



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO.**

**TIPIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
BACILOS LÁCTICOS AISLADOS DEL PULQUE**

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

**PRESENTA:  
VALERIA LIMÓN TORRES**



**Ciudad Universitaria, CD. MX.**

**2018**



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: Aurora Irma Ortegón Ávila

**Vocal:** Profesor: José Adelfo Escalante Lozada

**Secretario:** Profesor: Martha Giles Gómez

**1er suplente:** Profesor: Gloria Díaz Ruíz

**2do suplente:** Profesor: Norma Angélica Castellanos Chavéz.

**Sitio dónde se desarrolló el tema:**

Departamento de biología, Cepario, Edificio A, 1er piso, Laboratorio 1-C, Facultad de Química UNAM. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos.

**Asesor del tema**

---

M. en B. Martha Giles Gómez

**Sustentante**

---

Valeria Limón Torres

Este trabajo contó con el financiamiento del proyecto PAPIIT DGAPA-  
UNAM IN207914.

## Índice.

A. Índice de figuras.	7
B. Índice de tablas.	8
1. Resumen.	9
2. Introducción.	11
3. Antecedentes.	13
3.1. Pulque.	13
3.1.1. Definición.	13
3.1.2. Historia del pulque.	13
3.1.3. Proceso de elaboración del pulque.	16
3.2. Aguamiel como medio de cultivo.	19
3.3. Bacterias presentes en el pulque.	19
3.4. Bacterias ácido- lácticas.	21
3.4.1. Lactobacilos.	23
3.5. Importancia de la identificación genotípica de microorganismos.	25
3.6. Gen ribosomal 16s y su relevancia en la identificación de microorganismos.	26
3.7. Enzimas de restricción.	26
3.8. Métodos de identificación molecular.	27
3.8.1. Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).	27
3.8.2. Análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).	27
3.8.3. Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA).	28
3.8.4. Electroforesis en gel con gradiente de concentración y electroforesis en gel con gradiente de temperatura (DGGE,	28

DGGT).

3.8.5. Secuenciación.	29
4. Justificación.	30
5. Objetivos.	32
6. Hipótesis.	33
7. Material y metodología.	34
7.1. Origen de la colección microbiana.	34
7.2. Reactivación y verificación de pureza de las cepas.	34
7.3. Conservación a mediano plazo de las cepas.	35
7.4. Caracterización fenotípica.	35
7.5. Caracterización genotípica.	35
7.5.1. Extracción de ADN cromosomal y electroforesis en gel.	35
7.5.2. Amplificación del ADN ribosomal 16S por PCR.	36
7.5.3. Purificación de la amplificación del ADN ribosomal 16S.	37
7.5.4. Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado.	38
7.6. Identificación de perfiles únicos de restricción.	38
7.7. Secuenciación del ADN ribosomal 16S e identificación del microorganismo.	39
7.8. Construcción del dendograma.	39
8. Resultados y discusión.	40
8.1. Caracterización fenotípica.	40
8.2. Caracterización genotípica.	44
8.2.1. Extracción de ADN cromosomal y electroforesis.	44
8.2.2. Amplificación del ADN ribosomal 16S por PCR.	46

8.2.3. Purificación de la amplicón de ADN ribosomal 16S.	46
8.2.4. Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado.	49
8.2.5. Secuenciación del ADN ribosomal 16S e identificación del microorganismo.	52
8.3. Dendograma.	55
9. Conclusiones.	58
10. Perspectivas.	59
11. Referencias.	60
12. Anexos.	64

## A. Índice de figuras.

<b>Figura 1:</b> Anatomía del agave.	16
<b>Figura 2:</b> Tlachiquero extrayendo el agua miel del agave capaeado.	17
<b>Figura 3:</b> Tinacal con barriles de madera para la fermentación del pulque.	18
<b>Figura 4:</b> Vías metabólicas homofermentativa y heterofermentativa.	24
<b>Figura 5:</b> Diagrama de flujo del proceso experimental.	34
<b>Figura 6:</b> (A) Cepa 2S1.'15, (B) Cepa 2S1.19, (C) Cepa 2S1.21 cb ,(D) Cepa 1S1.'1 (E) Cepa 2F2.23.	42
<b>Figura 7:</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la extracción de DNA cromosomal de los bacilos lácticos aislados del pulque.	45
<b>Figura 8:</b> Electroforesis en gel de agarosa al de la amplificación del ADNr 16s de los bacilos lácticos aislados del pulque.	48
<b>Figura 9:</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % de la purificación del ADNr 16s de los bacilos lácticos aislados del pulque.	48
<b>Figura 10:</b> . Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % del análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado.	50
<b>Figura 11.</b> Dendograma elaborado a partir de los perfiles de restricción únicos con el programa Phylip-3.695.	57

## **B. Índice de Tablas.**

<b>Tabla 1.</b> . Bacterias identificadas en el pulque.	20
<b>Tabla 2.</b> Bacterias ácido lácticas. Características morfológicas y de crecimiento.	22
<b>Tabla 3.</b> Lactobacilos clasificados con base en el tipo de fermentación que llevan a cabo.	25
<b>Tabla 4.</b> Mezcla de reacción de PCR.	37
<b>Tabla 5.</b> Programación del termociclador.	37
<b>Tabla 6.</b> Reacción de digestión enzimática.	38
<b>Tabla 7.</b> Mezcla de reacción para secuenciar.	39
<b>Tabla 8.</b> Características morfológicas, microscópicas, prueba de catalasa de la colección bacteriana. Tinción de Gram de las cepas 1S1.'15 2S1.19 2S1,cb, 1S1'1,2F2.23.	41
<b>Tabla 9.</b> Perfiles de restricción identificados de la colección microbiana. Cepas que lo componen, peso molecular del patrón de bandeo y fenotipo al que pertenece.	51
<b>Tabla 10.</b> Identidad de las cepas con base en el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S.	53
<b>Tabla 11.</b> Identidad de perfiles únicos de restricción y número de cepas que lo conforman.	54

## 1. Resumen.

El pulque es una bebida alcohólica mexicana que es producto de la fermentación de la savia de distintas especies de agave.

En estudios previos se han identificado diversos grupos microbianos en el pulque, dentro de los cuales se encuentran las bacterias ácido lácticas (BAL). Mediante el uso de técnicas no dependientes del cultivo, se observó que la diversidad bacteriana del pulque se encuentra dominada por especies pertenecientes al género *Lactobacillus* (Escalante *et al.*, 2004; 2008). A pesar de haber descrito la presencia de este grupo microbiano, no fue hasta al trabajo de Gutiérrez (2015), que mediante el uso de un medio selectivo (Agar MRS con clindamicina y ciprofloxacino) se logró el aislamiento de 81 cepas de bacterias lácticas con morfología bacilar a partir de una muestra de pulque de Huitzilac. La colección completa no había sido totalmente identificada bajo ninguna aproximación, éste trabajo se realizó con el fin de conocer la diversidad completa de BAL aisladas del pulque de Huitzilac.

Se llevó a cabo la reactivación de las 81 cepas y posteriormente se efectuó tinción de Gram y prueba de catalasa para corroborar las características fenotípicas asociadas a los bacilos ácido lácticos, todas las cepas contaron con las características esperadas: morfología bacilar, Gram-positivo y catalasa- negativo.

Se realizó el análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA) para el gen 16S de las 81 cepas y se encontró un total de cinco perfiles únicos de restricción, la secuenciación del gen 16S de los representantes de cada perfil único permitió determinar las identidad de las bacterias que los conformaban. De esta forma se identificó la presencia de *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, *L. mudanjiangensis*, *L. kefir* y *Leuconostoc mesenteroides*.

*L. brevis* fue el microorganismo que se encontró en mayor proporción representando 72.3 % de la colección, *L. plantarum* representó 10%, *Leuconostoc*

*mesenteroides* 8.4%, *L. mudanjiangensis* 6% y por último *L. kefir* representando 1.2%.

En este trabajo se identificó a *L. brevis* y a *L. mudanjiangensis* por primera vez en el pulque. Tanto *L. plantarum* como *L. kefir* habían sido descritos en el pulque anteriormente (Escalante *et al*, 2004) sin embargo fue la primera vez que se logró cultivarlos y aislarlos a partir de la bebida.

Así mismo se conoció la diversidad de bacilos lácticos presentes en el pulque logrando así, una mejor comprensión de la microbiota asociada a esta bebida. Se amplió el conocimiento que se tiene sobre este producto dando pie a la identificación de grupos microbianos de interés que posteriormente se puedan usar en el desarrollo de otro tipo de productos alimentarios o en investigación.

## 2. Introducción.

El pulque es una bebida mexicana de carácter alcohólico no destilada, producida y consumida en los estados del centro del país. Se elabora a partir de la fermentación de la savia, denominada aguamiel, de distintas especies de maguey (*A. salmiana* var. *salmiana*, *A. atrovirens*, *A. mapisaga*, *A. lehmannii* y *A. altissima*) en condiciones no asépticas. Los microorganismos responsables de su fermentación son los naturales del aguamiel y los incorporados durante su recolección, transporte, inoculación y manipulación. Su producción se encuentra integrada por tres tipos de fermentación: la ácida, la alcohólica y la producción de biopolisacárido (García-Garibay y López-Munguía, Escalante *et al.*, 2004; 2008; 2012).

En estudios cuyo objetivo fue la caracterización de la microbiota del pulque mediante el uso de técnicas no dependientes del cultivo se demostró la presencia de clonas pertenecientes a diversas especies de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. kefir*, *L. acetotolerans*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*, *L. paraconilloides* y *L. sanfranciscensis*) y se observó que la diversidad bacteriana del pulque se encuentra dominada por especies pertenecientes a éste género (Escalante *et al.*, 2004; 2008). A pesar de haber descrito la presencia de este grupo microbiano, no fue sino hasta al trabajo de Gutiérrez (2015), que se logró el aislamiento de 81 cepas de bacterias lácticas con morfología bacilar.

Con objetivo de identificar bacilos lácticos con potencial probiótico Gutiérrez (2015) sometió a condiciones gastrointestinales in vitro (medio a pH=3.5, con 0.3 % de sales biliares) y probó la actividad antagónica contra patógenos (*S. enterica* serovar Tiphys ATCC 9992, *E. coli* Enteropatógena) de la colección bacteriana, 15 cepas mostraron buenos resultados y al momento de realizar la identificación de éstas se describió a *L. plantarum* y *L. brevis*. Sin embargo en dicho trabajo no se identificó la totalidad de cepas aisladas inicialmente.

Por lo anterior, el objetivo general de este trabajo es realizar la tipificación molecular de los 81 bacilos lácticos aislados del pulque, para posteriormente obtener la identidad de los grupos tipificados.

El análisis fenotípico examina las características morfológicas, metabólicas, fisiológicas y químicas de la célula; el análisis genotípico considera aspectos comparativos de las células a nivel de su genoma, siendo una de las aproximaciones más utilizadas la comparación de perfiles de restricción de genes ribosomales (ARDRA).

La identificación completa de la colección microbiana, puede resultar en la descripción de nuevas especies de *Lactobacillus* en el pulque o en reiterar la presencia de alguna de las especies de *Lactobacillus* anteriormente descritas en la bebida.

### **3. Antecedentes.**

#### **3.1. Pulque.**

##### **3.1.1 Definición.**

El pulque es una bebida blanca, viscosa ligeramente ácida y de carácter alcohólico (4 a 7°GL), se elabora a partir de la fermentación de la savia, denominada aguamiel, de distintas especies de maguey entre las que se encuentran: *Agave salmiana* var. *Salmania*, *Agave mapisaga* y *Agave ferox*, en condiciones no asépticas. Posiblemente sea la bebida alcohólica mexicana más antigua y con mayor tradición, representó un papel importante en diversos ritos dentro de la población mesoamericana. Actualmente el consumo del pulque persiste, se puede encontrar en pulquerías, restaurantes o incluso enlatado en tiendas de autoservicio. Tradicionalmente el pulque ha sido considerado como una bebida saludable debido a su contenido nutrimental, ya que puede ser considerado una fuente de energía, vitaminas y aminoácidos esenciales como la lisina y el triptófano, que son deficientes en la dieta de los mexicanos. (García-Garibay y López-Mungía, 1993; Escalante *et al*, 2012).

De acuerdo a la NMX-V-037-1972 existen dos tipos de pulque, el pulque de punta y el pulque de producción comercial, esta clasificación se genera con base en su producción.

##### **3.1.2 Historia del pulque.**

La producción del pulque se ha visto impactada por diversos periodos históricos del país.

Basado en evidencia arqueológica e información existente en códices pre y post hispánicos existe un consenso entre historiadores acerca de la importancia de la bebida en distintas culturas mesoamericanas, de igual manera se habla de la presencia dominante de esta en la vida diaria y su relevancia en rituales religiosos y de guerra. (Godoy *et al*, 2003)

Es probable que los Otomíes hayan sido la primera cultura en producirlo y consumirlo heredando el proceso de elaboración a casi todas las culturas que se encontraban en la región central del país; de acuerdo al arqueólogo Salvador Herrera la invención de la bebida se atribuye a Mayahuel, una mujer proveniente de los olmecas que se hizo diosa debido a que encontró la fuente de aguamiel en el maguey y desarrolló la técnica para obtenerlo, a Patécatl, que era su esposo se le atribuye la idea de la fermentación de la savia y a otros como Tezcatilpoca y Tilihua la mejora del brebaje ( Erlwein *et al*, 2013; Escalante *et al.*, 2012).

La civilización azteca dominaba el manejo del aguamiel y la producción de pulque, formaba parte de su dieta diaria, tenían establecidos lineamientos para el consumo de la bebida, únicamente podían consumir pulque: Niños, jóvenes, ancianos, mujeres que se encontraban embarazadas o en estado de lactación, sacerdotes, guerreros, o aquellos que iban a ser sacrificados, el consumo indiscriminado de la bebida era altamente castigado. Sin embargo tras la caída del imperio azteca el pulque perdió la relevancia religiosa y su consumo prevaleció como el de una bebida popular.

El rápido crecimiento de las actividades comerciales que hubo durante la Colonia no tardó en envolver a la producción del pulque, proceso que culminó en la formación de Haciendas Pulqueras que se dedicaban al cultivo de agave, extracción de aguamiel y producción del pulque. Posteriormente la bebida era trasladada a las principales ciudades de México. Esta organización prosperó para los estados centrales del país como: Tlaxcala, Puebla, Querétaro, Morelos y Michoacán. Desde 1779 la producción y comercialización de la bebida se reguló por los españoles y se convirtió en una de las actividades económicas más importantes. Una vez que México pasó a ser un país independiente, la regulación gubernamental respecto a la producción, calidad y comercialización de la bebida fueron consolidadas nuevamente por las haciendas pulqueras.

La eliminación de las haciendas pulqueras fue consecuencia de la promulgación de la Constitución de 1917, donde se establecía una redistribución de tierras, dando fin al periodo de esplendor de alrededor de 3 siglos de duración, a pesar de la redistribución de tierras la abundancia de cultivos de agave permitió el

desarrollo de la nueva industrial pulquera que fue capaz de cumplir con la demanda decreciente del producto (Escalante *et al.*, 2012).

Durante los años 20's el pulque era enviado a la ciudad de México por tren, sin embargo en el periodo comprendido entre 1934- 1940 una campaña antialcohólica fue establecida, principalmente en contra del pulque, se consideró supuestamente una bebida poco higiénica y que causaba perjuicios a la salud debido a la falta de control en el proceso de producción y a la adulteración durante su distribución, rigurosas normas fueron aplicadas hasta los años 70's para la entrada de los barriles pulqueros en la Ciudad de México. La industria del pulque se vio considerablemente afectada debido a esta situación así como a la introducción de la cerveza y la sobreexplotación de los plantíos de agave. La industria cervecera jugó un papel importante en la campaña de desprestigio contra el pulque ya que difundió muchos mitos alrededor de la bebida, el más conocido: Que el pulque se fermentaba con excremento animal o de ser humano.

La producción de la bebida se volvió a fomentar en los años 60's, se fundó el Patronato del Maguey con el propósito de crear e impulsar la cultura del maguey realizando modificaciones en la distribución y maquila de las plantas. Se enlató el producto, se intentaron estandarizar las condiciones higiénicas en la producción de la bebida e incluso se promovieron usos diferentes del agave para estimular su cultivo. Desafortunadamente el producto enlatado no cumplía con las características sensoriales que el consumidor esperaba en la bebida aunando que el producto era más caro, de tal forma la producción no fue exitosa ni abundante (Erlwein *et al.*, 2013; Escalante *et al.*, 2012).

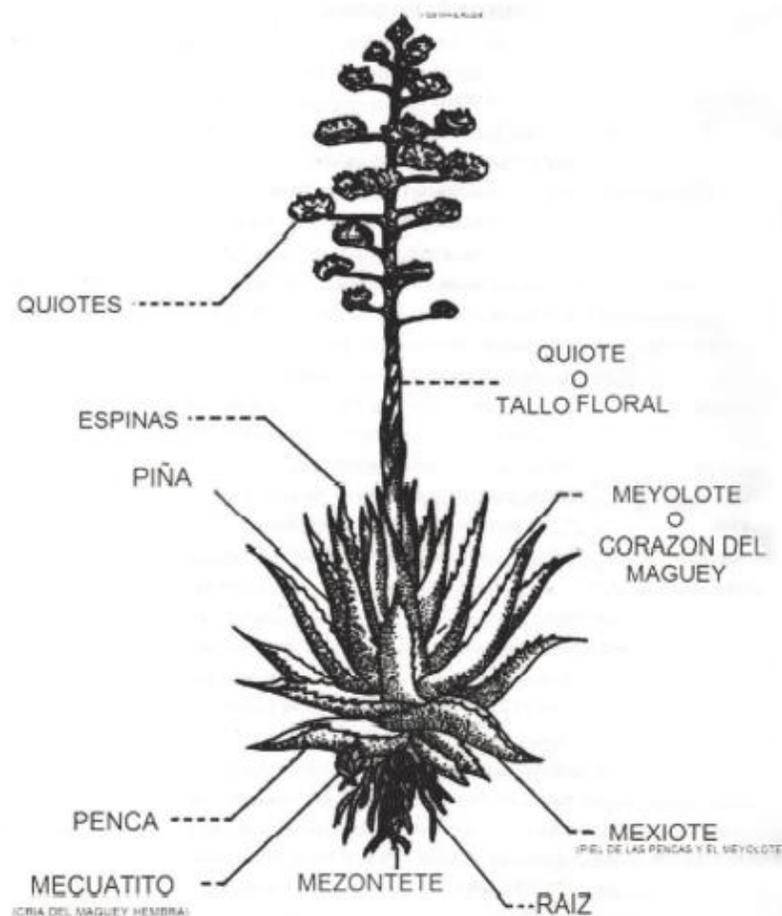
En el siglo XX el territorio destinado a la producción de agave pulquero disminuyó de manera importante y de manera consecuente también su producción. Actualmente la región más importante en cuanto a producción de Pulque se encuentra en el centro del país, principalmente en los estados de: Hidalgo, Tlaxcala y Estado de México, y en algunas regiones de Querétaro, Puebla, Morelos y Michoacán.

Actualmente el pulque se considera una bebida artesanal, se puede encontrar en pulquerías localizadas en diversas zonas de la ciudad, en las zonas conurbadas

sigue siendo el preferido de las familias con bajos ingresos, es consumido como parte de la dieta diaria y es una parte importante en las tradiciones,. (García-Garibay y López-Mungía, 1993; Erlwein *et al*, 2013; Escalante *et al*., 2004; 2008; 2012).

### 3.1.3 Proceso de elaboración del pulque.

La siembra del agave se lleva a cabo de dos formas; mediante la trasplatación de los brotes jóvenes de los agaves más viejos llamados metecuates (Figura 1), una planta adulta puede dar origen alrededor de a 50 metecuates, estos son cosechados durante la temporada de lluvia y son trasplantados, o sembrados a partir de la semilla de la planta.



**Figura 1.** Anatomía del Agave (Erlwein *et al*, 2013).

El aguamiel es extraído de plantas de 7-10 años de edad que se encuentran a punto de generar su inflorescencia, las plantas maduras son castradas mediante la eliminación de la flor dejando una cavidad conocida como cajete en el centro de la planta, la cavidad resultante es cubierta para evitar la exposición al medio ambiente y es raspada continuamente, promoviendo el flujo del aguamiel hacia el centro, a este proceso se le conoce como capeado y raspado del agave (Figura 2). El jarabe es recolectado por el tlachiquero dos veces al día mediante la succión oral con una calabaza seca conocida como acocote (Figura 2), la producción de aguamiel tiene una duración de 3 a 6 meses que culmina con la muerte de la planta. La producción aproximada de aguamiel es de 1000 L por planta.



**Figura 2.** Tlachiquero extrayendo el agua miel del agave capeado (Erlwein *et al*, 2013).

El proceso de elaboración del pulque comienza con la recolección diaria del aguamiel y su transferencia al recipiente donde se lleva a cabo la fermentación; estos pueden ser de fibra de vidrio, cuero, barriles de madera o recipientes de plástico, los contenedores se encuentran en cuartos llamados tinacales (Figura 3). La fermentación se lleva a cabo por varias horas (6 – 14), la duración se encuentra determinada por la calidad del aguamiel, la madurez del cultivo iniciador, la semilla y la temporada en la que se encuentran, el tiempo adecuado de fermentación podrá ser estimado por la viscosidad y el contenido alcohólico de la bebida.

Debido a todas las variables que tienen efecto sobre la fermentación del pulque es común que la bebida presente variación en su composición y propiedades. El cultivo iniciador se crea vertiendo un poco de aguamiel fresco en un recipiente adecuado para esto, se deja que fermente espontáneamente hasta que se alcanza el contenido alcohólico y acidez deseada, la duración de este proceso es dependiente de la temporada en la que se encuentre, teniendo máxima duración en invierno.

Posteriormente el pulque se extrae y se reemplaza con aguamiel nuevo. El pulque se puede consumir solo o puede ser mezclado con una amplia variedad de frutas maceradas, vegetales, nueces o condimentos, al pulque que cumple con estas características se le conoce como curado. (Erlwein *et al*, 2013; Escalante *et al*, 2012).

De acuerdo a la NMX-V-037-1972 el pulque de punta es el producto que se obtiene de las primeras tinas, en su preparación se utilizan la semilla y aguamiel que cumple con ciertas especificaciones indicadas por la norma (tipo I), este pulque es el que sirve de base para el desarrollo de la producción, el pulque de producción comercial es aquel que “se alimenta” con la generalidad de los aguamieles, pudiendo utilizarse durante las siguientes etapas de producción aguamieles enriquecidos con cualquier cantidad de concentrados de aguamiel.



**Figura 3.** Tinacal con barriles de madera para la fermentación del pulque (Erlwein *et al*, 2013).

### 3.2 Aguamiel como medio de cultivo.

El aguamiel constituye un medio favorable para el crecimiento bacteriano debido a todos sus componentes, entre los componentes más importantes se encuentran: agua, azúcares, proteínas, gomas y minerales. Con excepción de la metionina contiene todos los aminoácidos esenciales, tiene vitaminas como riboflavina, tiamina, niacina y biotina, contiene glucosa, fructosa, fructo-oligosacáridos e inulina; los minerales presentes en el aguamiel son: sodio, magnesio, hierro, zinc, cobre y manganeso (Escalante *et al*, 2012).

### 3.3 Bacterias presentes en el pulque.

La producción tradicional del pulque se desarrolla en condiciones no asépticas por lo que una gran diversidad microbiana se encuentra asociada a su fermentación, esta diversidad se encuentra integrada por microorganismos provenientes del aguamiel y los que se incorporan durante su extracción, transporte, inoculación, proceso de fermentación y manipulación.

Desde el punto de vista microbiológico el pulque es un ambiente enriquecido en el cual se presentan tres procesos fermentativos en los que participan diferentes grupos microbianos: una fermentación alcohólica desarrollada por levaduras de género *Saccharomyces* y la  $\alpha$ -proteobacteria *Zymomonas mobilis*; una fermentación viscosa en la que se producen polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa por bacterias lácticas de género *Leuconostoc*, principalmente por *L. mesenteroides*; y una fermentación ácida, en la que se producen: ácido láctico; por diferentes bacterias ácido lácticas y ácido acético; por bacterias ácido acéticas. (Sánchez-Marroquín and Hope, 1953; García-Garibay y López-Mungía, 1993; Escalante *et al.*, 2004; 2008; 2012).

En la siguiente tabla se presentan las bacterias que han sido reportadas en el pulque.

**Tabla 1.** Bacterias identificadas en el pulque (Escalante *et al*, 2008; Gutiérrez, 2015).

Phylum / Orden	Identidad
<i>α-Proteobacteria/Rhodospirillales</i>	<i>Acetobacterium malorum</i> <i>Acetobacter orientales</i>
<i>α-Proteobacteria/Sphingomonadales</i>	<i>Zymomonas mobilis Pomaceae</i>
<i>γ-Proteobacteria/ Enterobacteriales</i>	<i>Citrobacter</i> spp. <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Enterobacter</i> spp. <i>Erwinia rhapontici</i> <i>Kluyvera ascorbata</i> <i>Kluyvera cochleae</i> <i>Providencia</i> spp. <i>Serratia grimensii</i>
<i>γ-Proteobacteria/ Pseudomonadales</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
<i>γ-Proteobacteria/ Xanthomonadales</i>	<i>Sterotrophomonas</i> spp.
<i>Flavobacterias</i>	<i>Chryseobacterium</i> spp.
<i>Firmicutes/Bacillales</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus</i> sp
<i>Firmicutes/Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Lactobacillus paracollinoides</i>  <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactococcus</i> spp. <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis cremoris</i> <i>Leuconostoc kimchi</i> <i>Leuconostoc citreum</i> <i>Leuconostoc gasicomitatum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> <i>Pediococcus urinaeequi</i> <i>Streptococcus devriesei</i>

### 3.4 Bacterias ácido-lácticas.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son cocos o bacilos Gram-positivos, normalmente inmóviles, no esporulados, catalasa (-), tienen bajo contenido de G+C en su ADN. Todas las BAL crecen en condiciones anaerobias, sin embargo la mayoría no son sensibles al O<sub>2</sub> por lo que se denominan como aerotolerantes. Son oxidasa, gelatinasa, catalasa y bencidina negativos, no reducen nitratos.

Los miembros de este grupo carecen de porfirinas y citocromos, no llevan a cabo fosforilación oxidativa y generan energía exclusivamente mediante la fosforilación a nivel sustrato.

De acuerdo a la clasificación actual pertenecen al phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli* y al orden *Lactobacillales*, dentro de las familias que integran a este grupo de bacterias se encuentran: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Sterptococcaceae* (Tabla 2).

Constituyen un grupo diverso de microorganismos asociados a plantas, carne y productos lácteos. Son conocidas como cultivos iniciadores en la manufactura de productos lácteos como leches acidificadas, yogurt, mantequilla y queso. Además son importantes comercialmente en el proceso de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales. (Bu'lock, 1991; Boone y Castenholz, 2001; Carr y Chill, 2002; Lahtinen *et al*, 2012; Madigan *et al.*, 2009).

**Tabla 2.** Bacterias ácido lácticas. Características morfológicas y de crecimiento (Lahtinen *et al*, 2012).

Familia	Género	Características							
		Morfología	Producción de CO <sub>2</sub>	Crecimiento a 10°C	Crecimiento a 45°C	Crecimiento en 6.5% NaCl	Crecimiento 18% NaCl	Crecimiento pH 4.4	Crecimiento pH 9.6
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	Cocos (Tetradas)	-	+	-	+	-	-	+
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	Bacilos	-	+	-	ND	-	ND	-
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	Cocos	-	+	+	+	-	+	+
	<i>Tetragenococcus</i>	Cocos (Tetradas)		+	-	+	+	Variable	+
	<i>Vagococcus</i>	Cocos		+	-	-	-		-
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	Bacilos	Variable	Variable	Variable	Variable	-	Variable	-
	<i>Pediococcus</i>	Cocos (Tetradas)	-	Variable	Variable	Variable	-	+	-
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	Cocos	+	+	-	Variable	-	Variable	-
	<i>Oenococcus</i>	Cocos	+	+	-	Variable	-	Variable	-
	<i>Weissella</i>	Cocos	+	+	-	Variable	-	Variable	-
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	Cocos	-	+	-	-	-	Variable	-
	<i>Streptococcus</i>	Cocos	-	-	Variable	-	-	-	-

Nota: ND, no determinado.

La mayoría de las BAL obtienen su energía a partir de metabolismo de azúcares por lo que su crecimiento se encuentra limitado a la disponibilidad de estos. Una importante diferencia entre los subgrupos de las BAL se basa en el patrón de fermentación de azúcares, las que utilizan la vía homofermentativa; dando origen a ácido láctico, y las que usan la vía heterofermentativa; que en adición al ácido láctico produce CO<sub>2</sub>, etanol o acetal.

La fermentación homofermentativa se encuentra basada en la glicólisis o vía de Embden -Meyerhof- Parnas, generando 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa, mientras que en la heterofermentativa únicamente se da origen a una molécula de ATP por molécula de glucosa. En la figura 4 se presentan las dos vías metabólicas, las diferencias observadas en las fermentaciones surgen a

partir de la presencia o ausencia de la enzima aldolasa, enzima clave en la glucólisis, las bacterias homofermentativas contienen aldolasa y producen dos lactatos a partir de glucosa mediante la vía glucolítica, las heterofermentativas carecen de aldolasas, lo que impide que conviertan la fructosa - difosfato en triosa-fosfato, en su lugar oxidan la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato, posteriormente la descarboxilan a pentosa-fosfato, dando origen a: triosa-fosfato, acetil-fosfato y  $\text{CO}_2$ , mediante la acción de la enzima clave fosfoacetolasa, en las bacterias que tienen un metabolismo heterofermentativo, la triosa- fosfato se convierte por último en ácido láctico con la producción de ATP. Sin embargo, para conseguir un equilibrio redox, el acetil-fosfato se reduce con NADH y se convierte en etanol sin que se sintetice ATP, por ello las bacterias heterofermentativas únicamente producen un ATP/glucosa en vez de dos ATP/ glucosa que producen las homofermentativas (Lahtinen *et al*, 2012; Madigan *et al.*, 2009).

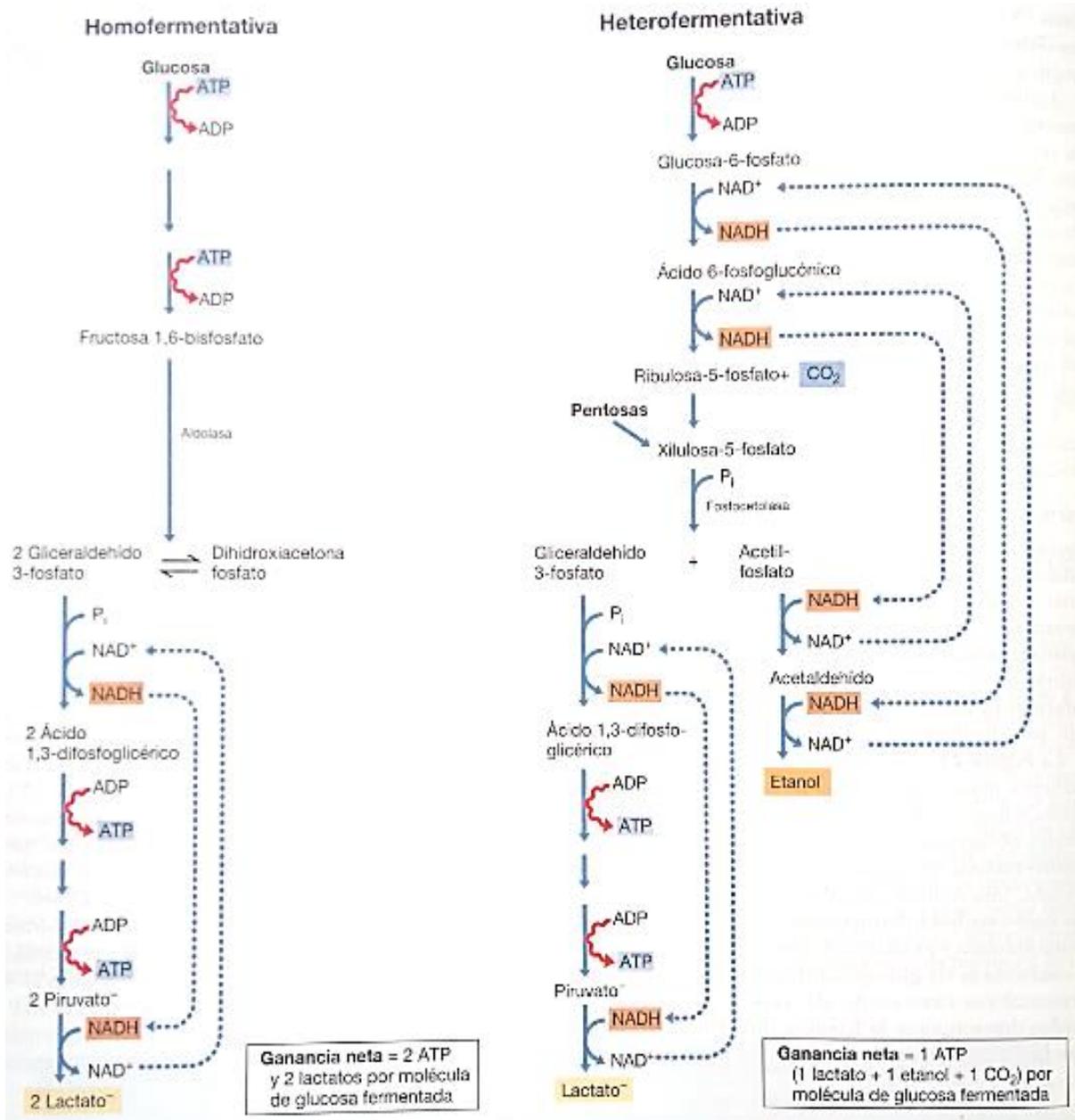
#### 3.4.1 Lactobacilos.

Normalmente presentan morfología bacilar que puede variar de bacilos largos esbeltos a bacilos cortos y curvados.

Se pueden clasificar en 3 grupos de acuerdo a la fermentación de azúcares que realizan, el Grupo I que se encuentra integrado por los homofermentativos, aquellos que fermentan los azúcares mediante glicólisis para generar ácido láctico como producto final, las del Grupo II que se refiere a los homofermentativos facultativos, son los que dan origen al ácido láctico como metabolito principal pero que también generan etanol y  $\text{CO}_2$  si ningún otro aceptor de electrones se encuentra disponible y por último las heterofermentativas obligadas que integran al Grupo III, que pueden usar tanto la vía de la glicólisis como la de la pentosa-fosfato. En la tabla 4 se presentan ejemplos de lactobacilos pertenecientes a cada uno de los grupos.

Los lactobacilos se encuentran naturalmente asociados a: Plantas, productos vegetales fermentados, masas fermentadas y a bebidas alcohólicas destiladas, su habilidad de crecer en ambientes ácidos y en presencia de etanol podrán explicar la abundancia de estos durante la fermentación del pulque. Son habituales en

productos lácteos y algunas cepas se utilizan en la preparación de leches fermentadas. Normalmente son más resistentes a condiciones ácidas, esto les permite continuar creciendo durante la fermentación láctica (Lahtinen *et al*, 2012; Madigan *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Vías metabólicas homofermentativa y heterofermentativa (Madigan *et al.*, 2009).

**Tabla 3.** Lactobacilos clasificados con base en el tipo de fermentación que llevan a cabo (Lahtinen *et al*, 2012).

Homofermentativo	Heterofermentativo facultativo	Heterofermentativo obligado
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. helveticas</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. salavarius</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. pontis</i>

### 3.5 Importancia de la identificación genotípica de microorganismos.

Un microorganismo es una célula microbiana aislada que puede tener una existencia independiente. Aunque son la forma más pequeña de vida, en conjunto los microorganismos constituyen la mayor proporción de biomasa del planeta, realizan muchos procesos bioquímicos que son necesarios para otros organismos y en su ausencia no podrían haber surgido otras formas de vida, situación que explica que su estudio sea fundamental. Los avances en biología molecular han sido esenciales en el estudio de estos debido a que han permitido aumentar considerablemente el conocimiento de características morfológicas, fisiológicas y ecológicas del taxa bacteriano.

Durante más de 100 años los microorganismos han sido descritos e identificados mediante métodos dependientes del cultivo, sin embargo la clave para elucidar la actividad biológica de estos se ha encontrado a través del uso de herramientas eficientes y novedosas como las técnicas moleculares basadas en la secuenciación de ADN o el análisis de las secuencias de los genes ribosomales de diversos procariotes, que han proporcionado información considerable acerca de la taxonomía, relaciones, rol ecológico y evolución de bacterias que se encuentran en el ambiente, sin la necesidad de aislar y cultivar al microorganismo.

Actualmente es ampliamente aceptado el uso de diversos métodos para identificar y caracterizar diferentes especies bacterianas, una combinación de información fenotípica y genotípica es necesaria para la correcta descripción y clasificación de las bacterias. (Santos *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2009)

### 3.6 Gen ribosomal 16s y su relevancia en la identificación de microorganismos.

Debido a la probable antigüedad de la maquinaria sintetizadora de proteínas, los ADNs ribosómicos son moléculas excelentes para discernir las relaciones evolutivas entre los seres vivos, son funcionalmente constantes, están universalmente distribuidos y su secuencia está moderadamente bien conservada a través de amplias distancias filogenéticas. Debido el elevado número de diferentes secuencias posibles de moléculas grandes, la similitud de dos secuencias indica alguna relación filogenética, es el grado de semejanza de las secuencias del ADN ribosómico de dos organismos lo que indica su parentesco evolutivo relativo.

El ADN ribosomal 16S contiene varias regiones de secuencias altamente conservadas que resultan útiles para obtener alineamientos apropiados, pero al mismo tiempo la variabilidad suficiente en otras regiones de la molécula para servir como excelente cronómetro filogenético.

El desarrollo de técnicas moleculares basadas en el análisis de los ácidos nucleicos, ha permitido la posibilidad de discriminar entre una gran cantidad de cepas para así agrupar en tipos genéticos únicos que posteriormente son identificados por comparación de las secuencias de ADN ribosómico 16S con secuencias de microorganismos previamente caracterizados y depositadas en bases de datos. (Tiedje *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2009).

### 3.7 Enzimas de restricción.

Todas las células contienen enzimas capaces de modificar químicamente al ADN, una de las clases principales de estas enzimas son las enzimas de restricción, que reconocen y cortan secuencias de bases específicas de ADN. La mayoría de las enzimas de restricción son proteínas homodiméricas; es decir, están compuestas por dos subunidades polipeptídicas idénticas y cada subunidad reconoce y corta en ADN en una de las dos cadenas.

*In vivo* dentro de las funciones de las enzimas de restricción se encuentra proteger a los procariotes de ADN extraño, sin embargo *In vitro* las enzimas de restricción son necesarias para la manipulación del ADN y su descubrimiento dio lugar al nacimiento de la ingeniería genética (Madigan *et al.*, 2009).

### 3.8 Métodos de identificación molecular.

El mundo de los microorganismos es fenotípicamente muy heterogéneo, el uso de técnicas que permiten la secuenciación del ADN ribosomal y los estudios basados en la hibridación de ADN ha permitido mejorar los estudios taxonómicos de las bacterias.

Entre los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede mencionar el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, el análisis de ADN polimórfico amplificado al azar, el análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado, electroforesis en gel con gradiente de concentración, electroforesis en gel con gradiente de temperatura y secuenciación (Reinheimer *et al.*, 2006; Madigan *et al.*, 2009)

#### 3.8.1 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).

Consiste en extraer el genoma completo del microorganismo y se digerirlo con enzimas de restricción, los fragmentos obtenidos, presentan polimorfismo en la longitud debido a la diferencia entre las secuencias, generando una colección de fragmentos de DNA de una longitud definida, se visualizan y separan mediante electroforesis (Reinheimer *et al.*, 2006).

#### 3.8.2 Análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).

Los ensayos de RAPD implican una amplificación por PCR de porciones del ADN genómico utilizando primers de secuencia arbitraria, los productos amplificados se separan en gel de agarosa y se visualizan mediante electroforesis, esta técnica permite la detección de polimorfismo en organismos altamente relacionados, el cual resulta en diferencias en el tamaño de la secuencia amplificada (Reinheimer *et al.*, 2006).

### 3.8.3 Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA).

El análisis por restricción de ADN ribosomal amplificado tiene un excelente potencial para la discriminación de microorganismos a nivel de especie. Es una técnica de huella digital basada en la amplificación por PCR de las regiones variables de los genes codificantes de subunidades del ADN ribosomal usando primers que hibridan con regiones conservadas del gen. Los amplicones son digeridos con enzimas de restricción con sitios de reconocimiento de 4 pb y separados por electroforesis en geles de agarosa, la diferencia en los patrones de corrida permite identificar diferencias en la estructura de las comunidades microbianas, se ha usado como un método para una rápida comparación de ADN ribosomal (Peña, 2010), al igual que para la identificación de cepas de lactobacilos aisladas de quesos duros y semiduros (Reinheimer *et al*, 2006).

La relación matemática entre el número de sitios compartidos por la enzima de restricción o de los fragmentos compartidos del ADN es lo que permite la identificación de la variedad genética. Los modelos matemáticos que permiten hallar la similaridad de los patrones de corte se basan en el uso de matrices binarias utilizando coeficientes de similitud, estos coeficientes permiten agrupar a los morfotipos en cladas que identifican la distancia genética mediante el uso de métodos de análisis de agrupamiento como Neighboring-Joining y UPGMA. Las herramientas de bioinformática han sido fundamentales para los análisis de perfiles de restricción (Jiménez, 2007).

### 3.8.4 Electroforesis en gel con gradiente de concentración y electroforesis en gel con gradiente de temperatura (DGGE, DGGT).

Son métodos de electroforesis en gel que permiten la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño con base en diferencias en su secuencia base, el fundamento de la técnica es al elevar la temperatura del ADN de doble cadena en solución o si se adicionan ciertos compuestos químicos, los puentes de hidrógeno se rompen y se disocia la doble cadena, el ADN parcialmente desnaturalizado migra más lentamente que el ADN de doble cadena, un fragmento de ADN de

doble cadena se desplaza por el gel hasta encontrar una determinada concentración de desnaturalizante o temperatura a la cual la cadena se separan y el desplazamiento se interrumpe, para evitar la separación completa de las cadenas y lograr una óptima resolución se utilizan “grapas” de GC, que son secuencias ricas en bases GC que se adicionan al fragmento durante la PCR (Fernández, 2014).

#### 3.8.5 Secuenciación.

La secuenciación de ADN para el análisis de un producto amplificado es un método común de análisis post-amplificación, es muy valioso cuando se analiza un grupo de microorganismos para determinar las áreas de conservación y variabilidad dentro del amplicón, lo que lo convierte en una herramienta eficaz para la identificación de microorganismos. La secuenciación de Sanger funciona mediante la incorporación de didesoxinucleótidos en una hebra creciente de DNA, por lo que ésta ya no puede extenderse. El análisis de los fragmentos de DNA que resultan proporcionan información de la secuencia, se usan moléculas indicadoras con fluorescencia y se visualiza con electroforesis en gel o electroforesis capilar (Koneman *et al.*, 2008).

#### 4. Justificación.

Mediante el uso de técnicas no dependientes del cultivo se demostró la presencia de los siguientes microorganismos en el pulque: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus acetotolerans*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraconilloides* y *Lactobacillus sanfranciscencis*, asimismo este estudio permitió determinar que la diversidad bacteriana de esta bebida se encuentra dominada por especies pertenecientes al género *Lactobacillus* (Escalante *et al.*, 2004; 2008). Posteriormente se volvieron a realizar estudios para caracterizar la microbiota del pulque, utilizando técnicas dependientes del cultivo, sin embargo no fue posible determinar la presencia de *Lactobacillus*, encontrando en su mayoría a bacterias pertenecientes al género *Leuconostoc* (Campos, 2010; Lozano, 2007).

El objetivo principal del trabajo de Gutiérrez fue llevar a cabo el aislamiento de lactobacilos con potencial probiótico a partir de pulque proveniente de la localidad de Huitzilac, dentro de los objetivos particulares del trabajo se encontraba establecer las bases para la detección de lactobacilos en el pulque por métodos dependientes de cultivo, dicho trabajo experimental dio como resultado una colección de 81 cepas que tenían características morfocoloniales, morfológicas y fisiológicas asociadas a éste género, posteriormente realizó la caracterización preliminar del potencial probiótico de los lactobacilos mediante ensayos *invitro*, el trabajo de Gutiérrez permitió la identificación de quince cepas de la colección microbiana, todas las cepas mostraron potencial probiótico, una de las cepas pertenece al género *Lactobacillus plantarum* y catorce pertenecen al género *Lactobacillus brevis*. Hasta éste trabajo la identidad del resto de la colección era desconocida.

La identificación de la colección bacteriana completa permitirá caracterizar a la población de *Lactobacillus* presentes en el pulque mediante el uso de técnicas dependientes del cultivo, permitiendo correlacionar estos resultados con los anteriormente reportados (Escalante *et al.*, 2004; 2008) y/o lograr la descripción de nuevas especies de *Lactobacillus* en el pulque, obteniendo de esta forma un

conocimiento más profundo de la microbiota de la bebida y dando pie a una mejor comprensión de las relaciones bacterianas dentro del producto fermentado.

## 5. Objetivos.

### Objetivo general.

- Realizar la caracterización y tipificación de los 81 bacilos lácticos aislados del pulque de Huitzilac, Morelos, posteriormente obtener la identidad de los grupos tipificados.

### Objetivos particulares.

- Conservar a largo plazo de los aislados identificados, para permitir su disponibilidad para futuras investigaciones.
- Conocer que especies de *Lactobacillus* se encuentran presentes en el pulque y de esta manera comprender el impacto que tienen dentro de la fermentación de la bebida.
- Correlacionar los resultados obtenidos con la información de microbiota de pulque disponible.
- Determinar el género y especie de los microorganismos encontrados y relacionarlo con otro tipo de alimentos en donde se han identificado.

## **6. Hipótesis.**

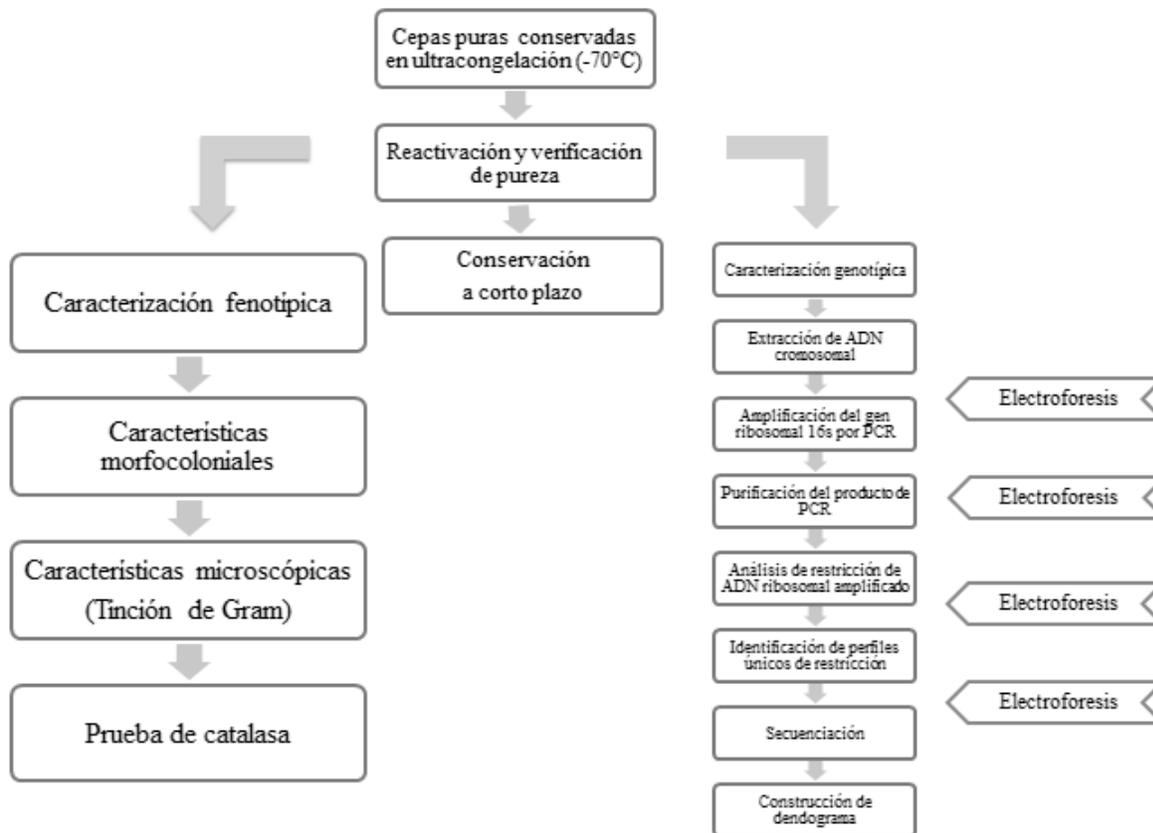
Las 81 cepas que conforman la colección bacteriana de bacilos lácticos aislados a partir de una muestra de pulque de Huitzilac pertenecerán al género *Lactobacillus*, la información obtenida permitirá hacer una correlación con las especies de *Lactobacillus* previamente descritas en el pulque mediante técnicas no dependientes de cultivo; o permitirá la descripción de nuevas especies de bacterias pertenecientes a este género dentro de la bebida.

## 7. Material y metodología.

### 7.1. Origen de la colección bacteriana.

A partir de muestras de pulque provenientes del municipio de Huitzilac, Gutiérrez logró el aislamiento de lactobacilos con el uso de un medio selectivo (AMRS con clindamicina y ciprofloxacino) bajo condiciones de anaerobiosis. Se obtuvo una población de ochenta y tres aislados, caracterizados por su carácter Gram-positivo, catalasa negativo y microscopía bacilar (Gutiérrez 2015).

Para éste trabajo de investigación la metodología que se siguió se presenta en la figura 5.



**Figura 5.** Diagrama de flujo del proceso experimental.

### 7.2. Reactivación y verificación de pureza de las cepas.

Las cepas se encontraban conservadas en ultracongelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  en crioviales con medio MRS de la marca DIFCO y glicerol a 50% p/v, se tomó una asada del cultivo y se inoculó en tubos que contenían caldo MRS, éstos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$

en condiciones de anaerobiosis lograda mediante el uso de una jarra anaeróbica y sobres generadores de atmósfera rica en CO<sub>2</sub> “Gaspak EZ”, durante 24, 48 y 72 horas, posteriormente los cultivos se inocularon por agotamiento en cuadrantes en agar MRS de la marca DIFCO, lo que permitió evaluar la pureza del cultivo y realizar la caracterización fenotípica. Las condiciones de incubación fueron las mismas que para los tubos con medio líquido.

### 7.3. Conservación a mediano plazo de las cepas.

Las cepas fueron conservadas por subcultivo en medio semisólido MRS con 0.5 % de agar bacteriológico y trazas de carbonato de calcio. Las muestras fueron incubadas en condiciones de microaerofilia a 37 °C. Los subcultivos fueron almacenados a 4°C por un periodo de 3 meses.

### 7.4. Caracterización fenotípica.

A partir de los cultivos reactivados puros se efectuaron las observaciones y descripciones morfológicas de las cepas (Anexos 1 y 2), posteriormente se realizó la tinción de Gram que permitió corroborar su carácter Gram-positivo y su morfología bacilar. En última instancia se llevó a cabo la prueba de catalasa debido a que las bacterias lácticas carecen de esta enzima (Parra, 2010).

### 7.5. Caracterización genotípica.

#### 7.5.1. Extracción de ADN cromosomal y electroforesis en gel.

Las cepas purificadas se inocularon en placa de Agar MRS por estriado radial e incubaron a 37° C durante 24 horas, de este desarrollo se realizó una suspensión a saturación en caldo MRS y se procedió a realizar la extracción de ADN cromosomal.

Se utilizó el sistema comercial UltraClean Microbial isolation kit (Mobio) y se siguieron las indicaciones del proveedor (Anexo 3), las que consisten en llevar a cabo una lisis celular mediante el uso de agentes físicos, como la agitación, y químicos, como el uso de detergentes. Posteriormente se retiraron los restos

celulares y se logró la unión selectiva del ADN a una membrana mediante la adición de una solución con una alta concentración de sales. El paso final de la extracción de ADN consiste en la elución de la molécula mediante el uso de una solución amortiguadora.

Mediante una electroforesis en gel de agarosa se verificó la presencia e integridad de ADN cromosomal de cada una de las extracciones realizadas, las condiciones de electroforesis fueron las siguientes: 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 cargó 5 µL de 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 <sup>TM</sup> (Thermo Scientific). El gel fue visualizado bajo luz ultravioleta (BIO – RAD, UV Transilluminator 2000), utilizando como revelador de bandas bromuro de etidio al 0.04%.

#### 7.5.2. Amplificación del ADN ribosomal 16S por PCR.

En la tabla 4 se presentan los reactivos utilizados para una mezcla de reacción de PCR para el gen ribosomal 16S, el templado se refiere al ADN cromosomal extraído, utilizando el par de primers: fD1 y rD1 (Weisburg *et al.*, 1991). La reacción de amplificación se realizó con la enzima Taq DNA polimerasa recombinante (Thermo Scientific) en un termociclador (Bio-Rad) cuya programación se muestra en la tabla 5, estas condiciones se habían utilizado anteriormente por Campos (2010), Juárez (2013) y Gutiérrez (2015). Posteriormente se validó la amplificación del gen 16S mediante una electroforesis (Inciso 7.5.1).

**Tabla 4.** Mezcla de reacción de PCR.

(Campos, 2015)

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
Buffer <sub>KCl</sub>	5	1X
MgCl <sub>2</sub>	5	2.5Mm
dNTP's	1	200μM
Primer fd1	0.6	0.12 μM
Primer rd1	0.6	0.12 μM
Agua	35.55	
Taq DNA polimerasa	1.25	1.25 U
Templado	1	

**Tabla 5.** Programación del termociclador.

1 ciclo de desnaturalización	95°C 5 minutos
30 ciclos de amplificación	Desnaturalización 95°C 1 minuto
	Alineamiento 49°C 1 minuto
	Elongación 72°C 1.5 minutos
1 ciclo de elongación final	72°C 5 minutos
Almacenamiento	4°C

### 7.5.3. Purificación de la amplificación del ADNr 16s.

Se llevó a cabo la purificación de los productos de PCR con el kit comercial Pure Link PCR Purification kit (Invitrogen), de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Anexo 4), mediante la adición de un buffer de unión al producto de la PCR, las condiciones se ajustan para la unión selectiva de ADN de doble hebra a la membrana de sílica en presencia de sales caotrópicas, el amortiguador de unión permite la eliminación de dímeros de primer y productos fallidos de la reacción en cadena de la polimerasa, posteriormente se utilizó un buffer de lavado que permite terminar de eliminar las impurezas y finalmente se llevó a cabo la elución, dando como resultado el ADN ribosomal 16s purificado. Para verificar la integridad y presencia del ADN ribosomal 16S se hizo una electroforesis (Inciso 7.5.1).

#### 7.5.4. Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado.

Mediante el uso de Nanodrop (Thermo Scientific) se determinó la concentración de ADN ribosomal 16S de cada una de las muestras purificadas y para la digestión enzimática se estandarizó a una concentración de 115ng/μL. Las muestras fueron digeridas con la enzima de restricción *BsuRI* (New England BioLabs) a 37°C durante un periodo de 1h (Tabla 6).

**Tabla 6.** Reacción de digestión enzimática

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer R	2 (10x)
<i>BsuRI</i>	0.5
Templado	Volumen ajustado a concentración de ADNr sea 115ng/μL
Agua	Volumen necesario par aforar a 20 μL
Total	20

Ejemplo de cálculo de volumen de templado y volumen de agua.

Concentración de ADNr de la cepa 2S1.21cgd = 16.5 ng/ μL

$$115ng \left[ \frac{1\mu L}{16.5ng} \right] = 6.96\mu L \text{ de templado}$$

$$2\mu L \text{ de Buffer R} + 0.5\mu L \text{ de BsuRI} + 6.96\mu L \text{ de templado} = 9.46\mu L$$

$$20\mu L \text{ de volumen final} - 9.46\mu L = 10.54\mu L \text{ de agua}$$

Al finalizar la digestión se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, a una velocidad de corrida de 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 20 μL de muestra con 3 μL del buffer de carga con azul de bromofenol y se utilizó el marcador de peso molecular O`GeneRuler 100pb DNA ladder <sup>TM</sup> (Thermo Scientific).

#### 7.6. Identificación de perfiles únicos de restricción.

La digestión enzimática se realizó bajo las mismas condiciones para el gen amplificado de las 81 cepas, de esta manera se atribuyó el mismo perfil de restricción a las cepas que reportaron bandas con un peso molecular idéntico (Jiménez, 2007).

### 7.7. Secuenciación del ADNr 16s e identificación del microorganismo.

Las muestras fueron secuenciadas en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM mediante la técnica de Sanger; en la tabla 7 se presenta la mezcla de reacción necesaria para secuenciar.

**Tabla 7.** Mezcla de reacción para secuenciar

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración
Primer fd1	1	10 pM
Agua mQ	1	-
ADNr 16S purificado	14	231 ng

Las secuencias fueron visualizadas con el programa Finch TV y DNA Chromatogram

Explorer Litea, posteriormente se analizaron en la base de datos del GenBank de National Center for Biotechnological Information (NCBI), utilizando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) y su identidad fue determinada de acuerdo al porcentaje de identidad y el valor de expectancia.

### 7.8. Construcción del dendograma

A partir de los patrones de bandeo generados en la digestión enzimática se construyó el dendograma con el paquete de programas Phylip-3.695 (Felsenstein, 2009).

- A partir de los perfiles de bandeo obtenidos para cada una de las cepas se elaboró la matriz de restricción.
- La matriz de restricción se utilizó para calcular la matriz de distancia de fragmentos de restricción con el programa Restdist.exe.
- La matriz de distancia de fragmentos de restricción se ingresó al programa Neighbor.exe, que mediante el algoritmo UPGMA construyó el dendograma.
- El dendograma fue visualizado con el programa TreeView X.

## 8. Resultados y discusión.

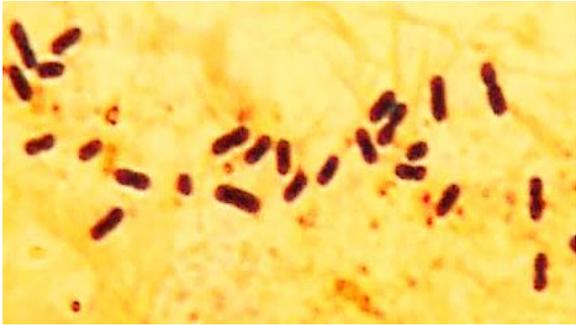
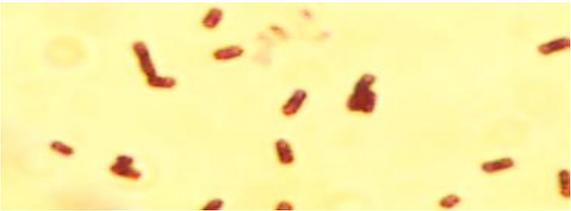
Todas las cepas se purificaron y cultivaron en medio MRS de la marca DIFCO, este medio sirve para cultivo, aislamiento y cuenta de bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus*, dentro de los ingredientes del medio se encuentran: peptona, dextrosa, polisorbato 80, acetato, magnesio y manganeso, ingredientes que proveen nitrógeno, carbono, y otros elementos necesarios para el crecimiento de bacterias pertenecientes a éste género, estos ingredientes actúan como inhibidores para otro tipo de microorganismos (DIFCO), la incubación de las cepas fue a 28 y 37 °C (Anexo 5) en una atmósfera microaerofílica. El uso de estas condiciones permitió promover el crecimiento de los microorganismos de interés, todos los cultivos fueron purificados mediante la selección de colonias que correspondían a la morfología reportada previamente (Gutierrez, 2015), el tiempo de incubación varió de 24 a 48 horas (Anexo 5).

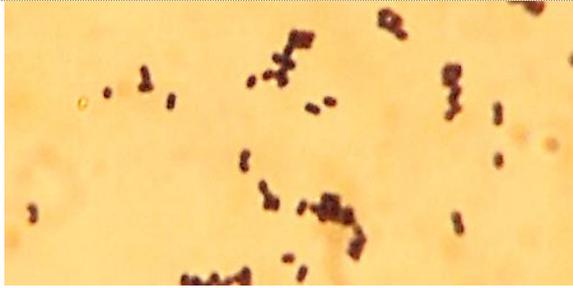
### 8.1. Caracterización fenotípica.

Las bacterias ácido lácticas están comprendidas por un diverso grupo de microorganismos Gram-positivo, no formadores de spora, anaerobios facultativos y catalasa negativo (Parra, 2010), debido a que la caracterización realizada es exclusiva para bacilos lácticos la morfología de las cepas debía ser bacilar.

La Tabla 8 agrupa a los 81 microorganismos de la colección con base en sus características fenotípicas (Anexo 5. Tabla con características fenotípicas de las 81 cepas), se presenta la tinción de Gram de 5 cepas distintas que representan a cada uno de los grupos que comparten morfología. Las cepas: 2S1.4, 2S1.19 y 1S1'.1 tienen una morfología similar; bacilos cortos y anchos Gram- positivo, éstas características morfológicas son las predominantes para la colección, presentándose en 3 de los 5 grupos totales , la cepa 2S1.21 cgd es Gram- positivo y presenta una morfología distinta al resto de las cepas mostradas en la tabla 8, ya que los bacilos son más largos y delgados , por último la cepa 2F2.23 es Gram- positivo y los bacilos son más cortos y anchos que el resto de las cepas.

**Tabla 8.** Características morfocoloniales, microscópicas, prueba de catalasa de la colección bacteriana. Tinción de Gram de las cepas 2S1.'15, 2S1.19, 2S1.21 cb, 1S1.'1, 2F2.23.

Cepas	Características morfocoloniales	Características microscópicas	Catalasa	Tinción de Gram
<b>Grupo 1</b>				
1S1'.33 - 2S1.23cb - 2S1.4 - 2S1.15 - 2S1.34 - 2S1.11ct - 2S1.40gd - 2S1.7 - 2S1''.1 - 2S1.11b - 2S1.29 - 1S1'.8 - 2S1''.2 - 2S1.8 - 2S1.38t - 1S1'.35 - 2S1''.3t - 1S1'.33t - 2S1''.36 - 2S1''.22 - 1S1'.11 - 2S1''.37t - 2S1.12 - 1S1.33bd - 2S1.28t - 2S1.14td - 1S1''.12 - 1S1''.22 - 2S1''.4t - 1S1'.9 - 1S1'.16t - 2S1''.5b - 1S1.25 - 2S1.35 - 1S1'.7 - 1F2.4 - 1S1.16 - 1S1'.15 - 1S1'.16b - 2S1.14tb - 1S1.31 - 1S1.10 - 1S1.25 - 1S1.32 - 2S1.5 - 1F2'.16 - 2S1.2 - 2S1''.12b - 1S1'.37 - 2S1''.5t - 1S1.15 - 2S1.37b - 2S1.32 - 2S1.37t - 2S1.38b - 2S1.28b - 1S1.27	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	(-)	 <p>Tinción de Gram cepa 2S1.' 15 (A)</p>
<b>Grupo 2</b>				
2S1.9 - 2S1.44 - 2S1.39cbb - 2S1.22 - 1S1.29 - 2S1.19 - 1F2.36b - 2S1.3 - 2S1'.19 - 2S1.20	Colonias circulares, pequeñas, bordes enteros, color crema	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	(-)	 <p>Tinción de Gram cepa 2S1.19 (B)</p>
<b>Grupo 3</b>				
2S1.21cgd - 2S1.10pt - 2S1.21cb - 1S1.11 - 2S1.1	Colonias circulares, planas, color crema, bordes ondulados	Gram (+) Bacilos largos	(-)	 <p>Tinción de Gram cepa 2S1.21 cb (C)</p>

Cepas	Características morfológicas	Características microscópicas	Catalasa	Tinción de Gram
<b>Grupo 4</b>				
1S1'.1	Colonias muy pequeñas, puntiformes, blancas, translúcidas	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	(-)	 <p>Tinción de Gram cepa 1S1'.1 (D)</p>
<b>Grupo 5</b>				
1F2.35 - 1F2.14 - 2F2.23 - 1F2.16 - 1F2.11 - 1S1".37b - 2F2.21	Colonias grandes, blancas, convexas, cremosas, bordes no limitados	Gram (+) Bacilococos	(-)	 <p>Tinción de Gram cepa 2F2.23 (E)</p>

**Figura 6.** Cepas obtenidas en agar MRS. (A) Cepa 2S1'.15, 1000x. Cultivo de 24 h de incubación a 37°C en condiciones de microaerofilia. Bacilos Gram positivos, algunos se encuentran como diplobacilos, son cortos y anchos. (B) Cepa 2S1.19, 1000x Cultivo de 24h de incubación a 37°C en condiciones de microaerofilia, diplobacilos Gram positivos, cortos y anchos. (C) Cepa 2S1.21 cb 1000x Cultivo de 48h de incubación a 28°C Bacilos Gram positivos, largos. (D) Cepa 1S1'.1, 1000x Cultivo de 48 h de incubación a 28°C Bacilos Gram positivos, en cadena o diplobacilos. (E) Cepa 2F2.23, 1000x Cultivo de 48h de incubación a 28°C Bacilos Gram positivos, cortos y anchos.

Las bacterias ácido lácticas están comprendidas por un diverso grupo de microorganismos Gram-positivos, no formadores de espora, anaerobios facultativos y catalasa negativo (Parra, 2010), debido a que la caracterización realizada es exclusiva para bacilos lácticos la morfología de las cepas debía ser bacilar.

La Tabla 8 agrupa a los 81 microorganismos de la colección con base en sus características fenotípicas, se presenta la tinción de Gram de 5 cepas distintas que representan a cada uno de los grupos que comparten morfología. Las cepas: 2S1.4, 2S1.19 y 1S1'.1 tienen una morfología similar; bacilos cortos y anchos Gram- positivos, éstas características morfológicas son las predominantes para la colección, presentándose en 3 de los 5 grupos totales , la cepa 2S1.21 cgd es Gram- positivo y presenta una morfología distinta al resto de las cepas mostradas en la tabla 8, ya que los bacilos son más largos y delgados , por último la cepa 2F2.23 es Gram-positivo y los bacilos son más cortos y anchos que el resto de las cepas.

Las cepas pertenecientes a los grupos 1 y 2 (Tabla 8) se comportaron de manera muy similar, mostraron las mismas condiciones de crecimiento, 37 °C en una atmósfera microaerófila y se desarrollaron en un periodo de 24 horas, las cepas que conforman estas agrupaciones mostraron morfología bacilar, Gram positivos y catalasa negativos, la diferencia radica en las características morfocoloniales, el grupo 1 mostró colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas y con bordes enteros mientras que en el grupo 2 las colonias eran circulares, pequeñas con bordes enteros y color crema. El grupo 3 conjunta cepas que se desarrollaron a 28 °C bajo condiciones de microaerofila en un periodo de 48 horas, la morfología de ese grupo es única en la colección ya que presenta bacilos largos, los otros cuatro grupos presentaron bacilos cortos. Los grupos 4 y 5 se desarrollaron a 28 °C en una atmósfera microaerófila en un periodo de 48 horas. Las cepas que conforman estas agrupaciones mostraron morfología bacilar, Gram positivos y catalasa negativos. Las características morfocoloniales presentadas el grupo 4 consistieron en colonias pequeñas, puntiformes, blancas y translúcidas, por último

el grupo 5 presentó colonias grandes, blancas, convexas, cremosas con bordes no limitados.

La caracterización fenotípica determinó que las 81 cepas estudiadas se encontraban dentro del grupo microbiano de interés para este estudio (Lahtinen *et al.*, 2012) por lo que se prosiguió a hacer la caracterización genotípica.

## 8.2. Caracterización genotípica.

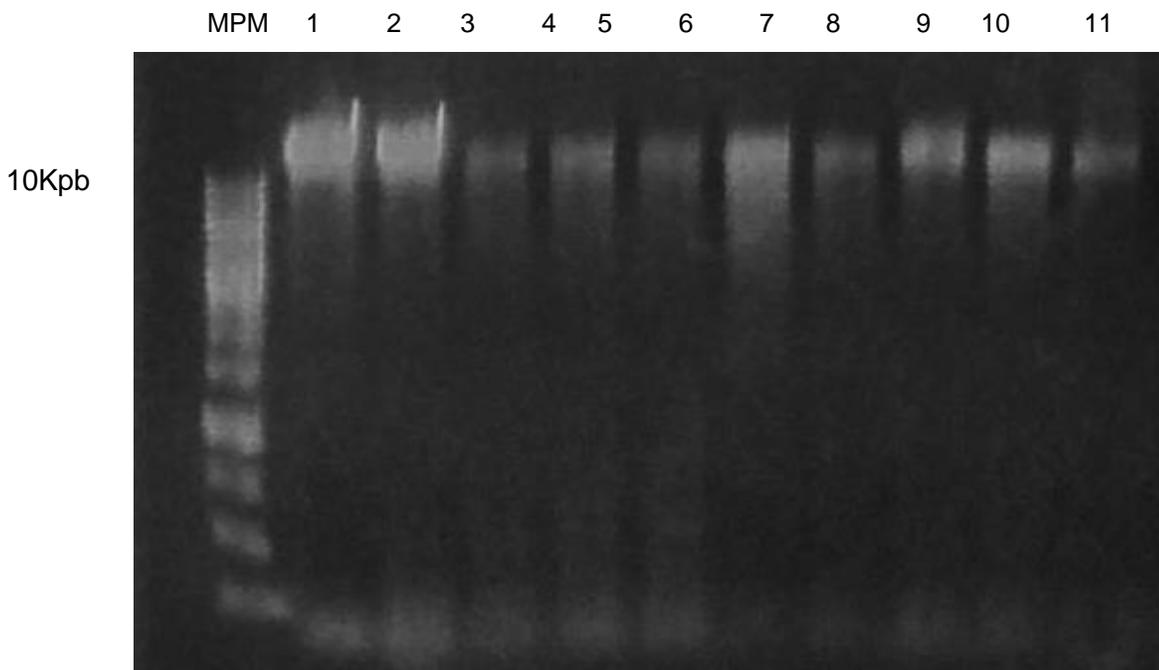
### 8.2.1 Extracción de ADN cromosomal y electroforesis.

La unidad funcional de la información genética es el gen, todos los microorganismos contienen genes, físicamente los genes están localizados en el cromosoma, que es el elemento genético principal de los procariontes. La extracción de ADN cromosomal de las células constituye el paso inicial en el proceso de una identificación genotípica, la técnica consiste en liberar el ADN de las estructuras celulares que lo rodean. (Madigan *et al.*, 2009). El ADN cromosomal es la materia prima de las técnicas de biología molecular utilizadas en éste trabajo.

Se llevó a cabo la extracción de ADN cromosomal como se describe en la sección 7.5.1, para verificar la correcta extracción del ADN cromosomal y evaluar su integridad se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % (Sección 7.5.2). La electroforesis consiste en la separación de moléculas mediante la aplicación de un campo eléctrico, el grado en el que una molécula en particular se mueve depende de la carga neta que tiene, de su tamaño y de su forma, las moléculas de ADN son separadas en función de su tamaño y forma, ya que tienen una carga uniforme. La electroforesis normalmente se lleva a cabo en gel de agarosa debido a que tiene un tamaño de poro que permite el paso de las moléculas de ADN. Las muestras que se desea examinar son cargadas en el gel y posteriormente es aplicado un campo eléctrico, los ácidos nucleicos migran a través del gel hacia el electrodo positivo a causa de los grupos fosfato cargados negativamente, como

resultado las moléculas más pequeñas y aquellas que se encuentran súper enrolladas avanzan más rápido que las grandes y lineales (Birge, 2006).

Los resultados obtenidos en la electroforesis de la extracción de ADN cromosomal de las cepas: 2S1.11 ct, 1S1.29, 2S1.14 tb, 2S1.11b , 1S1.10, 2S1.4, 2S1.15, 2S1. 21 cb, 2S1, 21cpr , 2S140 gd y 2S1.34, se presentan en la figura 7. Se puede observar la presencia de bandas por arriba de 10 Kpb, en bacterias el ADN cromosomal tiene un peso que va de 600 a 10,000 Kpb (Madigan *et al*, 2009), por lo que la presencia de bandas integras con ese peso molecular indica que la extracción de ADN fue exitosa. El producto de la extracción se utilizó como templado para la PCR.



**Figura 7.** Electroforesis de la extracción de DNA cromosomal de los bacilos lácticos aislados del pulque: Carril 1. 2S1.11 ct, Carril 2. 1S1.29, Carril 3. 2S1.14 tb, Carril 4. 2S1.11 b, Carril 5. 1S1.10, Carril 6. 2S1.4 , Carril 7. 2S1.15, Carril 8. 2S1. 21 cb, Carril 9. 2S1. 21 cpr, Carril 10. 2S140 gd, Carril 11. 2S1.34. Condiciones de corrida de electroforesis: Gel de agarosa al 1 % (Bromuro etidio 0.04%. Velocidad de corrida 100 V. Marcador de peso molecular (MPM): O'GeneRuler 1kb DNA ladder

### 8.2.2 Amplificación del ADN ribosomal 16s por PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar regiones de interés del ADN. El principio de la PCR consiste en la introducción de un par de primers en una mezcla que contiene ADN desnaturalizado y que posteriormente se renaturaliza, cuando el par de primers es homólogo a alguna parte de la secuencia se une a ésta y da origen a un dúplex pequeño, este par de dúplex define una región en el ADN que se encuentra delimitada por los extremos 5' de los primers, que posteriormente la ADN polimerasa puede usar como punto de inicio de síntesis de ADN, si se usan 30 ciclos de desnaturalización la secuencia de interés se amplifica más de un millón de veces, lo que permite una concentración de gen que sobrepasa por mucho a la concentración original, permitiendo la manipulación de la secuencia de interés (Birge, 2006).

El gen 16s sirve como cronómetro molecular, por lo que se asume que los cambios nucleotídicos se acumulan en su secuencia proporcionalmente al tiempo transcurrido, dichos cambios son por lo general neutrales, no interfieren en la función génica y ocurren al azar, con base en esta información se tomó la decisión de trabajar con el gen 16s aunando el hecho de que existe una extensa y siempre creciente base de datos de secuencias génicas para este (Madigan *et al.*, 2009).

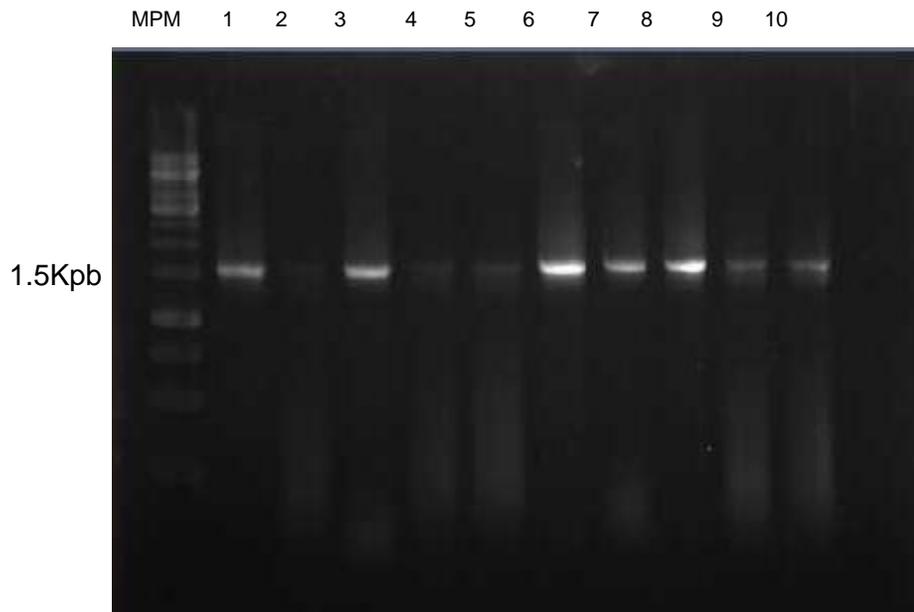
En la figura 8 se presenta la electroforesis realizada a los productos de la amplificación del ADNr 16s de las cepas: 2S1.11 ct, 1S1.29, 2S1.14 tb, 2S1.11 b, 1S1.10, 2S1.4, 2S1.15, 2S1. 21 cb, 2S1, 21cpr y 2S140 gd. A la altura de la banda correspondiente a un peso de 1.5 Kb, se observa la presencia de 10 bandas (Figura 8), esto demuestra una correcta amplificación del gen ribosomal debido a que los primers utilizados, fD1 y rD1 (Weisburg *et al.*, 1991) permiten la amplificación de un fragmento de gen 16s de este peso molecular.

### 8.2.3 Purificación del amplicón de ADNr 16s.

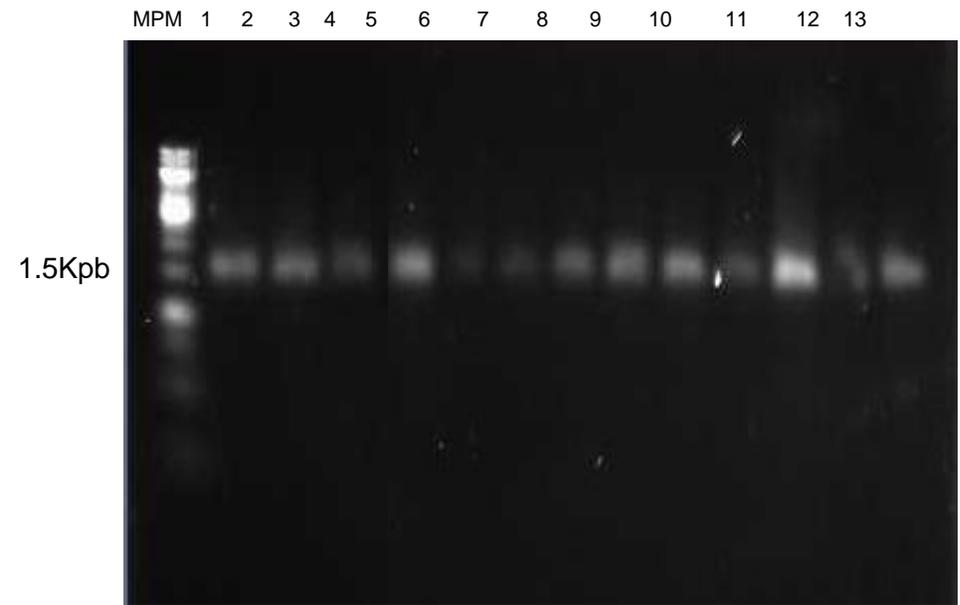
La purificación del producto de PCR se logra mediante la unión selectiva del ADN de doble cadena a una membrana de sílice en presencia de sales caotrópicas (Invitrogen).

Al comparar la figura 8 y la figura 9 se observa que la purificación cumplió con su cometido ya que la electroforesis realizada a los productos de purificación únicamente muestra bandas correspondientes al ADNr 16s, contrario a lo que se puede ver en la electroforesis de los productos de PCR dónde se distinguen bandas que no corresponden al producto de amplificación. La electroforesis permitió comprobar la integridad y asegurar la presencia de las purificaciones realizadas.

El objetivo de la purificación es eliminar residuos de oligonucleótidos que pudieran ser digeridos durante la reacción con la endonucleasa de restricción BsuRI, evitando de tal forma la generación de bandas de restricción no propias del gen (Campos, 2013).



**Figura 8.** Electroforesis de la amplificación del ADNr 16s de los bacilos lácticos aislados del pulque.: Carril 1. 2S1.11 ct, Carril 2. 1S1.29, Carril 3. 2S1.14 tb, Carril 4. 2S1.11 b, Carril 5. 1S1.10, Carril 6. 2S1.4, Carril 7. 2S1.15, Carril 8. 2S1. 21 cb, Carril 9. 2S1. 21 cpr, Carril 10. 2S140 gd, Condiciones de corrida de electroforesis: Gel de agarosa al 1 % (Bromuro etidio 0.04%. Velocidad de corrida 100 V. Marcador de peso molecular (MPM): O`GeneRuler 1kb DNA ladder



**Figura 9.** Electroforesis de la purificación del ADNr 16s de los bacilos lácticos aislados del pulque: Carril 1. 2S1.11 ct, Carril 2. 1S1.29, Carril 3. 2S1.14 tb, Carril 4. 2S1.11 b, Carril 5. 1S1.10, Carril 6. 2S1.4, Carril 7. 2S1.15, Carril 8. 2S1. 21 cb, Carril 9. 2S1. 21 cpr, Carril 10. 2S140 gd, Carril 11. 2S1.21cgd, Carril 12. 2S1.44, Carril 13, 2S1.21 cb. Condiciones de corrida de electroforesis: Gel de agarosa al 1 % (Bromuro etidio 0.04%. Velocidad de corrida 100 V. Marcador de peso molecular (MPM): O`GeneRuler 1kb DNA ladder

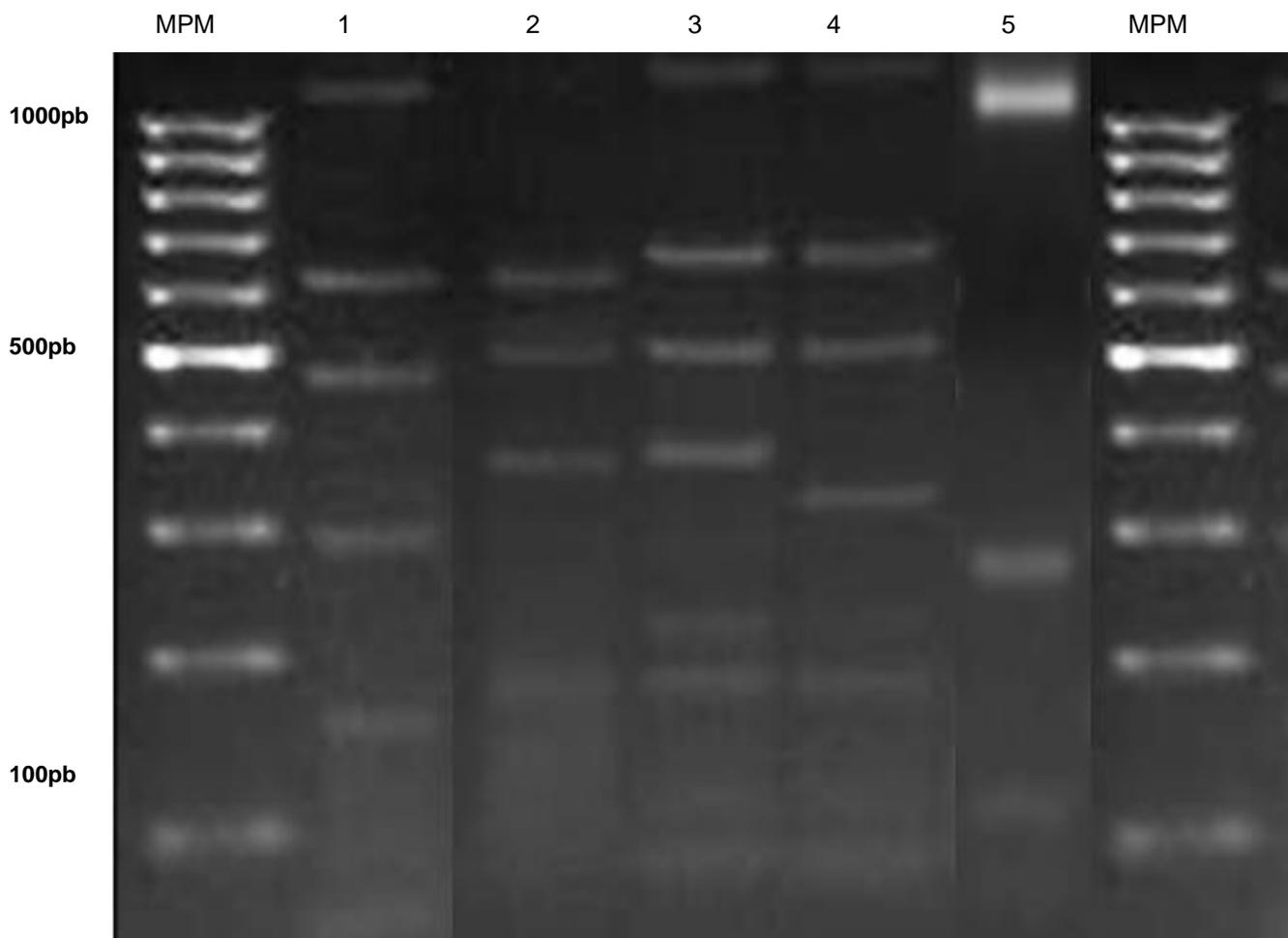
#### 8.2.4 Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado.

Las enzimas de restricción reconocen y cortan secuencias de bases específicas en el ADN, la enzima BsuRI reconoce la secuencia GGCC y lleva a cabo el corte en GG↓CC, debido a que la enzima siempre corta en el mismo sitio, el patrón de bandeo generado va a ser distinto para secuencias de ADN diferentes (Madigan *et al.*, 2009), lo que permite llevar a cabo una tipificación sin necesidad de conocer la identidad de los microorganismos con los que se está trabajando.

Un gel de electroforesis permite visualizar el resultado de la digestión enzimática y a su vez la identificación de perfiles únicos de bandeo. Mediante la electroforesis de las digestiones enzimáticas fue posible determinar que las 81 cepas que conformaban la colección bacteriana daban origen a 5 perfiles únicos de restricción (Anexo 6).

El perfil de restricción 1 (Figura 10) se presentó con mayor frecuencia en la digestión enzimática del gen 16S de la colección bacteriana (Tabla 9), este perfil presentó bandas con pesos moleculares de 600, 480, 300 y 180 pares de bases (Figura 10), sabemos que el gen 16S tiene un peso molecular aproximado de 1.5 kpb (Weisburg *et al.*, 1991), la suma de los pesos moleculares de las bandas presentes en esta digestión nos da un total de 1.56 kilopares de bases, lo cual coincide con lo reportado en la bibliografía, de esta forma podemos descartar la presencia de material genético ajeno al gen de interés. El perfil de restricción 2 presenta bandas con peso molecular de 600, 480, 380 y 180 pares de bases, es muy similar al perfil de restricción 1 con excepción de que éste en lugar de presentar una banda con peso molecular de 300 pares de bases la presenta en un peso de 380. El perfil de restricción 3 tiene un patrón de bandeo de 620, 480, 380 y 180 pares de bases, compartiendo una mayor similitud con el perfil 2, al diferenciarse únicamente por la banda que corresponde a 620 pares de bases. El perfil de restricción 4 presenta bandas con pesos moleculares de 620, 480, 300 y 180 pares de bases. El perfil de restricción 5 no tiene nada en común con el resto de los perfiles, presenta bandas con un peso molecular de 1,200 y 280 pares de bases.

Con base en lo discutido podemos observar que con excepción del perfil de restricción 5, todos los perfiles presentan bandas con pesos moleculares de 480 y 180 pares de bases, por lo que se puede elucidar que estas bandas son características para un género bacteriano específico y que las bacterias que presentaron estos perfiles de restricción lo comparten. De la misma manera se puede concluir que los microorganismos que presentaron el perfil de restricción 5 no comparten género con el resto de la colección bacteriana.



**Figura 10.** Electroforesis de la digestión enzimática de ADN ribosomal amplificado. de las cepas: Carril 1:1S1'.15 (Perfil 1), Carril 2: 2S1.19 (Perfil 2), Carril 3: 2S1.21 cb (Perfil 3), Carril 4: 1S1'.1 (Perfil 4), Carril 5: 2F2. 23 (Perfil 5). Condiciones de corrida de electroforesis: Gel de agarosa al 1 % (Bromuro etidio 0.04%. Velocidad de corrida 100 V. Marcador de peso molecular (MPM): O`GeneRuler 1kb DNA ladder.

**Tabla 9.** Perfil de restricción de la colección bacteriana. Cepas que lo componen, peso molecular del patrón de bandeado y fenotipo al que pertenecen (Tabla 8).

Cepas	Número de cepas que lo integran	Peso molecular bandas de restricción (pb)	Fenotipo
<b>Perfil de restricción 1</b>			
1S1'.33 - 2S1.23cb - 2S1.4 - 2S1.15 - 2S1.34 - 2S1.11ct - 2S1.40gd - 2S1.7 - 2S1".1 - 2S1.11b - 2S1.29 - 1S1'.8 - 2S1".2 - 2S1.8 - 2S1.38t - 1S1'.35 - 2S1".3t - 1S1'.33t - 2S1".36 - 2S1".22 - 1S1'.11 - 2S1".37t - 2S1.12 - 1S1.33bd - 2S1.28t - 2S1.14td - 1S1'.12 - 1S1".22 - 2S1".4t - 1S1'.9 - 1S1'.16t - 2S1".5b - 1S1.25 - 2S1.35 - 1S1'.7 - 1F2.4 - 1S1.16 - 1S1'.15 - 1S1'.16b - 2S1.14tb - 1S1.31 - 1S1.10 - 1S1.25 - 1S1.32 - 2S1.5 - 1F2'.16 - 2S1.2 - 2S1".12b - 1S1'.37 - 2S1".5t - 1S1.15 - 2S1.37b - 2S1.32 - 2S1.37t - 2S1.38b - 2S1.28b - 1S1.27	59	600 480 300 180	GRUPO 1  (Tabla 8)
<b>Perfil de restricción 2</b>			
2S1.9 - 2S1.44 - 2S1.39cbb - 2S1.22 - 1S1.29 - 2S1.19 - 1F2.36b - 2S1.3 - 2S1'.19 - 2S1.20	10	600 480 380 180	GRUPO 2  (Tabla 8)
<b>Perfil de restricción 3</b>			
2S1.21cgd - 2S1.10pt - 2S1.21cb - 1S1.11 - 2S1.1	5	620 480 380 180	GRUPO 3  (Tabla 8)
<b>Perfil de restricción 4</b>			
1S1'.1	1	620 480 300 180	GRUPO 4  (Tabla 8)
<b>Perfil de restricción 5</b>			
1F2.35 - 1F2.14 - 2F2.23 - 1F2.16 - 1F2.11 - 1S1".37b - 2F2.21	6	1,200 280	GRUPO 5  (Tabla 8)

En la tabla 9 se presenta un resumen de los perfiles de restricción obtenidos, cada uno se asocia a uno de los fenotipos anteriormente descritos (Tabla 8), sabemos que cada patrón de restricción único se asocia a un microorganismo (Madigan *et al.*, 2009), de esta forma podemos declarar que cada fenotipo se encuentra asociado a un grupo microbiano distinto.

#### 8.2.5 Secuenciación del ADNr 16S e identificación del microorganismo.

El término secuenciación se refiere a la determinación del orden preciso de los nucleótidos en una molécula de ADN, el método de Sanger genera fragmentos de ADN de diferentes longitudes que terminan en cada una de las cuatro bases y que se encuentran marcadas con un pigmento fluorescente, a continuación estos fragmentos son separados por electroforesis en gel de modo que las moléculas que difieren en un solo nucleótido de longitud se resuelven claramente, son necesarias cuatro reacciones separadas para la determinación de cada secuencia, una para cada fragmento terminado en cada una de las cuatro bases, las posiciones de los fragmentos se localizan por fluorescencia y las secuencias se pueden leer en el mismo gel (Madigan *et al.*, 2009).

Se eligieron uno o dos representantes de cada perfil único de restricción identificado y se secuenció el gen ribosomal 16S de cada uno de ellos. En la tabla 10 se presenta la identidad de cada una de las muestras que fue secuenciada así como el perfil al que representan.

Las secuencias fueron visualizadas con el programa Finch TV 1.4.0, posteriormente fueron analizadas en la base de datos de GenBank del National Center for Biotechnological Information (NCBI), utilizando el programa Basic Local Alignment Search Tool ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)).

**Tabla 10.** Identidad de las cepas con base en el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S.

Perfil de restricción	Cepa	Identidad	Porcentaje de cobertura (%)	Valor de expectancia	Identidad (%)	No. De acceso genbank
1	1S1'.15	<i>Lactobacillus brevis</i> IMAU:80562	99	0.0	99	HM058758.1
1	1S1'.18	<i>Lactobacillus brevis</i> Ni417	100	0.0	100	AB601171.1
2	2S1.19	<i>Lactobacillus plantarum</i> USIMI3	100	0.0	100	KT962242.1
2	2S1.3	<i>Lactobacillus plantarum</i> IMAU80059	100	0.0	99	GU125481.1
3	2S1. 21 cgd	<i>Lactobacillus mudanjiangensis</i> 11050	100	0.0	100	NR_125561.1
3	2S1.21 cb	<i>Lactobacillus mudanjiangensis</i> 11050	100	0.0	99	NR_125561.1
4	1S1'.1	<i>Lactobacillus kefir</i> 16_B	100	0.0	99	KT633920.1
5	2F2.23	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SF3	100	0.0	100	KR362874.1

El valor de cobertura indica el porcentaje de alineación de la secuencia sometida al análisis con la secuencia comparada, cuando se habla de un valor de cobertura igual o mayor a 94% se puede decir que el resultado obtenido es confiable, que el valor de expectancia sea cercano a 0.0 nos indica que la alineación no se debe a la probabilidad, en la tabla 10 se presentan los parámetros mencionados para todas las identificaciones, todos los valores de expectancia son de 0.0 y el porcentaje de cobertura se encuentra en un rango del 99 al 100%, por lo que podemos decir que las identificaciones son certeras.

La identidad de los grupos microbianos fue determinada con base en los perfiles únicos de restricción identificados, un patrón de bandeado idéntico indica que se trata de la misma secuencia y por lo tanto del mismo microorganismo (Madigan *et al.*, 2009), todos los microorganismos que comparten el patrón de bandeado con los

microorganismos que fueron identificados con base en la secuencia del gen ribosomal 16S tienen la misma identidad (Anexo7).

En la tabla 11 se presenta un resumen de la identidad de cada perfil único de restricción.

**Tabla 11.** Identidad de perfiles únicos de restricción y número de cepas que los conforman.

Perfil de restricción	Identidad	Número de cepas que lo integran
1	<i>Lactobacillus brevis</i>	59
2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	10
3	<i>Lactobacillus mudanjiangensis</i>	5
4	<i>Lactobacillus kefir</i>	1
5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	6

La colección de bacilos lácticos aislados del pulque se encuentra compuesta en mayor proporción por bacterias del género *Lactobacillus* y una pequeña parte está conformada por bacterias del género *Leuconostoc* (Tabla 11).

59 cepas de las 81 totales pertenecen al género y especie *Lactobacillus brevis*, esto quiere decir que el 72.8 % de la población se encuentra representado por este microorganismo, *Lactobacillus plantarum* es la especie que se encuentra en mayor proporción después de *L. brevis*, representando un 12.34 % de la población, *Leuconostoc mesenteroides* representa un 7.4%, *Lactobacillus mudanjiangensis* representa un 6.1% y por último *Lactobacillus kefir* microorganismo que únicamente representa un 1.2% de la población total.

Esta colección de bacilos lácticos aislados del pulque permitió identificar a *Lactobacillus brevis* (Gutiérrez, 2015) por primera vez en el pulque, esta bacteria se encuentra anteriormente descrita en productos lácteos, masas fermentadas y productos cárnicos (Lund *et al*, 2000; Ravishankar *et al*, 2015). De igual manera es

la primera vez que se describe a *Lactobacillus mudanjiangensis* en esta bebida, microorganismo que se encuentra descrito previamente en masas ácidas y pepinillos en China (Gu *et al*, 2015).

A pesar de que tanto *Lactobacillus plantarum* como *Lactobacillus kefir* ya se encontraban descritos en el pulque (Escalante *et al*, 2004) es la primera vez que se logra su aislamiento y cultivo a partir de esta bebida. *Lactobacillus plantarum* es una bacteria que se ha identificado en productos vegetales fermentados y productos cárnicos fermentados (Hui *et al*, 1995). *Lactobacillus kefir* se encuentra ampliamente descrito en los granos de kéfir que es un producto lácteo que al igual que el pulque tiene presencia de etanol, hasta cierto punto su presencia se puede relacionar con la de *Lactobacillus brevis* (Lund *et al*, 2000).

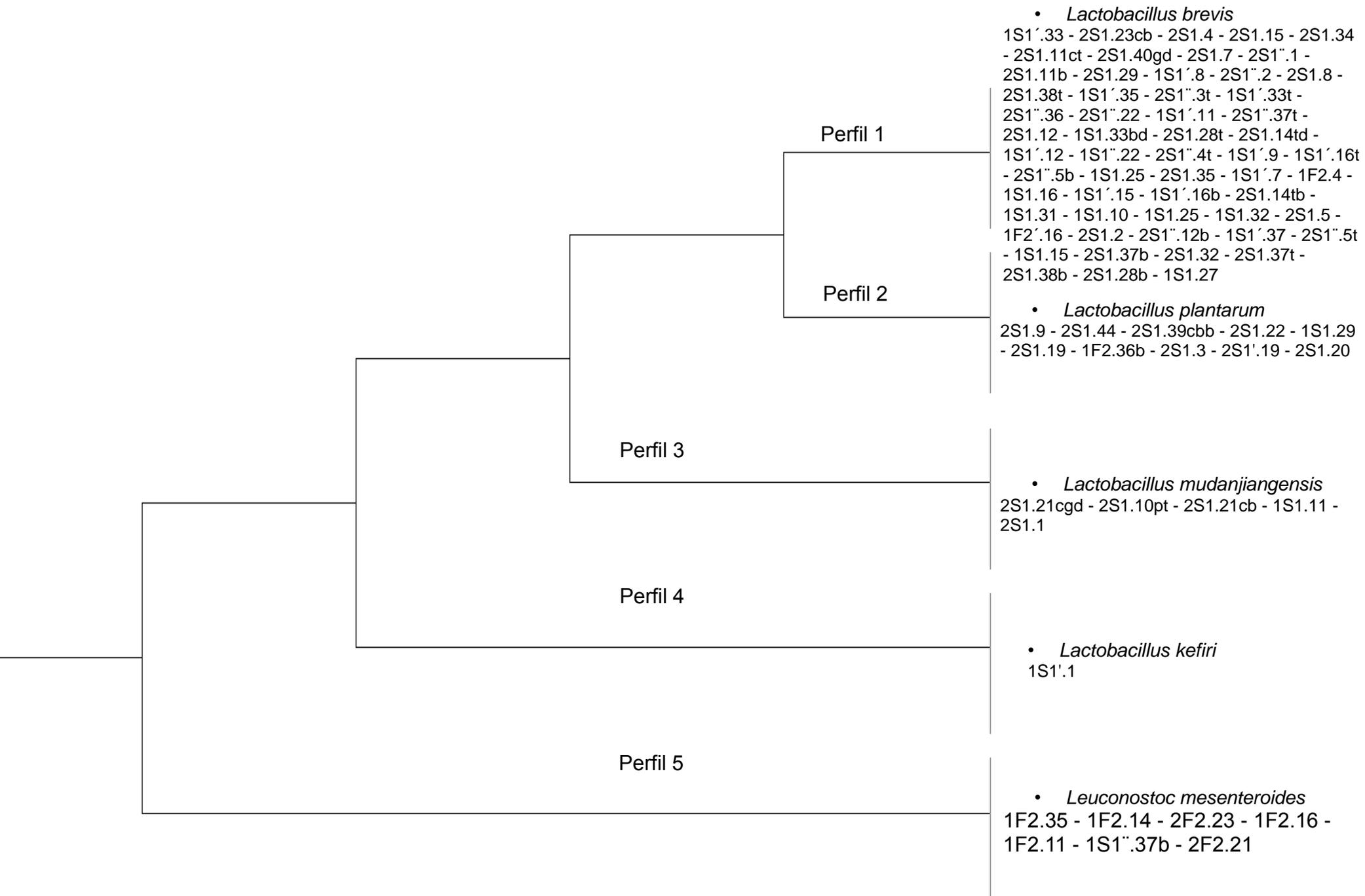
*Leuconostoc mesenteroides* ya ha sido descrito en el pulque en diversas ocasiones (Escalante *et al*, 2004; Escalante *et al*, 2008; Lozano, 2007; Campos, 2010).

### 8.3 Dendograma.

La filogenia utiliza la homología como evidencia de la presencia de un ancestro común entre organismos. El objetivo de la filogenia es determinar cladas; que es un grupo de organismos relacionados por las características compartidas. Los dendogramas son diagramas ramificados que permiten crear un resumen sobre las relaciones evolutivas que existen entre los organismos, permite visualizar las relaciones evolutivas que existen entre especies, en un dendograma las puntas de las ramas son particulares de una especie, mientras que los puntos de ramificación representan a los ancestros en común (Sapp, 2015).

La primera clada que presenta el dendograma (Figural 11) divide a *Leuconostoc mesenteroides* de la población total de *Lactobacillus*, si analizamos los perfiles únicos de restricción identificados (Figura 10) podemos ver que con excepción del perfil de restricción que corresponde a *Leuconostoc mesenteroides* (Perfil 5) todos los perfiles de restricción cuentan con un par de bandas con peso molecular de 180 y 480 pb , de esta forma es posible decir son propias del género *Lactobacillus*, mientras que las propias de *Leuconostoc mesenteroides* se

encuentran en 1200 y 280 pb , ambos géneros pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (Lahtinen *et al*, 2012) y en el cladograma se puede apreciar que tienen un ancestro común. Posteriormente se abre una clada que separa a a *Lactobacillus kefir*, del resto de los lactobacilos presentes en la colección, el perfil de restricción de este microorganismo y la clada que se encuentra a continuación separa a *Lactobacillus mudanjiangensis*, al observar los patrones de bandeo que se encontraron para estas dos bacterias podemos encontrar que ambos presentaron bandas con un peso molecular de 620, 480 y 180 pares de bases, lo que nos permite hablar de una zona de homología para esta zona del gen 16S de ambas especies. La siguiente clada separa a *Lactobacillus plantarum* de *Lactobacillus brevis*, microorganismos que también presentan patrones de digestión muy similares, diferenciados únicamente por la presencia de una banda de 300pb en el caso de *Lactobacillus brevis* y de 380 pb en el caso de *Lactobacillus plantarum*.



**Figura 11.** Dendograma elaborado con el paquete de programas Phylip-3.695 (Felsenstein, 2009). A partir de los perfiles de bandeos obtenidos para cada una de las cepas se elaboró la matriz de restricción., ésta se utilizó para calcular la matriz de distancia de fragmentos de restricción con el programa Restdist.exe, se ingresó al programa Neighbor.exe, mediante el algoritmo UPGMA se construyó el dendograma. Dendograma visualizado con el programa TreeView X.

## 9. Conclusiones.

- El análisis por ARDRA de una colección de 81 aislados de BAL de muestras de pulque de la localidad de Huitzilac, Morelos, permitió la tipificación e identificación de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus mudanjiangensis*, *Lactobacillus kefir* y *Leuconostoc menteroides*.
- El microorganismo *Lactobacillus brevis* domina la colección de bacilos lácticos aislados del pulque, representando un 72.3 % de la población total, mostró una gran variabilidad intraespecie dentro de la bebida. Esta colección microbiana fue la primera que permitió la identificación de esta bacteria dentro del pulque (Gutiérrez, 2015), de la misma forma permitió que *Lactobacillus mudanjiagensis* fuera descrito por primera vez en el pulque.
- *Lactobacillus plantarum* representa a la segunda cepa encontrada en mayor proporción, representando un 12% de la población total.
- *Leuconostoc mesenteroides* es capaz de desarrollarse en condiciones que son óptimas para el crecimiento de un lactobacilo y representó la especie que se encontró como el tercer microorganismo con mayor predominancia dentro de la colección.
- Al realizar una digestión enzimática del ADNr 16S de bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* con la enzima *BsuRI* se generan dos bandas con peso molecular de 480 y 180 pb que son propias de este género.

## **10. Perspectivas.**

- La caracterización fenotípica mediante el uso de tiras API de toda la colección bacteriana.
- Realizar la tipificación polifásica de toda la colección.
- Tener un mejor entendimiento de las condiciones que se presentan en la bebida debido a los microorganismos presentes en ésta. Comprender cómo se comporta la microbiota asociada al pulque y permitir el desarrollo de algún producto alimentario que cuente con características microbiológicas similares.

## 11. Referencias.

Birge, E. (2006). *Bacterial and bacteriophage genetics*. 5th edition New York: Springer.

Boone, R., Castenholz, R. (Eds.) (2001). *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, 2ª edición, Editorial Springer Vol. 1

Bu'lock, J. (1991). *Biotecnología básica*. España: Editorial Acribia,

Campos, I. (2010). *Aislamiento e identificación de bacterias lácticas del pulque con capacidad probiótica*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

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.

Carr, F. y Chill, D., (2002). The Lactic Acid Bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 4:281-370

DIBICO, S.A de C.V. Medios de cultivo Deshidratados y Preparados para Uso Microbiológico. 2009. Agar-Agar-1093.pdf. [En línea] (Actualizado: domingo, 14 de septiembre de 2014 09:49:06 p.m.) Disponible en:

<http://www.dibico.com/fichast/1093.pdf> [Último acceso 14 de septiembre de 2014]

Escalante, A.; Rodríguez, M.; Martínez, A.; López-Munguía, A.; Bolívar, F.; Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, as determined by 16 S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters* 235:273-279.

Escalante, A.; Giles-Gómez, M.; Hernández, G.; Córdova-Aguilar, M.; López-Munguía, A.; Gosset, G.; Bolívar, F. (2008). Analysis of bacteria community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology* 124: 126-134.

Escalante, A.; Giles-Gómez, M.; Esquivel, G.; Matus, V.; Moreno-Terrazas, R.; Lopez-Munguía, A.; Lappe-Oliveras, L. (2012). Pulque Fermentation En: Hui, H *et al.* ed. *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology*. New York: Taylor & Francis Group, an Informa business. 691-706.

Erlwein, S., Velasco, A. (2013). *Ejercicios etnográficos, Proceso de elaboración del pulque y su importancia económica y concepción social en Apan, Hidalgo*. 1ª edición. CONACULTA

G, C.T., Li, C.Y., Yanga, L.J., Huo, G.O. (2013). *Lactobacillus mudanjiangensis* sp. nov., *Lactobacillus songhuajiangensis* sp. nov. and *Lactobacillus nenjiangensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional pickle and sourdough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63:4698-4706

García-Garibay, M, y López-Munguía, A. (1993). Bebidas alcohólicas no destiladas. En: García-Garibay, M., Quintero-Ramírez, R. y López-Munguía, A. (Eds). *Biotecnología Alimentaria*. México D.F: Limusa.

Gutierrez, E. (2015). *Detección de lactobacilos aislados del pulque con capacidad probiótica*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de México.

Hui, Y.H., Khachatourians. (1995). *Food Biotechnology Microorganisms*. 1st Edition. WILEY-VCH

Invitrogen. *PureLink PCR Purification Kit*, [En línea] (Actualizado: 14 de septiembre de 2011) Disponible en:

[https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink\\_pcr\\_qrc.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink_pcr_qrc.pdf) [Último acceso 23 de noviembre de 2014]

Jimenez, D. (2007) *Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de Azotobacter spp. mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S*. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana.

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.

Lahtinen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Von Wright. (2012). *Lactic Acid Bacteria, Microbiological and functional aspects*. 4th Edition. CRC Press: Taylor & Francis Group.

Lozano, M. (2007). *Análisis de la diversidad de bacterias Gram-positivas presentes en aguamiel y en el inicio de la fermentación del pulque, por técnicas microbiológicas y moleculares*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Lund, M., Baird-Parker, T., Gould, G. (2000). *The microbiological safety and quality of food Volume I*. Aspen Publishers, Inc

Madigan, M.; Martinko, J.; Dunlap, P.; Clark, D. (2009). *Brock Biología de los microorganismos*. 12va edición. Madrid: Pearson Addison Wesley.

Monterrubio, A. (2007). *Las haciendas pulqueras en México*. 1ª Edición. Universidad Nacional Autónoma de México

Parra, R. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. Vol 8 No.1. Enero- Junio 2010. 13: 93- 106.

Peña, C., Cardona, G. (2010). *Dinámica de los suelos amazónicos: Procesos de degradación y alternativas para su recuperación*. 1ª Edición. Colombia: Instituto Sinchi. Páginas: 41-42.

Ravishankar, R., Bai, J. (2005). *Food safety and preservation techniques*. 1st Edition. CRC Press: Taylor & Francis Group.

Reinheimer, J., Zalazar, C. (2006). *Avances en microbiología, bioquímica y tecnología de quesos*. 1ª edición. Argentina: Universidad Nacional Del Litoral. Páginas: 49-53.

Sánchez- Marroquín, A., Hope, P., (1953). Fermentation and Chemical Composition Studies of Some Species. *Agricultural and Food Chemistry*. 1:246-249

Sapp, J. (2005). *Microbial Phylogeny and evolution Concepts and controversies*. 1a edición. Estados Unidos. OXFORD. 160-178

Tiedje, J. M., Asuming, S. (1999). *Opening the black box of soil microbial diversity*. *Applied Soil Ecology*. 13:109-122

Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D. and Lane, D. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703

Winn., Allen., Janda., Koneman., Procop., Schreckenberger., Woods. *Koneman Diagnóstico microbiológico*. 6ª Edición. Editorial Médica Panamericana.

## **12. Anexos.**

### Anexo 1. Tinción de Gram

- Preparar frotis bacterianos
- Teñir con cristal violeta ( 1 minuto)
- Lavar con agua el exceso de colorante
- Cubrir con lugol ( 1 minuto)
- Lavar con agua el exceso de lugol
- Decolorar con alcohol – acetona hasta que deje de perder color el frotis.
- Lavar con agua el residuo de alcohol – acetona.
- Teñir con safranina ( 1 minuto)
- Lavar con agua el exceso de colorante.
- Secar la preparación.
- Examinar al microscopio.

### Anexo 2. Prueba de catalasa.

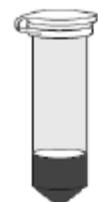
- Colocar una colonia pura sobre un portaobjetos limpio.
- Agregar con gotero una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> AL 30% sobre la colonia.
- En caso de ser positivo observar la formación de burbujas.

Anexo 3. Extracción de ADN cromosomal con el kit comercial Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit.

- Colocar 1.8 mL de cultivo bacteriano en un Collection tube de 2 ML, centrifugar a 10,000 rpm durante 30 segundos, decantar el sobrenadante. Volver a centrifugar a 10, 000 rmp durante 30 segundos. Eliminar el sobrenadante.
- Re suspender el pellet de células en 300 µL de MicroBead Solution. Mezclar con el vórtex. Transferir las células a Microbead Tube.
- Agregar 50 µL de la solución MD1 al Microbead Tube.
- Colocar el Microbead Tube en el vórtex durante 10 minutos a velocidad máxima.
- Centrifugar a 10,000 rpm durante 30 segundos el Microbead Tube.
- Transferir el sobrenadante a un 2mL Collection Tube.
- Agregar 100 µL de solución MD2, mezclar en el vórtex por 5 segundos. Refrigerar a 4° C durante 5 minutos.
- Centrifugar los tubos a 10,000 rpm durante 1 minuto.
- Transferir el sobrenadante a un 2mL Collection Tube.
- Agregar 900 µL de solución MD3 y mezclar con vórtex durante 5 segundos.
- Transferir 700 µL de muestra a Spin Filter, centrifugar a 10,000 rpm durante 30 segundos. Eliminar el líquido filtrado. ( Se realizará un total de 2 o 3 cargas)
- Agregar 300 µL de solución MD4 y centrifugar a 10,000 rpm durante 30 segundos.
- Eliminar el filtrado.
- Centrifugar a 10,000rpm durante un minuto.
- Colocar el Spin Filttter en un Collection Tube nuevo.
- Agregar 50 µL de colución MD5 en el centro de la membrana del Spin Filter.
- Centrifugar a 10,000rpm durante 30 segundos.
- Eliminar el Spin Filter.
- El ADN en el tubo se encuentra listo para usar en alguna otra metodología.

- Almacenar a -20°C

#### Anexo 4. Metodología de purificación con el kit comercial Pure Link PCR Purification Kit



Añadir a los productos de PCR el amortiguador de unión apropiado con isopropanol



Transferir la muestra a un tubo de microcentrífuga con filtro de membrana



Adicionar el amortiguador de lavado a la columna



Adicionar el amortiguador de elución y eluir el ADN en un tubo limpio

Anexo 5. Características fenotípicas de las 81 cepas cultivadas en el laboratorio: características morfocoloniales, microscópicas y resultado a la prueba de catalasa.

<b>Cepa</b>	<b>Características morfocoloniales</b>	<b>Características microscópicas</b>	<b>Catalasa</b>
1S1'.33	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.23cb	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.4	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.15	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.34	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.11ct	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.40gd	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.7	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1".1	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.11b	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.29	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1'.8	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )

2S1".2	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.8	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.38t	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1'.35	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1".3t	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1'.33t	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1".36	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1".22	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1'.11	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1".37t	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.12	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1.33bd	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.28t	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.14td	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )

1S1'.12	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1".22	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1".4t	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1'.9	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1'.16t	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1".5b	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1.25	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.35	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1'.7	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1F2.4	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1.16	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1'.15	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1'.16b	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.14tb	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )

2S1.40pb	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1.31	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.21cgd	Colonias circulares, planas, color crema, bordes ondulados	Gram (+) Bacilos largos	( - )
2S1.10pt	Colonias circulares, planas, color crema, bordes ondulados	Gram (+) Bacilos largos	( - )
2S1.21cb	Colonias circulares, planas, color crema, bordes ondulados	Gram (+) Bacilos largos	( - )
1S1.11	Colonias circulares, planas, color crema, bordes ondulados	Gram (+) Bacilos largos	( - )
2S1.1	Colonias circulares, planas, color crema, bordes ondulados	Gram (+) Bacilos largos	( - )
2S1.9	Colonias circulares, pequeñas, bordes enteros, color crema	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.44	Colonias circulares, pequeñas, bordes enteros, color crema	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.39cbb	Colonias circulares, pequeñas, bordes enteros, color crema	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.22	Colonias circulares, pequeñas, bordes enteros, color crema	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1.29	Colonias circulares, pequeñas, bordes enteros, color crema	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.19	Colonias circulares, pequeñas, bordes enteros, color crema	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1F2.36b	Colonias circulares, pequeñas, bordes enteros, color crema	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.3	Colonias circulares, pequeñas, bordes enteros, color crema	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1'.19	Colonias circulares, pequeñas, bordes enteros, color crema	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.20	Colonias circulares, pequeñas, bordes enteros, color crema	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )

1S1.10	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1.25	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1.32	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.5	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1F2'.16	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.2	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1".12b	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1'.37	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1".5t	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1.15	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.37b	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1'.18	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.32	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.37t	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )

2S1.38b	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1.28b	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1'.1	Colonias muy pequeñas, puntiformes, blancas, tanslúcidas	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
2S1".7	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1S1.27	Colonias circulares, pequeñas, blancas, brillantes, convexas, bordes enteros	Gram (+) Bacilos cortos, anchos	( - )
1F2.35	Colonias grandes, blancas, convexas, cremosas, bordes no limitados	Gram (+) Bacilo-cocos	( - )
1F2.14	Colonias grandes, blancas, convexas, cremosas, bordes no limitados	Gram (+) Bacilo-cocos	( - )
2F2.23	Colonias grandes, blancas, convexas, cremosas, bordes no limitados	Gram (+) Bacilo-cocos	( - )
1F2.16	Colonias grandes, blancas, convexas, cremosas, bordes no limitados	Gram (+) Bacilo-cocos	( - )
1F2.11	Colonias grandes, blancas, convexas, cremosas, bordes no limitados	Gram (+) Bacilo-cocos	( - )

Anexo 6. Perfiles de restricción identificados tras la digestión enzimática del gen ribosomal 16S de las 81 cepas aisladas a partir del pulque.

- + → Indica presencia de banda con ese peso molecular.
- - → Ausencia de banda con ese peso molecular.

Peso molecular

Perfil	Cepa	1500	1300	1200	1100	1000	800	700	620	600	500	480	400	380	320	300	280	200	180	120	100
1	1S1'.33	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.23cb	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.34	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.11ct	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.40gd	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1''.1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.11b	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.29	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1'.8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1''.2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.38t	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1'.35	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1''.3t	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1'.33t	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1''.36	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1''.22	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1'.11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1''.37t	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1.33bd	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.28t	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.14td	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1'.12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1''.22	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1''.4t	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1'.9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1'.16t	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1''.5b	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.35	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1'.7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1F2.4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1.16	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1'.15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1'.16b	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-

1	2S1.14tb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1.31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1F2.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.12b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1.37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.5t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.37b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.37t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.38b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.28b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	2S1.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1	1S1.27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
2	2S1.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
2	2S1.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
2	2S1.39cbb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
2	2S1.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
2	1S1.29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
2	2S1.19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
2	1F2.36b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
2	2S1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
2	2S1.19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
2	2S1.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
3	2S1.21cgd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
3	2S1.10pt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
3	2S1.21cb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
3	1S1.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
3	2S1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
4	1S1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
5	1F2.35	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
5	1F2.14	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
5	2F2.23	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
5	1F2.16	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
5	1F2.11	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
5	1S1.37b	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Anexo 7. Identidad de las 81 cepas con base en la comparación de perfiles únicos de restricción con las cepas identificadas con base en la secuencia del gen ribosomal 16S.

<b>Perfil de restricción</b>	<b>Cepa</b>	<b>Identidad</b>
1	1S1'.33	<i>L. brevis</i>
1	2S1.23cb	<i>L. brevis</i>
1	2S1.4	<i>L. brevis</i>
1	2S1.15	<i>L. brevis</i>
1	2S1.34	<i>L. brevis</i>
1	2S1.11ct	<i>L. brevis</i>
1	2S1.40gd	<i>L. brevis</i>
1	2S1.7	<i>L. brevis</i>
1	2S1".1	<i>L. brevis</i>
1	2S1.11b	<i>L. brevis</i>
1	2S1.29	<i>L. brevis</i>
1	1S1'.8	<i>L. brevis</i>
1	2S1".2	<i>L. brevis</i>
1	2S1.8	<i>L. brevis</i>
1	2S1.38t	<i>L. brevis</i>
1	1S1'.35	<i>L. brevis</i>
1	2S1".3t	<i>L. brevis</i>
1	1S1'.33t	<i>L. brevis</i>
1	2S1".36	<i>L. brevis</i>
1	2S1".22	<i>L. brevis</i>
1	1S1'.11	<i>L. brevis</i>
1	2S1".37t	<i>L. brevis</i>
1	2S1.12	<i>L. brevis</i>
1	1S1.33bd	<i>L. brevis</i>
1	2S1.28t	<i>L. brevis</i>
1	2S1.14td	<i>L. brevis</i>
1	1S1'.12	<i>L. brevis</i>
1	1S1".22	<i>L. brevis</i>
1	2S1".4t	<i>L. brevis</i>
1	1S1'.9	<i>L. brevis</i>
1	1S1'.16t	<i>L. brevis</i>
1	2S1".5b	<i>L. brevis</i>
1	1S1.25	<i>L. brevis</i>
1	2S1.35	<i>L. brevis</i>
1	1S1'.7	<i>L. brevis</i>
1	1F2.4	<i>L. brevis</i>
1	1S1.16	<i>L. brevis</i>
1	1S1'.15	<i>L. brevis</i>
1	1S1'.16b	<i>L. brevis</i>

1	2S1.14tb	<i>L. brevis</i>
1	1S1.31	<i>L. brevis</i>
1	1S1.10	<i>L. brevis</i>
1	1S1.25	<i>L. brevis</i>
1	1S1.32	<i>L. brevis</i>
1	2S1.5	<i>L. brevis</i>
1	1F2.16	<i>L. brevis</i>
1	2S1.2	<i>L. brevis</i>
1	2S1.12b	<i>L. brevis</i>
1	1S1.37	<i>L. brevis</i>
1	2S1.5t	<i>L. brevis</i>
1	1S1.15	<i>L. brevis</i>
1	2S1.37b	<i>L. brevis</i>
1	2S1.18	<i>L. brevis</i>
1	2S1.32	<i>L. brevis</i>
1	2S1.37t	<i>L. brevis</i>
1	2S1.38b	<i>L. brevis</i>
1	2S1.28b	<i>L. brevis</i>
1	2S1.7	<i>L. brevis</i>
1	1S1.27	<i>L. brevis</i>
2	2S1.9	<i>L. plantarum</i>
2	2S1.44	<i>L. plantarum</i>
2	2S1.39cbb	<i>L. plantarum</i>
2	2S1.22	<i>L. plantarum</i>
2	1S1.29	<i>L. plantarum</i>
2	2S1.19	<i>L. plantarum</i>
2	1F2.36b	<i>L. plantarum</i>
2	2S1.3	<i>L. plantarum</i>
2	2S1.19	<i>L. plantarum</i>
2	2S1.20	<i>L. plantarum</i>
3	2S1.21cgd	<i>L. mudanijangensis.</i>
3	2S1.10pt	<i>L. mudanijangensis.</i>
3	2S1.21cb	<i>L. mudanijangensis.</i>
3	1S1.11	<i>L. mudanijangensis.</i>
3	2S1.1	<i>L. mudanijangensis.</i>
4	1S1.1	<i>L. kefir</i>
5	1F2.35	<i>L. mesenteroides</i>
5	1F2.14	<i>L. mesenteroides</i>
5	2F2.23	<i>L. mesenteroides</i>
5	1F2.16	<i>L. mesenteroides</i>
5	1F2.11	<i>L. mesenteroides</i>
5	1S1.37b	<i>L. mesenteroides</i>