas, blanquecinas, con bordes enteros.
1S1. 31	Negativo	Bacilos Gram-positivo, individuales o formando cadenas.	Colonias circulares convexas, blanquecinas y con bordes enteros.
2S1. 21 cpr	Negativo	Bacilos Gram-positivo, cortos y formando cadenas.	Colonias circulares blancas y con bordes ondulados.
2S1. 21 cb	Negativo	Bacilos Gram-positivo, delgados.	Colonias blancas, opacas, con bordes ondulados.
2S1.21 cgd	Negativo	Bacilos Gram-positivo, formando largas cadenas.	Colonias planas de color crema con bordes ondulados.
2S1.39 cbb	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo.	Colonias circulares pequeñas de color crema.
2S1.15	Negativo	Bacilos Gram-positivo cortos, individuales y formando cadenas.	Colonias blancas brillantes, con bordes enteros.
2S1. 14 tb	Negativo	Bacilos Gram-positivo.	Colonias pequeñas, blanquecinas, con bordes enteros.
2S1. 14 td	Negativo	Bacilos Gram-positivo.	Colonias de color crema brillante, con bordes transparentes e irregulares.
2S1.12	Negativo	Bacilos Gram-positivo.	Colonias pequeñas con bordes enteros, blancas y brillantes.

Cepa	Catalasa	Tinción de Gram	Descripción colonial
2S1.44	Negativo	Bacilos cortos y anchos Gram-positivo.	Colonias circulares blancas, pequeñas y con bordes enteros.
1S1.11	Negativo	Bacilos Gram-positivo, aislados o en cadenas.	Colonias planas, color crema con bordes ondulados.
2S1.5	Negativo	Bacilos largos Gram-positivo.	Colonias blancas, con centro blanco y bordes transparentes crenados
1S1.25	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo.	Colonias circulares, color crema, transparentes y planas con bordes enteros.
1S1.33t	Negativo	Bacilos Gram-positivo.	Colonias planas, color crema con bordes ondulados.
2S1.10pt	Negativo	Bacilos Gram-positivo.	Colonias circulares pequeñas, color crema y con bordes enteros.
1S1.35	Negativo	Bacilos Gram-positivo, aislados o formando cadenas.	Colonias circulares pequeñas, blanquecinas, brillantes y con bordes enteros.
2S1.3	Negativo	Bacilos Gram-positivo aislados o formando largas cadenas.	Colonias color crema, planas y con bordes irregulares.
1S1.15	Negativo	Bacilos anchos Gram-positivo.	Colonias circulares de color blanco, brillantes y convexas, con bordes enteros.
2S1.7	Negativo	Bacilos Gram-positivo, aislados o en cadenas.	Colonias pequeñas blanquecinas, convexas y con bordes enteros.
1S1.27	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo.	Colonias circulares blancas, convexas y con bordes enteros.
2S1.8	Negativo	Bacilos Gram-positivo, aislados o en cadenas.	Colonias blanquecinas, convexas y con bordes crenados.
1S1.32	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo.	Colonias circulares de color blanco, brillantes, convexas y con bordes enteros.
2S1.4	Negativo	Bacilos Gram-positivo, individuales.	Colonias circulares de color crema, circulares y brillantes.
1S1.16b	Negativo	Bacilos Gram-positivo, delgados.	Colonias circulares blancas, brillantes, convexas con bordes enteros.
1S1.12b	Negativo	Bacilos Gram-positivo aislados o en cadenas.	Colonias circulares blancas, brillantes, convexas, con bordes enteros.
1S1.33bd	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo aislados o en cadenas.	Colonias pequeñas, circulares blancas, convexas, con bordes enteros.
2S1.23cb	Negativo	Bacilos Gram-positivo, delgados.	Colonias blancas brillantes, convexas, con bordes ondulados.
2S1.19	Negativo	Bacilos Gram-positivo, anchos.	Colonias de color crema, pequeñas, bordes enteros.
1S1.16	Negativo	Bacilos anchos Gram-positivo, individuales o formando cadenas.	Colonias grandes, blanquecinas, convexas con bordes crenados.
2S1.40pb	Negativo	Bacilos cortos y anchos Gram-positivo.	Colonias circulares pequeñas, blanquecinas, con bordes enteros.

Cepa	Catalasa	Tinción de Gram	Descripción colonial
2S1".22	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo aislados o en cadenas.	Colonias circulares, blancas, brillantes, convexas y con bordes enteros.
2S1".36	Negativo	Bacilos muy cortos Gram-positivo.	Colonias pequeñas circulares, blanquecinas y con bordes enteros.
1S1'.18	Negativo	Bacilos Gram-positivo.	Colonias circulares convexas, blancas, brillantes, bordes enteros.
1S1".33	Negativo	Bacilos Gram-positivo.	Colonias blancas convexas, brillantes, con bordes crenados.
1S1".11	Negativo	Bacilos Gram-positivo aislados o en cadenas.	Colonias pequeñas, color crema, bordes crenados.
2S1.20	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo, formando cadenas.	Colonias circulares blancas, brillantes, convexas y con bordes enteros.
2S1".22	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo, aislados o en cadenas.	Colonias circulares blancas, convexas, brillantes, bordes enteros.
2S1".12 b	Negativo	Cocobacilos Gram-positivo, formando cadenas.	Colonias blancas, brillantes, convexas y con bordes enteros.
2S1.35	Negativo	Bacilos Gram-positivo, algunos en diplobacilos.	Colonias pequeñas, blanquecinas, planas y con bordes enteros.
2S1".5 t	Negativo	Bacilos Gram-positivo individuales o formando cadenas.	Colonias circulares pequeñas, de color crema, con bordes enteros.
1S1'.7	Negativo	Bacilos Gram-positivo.	Colonias circulares pequeñas, blanquecinas y con bordes enteros.
1S1.15	Negativo	Bacilos Gram-positivo individuales o formando cadenas.	Colonias circulares blancas, brillantes, convexas con bordes enteros.
1S1'.8	Negativo	Bacilos Gram-positivo.	Colonias circulares, blancas, brillantes, convexas y con bordes enteros.
2S1.28 b	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo.	Colonias blancas, brillantes, convexas y con bordes enteros.
1S1".22	Negativo	Bacilos delgados Gram-positivo, individuales o formando cadenas.	Colonias circulares, blancas, brillantes y con bordes enteros.
2S1".2	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo.	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes.
1S1'.1	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo.	Colonias circulares pequeñas, color crema, translúcidas.
1S1'.9 b	Negativo	Bacilos Gram-positivo, agrupados en cadenas.	Colonias blancas circulares, brillantes y con bordes enteros.
2S1".3 t	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo, formando cadenas.	Colonias circulares, pequeñas, translúcidas, de color crema.

Cepa	Catalasa	Tinción de Gram	Descripción colonial
2S1".4 t	Negativo	Cocobacilos Gram-positivo, formando cadenas.	Colonias pequeñas, color crema, translúcidas.
2S1".5 b	Negativo	Bacilos anchos Gram-positivo, individuales o formando cadenas.	Colonias circulares pequeñas, de color crema con bordes enteros.
2S1".37 t	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo.	Colonias circulares, blancas, brillantes, con bordes enteros.
2S1.28 t	Negativo	Bacilos cortos y anchos Gram-positivo.	Colonias pequeñas, color crema, brillantes, bordes enteros, convexas.
2S1".1	Negativo	Bacilos Gram-positivo, individuales o formando cadenas.	Colonias blanquecinas, con bordes irregulares crenados
2S1.38 b	Negativo	Bacilos delgados Gram-positivo.	Colonias blancas, circulares, brillantes y convexas.
2S1.2	Negativo	Bacilos Gram-positivo, individuales o formando cadenas.	Colonias circulares pequeñas, color crema y con bordes enteros.
1S1'.16 t	Negativo	Bacilos cortos y anchos Gram-positivo.	Colonias pequeñas circulares, color crema.
2S1".37 b	Negativo	Cocobacilos Gram-positivo.	Colonias blancas, convexas, bordes crenados.
2S1.38 t	Negativo	Bacilos Gram-positivo individuales o formando cadenas.	Colonias circulares pequeñas, color crema, con bordes enteros.
2S1.29	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo.	Colonias pequeñas, color crema, brillantes.
2S1.1	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo, formando largas cadenas	Colonias color crema, planas y con bordes crenados.
1S1'.37	Negativo	Bacilos Gram-positivo, individuales o en cadenas.	Colonias blancas brillantes, convexas, bordes enteros translúcidos.
2S1.37 b	Negativo	Bacilos Gram-positivo.	Colonias blancas, convexas, bordes enteros translúcidos.
2S1.37 t	Negativo	Bacilos cortos formando cadenas.	Colonias pequeñas, color crema, planas con bordes enteros.
1F2.36 b	Negativo	Bacilos cortos Gram-positivo.	Colonias circulares blancas, brillantes, con bordes enteros.
1F2.21	Negativo	Cocobacilos Gram-positivo.	Colonias blancas, circulares, convexas, con bordes enteros.
1F3'.45	Positivo	Bacilos Gram-positivo.	Colonias de color crema, brillantes, bordes irregulares y consistencia gomosa.
1F3'.30	Positivo	Bacilos Gram-positivo.	Colonias circulares pequeñas, de color crema y textura gomosa.
1F3'.31	Positivo	Bacilos Gram-positivo.	Colonias grandes, color crema, convexas, textura gomosa.

Anexo 4. Resultados de resistencia a condiciones gastrointestinales *in vitro* de las cepas aisladas.

Cepa	Réplica	Resistencia a medio de estrés (pH 3.5 y 0.3% sales biliares)	Desarrollo en Agar MRS posterior al medio de estrés
2S1. 11 ct	1	++	+++
	2	++	+++
2S1. 11 b	1	+	-
	2	+	-
2S1. 32	1	+	-
	2	+	-
2S1. 34	1	++	+++
	2	++	+++
1S1. 29	1	-	-
	2	-	-
1S1. 10	1	++	+++
	2	++	+++
2S1. 40 gd	1	+++	+
	2	+++	+
2S1.40 pb	1	+++	+
	2	+++	+
2S1. 9	1	+++	+++
	2	+++	+++
2S1.7	1	+++	++
	2	+++	++
1S1. 31	1	+	+
	2	+	+
1S1.33 t	1	+	-
	2	+	-
1S1.33 bd	1	+++	+++
	2	+++	+++
2S1. 21 cpr	1	-	-
	2	-	-
2S1. 21 cb	1	-	-
	2	-	-

Cepa	Réplica	Resistencia a medio de estrés (pH 3.5 y 0.3% sales biliares)	Desarrollo en Agar MRS posterior al medio de estrés
2S1.21 cgd	1	+	-
	2	+	-
2S1.15	1	++	+
	2	++	+
2S1.10 pt	1	+++	+++
	2	+++	+++
2S1.39 cbb	1	++	+++
	2	++	+++
2S1. 14 tb	1	++	+++
	2	++	+++
2S1. 14 td	1	+++	+++
	2	+++	+++
2S1.12	1	+++	+++
	2	+++	+++
2S1.44	1	++	++
	2	++	++
2S1.29	1	++	+
	2	++	+
2S1.2	1	++	++
	2	++	++
2S1.19	1	+++	+
	2	+++	+
1S1.27	1	+++	+++
	2	+++	+++
2S1.37 b	1	+++	+++
	2	+++	+++
2S1.37 t	1	+	+++
	2	+	+++
1S1. 25	1	+++	++
	2	+++	++
2S1.23 cb	1	++	++
	2	++	++

Cepa	Réplica	Resistencia a medio de estrés (pH 3.5 y 0.3% sales biliares)	Desarrollo en Agar MRS posterior al medio de estrés
2S1.22	1	+++	++
	2	+++	++
1S1.16	1	++	+++
	2	++	+++
2S1.1	1	++	-
	2	++	-
2S1.3	1	+	+
	1	+	+
2S1.5	2	+++	+
	1	+++	+
2S1.4	2	+++	+++
	1	+++	+++
2S1.8	2	+++	+
	1	+++	+
2S1.28 b	2	+++	+++
	1	+++	+++
2S1.28 t	2	+++	+++
	1	+++	+++
2S1.38 b	2	+++	+++
	1	+++	+++
2S1.38 t	2	++	+++
	1	++	+++
2S1'.7	1	++	+
	2	++	+
1S1'.8	1	+++	+
	2	+++	+
1S1'.35 b	1	+++	+
	2	+++	+
1S1'.12 b	1	++	++
	2	++	++
1S1.32	1	++	+++
	2	++	+++

Cepa	Réplica	Resistencia a medio de estrés (pH 3.5 y 0.3% sales biliares)	Desarrollo en Agar MRS posterior al medio de estrés
1S1'.16 b	1	+++	+++
	2	+++	+++
1S1'.16 t	1	++	+++
	2	++	+++
1S1'.15	1	+++	+++
	2	+++	+++
1S1'.37	1	+++	+++
	2	+++	+++
2S1".36	1	++	+
	2	++	+
1S1'.9 b	1	+++	++
	2	+++	++
2S1".1	1	+++	++
	2	+++	++
2S1.20	1	++	+++
	2	++	+++
1S1".11	1	+	+
	2	+	+
1S1'.1	1	+	+
	2	+	+
2S1".37 t	1	++	++
	2	++	++
2S1".37 b	1	+++	++
	2	+++	++
2S1".5 t	1	++	+
	2	+	+
2S1".5 b	1	+++	++
	2	+++	++
2S1.35	1	++	++
	2	++	++
2S1". 12 b	1	+++	+++
	2	+++	+++

Cepa	Réplica	Resistencia a medio de estrés (pH 3.5 y 0.3% sales biliares)	Desarrollo en Agar MRS posterior al medio de estrés
2S1" 4 t	1	++	++
	2	++	++
1S1.15	1	+++	++
	2	+++	++
2S1".22	1	++	++
	2	++	++
1S1'.33	1	+++	+++
	2	+++	+++
1S1'.18	1	+++	+++
	2	+++	+++
1S1'.7	1	+++	+
	2	+++	+
2S1".3 t	1	+++	+
	2	+++	+
1S1'.22	1	++	++
	2	++	++
2S1".2	1	+	++
	2	+	++
1S1.11	1	++	+
	2	++	+
1F2.36 b	1	+	+++
	2	+	+++
1F2.21	1	-	-
	2	-	-

Anexo 5. Composición de la gallería API® 50 CH y patrones fermentativos de las cepas 2S1.9 y *L. casei* Shirota®.

Tubo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ingrediente activo	Control	Glicerol (GLY)	Eritritol (Ery)	D-arabinosa (DARA)	L-arabinosa (LARA)	D-ribosa (RIB)	D-xilosa (DXYL)	L-xilosa (LXYL)	D-adonitol (ADO)	Metil-beta-D-xilopiranos (MDX)
2S1.9	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>L. casei</i> Shirota®	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-

Tubo	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Ingrediente activo	D-galactosa (GAL)	D-glucosa (GLU)	D-fructosa (FRU)	D-manosa (MNE)	L-sorbasa (SBE)	L-rhamnosa (RHA)	Dulcitol (DUL)	Inositol (INO)	D-manitol (MAN)	D-sorbitol (SOR)
2S1.9	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
<i>L. casei</i> Shirota®	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+

Tubo	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Ingrediente activo	Metil-alfa-D-manopiranos (MDM)	Metil-alfa-D-glucopiranos (MDG)	N-acetilglucosamina (NAG)	Amigdalina (AMY)	Arbutina (ARB)	Esculina/Citrato férrico (ESC)	Salicina (SAL)	D-celobiosa (CEL)	D-maltosa (MAL)	D-lactosa (LAC)
2S1.9	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. casei</i> Shirota®	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Tubo	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Ingrediente activo	D-melibiosa (MEL)	D-sacarosa (SAC)	D-trehalosa (TRE)	Inulina (INU)	D-melezitosa (MLZ)	D-rafinosa (RAF)	Almidón (AMD)	Glicógeno (GLYG)	Xilitol (XLT)	Gentiobiosa (GEN)
2S1.9	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>L.casei</i> Shirota®	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+

Tubo	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
Ingrediente activo	D-turanosa (TUR)	D-xilosa (LYX)	D-tagatosa (TAG)	D-fucosa (FUC)	L-fucosa (DFUC)	D-arabitol (DARL)	L-arabitol (LARL)	Glucanato potásico (GNT)	2-cetoglucanato potásico (2KG)	5-cetoglucanato potásico (5KG)
2S1.9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L.casei</i> Shirota®	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-