

00551

UNAM
POSGRADO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

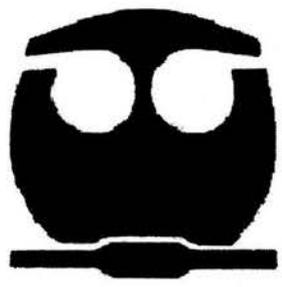
VARIABILIDAD EN LA MICROBIOTA DE
DIFERENTES MUESTRAS DE POZOL,
DETERMINADA MEDIANTE ELECTROFORESIS
EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE
(DGGE).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
BIOL. SANDRA BOLAÑOS NÚÑEZ

Tutora: DRA. MA. DEL CARMEN WACHER RODARTE



MÉXICO, D. F.

Mayo 2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

RECONOCIMIENTOS

El proyecto de tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte en el laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología en el conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce y agradece la colaboración del Dr. Jean-Pierre Guyot para la realización de este proyecto.

Se agradece a la Dra. Alicia González y al Ingeniero Héctor Quezada por el apoyo brindado en la clonación de productos de PCR.

Se agradece a la M. en C. Rebeca Ramírez su valiosa colaboración en la parte estadística de este proyecto.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

Se agradece al Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD) por el apoyo económico brindado.

El **Comité Tutorial** que asesoró el desarrollo del proyecto de tesis estuvo formado por:

Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Dra. Esperanza Martínez Romero	I. de Fijación del Nitrógeno, UNAM

El **Jurado de Examen de Maestría** estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Sergio Sánchez Esquivel	I. Invest. Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Guillermo Mendoza Hernández	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dra. Esperanza Martínez Romero	I. de Fijación del Nitrógeno, UNAM
Suplente	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Sylvie Le Borgne Le Gall	I. Mexicano del Petróleo

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Sandra Bolaños Núñez

FECHA: 12 Mayo 04

FIRMA: [Firma]

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a Carmen Wachter: por la confianza y el apoyo incondicional que siempre me ha brindado. Por creer en mi y por permitirme formar parte de su equipo. Por la dirección de este proyecto, por su valiosa amistad y por ser ejemplo a seguir como profesionista y como persona.

A Gerardo Ortiz: por la amistad, el constante apoyo y por mostrarme el camino.

A Gloria Díaz: por su ayuda y atenciones brindadas. Por la convivencia.

A Teresita Sainz: por las sugerencias y aportaciones al proyecto.

A Llia: por el constante apoyo en el trabajo, por los buenos momentos, las buenas aventuras, pero sobre todo por la buena amistad.

A Checo y Carlitos: por todos los momentos compartidos.

A mis compañeros del laboratorio 324: Alicia, Mariana y Alex; por su comprensión y paciencia.

A los profesores y compañeros del Laboratorio 312 por su constante apoyo.

Al jurado de examen, por sus contribuciones para mejorar esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

EL ÉXITO EN LA VIDA PUEDE DEFINIRSE COMO EL CRECIMIENTO CONTINUO DE LA FELICIDAD Y LA REALIZACIÓN PROGRESIVA DE LAS METAS. EL ÉXITO ES LA CAPACIDAD DE CONVERTIR LOS DESEOS EN REALIDAD.

Deepak Chopra

DEDICO ESTE TRABAJO A MI FAMILIA, QUE ES LO MÁS IMPORTANTES EN MI VIDA. CON SU PACIENCIA, APOYO Y AMOR ME HAN BRINDADO EL IMPULSO Y EL DESEO DE SEGUIR ADELANTE.

GLORIA: Hemos andado juntas todos los caminos. La vida que no nos ha sido fácil en algunos momentos, nos ha unido y nos ha hecho crecer. Miro hacia atrás y reflexiono: gracias por tu amor, por creer en mi y por apoyarme siempre. Gracias por ser mi madre.

YOLI: Me has enseñado a creer en mí, a valorarme y a confiar en mí. Gracias por mostrarme el camino, por ser mi amiga, mi tía, mi madre. Gracias por tus consejos, por estar siempre cuando te necesito, por quererme tanto. Gracias porque a tí te debo lo que soy.

TITA: Eres muy especial para mi. Gracias por todo lo que me has dado. Gracias por ser mi tía.

PEPE: Nuestra amistad no sabe de tiempos, su fuerza se basa en la sinceridad y en aceptarnos como somos. Gracias por estar conmigo en los momentos alegres y en los difíciles. Gracias por ser mi siempre amigo. Gracias por ser mi hermanoide.

MIGUEL: Tu amor me ha iluminado como un rayo de sol y me ha dado la fuerza de seguir adelante y de ser mejor. Gracias por el respeto, la sinceridad, comprensión y paciencia que día a día consolidan este sentimiento y nos unen más. Gracias por el presente, el pasado y por creer en el futuro.

A LA MEMORIA DE MI PADRE ROGELIO BOLAÑOS RAMOS.
PORQUE NUNCA TE OLVIDO

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	1
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	5
2.1 Alimentos fermentados	5
2.1.1 Alimentos fermentados tradicionales de México	6
2.1.2 El pozol	6
2.1.2.1 Elaboración del pozol	7
2.1.2.2 Microbiología del pozol	9
2.2 Electroforesis en gel con gradientes desnaturizante (DGGE)	15
2.2.1 Introducción	15
2.2.2 Pasos previos al DGGE	17
2.2.3 DGGE	18
2.2.4 Aplicación del DGGE en alimentos fermentados	19
2.2.5 Índices ecológicos en microbiología	22
CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS	24
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	25
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y METODOS	26
5.1 Muestras de pozol	27
5.1.1 Extracción y purificación de ADN de pozol	29
5.1.2 Amplificación por PCR de la región V3 del gen ARN 16S	30
5.2 Montaje y calibración de la técnica de DGGE	32
5.2.2 Separación de los productos de PCR mediante la técnica de DGGE	33
5.2.3 Secuenciación de fragmentos de geles de DGGE	34
5.2.4 Identificación de los microorganismos correspondientes a cada banda	34
5.3 Clonación de productos de PCR	35

Contenido	Página
5.3.2 Transformación de células competentes	35
5.3.3 PCR para verificar la presencia de colonias transformantes de <i>E. coli</i>	36
5.3.4 Obtención de ADN plasmídico	37
5.3.5 Secuenciación	37
5.3.6 Identificación de bandas	37
5.4 Análisis de las huellas comunidades microbianas	38
5.4.1 Índice de riqueza	38
5.4.2 Coeficiente de similitud de Dice SD	38
5.4.3 Índice de diversidad	39
5.4.4 Índice de dominancia de Simpson	39
5.4.5 Análisis estadístico	39
5.5 Caracterización de cepas puras de pozol	40
5.5.1 Extracción y purificación de ADN de las cepas puras	40
5.5.2 Amplificación por PCR de un fragmento del gen ARN 16S y secuenciación de la región V1	41
5.5.3 Limpieza de los productos de PCR de las cepas puras	43
5.5.4 Secuenciación	43
5.5.5 Comparación de secuencias	43
CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
6.1 Caracterización de cepas puras de pozol para montar la técnica del DGGE	44
6.2 Variabilidad microbiológica del pozol	50
6.2.1 Masa recién molida	50
6.2.2 Fermentación al tiempo cero	51
6.2.3 Fermentación a las 24 y 48 h	53
6.2.4 Fermentación a las 72 h	58
6.3 Identificación de fragmentos de geles de DGGE	61
6.3.1 Secuenciación	61

Contenido	Página
6.3.2 Banda No. 20	63
6.3.2.1 Características del género <i>Weissella</i>	63
6.3.3 Banda No. 21	64
6.3.3.1 Características del género <i>Aerococcus</i>	65
6.3.3.2 Características de <i>P. urinae-equi</i>	65
6.3.4.1 Características del género <i>Streptococcus</i>	67
6.4 Comparación de patrones de bandas de microorganismos identificados	68
6.5 Análisis de huellas de comunidades microbianas	74
6.5.1 Análisis de las comunidades de cada muestra a través del tiempo	74
6.5.1.1 Productor 1	74
6.5.1.2 Productor 2	76
6.5.1.3 Productor 3	78
6.5.1.4 Productor 4	78
6.5.1.5 Productor 5	81
6.5.1.6 Productor 6	82
6.5.1.7 Productor 7	84
6.5.2 Índices de riqueza, diversidad y dominancia	88
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	95
CAPÍTULO 8. REFERENCIAS	96
CAPÍTULO 9. ANEXOS	105

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla	Página
Tabla 1. Estimación del porcentaje de bacterias cultivables.	15
Tabla 2. Protocolo de PCR para amplificar la región V3 del gen ARN de bacterias	30
Tabla 3. Cebadores para PCR utilizados en este estudio.	31
Tabla 4. Condiciones de la reacción de PCR para amplificar la región V3 del gen ARN 16 S.	31
Tabla 5. Condiciones para secuenciar cepas	34
Tabla 6. Protocolo para la reacción de PCR de células transformantes.	36
Tabla 7. Condiciones de la reacción de PCR para amplificar los insertos clonados en el vector pGEM ®-T.	37
Tabla 8. Condiciones para secuenciar ADN plasmídico.	37
Tabla 9. Cebadores para PCR utilizados en este estudio.	42
Tabla 10. Protocolo para amplificar por PCR el fragmento V1 del gen ARNr 16S.	42
Tabla 11. Condiciones de PCR Termociclador para amplificar la región V1 del gen ARNr 16S.	42
Tabla 12. Condiciones para secuenciar cepas puras de pozol	43
Tabla 13. Identificación de cepas puras de pozol, mediante la comparación de la secuencia de la región V1 del gen ARNr 16S y del API 50CH.	46
Tabla 14. Secuencia de bandas cortadas del gel de DGGE y de la identificación de bandas de comunidades de acuerdo a un patrón de cepas puras de pozol previamente elaborado.	62
Tabla 15. Microheterogeneidad de cepas puras de pozol.	70
Tabla 16. Valores promedio de los Índices de Riqueza (R), Diversidad (H) y Dominancia (S) calculados a partir de las huellas de comunidades bacterianas de geles de DGGE (Ampe <i>et al.</i> , 2000).	92

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura	Página
Fig. 1 Diagrama que resume el proceso de elaboración de pozol en Villahermosa, Tabasco.	8
Fig. 2 Mapa de la estructura secundaria del gen 16S donde se muestran las regiones hipervariables y las regiones conservadas.	16
Fig. 3 Imagen que representa la migración del fragmento de ADN a través de un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante.	18
Fig. 4 Diagrama que resume la estrategia experimental empleada en el análisis de las comunidades de bacterias lácticas de pozol.	26
Fig. 5 Diagrama de la colecta de pozol en la ciudad de Villahermosa Tabasco.	28
Fig. 6 Gel perpendicular de DGGE.	32
Fig. 7 Gel paralelo de DGGE.	33
Fig 8 Representación del gen ribosomal 16 S y cebadores utilizados para su secuenciación	41
Fig. 9 Patrones de bandas de cepas puras de pozol en gel de DGGE. A. <i>Leuc. citreum</i> , B. <i>W. confusa</i> , C. <i>W. confusa</i> , D. <i>Lb. plantarum</i> , E. <i>Leuc. argentum</i> , F. <i>Lb. plantarum</i> , G. <i>Leuc. citreum</i> , H. <i>S. bovis</i> I. <i>W. confusa</i> , J. <i>Lact. lactis</i> , K. <i>L. lactis</i>	47
Fig 10 Gel de DGGE de muestras de cepas puras de pozol. (C) amplificación mediante PCR de una mezcla de ADN de cada una de las cepas de pozol, utilizando una concentración homogénea de templado [50 ng/ μ l]. (1-8) Amplificación por PCR de cada una de las cepas de pozol previamente identificadas (1 <i>Lb. plantarum</i> , 2 <i>Lact. raffinolactis</i> , 3 <i>Lac. lactis lactis</i> , 4 <i>S. sp.</i> 5 <i>Leuc. citreum</i> , 6 <i>W. confusa</i> , 7 <i>Leuc. argentum</i> , 8 <i>Lb. pentosus</i>).	48
Fig 11 A Diagrama de patrones de bandas de muestras de pozol de masa recién molida de diferentes productores. B Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD .	50
Fig 12 A Diagrama de patrones de bandas de muestras de la superficie de pozol de diferentes productores a las cero horas de fermentación. B Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD .	51

Figura	Página
Fig 13 A Diagrama de patrones de bandas de muestras del centro de pozol de diferentes productores a las cero horas de fermentación. B Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD	52
Fig 14 A Diagrama de patrones de bandas de muestras de la superficie de pozol de diferentes productores a las 24 horas de fermentación. B Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD.	54
Fig 15 A Diagrama de patrones de bandas de muestras del centro de pozol de diferentes productores a las 24 horas de fermentación. B Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD.	55
Fig 16 A Diagrama de patrones de bandas de muestras de la superficie de pozol de diferentes productores a las 24 horas de fermentación. B Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD.	56
Fig 18 A Diagrama de patrones de bandas de la superficie de pozol de diferentes productores a las 72 horas de fermentación. B Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD.	58
Fig 19 A Diagrama de patrones de bandas de muestras del centro de pozol de diferentes productores a las 72 horas de fermentación. B Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD	59
Fig. 20 Representación en gel de DGGE de la huella de comunidades microbianas de muestras de pozol de dos productores diferentes. Se observan las 3 bandas seleccionadas (20, 21 y 29) que fueron cortadas y reamplificadas. Estas permanecieron constantes en casi todos los tiempos de fermentación. TC.-Todas las cepas de pozol; MRM.- masa recién molida; T1s-T3s .- Tiempos de fermentación (0,1,2 y 3 días)de la superficie de la muestra de pozol; T1c-T3c.- Tiempos de fermentación del centro de la muestra de pozol.	61
Fig. 21. Árbol filogenético obtenido por análisis de secuencias de ARNr 16S, donde se muestra la relación entre organismos del género <i>Pediococcus</i> y otras especies. (De Collins <i>et al.</i> , 1990).	66
Fig. 22 Gel de DGGE de muestras de cepas puras de pozol donde se observa microheterogeneidad en cada una de ellas.	69

Figura	Página
Fig. 23 Patrón de cepas de pozol en la huella de comunidades microbianas.	71
Fig. 24 Digitalización del patrón de comunidades de muestras de pozol del productor uno a diferentes tiempos de fermentación	77
Fig. 25 Digitalización del patrón de comunidades de muestras de pozol del productor 2 a diferentes tiempos de fermentación	77
Fig. 26 Digitalización del patrón de comunidades de muestras de pozol del productor 3 a diferentes tiempos de fermentación.	80
Fig. 27 Digitalización del patrón de comunidades de muestras de pozol del productor 4 a diferentes tiempos de fermentación.	80
Fig. 28 Digitalización del patrón de comunidades de muestras de pozol del productor 5 a diferentes tiempos de fermentación.	83
Fig. 29 Digitalización del patrón de comunidades de la muestras de pozol del productor 6 a diferentes tiempos de fermentación.	83
Fig. 30 Digitalización del patrón de comunidades de muestras de pozol del productor 7 a diferentes tiempos de fermentación.	85
Fig. 31 Promedios de riqueza de bacterias lácticas en la superficie de muestras de pozol de diferentes productores a diferentes tiempos de fermentación (MRM.-masa recién molida, 0, 24, 48 y 72h).	88
Fig. 32 Promedios de riqueza de bacterias lácticas en el centro de muestras de pozol de diferentes productores a diferentes tiempos de fermentación (MRM.-masa recién molida, 0, 24, 48 y 72h).	89
Fig. 33 Promedios de diversidad de bacterias lácticas en la superficie de muestras de pozol de diferentes productores a diferentes tiempos de fermentación (MRM.-masa recién molida, 0, 24, 48 y 72h).	92
Fig. 34 Promedios de diversidad de bacterias lácticas en el centro de muestras de pozol de diferentes productores a diferentes tiempos de fermentación (MRM.-masa recién molida, 0, 24, 48 y 72h).	93
Fig. 35 Promedios de dominancia de bacterias lácticas en la superficie de muestras de pozol de diferentes productores a diferentes tiempos de fermentación (MRM.-masa recién molida, 0, 24, 48 y 72h).	93

Figura**Página**

Fig. 36 Promedios de dominancia de bacterias lácticas en el centro de muestras de pozol de diferentes productores a diferentes tiempos de fermentación (MRM.-masa recién molida, 0, 24, 48 y 72h).

94

RESUMEN

El pozol es una bebida ácida refrescante que se consume desde la época prehispánica en el sureste de México. Se prepara diluyendo en agua una masa fermentada de nixtamal que es consumida como alimento básico por diversos grupos indígenas y como bebida refrescante por mestizos de las mismas regiones. Se conocen los cambios microbiológicos que ocurren durante la fermentación; sin embargo, debido a que ocurre una fermentación natural, el objetivo de este trabajo fue determinar la variabilidad en la microbiota de muestras de pozol de diferentes productores.

Se estudiaron pozoles de 7 productores diferentes de Villahermosa, Tabasco; se tomaron muestras de masa recién molida y con el resto se hicieron bolas, se envolvieron en hojas de plátano y se incubaron a 30°C durante 72 h. Se extrajo el ADN de la superficie y del centro de cada muestra y se amplificó por PCR la región V3 del gen ARNr 16S. Los fragmentos amplificados se separaron por DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante) y se compararon los patrones de bandas obtenidos con los de cepas previamente aisladas del pozol e identificadas por comparación de secuencias parciales del gen ARNr 16S o secuenciando cada banda.

Al comparar la diversidad microbiana entre los diferentes productores, se observó que existe una mayor variación en la composición microbiológica de pozoles de diferentes productores al inicio de la fermentación, sin embargo, al transcurrir el proceso, la comunidad microbiana se va estructurando progresivamente. Se detectaron microorganismos cuya presencia fue constante en la mayoría de las muestras y se identificaron como *Streptococcus suis*, *Weissella sp.*, *Pediococcus urinae-equi* y *Aerococcus sp.* El género *Lactobacillus* estuvo presente en casi todas las muestras de masa recién molida, sin embargo, tendió a desaparecer a lo largo de la fermentación. Se observó que organismos de los géneros *Leuconostoc* y *Lactococcus* se encontraron esporádicamente a lo largo de la fermentación. Por último, no se encontraron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la riqueza, diversidad y dominancia del centro y superficie de la muestra de pozol.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista ecológico, las comunidades microbianas son consideradas extremadamente complejas, debido a la variedad de microorganismos presentes, a las interacciones interespecíficas y a las relaciones con el medio. En la década pasada, se demostró que las técnicas microbianas convencionales sólo permitían conocer una pequeña fracción de la diversidad microbiana (Muyzer y Smalla, 1998). Lo anterior fue comprobado al tratar de estudiar las comunidades de ambientes complejos, como lo son las ventilas hidrotermales, las plantas de tratamiento de aguas residuales (Amann *et al.*, 1995) los microorganismos del tracto digestivo, o de ambientes que parecían menos complejos, como los encontrados en los alimentos fermentados tradicionales (Ampe *et al.*, 1999^a; ben Omar y Ampe, 2000). En éstos participa una microbiota muy vasta y es aquí donde se han reportado muchos microorganismos difíciles de cultivar o no cultivables. Con lo antes mencionado, se concluyó que las técnicas convencionales no permitían obtener un conocimiento real de la diversidad microbiana en una muestra del ambiente.

Durante los últimos años se han desarrollado estrategias basadas en métodos moleculares para detectar e identificar de forma rápida y directa microorganismos presentes en una muestra sin necesidad de cultivarlos. Una de las técnicas más utilizadas en los últimos años ha sido el DGGE, que es una electroforesis en gel con gradiente desnaturizante. Este método incluye las siguientes etapas: (i) extracción total de ácidos nucleicos, (ii) amplificación de un fragmento particular de ADN/ARN por PCR, utilizando cebadores específicos, (iii) elaboración de una huella de comunidades de microorganismos presentes en la muestra en un gel de DGGE, (iv) identificación de bandas del gel de DGGE mediante incisión de bandas y reamplificación por PCR, para después hacer una secuencia y comparar en una base de datos; o bien clonar los productos de PCR en un vector y secuenciar.

El DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante) es una técnica recientemente incorporada al estudio de comunidades microbianas que separa fragmentos de ADN, previamente amplificados, por PCR, de la misma longitud pero con diferentes secuencias. La separación está basada en la movilidad electroforética de un fragmento de ADN de doble cadena que conforme va migrando en el gel de poliacrilamida se va desnaturizando parcialmente de acuerdo con su secuencia nucleotídica; el fragmento de ADN debe tener en un extremo una grapa de G+C para evitar que se desnaturalice totalmente y no se detenga en el gel (Fromin *et al.*, 2002).

La técnica fue diseñada inicialmente para detectar mutaciones puntuales, ya que presenta una eficiencia hasta del 99%, sin embargo, los ecologistas microbianos la han adoptado para el análisis de comunidades bacterianas completas. Hasta hace poco tiempo, los resultados de estos patrones de las huellas de comunidades se habían restringido a una interpretación visual, sin embargo, al aplicar métodos estadísticos, la técnica de DGGE es una herramienta aún más prometedora.

La técnica de DGGE permite analizar simultáneamente numerosas muestras, siendo posible la supervisión de las comunidades microbianas o de los grupos bacterianos cuya ocurrencia y frecuencia relativa son afectadas por cualquier parámetro ambiental. Este es el caso del pozol, que es una bebida ácida, refrescante, no alcohólica, de origen maya; se prepara a partir de una masa de maíz previamente nixtamalizada y fermentada que se diluye en agua. Esta bebida refrescante constituye la base de la alimentación de numerosos grupos étnicos. El pozol también es utilizado con fines ceremoniales o medicinales por grupos indígenas (chontales, choles, mayas, lacandones, tzeltales, tzotziles, zoques, tojolabales, mames y zapotecos) y mestizos en estados del sureste del país (Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Veracruz y Oaxaca) (Ulloa *et al.*, 1987; Cañas *et al.*, 1993).

Se conocen los cambios microbiológicos que ocurren durante la fermentación del pozol (ben Omar y Ampe. 2000); sin embargo, debido a que éste se produce mediante una fermentación natural, es necesario determinar la variabilidad entre muestras de diferentes orígenes con el interés de saber si existen microorganismos cuya presencia sea constante en la fermentación y que a su vez sean los responsables de brindarle las características propias.

En este trabajo se realizó un análisis global de la variabilidad de las comunidades microbianas presentes en el centro y la superficie de muestras de pozol de diferentes productores de una misma región.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 ALIMENTOS FERMENTADOS.

Los alimentos fermentados son aquellos cuyo procesamiento involucra el crecimiento y la actividad de microorganismos (bacterias, mohos o levaduras). Son productos antiguos, cuyo origen se pierde en los albores de la historia; probablemente surgieron en forma accidental y el hombre los acogió rápidamente debido a sus características sensoriales y a que podían ser conservados por un tiempo prolongado. Actualmente algunos de ellos se han industrializado y son de consumo generalizado en cualquier parte del mundo. Sin embargo, la mayoría de los conocidos hasta la fecha son de manufactura artesanal y se producen en forma regional.

Un aspecto importante sobre los alimentos fermentados es la mejora de sus propiedades sensoriales, como son el aroma, el color, el olor y el sabor. Dichas características y el mayor tiempo de conservación del alimento, han hecho que éstos hayan tenido aceptación por el consumidor en la antigüedad y hasta nuestros días.

La fermentación tiene ventajas adicionales, entre las que se pueden mencionar: aumento de la digestibilidad del sustrato, reducción del tiempo de cocción, inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y de la producción de algunas toxinas, eliminación de sabores y texturas que pueden considerarse desagradables. En algunos casos los alimentos fermentados presentan una mejora en la biodisponibilidad de sus proteínas y ciertas vitaminas (Wang *et al.*, 1981; Nout *et al.* 1989). Por último, cabe destacar que la fermentación es un método barato que prolonga la vida de anaquel de los alimentos (Cooke *et al.*, 1987; Nout *et al.*, 1989).

2.1.1 Alimentos fermentados tradicionales de México.

El maíz ha sido durante mucho tiempo la base de la alimentación en los pueblos prehispánicos mesoamericanos. A este cereal se le han asociado conceptos religiosos y mitos sobre el origen de la vida y otros elementos de la cultura, razón por la cual no resulta extraño que la mayoría de los alimentos fermentados que se consumen en México y en América Latina se preparen a base de maíz (Casillas y Vargas, 1984).

La importancia de los alimentos fermentados en México data desde la época prehispánica han sido relevantes en la vida diaria y ceremonial de numerosos grupos indígenas. La tradición de elaborarlos y consumirlos ha persistido hasta la época actual. Sin embargo, hasta la fecha, únicamente se han estudiado algunos, de los más de 200 alimentos y bebidas fermentadas que hay en el país. Entre los que se encuentra el Agua agria, el Sendecho, el Tescüino, el Atole, el Tepache (Cruz-Ulloa y Ulloa, 1973), el Tamal agrio (Valderrama y Ramírez, 1993; Escamilla *et al.*, 1991) la Tortilla agria (Nieto y Vázquez, 1993; Escamilla *et al.*, 1991); el Atole agrio y el Pozol (Cruz-Ulloa y Ulloa, 1973; Escamilla *et al.*, 1991). Además de que el grado de avance en la investigación de cada uno de ellos es variable, puede considerarse que su conocimiento microbiológico y químico es aún incipiente.

2.1.2 El pozol.

El pozol (del náhuatl *pozolli*; espumoso) es una bebida ácida, no alcohólica, refrescante de origen maya preparado a partir de una masa de maíz previamente nixtamalizada y fermentada que se suspende en agua. Esta bebida es utilizada con fines ceremoniales o medicinales y es ampliamente consumida entre grupos indígenas (chontales, choles, mayas, lacandones, tzeltales, tzotziles, zoques, tojolabales, mames y zapotecos) y mestizos en estados del sureste de México

(Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Veracruz y Oaxaca)(Ulloa *et al.*, 1987; Cañas *et al.*, 1993).

2.1.2.1 Elaboración del pozol.

Para preparar esta bebida (Fig. 1), el maíz se limpia para eliminar tanto el material extraño como los granos podridos que darían mal aspecto al pozol. Posteriormente, el maíz se nixtamaliza hirviéndolo en agua con un puñado de cal (aproximadamente 10% p/v de $\text{Ca}(\text{OH})_2$), hasta que se hinchan los granos y se desprenden las cascarillas, a continuación los granos se frotan con las manos y se enjuagan (Ulloa *et al.*, 1983). Después se martajan y con la masa obtenida se preparan bolas, las cuales se envuelven en hojas de plátano y se dejan fermentar durante un periodo de tiempo variable, que incluye desde varias horas hasta varios días, o incluso más de un mes. Una vez fermentada la masa, se suspende en agua y se obtiene una bebida de sabor ácido, refrescante, a la cual se le puede adicionar azúcar, sal, miel, chiles secos o diversos tipos de sabores (Cañas *et al.*, 1993).

En el proceso de fermentación del nixtamal se desarrolla un sabor ácido y un aroma característico que le brinda propiedades refrescantes a la bebida. El pH de los granos de maíz es de 5.7 y después de la nixtamalización aumenta a 7.5; mientras que la masa tiene un pH inicial cercano a la neutralidad y disminuye hasta 3.9 el octavo día de fermentación (Ulloa, 1974).



Figura 1. Diagrama que resume el proceso de elaboración de pozol en Villahermosa, Tabasco.

2.1.2.2 Microbiología del pozol.

Las bacterias lácticas tienen un papel muy importante en la fermentación de muchos alimentos, poseen actividad antimicrobiana al producir ácidos, bacteriocinas, diacetilo y peróxido de hidrógeno. Se ha demostrado que son las responsables de la fermentación acidoláctica en los alimentos al tener la capacidad de producir ácidos orgánicos (como el láctico y el acético) con efectos de conservación sobre los alimentos, debido a sus propiedades inhibitorias y germicidas. Estas bacterias se caracterizan por ser Gram positivas, catalasa negativas, no esporuladas, microaerofílicas y ácido tolerantes. Las bacterias lácticas presentan una enorme capacidad para degradar diferentes carbohidratos y compuestos relacionados. Y de acuerdo a cómo fermentan la glucosa, se dividen en dos grupos metabólicos. Las homofermentativas que convierten en un 95% o más la glucosa en ácido láctico; y las heterofermentativas, las cuales fermentan la glucosa en ácido láctico, etanol ácido acético y dióxido de carbono en diferentes proporciones (De Vuyst, 1994).

Las bacterias lácticas son mesófilas, aunque pueden crecer en un rango de temperatura de 5-45°C, su pH óptimo es cercano a 6.0, aunque se ha encontrado que algunas crecen a pH 9.0. Las bacterias lácticas actúan durante las primeras horas de la fermentación del pozol, reduciendo el pH de un valor cercano a la neutralidad hasta 3.6 a 3.9 (Nuraida *et al.*, 1995).

La fermentación en el pozol es de tipo natural, ya que la realiza la microbiota original de la masa proveniente de la contaminación del nixtamal durante la molienda, sin la adición intencional de un inóculo. La mayoría de los microorganismos presentes en el maíz se eliminan durante la nixtamalización y durante la molienda ocurre la mayor inoculación, tanto de bacterias lácticas como de bacterias indeseables, como las enterobacterias (Wacher *et al.*, 1993).

En el proceso de fermentación del pozol participa una microbiota compleja, que incluye bacterias lácticas, enterobacterias, otras bacterias mesófilas no lácticas, mohos y levaduras (Ulloa *et al.*, 1987; Nuraida *et al.*, 1995; Wachter *et al.*, 1993).

En las primeras horas de fermentación *Lactococcus* y *Leuconostoc* parecen ser los géneros dominantes. Por el contrario, éstos representan a los géneros menores al final de la fermentación, cuando *Lactobacillus* domina el proceso. Otros estudios han reportado que *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis* están presentes en el pozol (Nuraida *et al.*, 1995; Escalante *et al.*, 2001).

La masa de pozol se moldea en forma de bolas, por lo que existe la posibilidad de la formación de zonas micro aerobias y aerobias, respectivamente en el centro y en la periferia de la masa, lo que da origen a una heterogeneidad en cuanto al grado de aireación (Wacher, 1995; Ampe *et al.*, 1999^a; ben Omar y Ampe, 2000).

En la periferia de la bola de pozol, donde el oxígeno no es una limitante, se ha encontrado la mayor población microbiana y actividad metabólica, en comparación con el centro de la bola. Miembros del género *Leuconostoc* parecen ser predominantes en la periferia y los del género *Lactobacillus* predominan en el centro. En el pozol se encuentran presentes bacterias ácido-lácticas homofermentativas y heterofermentativas (Ampe *et al.*, 1999^a).

Salinas (1958) aisló *Bacillus cereus* y *Paracolobactrum aerogenoides*. Posteriormente Ulloa y Herrera (1972) aislaron *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter (Alkaligenes) pozolis*. Por su parte, en 1974 Fuentes *et al.*, aislaron *Escherichia coli var. neapolitana* y *Pseudomonas mexicana*.

Recientemente el estudio de las bacterias del pozol ha resultado ser un tema de interés, Nuraida *et al.*, (1995) caracterizaron bacterias lácticas aisladas

del pozol de Chiapas, encontrando las siguientes especies *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis*. Así mismo determinaron que *Leuconostoc* predominaba en las masas en fermentación.

Wacher (1995) realizó estudios sobre la microbiología del pozol y llevó a cabo una caracterización de las bacterias lácticas de este alimento mediante el uso de pruebas bioquímicas convencionales. Wacher (1995) reportó la presencia de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*, destacando el predominio de éste último, por lo que se infirió su importancia dentro de la fermentación. Así mismo, aisló bacterias lácticas amilolíticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. De igual manera se infiere su importancia dentro de la fermentación debido al carácter amiláceo del sustrato.

Las bacterias lácticas aisladas del pozol por Wacher *et al.*, (1993) fueron identificadas con base en su patrón de fermentación de carbohidratos (Flores, 1996), mediante el sistema API 50 CH y el programa APILAB PLUS (Bio-mérieux). Flores identificó bacterias de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, predominando las especies de *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum*.

En un estudio comparativo realizado en la microbiota de dos tipos de pozol: el pozol elaborado y consumido por los indígenas y el pozol elaborado y consumido por los mestizos, no se encontraron diferencias significativas entre las microbiotas de ambos (Wacher *et al.*, 2000).

Recientemente y aplicando técnicas de biología molecular, se determinó la estructura microbiana de la masa con un enfoque polifásico y utilizando métodos de cultivo y métodos independientes de cultivo. Estos incluyeron la obtención de la cuantificación de los taxa microbianos, mediante hibridación cuantitativa de ARNr

16S y determinación de la huella microbiana mediante DGGE. Se encontró que las bacterias lácticas constituyen entre el 90 y 97% de la microbiota activa del pozol. Que del 25 al 50% de éstas son miembros del género *Streptococcus* aunque también predominan *Lactobacillus plantarum*, *Lb. fermentum* y bacterias de los géneros *Leuconostoc* y *Weissella*. La actividad microbiana fue mayor en la periferia de la bola de pozol que en el centro (Ampe *et al.*, 1999).

Escalante *et al.*, (2001) encontraron, mediante un análisis de secuencias de ADN_r obtenidas por amplificación de ADN total extraído del pozol, 14 secuencias únicas, identificadas como *Lactococcus lactis*, *Streptococcus suis*, *Lb. plantarum*, *Lact. casei*, *Lact. alimentarium*, *Lact. delbrueckii* y *Clostridium sp.* Esto indicó que las bacterias lácticas constituyen el grupo principal dentro de las bacterias Gram positivas del pozol.

Por su parte, ben Omar y Ampe, (2000) encontraron que las especies del género *Streptococcus* son muy importantes en la fermentación, ya que en ciertas etapas del proceso pueden llegar a constituir hasta el 75% del total de microbiota. Mientras que el desarrollo de las bacterias lácticas y de las enterobacterias fue similar en el interior y en la superficie de la masa, donde existe mayor aireación, los grupos más aerobios, como son mohos, levaduras y bacterias mesofílicas aerobias tienen un mayor crecimiento en la superficie de la bola.

Recientemente Díaz-Ruiz *et al.*, (2003) determinaron la diversidad de bacterias lácticas en el pozol, encontrando que las que poseían mayor actividad amilolítica fueron *S. bovis*, *Enterococcus sulfureus* y *Lact. lactis*, dentro de las cuales predominó *S. bovis*. De acuerdo con lo anterior, se piensa que las bacterias lácticas amilolíticas juegan un papel importante en la fermentación de sustratos amiláceos. Esto es especialmente importante para el caso del pozol, en el cual se demostró que la nixtamalización elimina la mayor parte de los mono- y disacáridos, quedando como fuente de carbono más importante el almidón (Wacher, 1995). La mayoría de las bacterias lácticas amilolíticas aisladas de

alimentos fermentados tradicionales de otros cereales o de la yuca, pertenecen al género *Lactobacillus*. En comparación con estos alimentos, pareciera que el pozol es un ecosistema alimenticio en el que se desarrollan otro tipo de bacterias lácticas amilolíticas, subrayando así, su carácter original (Díaz, 2003).

Ampe *et al.*, (1999) empleando la técnica de DGGE, encontraron que en el patrón de bandas de la comunidad de pozol con 5 días de fermentación, la banda más intensa correspondió a la especie *S. bovis*, encontrándose en todas las etapas de la fermentación. Haciendo uso de la técnica de DGGE también se han identificado otros microorganismos antes no detectados como es el caso de *Lb. pentosus*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum* y *W. paramesenteroides* (Ampe *et al.*, 1999); *Lb. delbrueckii* y *E. sacharolyticus* (ben Omar y Ampe, 2000). Mediante la técnica de DGGE, se detectó la presencia de hongos y levaduras tanto de la superficie como en el interior de la bola de pozol, pero no se precisaron géneros ni especies (Ampe *et al.*, 1999).

Aunado al estudio de la diversidad de bacterias lácticas, también se han estudiado diferentes aspectos del pozol que comprenden a otros grupos bacterianos, hongos y a levaduras. Para el caso de bacterias, se cuenta con los trabajos de Ampe *et al.*, (1999) quienes identificaron a *Acetobacter sp.* y *Bacillus subtilis*, también se aisló a *Bacillus minimum* (ben Omar *et al.*, 2000), *B. cereus*, *B. mycoides* y *B. lentus* (Rivera, 2001), *Clostridium sp.* (Escalante *et al.*, 2001), *Exiguobacterium aurantiacum*, *Bifidobacterium minimum*, *Sphingomonas sp.* (ben Omar *et al.*, 2000). Por otro lado, también es importante resaltar la presencia de cepas de *Escherichia coli* con factores de virulencia en masas de pozol, a diferentes horas de fermentación. Se identificaron serotipos pertenecientes a los grupos O18, O88, O8, O11, O20 y O173; también se encontraron cepas con patrones de adherencia localizada, difusa y agregativa, así como la presencia de genes de virulencia relacionadas con la patogénesis de la diarrea (Sainz *et al.*, 2001).

Respecto a su micología, uno de los primeros trabajos elaborados fue el de Ulloa y Herrera (1972) quienes estudiaron la sucesión de hongos y levaduras en muestras de pozol de Tabasco (Ulloa y Herrera, 1974). Los hongos aislados del pozol se identificaron como *Geotrichum candidum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Clad. sp.* (Ulloa et al., 1987), *Phoma glomerata*, *Ph. fimeti* y *Penicillium fellatanum* (Wacher et al., 2000).

En cuanto a los estudios de levaduras, se pueden mencionar los trabajos de Ulloa et al., (1987), que aislaron a *Candida guilliermondii var guilliermondii*, *Rhodotorula minuta*, *Rhod. mucilaginoso*, *Debariomyces hansenii* y *Kluyveromyces lactis var. lactis* (Wacher et al., 2000).

Por su importancia, cabe mencionar el trabajo realizado por Río (1999) quien hizo un estudio de campo, encuestando 62 pozolerías en 3 zonas representativas de la ciudad de Villahermosa, Tabasco. Investigó los hábitos de consumo del pozol entre los habitantes de Villahermosa (hombres, mujeres y niños). Encontró que en su mayoría lo prefieren fresco y con cacao. Que el proceso de elaboración del pozol natural en Villahermosa es similar al que se describe para el pozol mestizo en el estado de Chiapas. Y que durante la nixtamalización del maíz, habitualmente se omite el reposo del grano en el agua de cocción, ya que es lavado inmediatamente después a ésta. Encontró que el nixtamal se muele en pequeños molinos y la masa martajada se mezcla con agua para formar bolas grandes de uno hasta varios kilos, las cuales están listas para la venta o para su consumo como bebida. Encontró que el pozol fermentado se denomina "pozol agrio". Y que tanto el pozol fresco como del agrio se preparan mezclando la masa manualmente o en licuadora con agua y otros ingredientes (azúcar, leche, horchata), según los gustos del consumidor. El censo estableció que la principal venta la tiene el pozol con cacao, y que algunos habitantes consumen el pozol acompañándolo con frutas confitadas, sal o chile. Por último, se concluyó que existen pocas variaciones en cuanto al proceso de la elaboración del pozol en los diferentes establecimientos estudiados.

2.2 ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE)

2.2.1 Introducción

A partir de 1995 con los trabajos de Amman *et al.*, los métodos para el análisis de las comunidades microbianas cambiaron considerablemente. Las técnicas clásicas, tales como cultivo de microorganismos e identificación por pruebas bioquímicas no son suficientes para valorar la diversidad bacteriana en muestras naturales. Por un lado, la vasta diversidad de formas celulares y su pequeño tamaño hacen difícil la identificación microscópica. Por otro lado, los medios utilizados para el cultivo de cepas microbianas son selectivos y por lo tanto enmascaran la composición microbiana real.

Haciendo una relación entre los microorganismos hasta ahora identificados y los existentes en la naturaleza en los diferentes hábitats, se han expuesto las limitaciones de los métodos tradicionales dependiendo del cultivo (Tabla 1). Por lo que se ha recurrido a técnicas moleculares que suplen o muchas veces complementan a las técnicas microbiológicas tradicionales.

Tabla 1. Estimación del porcentaje de bacterias cultivables.

Hábitats	% de Bacterias cultivable (Cuantificadas como UFC)
Océanos	0.001-0.1
Agua dulce	0.25
Lagos mesotróficos	0.1-1
Aguas estuarinas no contaminadas	0.1-3
Lodos activados	1-15
Sedimentos	0.25
Suelos	0.3

(Amann *et al.*, 1995).

La introducción de técnicas moleculares en ecología microbiana incluye el uso de secuencias genéticas del ARNr 16S, ya que las secuencias de los genes que codifican dicha subunidad ribosomal, refleja la relación evolutiva de los microorganismos (Woese, 1987). La secuencia de estos genes permite su identificación. El ARNr es una molécula distribuida universalmente, que tiene una función homóloga en todos los organismos. Es una molécula ancestral que tiene regiones conservadas y regiones hipervariables (Fig. 2). Por otra parte, el ARNr presenta secuencias firma u oligonucleótidos cortos que son únicos para cierto grupo de organismos. Con base en la secuencia de los genes ribosomales se definieron los tres dominios de la vida: Arquea, Bacteria y Eucaria. Las secuencias firma se encuentran generalmente en regiones bien definidas dentro de la molécula del ARNr 16S. Su importancia radica en la exclusividad que tienen y por tanto en la utilidad que presentan para situar organismos desconocidos en el grupo filogenético principal que les corresponde.

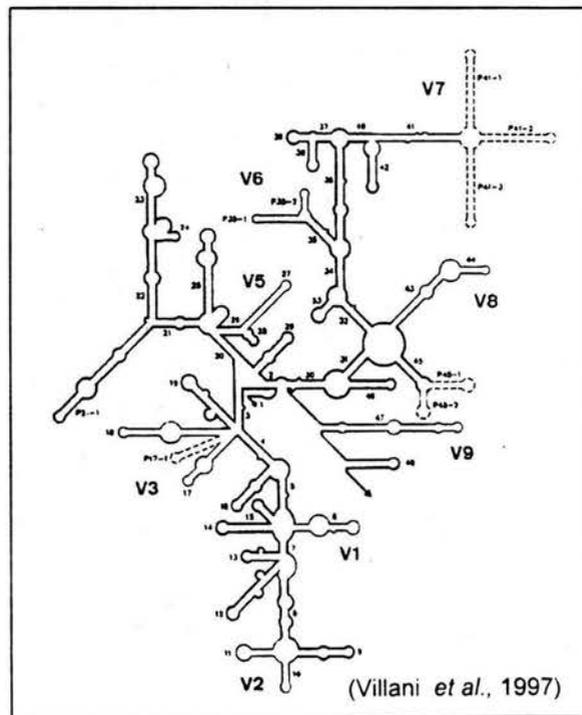


Fig. 2 Mapa de la estructura secundaria del gen 16S donde se muestran las regiones hipervariables (V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8, V9) y las regiones conservadas.

En los últimos años, las técnicas moleculares que incluyen huellas genéticas, han resultado un excelente método para comparar numerosas muestras. Las huellas de comunidades microbianas proveen un patrón de bandas o perfil que refleja la diversidad genética de la comunidad.

2.2.2 Pasos previos al DGGE.

El DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante) es una técnica recientemente incorporada al estudio de comunidades microbianas complejas (Muyzer *et al.*, 1995). Los pasos previos a esta técnica consisten en:

- a) La extracción y purificación del ADN de un cultivo o de una muestra microbiana natural (alimento, suelo, agua, sedimento, entre otras). La extracción del ADN puede ser directa (extracción del ADN total de la muestra) o indirecta (extracción de microorganismos de la muestra, seguida de la extracción de ADN de éstos).
- b) A continuación se amplifica el ADN obtenido mediante la reacción en cadena de la polimerasa. En este paso, se usan cebadores correspondientes al grupo en estudio (levaduras, bacterias, etc) utilizando el ARNr 16S. Es decir, los cebadores son como los anzuelos para "pescar" a los organismos deseados y amplificar su ADN.
- c) Posteriormente, para conocer la diversidad de microorganismos, se realizan huellas genéticas que constituyen un patrón o un perfil de la diversidad genética de una comunidad microbiana. La técnica del DGGE se inicia con la separación electroforética de fragmentos de ADNr previamente amplificados.

2.2.3 DGGE.

El DGGE separa fragmentos (previamente amplificados por PCR) con la misma longitud pero con diferente secuencia. El principio de la técnica se basa en la separación y en la movilidad electroforética de un fragmento de ADN de doble cadena que conforme va migrando en el gel de poliacrilamida se va deteniendo parcialmente de acuerdo a su secuencia nucleotídica. Lo anterior se logra porque los fragmentos de ADN contienen dominios con grados de desnaturalización (T_m) característicos, de manera que cuando se alcanza una determinada concentración de desnaturalizante, la molécula se funde parcialmente y deja de migrar en el gel (Fig. 3). Los gradientes de fusión de esos dominios dependen de las variaciones en sus secuencias de bases, por lo que los fragmentos correspondientes a microorganismos diferentes tendrán diferentes posiciones en el gel (Muyzer y Smalla, 1998).

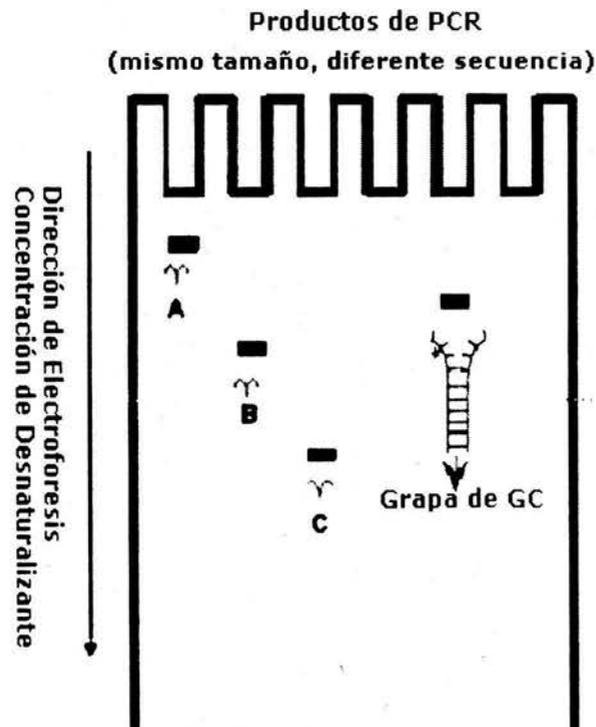


Fig. 3 Imagen que representa la migración de fragmentos de ADN en un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (DGGE).

En el análisis de DGGE, el patrón de bandas generado es considerado como una huella de la comunidad bacteriana; donde cada una de las bandas representa a un organismo diferente en la comunidad. Otro aspecto importante a considerar para el análisis de geles de DGGE es que la intensidad de la banda muchas veces está relacionada directamente con la abundancia relativa del frototipo bacteriano presente en la muestra (Muyzer *et al.*, 1995; van Hannen *et al.*, 1999).

El gel de poliacrilamida tiene un gradiente desnaturalizante de urea y formamida. Para evitar la disociación completa del fragmento de ADN de doble cadena que corre por el gel de DGGE, se debe colocar en uno de los extremos de los cebadores una secuencia de aproximadamente 40 nucleótidos de G+C (grapa de GC) (Fromin *et al.*, 2002).

La técnica fue diseñada inicialmente para detectar mutaciones puntuales en el área de medicina humana, ya que presenta una confiabilidad de hasta el 99%; sin embargo, desde que Muyzer la introdujo en 1993 al campo de la ecología microbiana, ésta ha sido adaptada a muchos laboratorios como una herramienta útil, rápida y confiable que facilita la identificación de poblaciones individuales por análisis de hibridación con sondas específicas o por análisis de secuencias de bandas individuales.

2.2.4 Aplicación del DGGE en alimentos fermentados.

Debido a su gran importancia en aspectos de fermentación y conservación de alimentos, en los últimos años se han realizado estudios para identificar bacterias lácticas aisladas de alimentos utilizando la técnica de DGGE. Se considera un método sensible y rápido, que permite monitorear los cambios en las comunidades microbianas durante la fermentación de alimentos.

Walters *et al.*, (2000) identificaron del tracto digestivo en humanos un gran número de especies de *Lactobacillus* que antes no habían sido identificados mediante técnicas tradicionales, al amplificar la región hipervariable V3 del gen ribosomal 16S y siguiendo la técnica del DGGE.

Ampe *et al.*, (2001) estudiaron el desarrollo de las comunidades microbianas en la fermentación espontánea de yuca. Encontraron que de acuerdo con la intensidad de las bandas en los patrones de DGGE, las bacterias lácticas son los organismos dominantes. Los organismos que los representaron fueron *Bifidobacterium minimum*, *Lact. lactis*, *S. sp.*, *E. sacharolyticus* y *Lb. plantarum*. También se encontraron otras especies como *Lb. panis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuc. citreum*. Por otro lado, Miambi *et al.*, (2003) utilizaron la técnica del DGGE y encontraron que las bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Clostridium*, *Propionibacterium* y *Bacillus* están presentes en la fermentación de la yuca.

La fermentación de salchichas es otro alimento en donde participa una microbiota compleja. Cocolin *et al.*, (2001) monitorearon la dinámica de cambios en las poblaciones bacterianas durante la fermentación natural de salchichas italianas. Obtuvieron perfiles de DGGE a partir de ADN y de ARN de muestras tomadas a diferentes tiempos durante la fermentación. En este estudio, además de determinar la estructura y diversidad en la comunidad microbiana, también se analizó al ARN para detectar a los microorganismos metabólicamente activos; ya que como es sabido, éstos presentan elevados números de ribosomas en comparación con las células muertas. Encontraron que la población principal está representada por bacterias lácticas, predominando *Lb. sake* y *Lb. curvatus*; y que organismos pertenecientes a la familia *Micrococcaceae* también están presentes. Se elaboraron a la par geles tanto de ADN como de ARN, encontrando que la principal diferencia fue la presencia de *Lb. plantarum* únicamente en los de ADN. Por otro lado, también se encontraron en los primeros días de fermentación las especies *E. sp* y de *Brochotrix thermosphacta*.

Coppola *et al.*, (2001) compararon la elaboración tradicional de queso Mozzarella con la elaboración industrial, encontrando en los perfiles genéticos de DGGE a *Lact. lactis* y *Lb. sp.* sólo en la elaboración tradicional. No obstante, en ambos procesos se encontraron organismos como *Lact. garviae*, *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. lactis*, *E. faecium*, *E. obrans*, *E. faecalis*, *Lb. delbrueckii subsp bulgaricus*, *Lb. delbrueckii subsp lactis* y *Lact. lactis subsp lactis*.

Randazzo *et al.*, (2002) estimaron la dinámica y la diversidad de las comunidades microbianas durante la elaboración y maduración del queso Ragusano, producto artesanal siciliano con características sensoriales únicas. Se utilizaron tanto técnicas microbiológicas clásicas como técnicas moleculares independientes del cultivo, incluyendo PCR, RT-PCR y DGGE de genes de ARN 16S para *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Se detectaron en la leche utilizada como sustrato especies mesófilas de *Leuc.* y *Lact. lactis*, que aparentaron no estar muy activas metabólicamente. De acuerdo con los perfiles de DGGE también se encontró que *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* predominaron durante la maduración y fueron las más activas en esta etapa, por lo que consideraron que están relacionadas con el desarrollo del sabor y el aroma del queso.

El vasto desarrollo de una compleja población de levaduras y bacterias en la elaboración del vino, han motivado su estudio y la utilización de métodos moleculares para poder realizar la caracterización de los microorganismos presentes y que además son difíciles de cultivar. Cocolin *et al.*, (2000) obtuvieron el perfil de la dinámica de crecimiento de levaduras mediante la técnica del DGGE, utilizando fragmentos del gene ADN_r previamente amplificados mediante PCR. Detectaron pequeñas diferencias en cuanto al desarrollo y a la persistencia de levaduras en dos fermentaciones.

van Beek y Priest, (2002) determinaron la composición de la comunidad microbiana durante la fermentación de whisky de malta utilizando la técnica de DGGE. Fue posible detectar tres etapas; en la primera se dio un claro crecimiento

de levaduras, mientras que el crecimiento bacteriano fue suprimido; en la segunda etapa se da un crecimiento bacteriano exponencial; mientras que en la última etapa se acumula ácido láctico, y ya no hay crecimiento de microorganismos. También se encontró que en un inicio las bacterias predominantes fueron *S. thermophilus* y/o *Saccharococcus thermophilus*, mientras que al final se encontraron organismos tales como *Lb. acidophilus* y/o *Lb. crispatus*, bacterias difíciles de cultivar en medios tradicionales.

2.2.5 Índices ecológicos en microbiología.

Las poblaciones microbianas raramente se encuentran solas en la naturaleza, por lo general están relacionadas con otras poblaciones compitiendo por espacio y recursos. Algunos índices matemáticos aunados a los conceptos de diversidad y dominancia son fundamentales en ecología para el estudio de las comunidades. Los índices matemáticos, con los que se describen la riqueza y la distribución de especies en la comunidad, son los índices de diversidad de especies, y se utilizan para describir el conjunto de poblaciones de una comunidad (Pielou, 1975).

Frecuentemente los ecologistas microbianos emplen la taxonomía numérica para determinar las especies taxonómicas presentes en una muestra, basándose en características fenotípicas principalmente. Ya que debido a la complejidad de las comunidades microbianas, los índices de diversidad han sido poco utilizados en microbiología. Sin embargo, en los últimos años con la introducción de las técnicas moleculares que incluyen huellas genéticas, éstos han sido muy utilizados.

Los índices de diversidad relacionan el número de especies con la importancia relativa de las especies individuales. Los principales parámetros en los índices de diversidad son la riqueza, variedad y homogeneidad de especies.

La riqueza puede ser expresada como el número total de especies en una muestra, mientras que el índice de homogeneidad, proporciona la cantidad individual de especies presentes, haciendo incapié en las poblaciones dominantes (Atlas, 1984). El índice más utilizado para cuantificar diversidad es el de Shannon-Weaver (1963), porque es sensible tanto a la riqueza como a la abundancia relativa de especies.

Retomando que en el proceso de fermentación del pozol participa una microbiota compleja, que la fermentación es de tipo natural, y sabiendo que hasta el momento se conocen únicamente los cambios microbiológicos que ocurren durante la fermentación (Ulloa *et al.*, 1987; Wachter *et al.*, 1993; Nuraida *et al.*, 1995; Ampe *et al.*, 1999) en un número restringido de muestra de pozol, se plantea la necesidad de determinar la variabilidad en la composición microbiológica de pozoles de diferentes productores. Por otro lado, surge el interés de estudiar el desarrollo de las comunidades bacterianas del pozol, monitoreando los cambios que ocurren en los diferentes tiempos de la fermentación, e identificando los organismos responsables de la fermentación del pozol que a su vez le brindan características propias. Por lo que en este trabajo de tesis se propuso emplear técnicas independientes de cultivo para detectar si existen diferencias en cuanto a los microorganismos presentes en las muestras de pozol de diferentes productores, específicamente la técnica de DGGE.

CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS

Debido a que la fermentación en el pozol es de tipo natural, existirán variaciones en la composición microbiológica de pozoles de diferentes productores; sin embargo, se detectarán microorganismos cuya presencia sea constante en las diferentes muestras.

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

Objetivo general: Conocer la variabilidad en la composición de bacterias lácticas de pozol elaborado por diferentes productores.

Objetivos particulares:

- Estandarizar la técnica de extracción de ADN de pozol.
- Montar y calibrar la técnica de DGGE (Electroforesis en gel con gradiente de urea y formamida).
- Determinar diferencias en la dinámica de cambios en las poblaciones de bacterias lácticas durante la fermentación de pozoles de diferentes productores.
- Identificar los microorganismos predominantes en los patrones de bandas obtenidos.
- Determinar si existen diferencias significativas en los índices de riqueza, diversidad y dominancia entre las diferentes muestras de pozol.

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

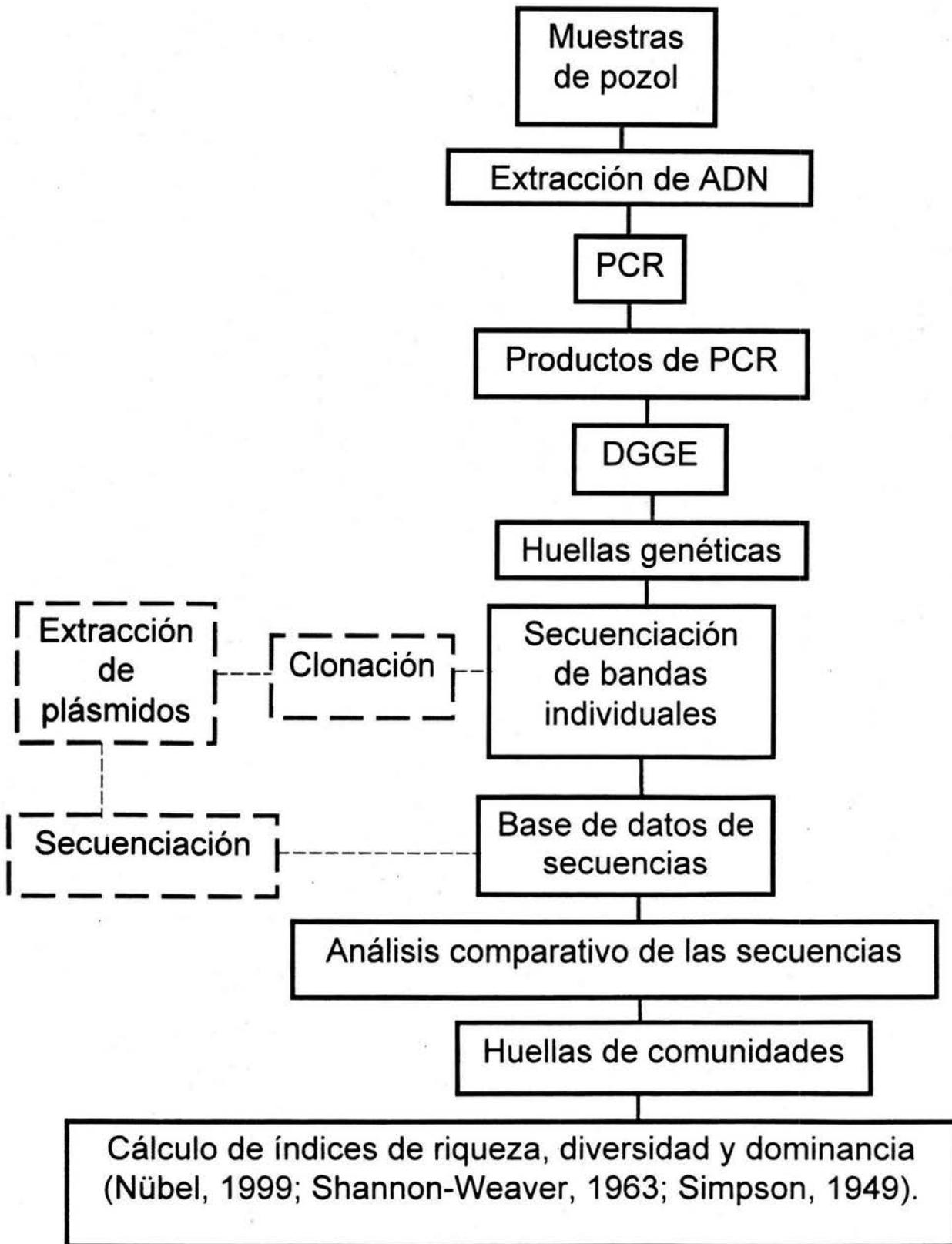
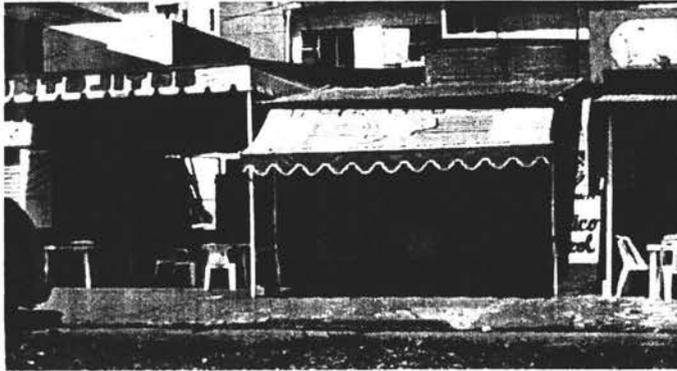
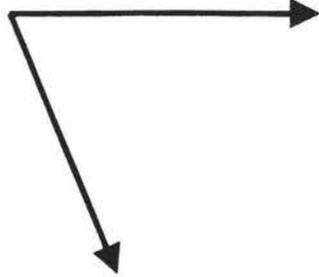


Fig. 4 Diagrama que resume la estrategia experimental empleada en el análisis de las comunidades de bacterias lácticas de pozol.

5.1 MUESTRAS DE POZOL.

Se estudiaron pozoles de 7 productores diferentes de la Ciudad de Villahermosa, Tabasco. Se colectaron 6 muestras del Mercado "Pino Suárez" ubicado en el centro de la ciudad. La muestra uno fue comprada en un puesto ubicado en el primer piso del mercado, mientras que las restantes (2,3,4,5, y 6) fueron colectadas en el primer piso del mercado y todas en puestos del mismo pasillo. Todos estos productores, usan nixtamal que se produce centralmente en el mercado, con excepción del 4, que produce su propio nixtamal. La muestra 7 se colectó de un establecimiento conocido como "Pozolería de la Fuente" ubicado al noreste de la ciudad. De cada productor se tomaron muestras de pozol de masa recién molida (salida del molino), que inmediatamente fueron colocadas en hielo; así mismo, se tomaron también muestras de masa moldeada de aproximadamente 250 g con las que se hicieron bolas, se envolvieron en hojas de plátano y se incubaron a 30°C. A las 0, 24, 48 y 72 horas se tomó una bola de cada muestra y se congeló a -20°C para su análisis posterior (Fig. 5). Los tiempos (0, 24, 48 y 72 h) se consideraron después de que las masas fueron amasadas y expuestas a la venta.

Muestras de pozol
de 7 productores
(Villahermosa, Tab.)



Pozolería de la Fuente

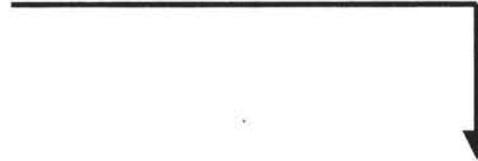
Masa Recién Molida



Masa lista para la venta



Mercado Pino Suárez



Tiempo de fermentación: 0 24 48 72 h
a 30°C

Fig. 5 Diagrama de la colecta de muestras de pozol en la ciudad de Villahermosa Tabasco.

5.1.1 Extracción y purificación de ADN de pozol.

Para la obtención de las muestras tanto de la periferia como del centro de la bola de pozol, se realizó el siguiente procedimiento:

Periferia. Se separó la masa de la superficie de la muestra (5 g como máximo) con espátula estéril, usando guantes.

Centro: La misma bola de masa se abrió por la mitad separando con ambas manos y con espátula se tomó la porción central de la bola (5 g como máximo).

De acuerdo a Nübel *et al.*, (1999) y Ampe *et al.*, (1999), ambas muestras se resuspendieron por separado en 10 ml de Na_2HPO_4 (0.1 M y pH 8). Cada muestra fue homogenizada en un Stomacher 400 (SEWARD) durante 6 min. A continuación se colocaron 1.5 ml de suspensión resultante en 2 tubos eppendorf, y se centrifugaron en una centrifuga HERMLE Z160M a 14,000 rpm durante 10 min para eliminar las partículas de mayor tamaño. Se recuperó el sobrenadante y se adicionaron a cada tubo 20 μl de solución de lisozima [$20 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$] en amortiguador TES [50 mM Tris pH8-1mM EDTA-8.56% (p/v) sacarosa] y 10 μl de solución de mutanolisina. (1UI/ μl). Se agitaron las muestras en vortex (1 min) y se incubaron a 37°C por 1h o hasta visualizar viscosidad. A continuación se adicionó a cada tubo 10 μl de solución de pronasa (1UI/ μl), se agitaron las muestras en vortex (1 min) y se incubaron a 65°C por 1 h. Posteriormente se adicionaron 20 μl de solución de RNAsa (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), se agitaron las muestras en vortex (1 min) y se incubaron a 65°C por 1 h. Se adicionaron 120 μl de SDS al 10% (p/v) a cada tubo y se incubaron nuevamente a 65°C durante 10 min. A continuación se dejaron enfriar y se adicionaron 300 μl de NaCl 5 M, después se agregaron 650 μl de solución de Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se agitaron los tubos manual y fuertemente durante 20 s y posteriormente 10 s en vortex a alta velocidad. A continuación, se centrifugaron las muestras más de una vez durante 5 min (14 000 rpm), hasta que la interfase fuera casi nula. Se recuperó con micropipeta el sobrenadante de cada tubo y se transfirió a otro tubo eppendorf limpio, en seguida se adicionó a cada tubo 1000 μl de solución de fenol-cloroformo (25:24) y se mantuvo en vortex

durante 30 s. Después las muestras se centrifugaron durante 5 min a 5000 rpm y se transfirió nuevamente el sobrenadante (400 μ l) a tubos eppendorf limpios. Se agregaron 250 μ l de isopropanol a cada tubo y se agitaron suavemente para después ponerlos en refrigeración durante 15 min, con la finalidad de favorecer la precipitación del ADN. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 15 min a 14000 rpm. Se retiró el sobrenadante con micropipeta y se lavaron los precipitados con 1 ml de etanol al 70%(v/v). A continuación se centrifugaron durante 15 min a 14000 rpm. En seguida se retiró nuevamente el sobrenadante con micropipeta y se dejó secar el tubo temperatura ambiente. Por último, se resuspendieron en 50 μ l de agua desionizada estéril, se calentaron durante 5 min a 65°C y después se congelaron a -21°C, donde permanecieron hasta su uso. Finalmente se comprobó la calidad de la extracción de ADN de pozol mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) y amortiguador TBE [1X], revelada con una solución de bromuro de etidio [5 μ g/ μ l] y observada a través del equipo Fluor-S (BIORAD).

5.1.2 Amplificación por PCR de la región V3 del gene ARN 16 S.

La región V3 del gen ARNr 16S del ADN ribosomal presente en el pozol se amplificó mediante la reacción de PCR (Tabla 2) utilizando los cebadores Agc338F y B518R (Tabla 3) para bacterias (Ampe *et al.*, 1999), con las condiciones mostradas en la Tabla 4, utilizando un termociclador Perkin Elmer 2400.

Tabla 2. Protocolo de PCR para amplificar la región V3 del gen ARN de bacterias

Componente	Volumen	Concentración Final en la reacción
Amortiguador para PCR	10 μ l	1 X
MgCl ₂	5 μ l	50 mM
dNTPs	2 μ l	10 mM
Primer 338F	1 μ l	20 pmol/ μ l
Primer 518R	1 μ l	20 pmol/ μ l
Templado	10 μ l	10 ng/ μ l
Taq polimerasa	2 μ l	1 U/ μ l
Agua destilada	Para 100 μ l	-----

Tabla 3. Cebadores para PCR utilizados en este estudio.

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Posición en gen <i>E. coli</i>	Orientación
Agc338F	CGCCCGCCGGGCGGGCGGGCGG GGGCGGGGGGCACGGGGGGGAC TCTACGGAGGCAGCAG	357-338	Hacia adelante
B 518R	ATTACCGCGGCTGCTGG	534-518	Reversa
338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	534-518	Hacia adelante

Tabla 4. Condiciones de la reacción de PCR para amplificar la región V3 del gen ARN 16 S.

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	5 min
20	94°C	1 min
	65°C	1min
	72°C	3 min
10	94°C	1 min
	55°C	1 min
	72°C	3 min
1	72°C	10 min

(Muyzer *et al.*, 1999).

Se visualizaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) y se revelaron con una solución de bromuro de etidio, observándolos a través del equipo Fluor-S (BIORAD).

5.2 MONTAJE Y CALIBRACIÓN DE LA TÉCNICA DE DGGE (ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE).

5.2.1 Elaboración de gel con gradiente perpendicular al campo eléctrico

Con el fin de obtener el gradiente óptimo para la separación de los fragmentos amplificados, se elaboró un gel con gradiente desnaturalizante perpendicular al campo electroforético (Fig. 6). La finalidad fue establecer el intervalo de desnaturalizante en el cual el producto de PCR forme una "S", que represente la zona de desnaturalización del ADN.

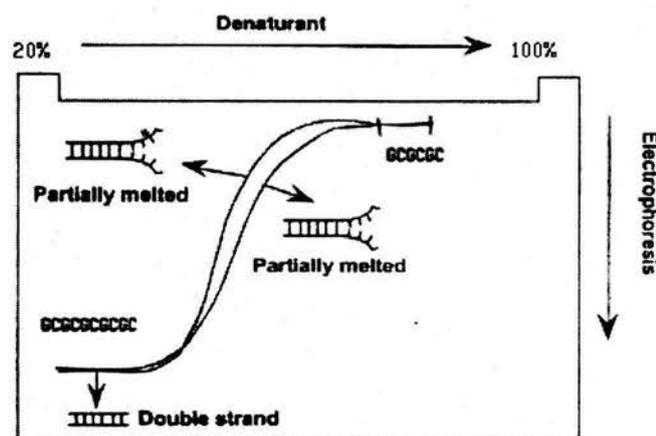


Fig.6 Gel perpendicular de DGGE

El ADN total de las muestras de pozol previamente amplificado mediante la reacción de PCR, fue analizado por DGGE perpendicular usando el equipo Bio-Rad Dcode (ANEXOS I y II) y siguiendo el procedimiento descrito primeramente por Muyzer *et al.*, (1993).

La muestra fue depositada en un gel de poliacrilamida al 8% (p/v) utilizando un intervalo desnaturalizante de 20% (p/v) a 70% (p/v) y amortiguador TAE [1X] (ANEXO III). El gradiente desnaturalizante estuvo formado por urea 7 M

y formamida al 40% (v/v). La electroforesis se realizó a una temperatura de 60°C durante 2 h a 130 V. Posteriormente el gel se reveló con una solución de bromuro de etidio [50 µg/µl] durante 15-20 min. A continuación se destiñó con amortiguador TAE 1 X durante 10 min; y por último, se observó a través del equipo Fluor-S (BIORAD).

5.2.2 Separación de los productos de PCR mediante la técnica del DGGE (electroforesis con gradiente de urea y formamida).

Los productos de PCR de las muestras de cada uno de los diferentes tiempos de fermentación de pozol se corrieron en un gel de poliacrilamida al 8% y con un gradiente desnaturante (ANEXO III) de 30 a 60% (p/v) de urea (7 M) y formamida (40%) (Fig. 7). La electroforesis se realizó a 85 V y 65°C durante 17 h. Posteriormente los geles fueron teñidos con el Kit Plus One DNA silver staining, de Pharmacia Biotech y digitalizados con el equipo Fluor-S (BIORAD).

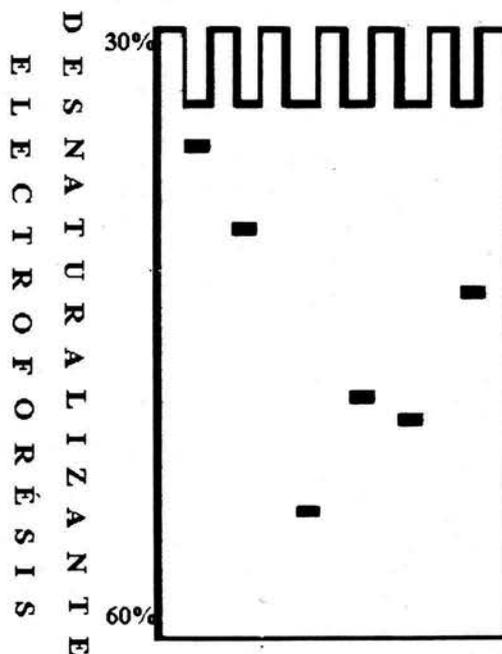


Fig.7 Gel paralelo de DGGE

5.2.3 Secuenciación de fragmentos de geles de DGGE.

Algunas bandas seleccionadas se cortaron individualmente con un bisturí estéril y se colocaron por separado en tubos eppendorf. El ADN de cada muestra fue extraído utilizando el KIT PCR CLEAN-UP de Qiagen. A continuación, se utilizó 1 μ l del ADN extraído de cada muestra y se reamplificó utilizando los cebadores 338F y B518R (Tabla 3) y las condiciones antes mencionadas (Tabla 3). El éxito de este procedimiento fue comprobado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) y amortiguador TBE [1X], revelada con una solución de bromuro de etidio y observada a través del Fluor-S (BIORAD).

Los productos reamplificados fueron purificados utilizando el KIT PCR CLEAN-UP de Qiagen siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente, se enviaron a secuenciar con el cebador 338F (Tabla 3) al Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las condiciones requeridas para la secuenciación se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones para secuenciar cepas

	Concentración	Volumen
Muestra (cepas)	20 ng/ μ l	20 μ l
Cebador 338F	20 pm/ μ l	20 μ l

5.2.4 Identificación de los microorganismos correspondientes a cada banda.

La base de datos utilizada para comparar la secuencias de los productos reamplificados de pozol fue el National Center for Biotechnology Information (<http://ncbi.nih.gov/>), utilizando los servicios de BLAST para buscar a sus "parientes" más cercanos.

5.3 CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.

Al cortar directamente bandas de los geles de DGGE, algunas presentaron ADN de más de un organismo. Lo anterior motivó a realizar una clonación con el ADN amplificado. para separar a cada componente y posteriormente poder secuenciarlo e identificarlo.

4.3.1 Ligación

a) Se preparó la siguiente mezcla de ligación:

REACTIVO	CANTIDAD
2X rapid ligation Buffer, T4 DNA ligasa	5 μ l
pGEM ®-T (50 ng)	1 μ l
Producto de PCR	Variable
T4 DNA ligasa (3 unidades Weiss/ μ l)	1 μ l
Agua desionizada hasta un volumen de	10 μ l

b) Para determinar el volumen de PCR utilizado en la reacción, se utilizó la siguiente regla:

$$\frac{\text{Cantidad de vector (ng)} \times \text{tamaño del inserto (kb)} \times \text{proporción molar inserto: vector}}{\text{Tamaño del vector en kb}}$$

(Technical Manual, 2003).

c) Posteriormente se mezclaron los reactivos como lo indicó el proveedor y se incubaron a 4°C entre 2 y 12 horas.

5.3.2 Transformación de células competentes.

Se prepararon placas de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml), X -Gal (80 μ g/ml) e IPTG (0.5 mM). Se centrifugaron los tubos con la reacción de ligación y

posteriormente, se añadieron 2 μ l de la mezcla de ligación a un tubo eppendorf de 1.5 ml el cual se colocó en un baño de hielo. A continuación, se transfirieron 50 μ l de células competentes JM109, se agitaron suavemente los tubos y se mantuvieron en el baño de hielo durante 20 min. Se incubaron los tubos a 42°C durante 45-90 seg. y de inmediato se regresaron al baño de hielo por 2 min. Se añadieron 950 μ l de medio LB a cada tubo y a continuación se incubaron por 1.5 h a 37°C con agitación (150 rpm). Posteriormente se inocularon con un asa estéril 100, 200 y 400 μ l de muestra en cada una de las placas de medio LB más ampicilina, X-Gal e IPTG. Se incubaron durante toda la noche a 37°C. Las colonias transformantes con plásmido recombinante se reconocieron por su coloración blanca.

5.3.3 PCR para verificar la presencia de colonias transformantes de *E. coli*.

Se elaboró un PCR usando como templado ADN total (Technical Manual, 2003) de colonias transformantes de *E. coli* bajo las condiciones mostradas en la Tabla 6 con los cebadores T7 (ACATTATGCTGAGTGATATCCC) y SP6 (TAAGATATCACAGTGGATTTA) para amplificar el inserto, utilizando un termociclador Perkin Elmer 2400 (Tabla 7).

Tabla 6. Protocolo para la reacción de PCR de células transformantes.

Componente	Volumen	Concentración Final en la Reacción
Amortiguador para PCR con MgCl ₂	2.5 μ l	1 X
dNTPs	2 μ l	50 X
Cebador T7	1 μ l	20 pmol/ μ l
Cebador SP6	1 μ l	20 pmol/ μ l
Templado	10 μ l	10 ng/ μ l
Taq polimerasa	2 μ l	1 U/ μ l
Agua destilada	Para 25 μ l	-----

Tabla 7. Condiciones de la reacción de PCR para amplificar los insertos clonados en el vector pGEM ®-T.

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
	95°C	3 seg
29	95°C	30 min
	55°C	1 min
	72°C	2 min 30 seg
1	72°C	10 min

5.3.4 Obtención de ADN plasmídico.

La obtención de ADN plasmídico se realizó de acuerdo con el protocolo del Plasmid mini KIT de Qiagen. Posteriormente el ADN plasmídico fue purificado utilizando el KIT CLEAN-UP de Qiagen siguiendo las instrucciones del proveedor.

5.3.5 Secuenciación

El ADN plasmídico se envió a secuenciar con el cebador (T7) al Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las condiciones requeridas para la secuenciación se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones para secuenciar ADN plasmídico.

	Concentración	Volumen
Muestra	400 ng/μl	20 μl
Cebador gamma (T7)	20 pm/μl	20 μl

5.3.6 Identificación de bandas.

Se usó la base de datos National Center for Biotechnology Information (<http://ncbi.nih.gov/>), como ya fue reportado.

5.4 ANÁLISIS DE LAS HUELLAS DE COMUNIDADES MICROBIANAS.

Los geles con los patrones de las comunidades microbianas del pozol obtenidas con la técnica de DGGE fueron digitalizados utilizando el software QUANTITY ONE Versión 4 para Windows (BIORAD). Posteriormente, para los diferentes tiempos de fermentación de las muestras, se determinó la similitud entre la microbiota de las diferentes muestras, así como los índices de riqueza, diversidad y dominancia en las comunidades microbianas.

5.4.1 Índice de riqueza (R).

El estimado de riqueza (R), se obtuvo contando el número de bandas visibles para cada tiempo de fermentación (Nübel *et al.*, 1999).

5.4.2 Coeficiente de similitud de Dice SD.

Para determinar la similitud entre la microbiota de las diferentes muestras, se calcularon los coeficientes de similitud de Dice SD (matriz de distancias) de cada combinación de par de muestras y se elaboraron dendrogramas utilizando el software DIVERSITY DATABASE Versión 2.2 para Windows (BIORAD).

$$S_D = (2n_{AB}) / (n_A + n_B)$$

Donde:

S_D = Coeficiente de similitud de Dice.

n_A y n_B = número total de bandas en los carriles A y B.

n_{AB} = número de bandas comunes entre los carriles A y B.

Se usó el algoritmo de Ward (Ward, 1963) para calcular el dendrograma.

5.4.3 Índice de diversidad

El índice general de diversidad de Shannon-Weaver (H) (Shannon y Weaver, 1963) fue calculado usando la siguiente función:

$$H = -\sum P_i \log_2 P_i$$

Se utilizó la intensidad de las bandas, medida como la altura de los picos de las curvas densitométricas. Se calculó la probabilidad de la importancia P_i :

$$P_i = n_i / \sum n_i$$

Donde:

n_i = la altura del pico i en la curva densitométrica.

5.4.4 Índice de dominancia de Simpson (S).

El índice de dominancia de Simpson (1949) se calculó mediante la siguiente función:

$$S = \sum 1/P_i^2$$

Donde:

S = Índice de diversidad de Simpson

P_i = Proporción de individuos de la especie i en la comunidad

5.4.5 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza usando el paquete estadístico SPSS 11.0 para Windows 2001.

5.5 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS PURAS DE POZOL.

De una colección de cepas de bacterias lácticas aisladas de diferentes muestras de pozol, se seleccionaron 26 cepas representativas previamente identificadas por Flores (1996) utilizando el sistema API 50CH y caracterizadas mediante la técnica de RAPD por Escalante (en preparación).

5.5.1 Extracción y purificación de ADN de las cepas puras.

Las cepas se sembraron en cajas Petri en medio MRS y se incubaron durante 24 h. a 30°C. Posteriormente se realizó la extracción de ADN de acuerdo con la técnica reportada por Lawson *et al.*, (1989):

Se colocaron 500 μl de amortiguador TES en tubos eppendorf. Se tomó muestra con asa estéril (aprox. del tamaño de un grano de arroz) de cada una de las cajas Petri y se depositó en su tubo correspondiente. A continuación se adicionaron 20 μl de solución de lisozima [20 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$] y se incubaron a 37°C durante 15 min o hasta visualizar viscosidad. En seguida se adicionaron 8 μl de solución de pronasa [10 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$] y 8 μl de RNAsa [20 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$] a cada tubo, se agitaron las muestras y se incubaron a 65°C por 1 h. Se adicionaron 120 μl de SDS al 10% (p/v) a cada tubo y se incubaron a 65°C durante 10 min. Posteriormente se dejaron enfriar y se les adicionó 600 μl de solución de Fenol:cloroformo (25:24), se agitaron vigorosamente hasta obtener una emulsión blanca. A continuación se centrifugaron durante 10 min a 14000 rpm. Se obtuvieron 3 fases, se extrajo la primera y se colocó en un tubo eppendorf nuevo. Se adicionó 1 ml de etanol absoluto frío (-20 °C) y se agitó suavemente cada muestra. En seguida se centrifugaron las muestras durante 10 min a 10000 rpm. Inmediatamente se retiró el sobrenadante con micropipeta y se dejó que secan los precipitados. Por último, se resuspendieron en 50 μl de agua desionizada estéril y después se congelaron a -21°C. Finalmente se comprobó la calidad de la extracción de ADN de las cepas mediante una electroforesis en gel de agarosa al

1.5% (p/v) y amortiguador TBE [1X], revelada con una solución de bromuro de etidio y observada usando el Fluor-S (BIORAD).

5.5.2 Amplificación por PCR de un fragmento del gen ARN 16 S y secuenciación de la región V1.

Se amplificó aproximadamente la mitad del gen ARNr 16S (Fig. 8) utilizando los cebadores pA y 3 para bacterias (Tabla 9) bajo las condiciones mostradas en las Tablas 10 y 11, utilizando un termociclador Perkin Elmer 2400. Posteriormente se secuenció la región V1 del gen ARNr 16S utilizando el cebador gamma.

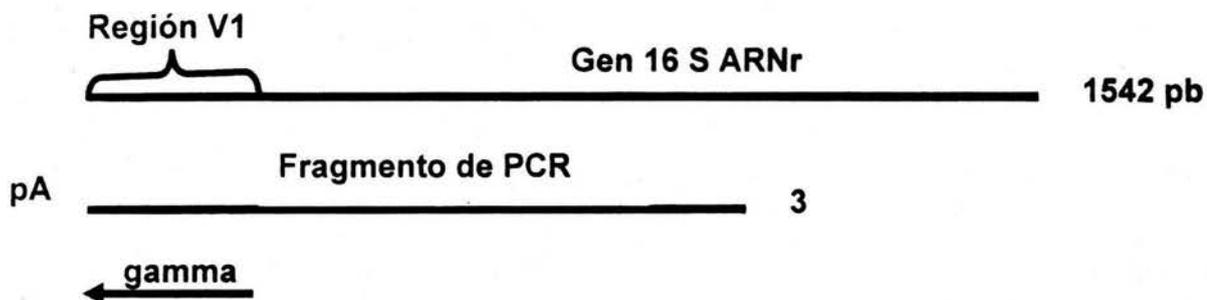


Fig 8 Representación del gen ribosomal 16 S y del cebador utilizado para su secuenciación.

Tabla 9. Cebadores para PCR utilizados en este estudio.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Posición	Orientación
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	9-28	Reversa
3	GTTGCGCTCGTTGCGGGACT	1109-1090	Hacia adelante
7	ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG	358-339	Hacia adelante

Tabla 10. Protocolo para amplificar por PCR el fragmento V1 del gen ARNr 16S.

Componente	Volumen	Concentración en la reacción
Amortiguador para PCR	10 μ l	1 X
MgCl ₂	5 μ l	50 mM
dNTPs	2 μ l	10 mM
Primer 3	1 μ l	20 pmol/ μ l
Primer pA	1 μ l	20 pmol/ μ l
Templado	10 μ l	10 ng/ μ l
Taq polimerasa	2 μ l	1 U/ μ l
Agua destilada	Para 100 μ l	-----

Tabla 11. Condiciones de PCR Termociclador para amplificar la región V1 del gen ARNr 16S.

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	3 min
34	94°C	1 min
	65°C	1.30 min
	72°C	2 min
2	72°C	15 min

Se visualizaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se revelaron con una solución de bromuro de etidio y se observaron a través del Fluor-S (BIORAD).

5.5.3 Limpieza de los productos de PCR de las cepas puras.

Los productos de PCR de las cepas puras de pozol fueron purificados utilizando el KIT PCR CLEAN-UP de Qiagen, siguiendo las instrucciones del proveedor.

5.5.4 Secuenciación.

Posteriormente los productos de PCR se enviaron a secuenciar con el cebador gamma (γ) que incluyeron la región hipervariable V1 (Tabla 9) al Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las condiciones requeridas para la secuenciación se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Condiciones para secuenciar cepas puras de pozol

	Concentración	Volumen
Muestra (cepas)	20 ng/ μ l	20 μ l
Cebador gamma (γ)	20 pm/ μ l	20 μ l

5.5.5 Comparación de secuencias.

La base de datos utilizada para comparar la secuencias de cepas de pozol fue el National Center for Biotechnology Information (<http://ncbi.nih.gov/>), como se reportó previamente.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS PURAS DE POZOL PARA MONTAR LA TÉCNICA DEL DGGE.

La mayoría de los resultados obtenidos en la identificación de las cepas puras de pozol fueron exitosas al tener porcentajes de identidad por arriba del 97% (Tabla 13). Sin embargo, hubo dos cepas cuya identidad fue menor al 97% (cepas Lilis 32 y Amil47), por lo que se sugiere secuenciar fragmentos más largos del gen para asegurar la identificación de los microorganismos; no se descarta la posibilidad de que sean nuevas especies. Se ha propuesto que los procariontes que difieran en la secuencia del ARNr 16S en porcentajes mayores a 3 en comparación con otros organismos, deben ser considerados como especies nuevas.

Se observó que la mayoría de las identificaciones de las cepas mediante la técnica API 50CH difiere de los resultados obtenidos en la secuenciación al utilizar un segmento del gen ARNr 16S. Esto se ha observado en otros trabajos, como el realizado por Díaz-Ruiz *et al.*, (2003) en la identificación de bacterias lácticas amilolíticas. Lo anterior se atribuye a que existen ambientes que antes no habían sido estudiados, y que los microorganismos ahí existentes no están registrados en la base de datos del API.

En la mayoría de los patrones de DGGE para cepas puras de pozol se observó más de una banda (Fig. 9) correspondiente a un mismo organismo. Así mismo, se observó que algunas bandas de cepas diferentes presentaron migraciones muy parecidas en el gel de DGGE. En estudios recientes se menciona que al utilizar técnicas moleculares muy sensibles tales como el DGGE o TGGE se puede observar que en una sola banda de ADNr 16S haya más de dos especies de bacterias (van Hannen *et al.*, 1998; Sekiguchi *et al.*, 2001). Lo anterior se atribuye principalmente a una micro variación producto de la incorporación de

artefactos. Esto puede ocurrir por una variabilidad natural, por una introducción artificial proveniente de la amplificación por PCR y/o por técnicas de clonación o por la presencia de copias de los genes que tienen pequeñas diferencias en sus secuencias.

En la interpretación de los perfiles en geles de DGGE, esto significa que una sola banda puede representar varias especies, o que una especie podría estar representada por un grupo de bandas. Este fenómeno está asociado con la heterogeneidad intraespecífica, que es el resultado de las múltiples copias de los genes del ARNr que involucran diferencias en su secuencia (cistrones que codifican al ARNr 16S con diferente secuencia en un solo genoma) (Dahllöf *et al.*, 2000). Ciertos autores reportan que el número de operones de ARNr por genoma de bacteria puede variar de 1 hasta 15 copias, como es el caso de la bacteria patógena *Rickettsia prowazkeii*, mientras que *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium posee hasta siete copias (Cilia *et al.*, 1996). Se piensa que la variación en el número de operones de ARNr por genoma de bacteria está dada como un indicador genético de la estrategia general ecológica de una especie de bacteria para la explotación de nutrientes. Se ha propuesto también que la duplicación de cromosomas es un mecanismo para incrementar el número de ciertos genes particulares que se encienden bajo estrés nutricional (Cilia *et al.*, 1996).

Tabla 13. Identificación de cepas puras de pozol, mediante la comparación de la secuencia de la región V1 del gen ARNr 16S y del API 50CH.

CEPAS	Identificación mediante API 50CH (Flores 1996)	Calidad de Identificación API 50CH (Flores 1996)	Porcentaje de Identificación API 50CH (Flores 1996)	Resultados de secuenciación	% de identidad (comparación de secuencias)
Lilis 3	<i>Lact. raffinolactis</i>	Dudosa	45.6	<i>Lb. plantarum</i>	99
Tap5	<i>Lb. plantarum</i>	Excelente	99.9	<i>Lb. plantarum</i>	100
Lilis14	<i>Lb. crispatus</i>	Excelente	99.9	<i>Lb. plantarum</i>	99
Lilis44	<i>Lb. plantarum</i>	Excelente	99.9	<i>Lb. plantarum</i>	100
Lilis32	<i>Lact. raffinolactis</i>	Excelente	99.9	<i>Lact. raffinolactis</i>	92.36
Snc15	<i>Lact. lactis lactis</i>	Muy buena	99.5	<i>Lact. lactis</i>	100
Snc25	<i>Lact. raffinolactis</i>	Dudosa	91.3	<i>Lact. lactis</i>	99
Snc23	<i>Leuc. mesenteroides</i>	Dudosa	58.2	<i>Lact. lactis</i>	99
Amil47	<i>Lact. raffinolactis</i>	Dudosa	96.9	<i>S. infantarius</i>	93
Snc22	<i>Lact. lactis lactis</i>	Dudosa	60.8	<i>Leuc. citreum</i>	99.6
Snc28	<i>Lact. raffinolactis</i>	Dudosa	99.8	<i>Leuc. citreum</i>	100
Lilis42	<i>Lb. plantarum</i>	Excelente	99.9	<i>Leuc. citreum</i>	99
Amil30	<i>Leuc. citreum</i>	Aceptable	83.6	<i>Leuc. citreum</i>	99
Lilis9	<i>Lact. raffinolactis</i>	Excelente	99.9	<i>W. confusa</i>	99
Lilis17	<i>Lb. pentosus</i>	Dudosa	73.9	<i>W. confusa</i>	100
Lilis19	<i>Lb. plantarum</i>	Dudosa	95.2	<i>W. confusa</i>	99
Lilis20	<i>Lb. coprophilus</i>	Excelente	99.9	<i>W. confusa</i>	99
Snc40	<i>Lb. s coprophilus</i>	Dudosa	39.2	<i>W. confusa</i>	100
Snc45	<i>Lb. fermentum</i>	Buena	52.7	<i>W. confusa</i>	99
Tap50	<i>Lact. raffinolactis</i>	Buena	53.0	<i>Leuc. argentum</i>	99
Lilis39	<i>Leuc. citreum</i>	Excelente	99.9	<i>Lb. pentosus</i>	99.6



Fig. 9 Patrones de bandas de cepas puras de pozol en gel de DGGE. **A.** *Leuc. citreum*, **B.** *W. confusa*, **C.** *W. confusa*, **D.** *Lb. plantarum*, **E.** *Leuc. argentum*, **F.** *Lb. plantarum*, **G.** *Leuc. citreum*, **H.** *S. bovis* I. *W. confusa*, **J.** *Lact. lactis*, **K.** *L. lactis*.

En años recientes, se han propuesto técnicas para evitar el fenómeno de heterogeneidad, como la de Dahllöf *et al.*, (2000), quienes plantean utilizar el gen *rpoB* de la subunidad beta de la RNA polimerasa, de la cual parece que solo existe una copia por bacteria.

Actualmente se ha discutido mucho sobre la repercusión del fenómeno de microheterogeneidad en el análisis de comunidades, pero hasta la fecha, el problema sigue sin ser resuelto. Sin embargo, se considera importante, porque se piensa que esto podría interferir no solo en los análisis de los patrones de microorganismos, sino principalmente en conceptos de taxonomía y evolución de bacterias.

Otro problema suscitado con los gels de DGGE de cepas puras de pozol fue el de la co-migración, lo que complicó la elaboración de un patrón con las cepas de pozol. Cuando se amplificó mediante PCR una mezcla de los ADN (utilizando una misma concentración de templado [50 ng/ μ l]) de cada una de las cepas previamente identificadas, se obtuvieron como resultado un número de

bandas por abajo del esperado. Lo anterior se observa en el carril C de la Figura 10 donde apenas y se distinguieron 6 de las 20 bandas posibles, si además de que se identificaron 8 cepas (Fig 10, carriles 1-8), se considera la microheterogeneidad existente en cada una de ellas.

Existen varios trabajos en los que se menciona que cuando se trabaja con mezclas de ADN de comunidades complejas, es muy común que se presente el fenómeno de amplificación preferencial, ya que las moléculas de ADN presentes que sirven como templado, en su mayoría no son homogéneas (Wintzingerode *et al.*, 1997). En la mayoría de los casos la amplificación preferencial está en función de la selección de los cebadores, del número de ciclos de replicación y del contenido de G + C en el fragmento de ADN a amplificar. Los genes que tienen un alto contenido de G + C, tienen poca eficiencia para disociarse y con ello dificultan su amplificación, por su parte, los genes con bajo contenido de G + C se disocian fácilmente pudiendo presentar una amplificación preferencial sobre los anteriores.



Fig 10 Gel de DGGE de muestras de cepas puras de pozol. (C) amplificación mediante PCR de una mezcla de ADN de cada una de las cepas de pozol, utilizando una concentración homogénea de templado [50 ng/ μ l]. (1-8) Amplificación por PCR de cada una de las cepas de pozol previamente identificadas (1 *Lb. plantarum*, 2 *Lact. raffinolactis*, 3 *Lac. lactis lactis*, 4 *S. sp.* 5 *Leuc. citreum*, 6 *W. confusa*, 7 *Leuc. argentum*, 8 *Lb. pentosus*).

RESUMEN

La aplicación de técnicas moleculares que no dependen del cultivo de los microorganismos han abierto un nuevo camino en el estudio de comunidades microbianas naturales, sin embargo, estas técnicas complementan pero no reemplazan a las técnicas tradicionales microbianas. El método API 50CH no resulta ser adecuado para la identificación de cepas puras de pozol, ya que es un ambiente poco estudiado, y los microorganismos ahí existentes no se encuentran registrados en la base de datos del API. Sin embargo, es un método sencillo que proporciona una idea aproximada de cuáles son los microorganismos existentes en la muestra que se esté estudiando.

Por otro lado, se piensa que la microheterogeneidad en los microorganismos siempre ha estado presente; sin embargo, ha sido con la introducción de técnicas moleculares de alta sensibilidad, las que han evidenciado este fenómeno. Aunado a este problema, la co-migración de ADN de cepas de pozol, dificultó la elaboración de un patrón. Si bien las técnicas moleculares han sido una herramienta muy útil para el estudio microbiano, también han exhibido limitaciones. Se piensa que cuando los microorganismos están estrechamente relacionados filogenéticamente, la separación de las bandas no es muy clara, ya que dos o más fragmentos de ADN pueden aparentar tener la misma distancia de migración en un gel y enmascarar resultados.

6.2 VARIABILIDAD MICROBIOLÓGICA DEL POZOL.

6.2.1 Masa recién molida.

Se observó una marcada variabilidad entre los patrones de bandas de las muestras de masa recién molida de cada productor (Fig. 11A). La muestra que presentó más bandas fue la del productor 3 (8 bandas) obtenida del mercado Pino Suárez de Villahermosa, mientras que la muestra que presentó menos bandas (2 bandas) fue obtenida de la "Pozolería de la Fuente", ubicada en el noreste de la ciudad. Así mismo, en la Figura 9B se puede observar que no existe ningún agrupamiento de las muestras debido a la alta variabilidad que presentan. Esto se debe probablemente a que la masa se contamina con microorganismos diferentes en el caso de cada productor.

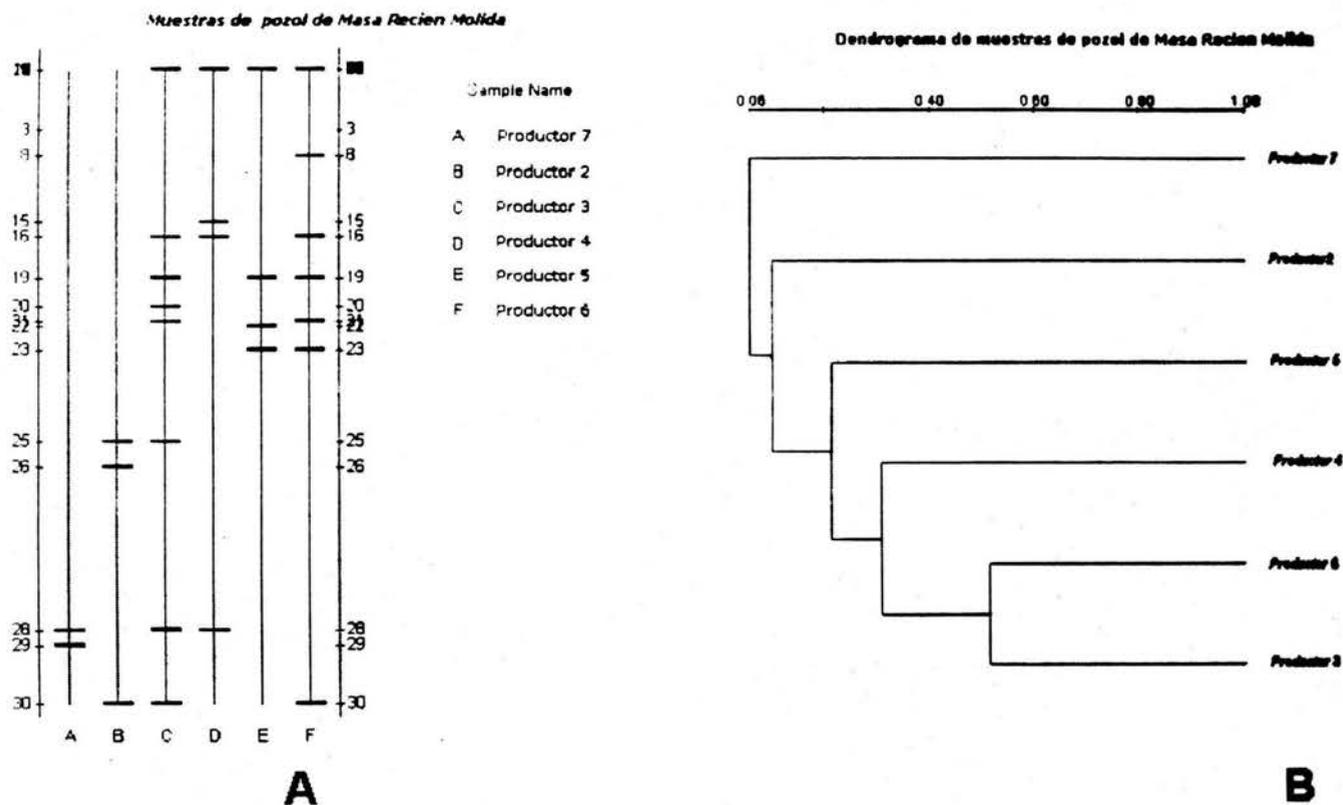


Fig 11 **A** Diagrama de patrones de bandas de muestras de pozol de masa recién molida de diferentes productores. **B** Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD .

6.2.2 Fermentación al tiempo cero.

En cuanto al tiempo cero de fermentación (T0) se observó variabilidad entre los patrones de bandas. Si bien existieron bandas comunes tanto para la superficie como para el centro de las muestras de pozol, también existieron muchas otras que estuvieron presentes en la superficie pero no en el centro y viceversa; por lo que no se obtuvo una tendencia clara en el agrupamiento (Figs. 12 y 13).

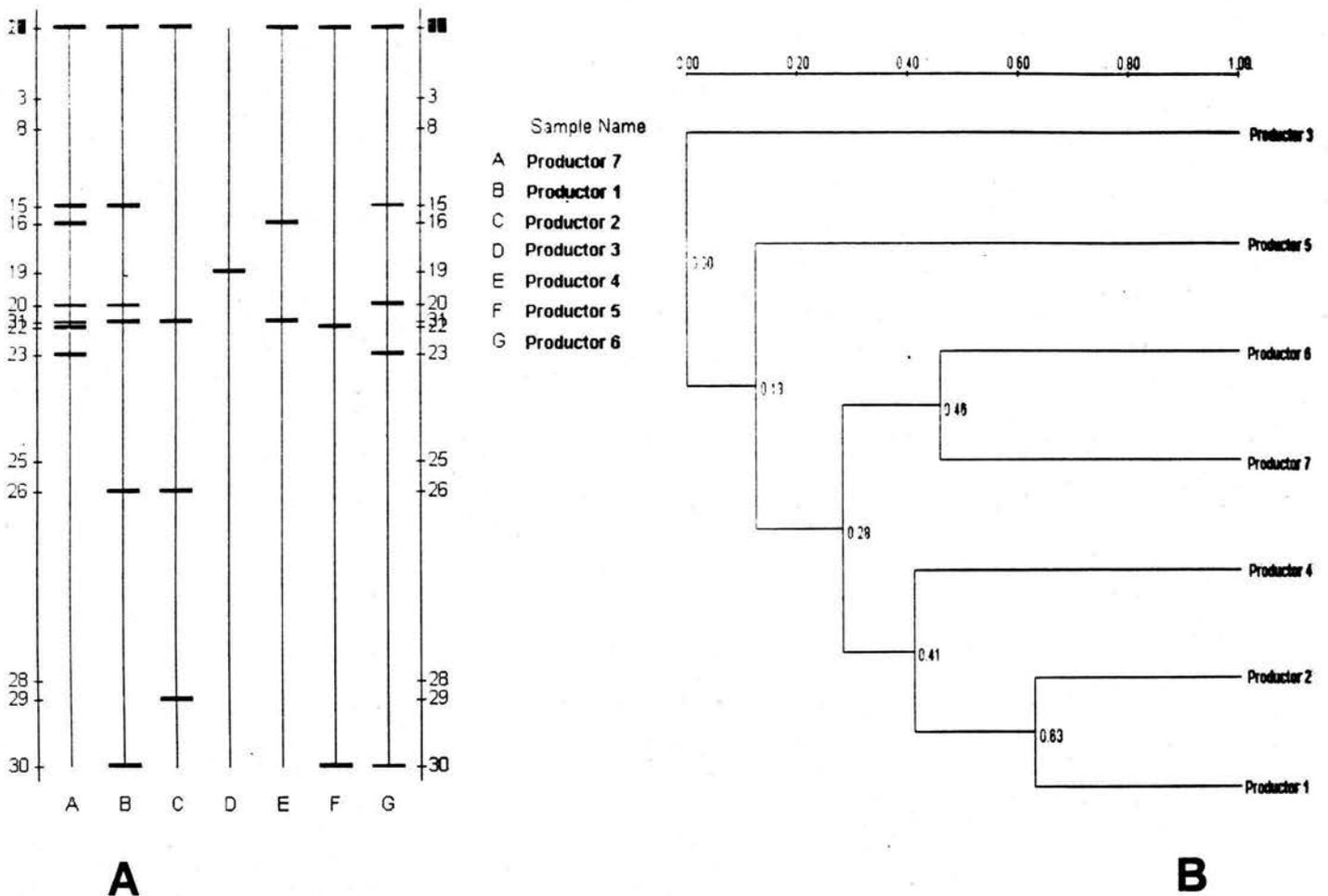
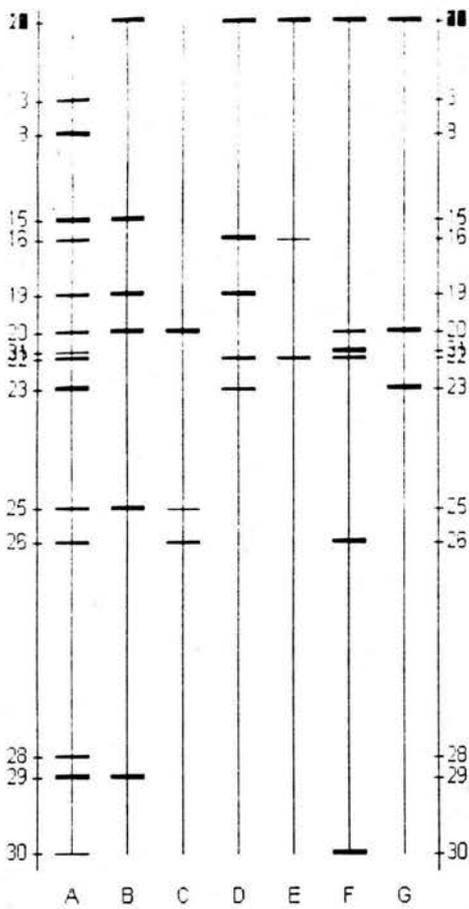
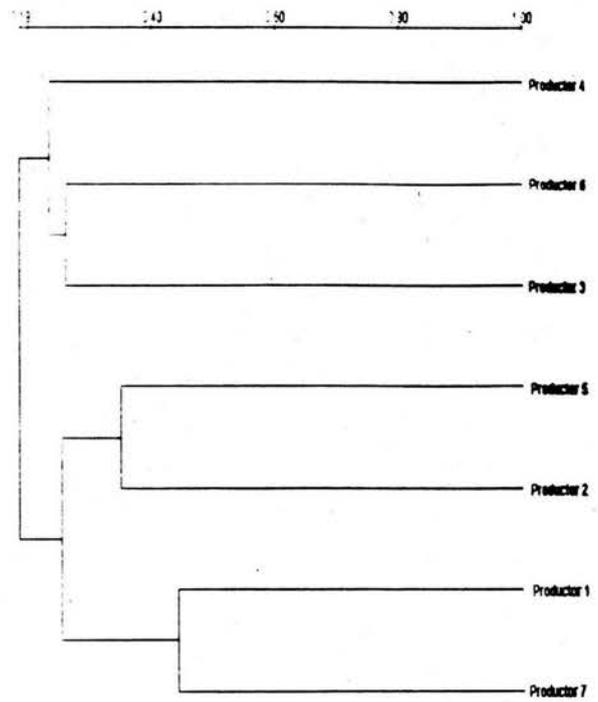


Fig 12. **A** Diagrama de patrones de bandas de muestras de la superficie de pozol de diferentes productores a las cero horas de fermentación. **B** Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD .



A

- Sample Name
- A Productor 7
 - B Productor 1
 - C Productor 2
 - D Productor 3
 - E Productor 4
 - F Productor 5
 - G Productor 6



B

Fig 13 **A** Diagrama de patrones de bandas de muestras del centro de pozol de diferentes productores a las cero horas de fermentación. **B** Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD .

6.2.3 Fermentación a las 24 y 48 h.

Respecto a los tiempos 24 y 48 h de fermentación (Figs. 14, 15, 16, 17) se observó variabilidad entre los patrones de bandas tanto en el centro como en la superficie. Sin embargo, conforme se desarrolló la fermentación, se observó que algunas bandas se mantuvieron constantes, pudiendo éstas representar a los microorganismos dominantes. Por otro lado también se observó que durante el proceso de fermentación (Figs. 14B, 15B, 16B, 17B) se fueron conformando los grupos de microorganismos. Por ejemplo, en la superficie a las 24 y 48 h (Figs. 14 y 16) de fermentación se observó un mismo patrón. Para el centro a las 24 y 48 h de fermentación (Figs. 15 y 17) se observó un patrón similar.

Pareciera que el agrupamiento de los microorganismos no depende del lugar donde se produce el pozol, ya que las muestras 1 y 7 que se pensó pudieran tener diferencias, presentaron patrones muy similares respecto a los demás. Las muestras de pozol pueden ser muy heterogéneas, sin embargo, durante la fermentación se desarrollarán los organismos más aptos.

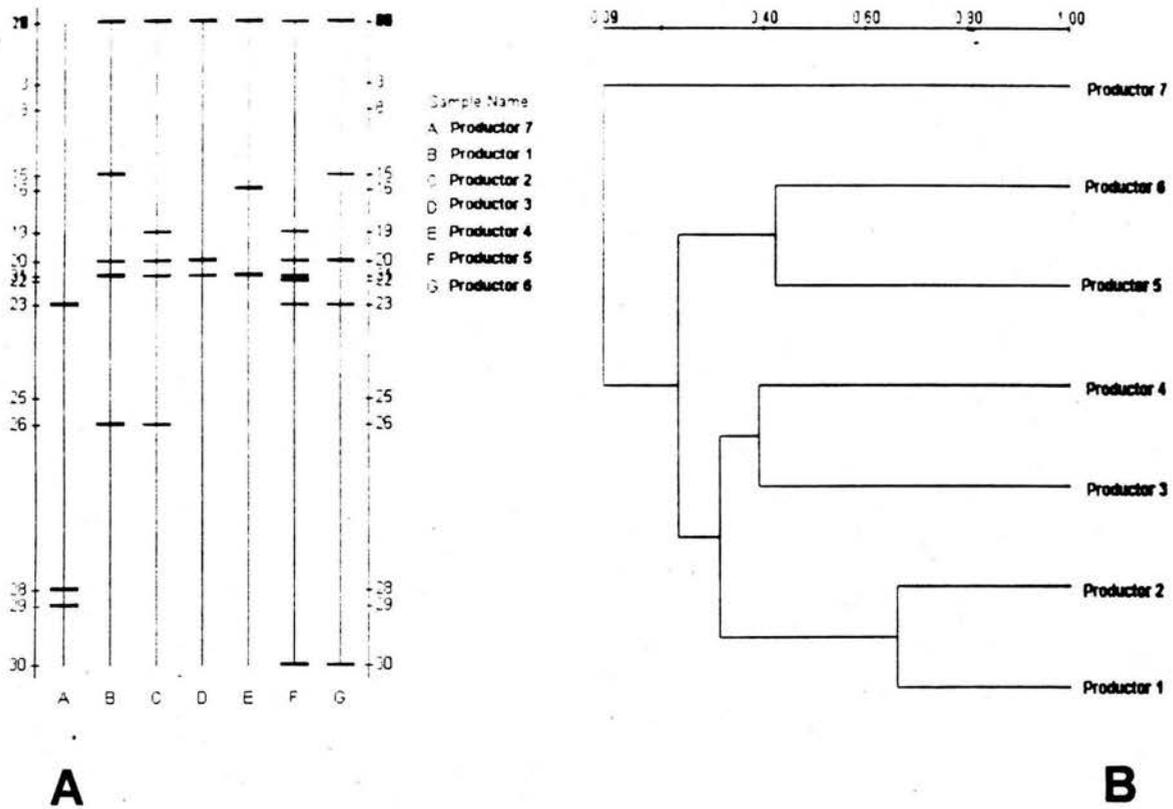


Fig 14 **A** Diagrama de patrones de bandas de muestras de la superficie de pozol de diferentes productores a las 24 horas de fermentación. **B** Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD .

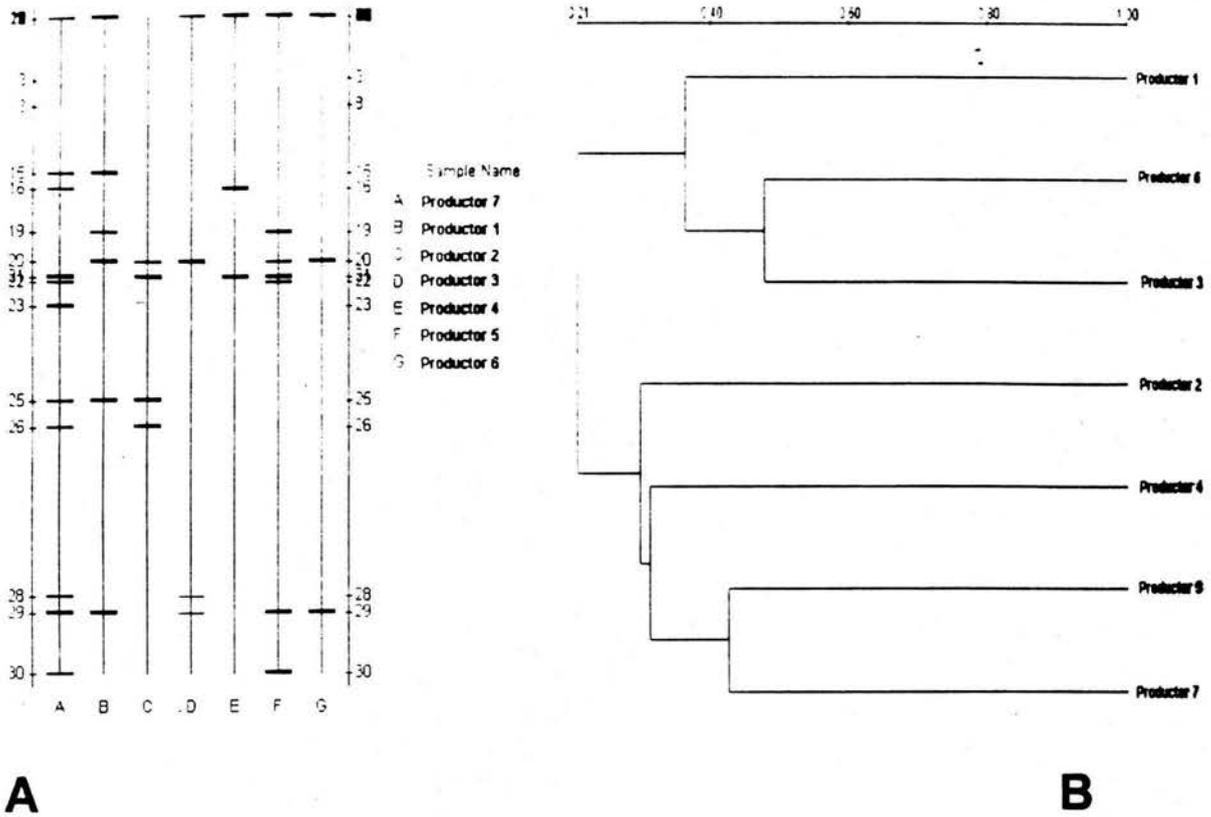


Fig 15. **A** Diagrama de patrones de bandas de muestras del centro de pozol de diferentes productores a las 24 horas de fermentación. **B** Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD .

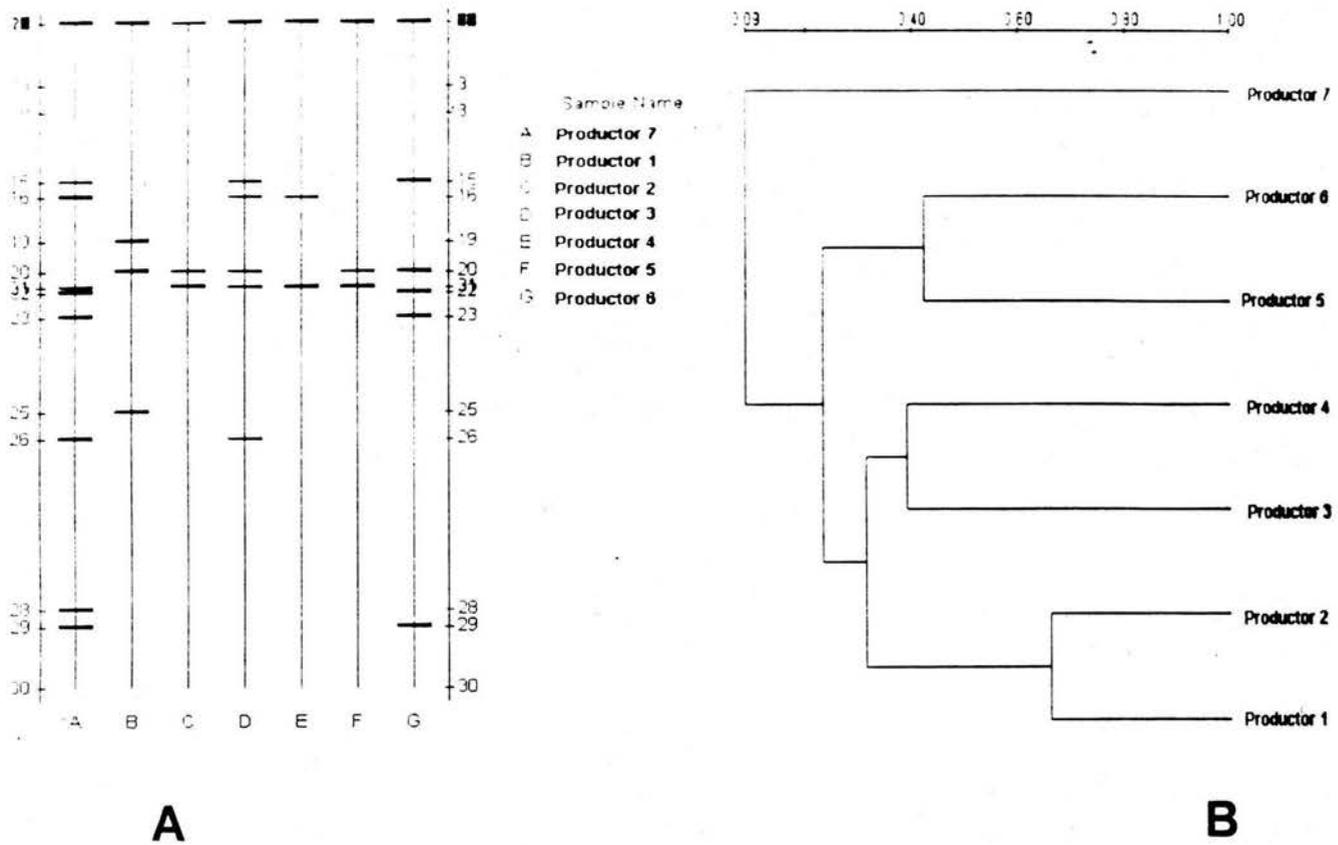


Fig 16 **A** Diagrama de patrones de bandas de muestras de la superficie de pozol de diferentes productores a las 24 horas de fermentación. **B** Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD .

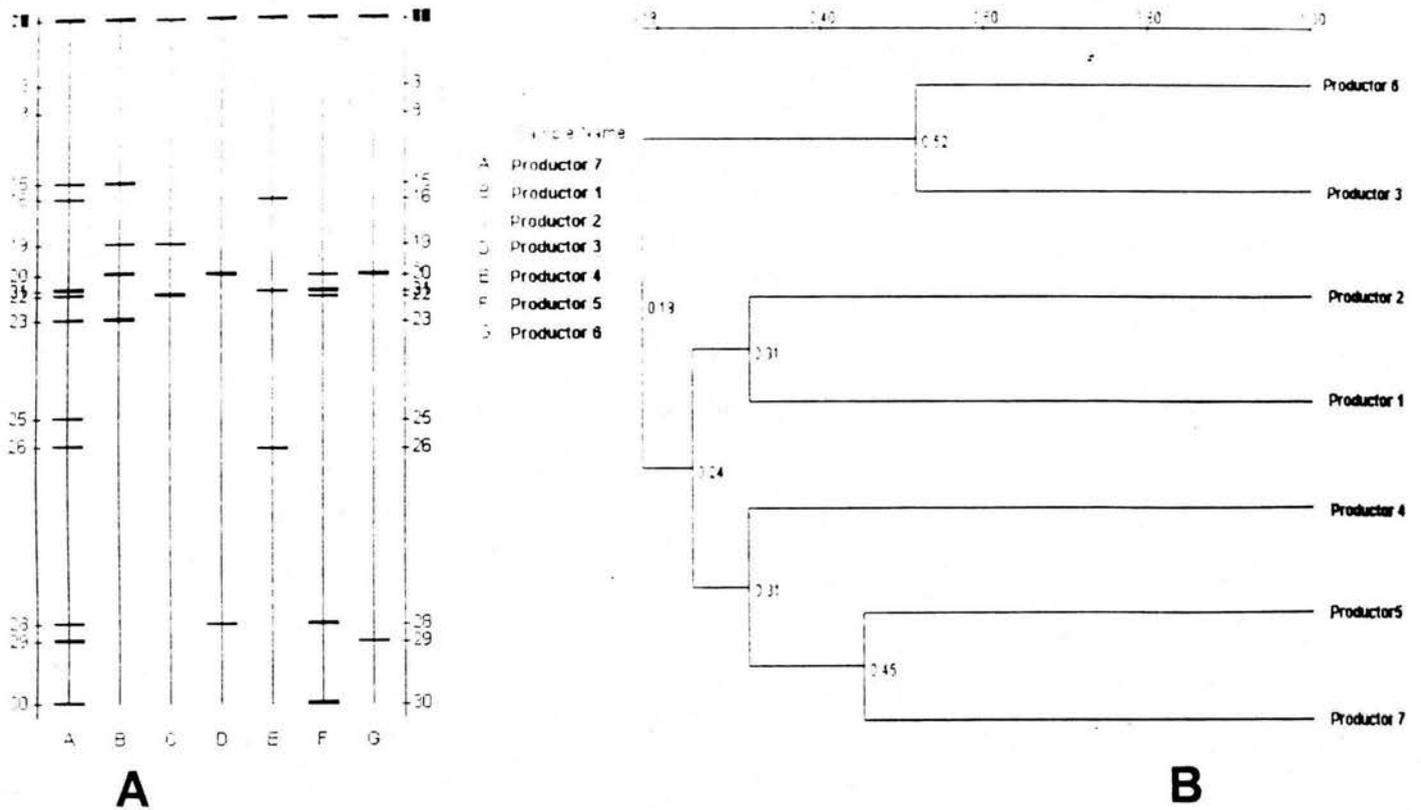


Fig 17 **A** Diagrama de patrones de bandas de muestras del centro de pozol de diferentes productores a las 24 horas de fermentación. **B** Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD .

6.2.4 Fermentación a las 72 h.

Para las 72 horas de fermentación (T3) se observó en todas las muestras la presencia de un conjunto de bandas (19, 20, 21, 22, 23) en la parte media del gel (Fig. 18A) tanto en la superficie como en el centro de la masa (Fig. 19A). Así mismo, para la superficie se observa en la figura 2A que existen dos bandas, la 20 y la 21 que son comunes en la mayoría las muestras; sin embargo, las muestras que presentan la banda 20 no presentan la banda 21. Lo anterior se ve reflejado en el la Figura 16B en donde se observa la formación de 2 grupos. El primer conjunto que contiene a la banda 20, agrupa a las muestras de los productores 1, 6 y 3, mientras que el segundo conjunto que contiene a la banda 21 agrupa a las muestras de los productores 5, 7, 4 y 2.

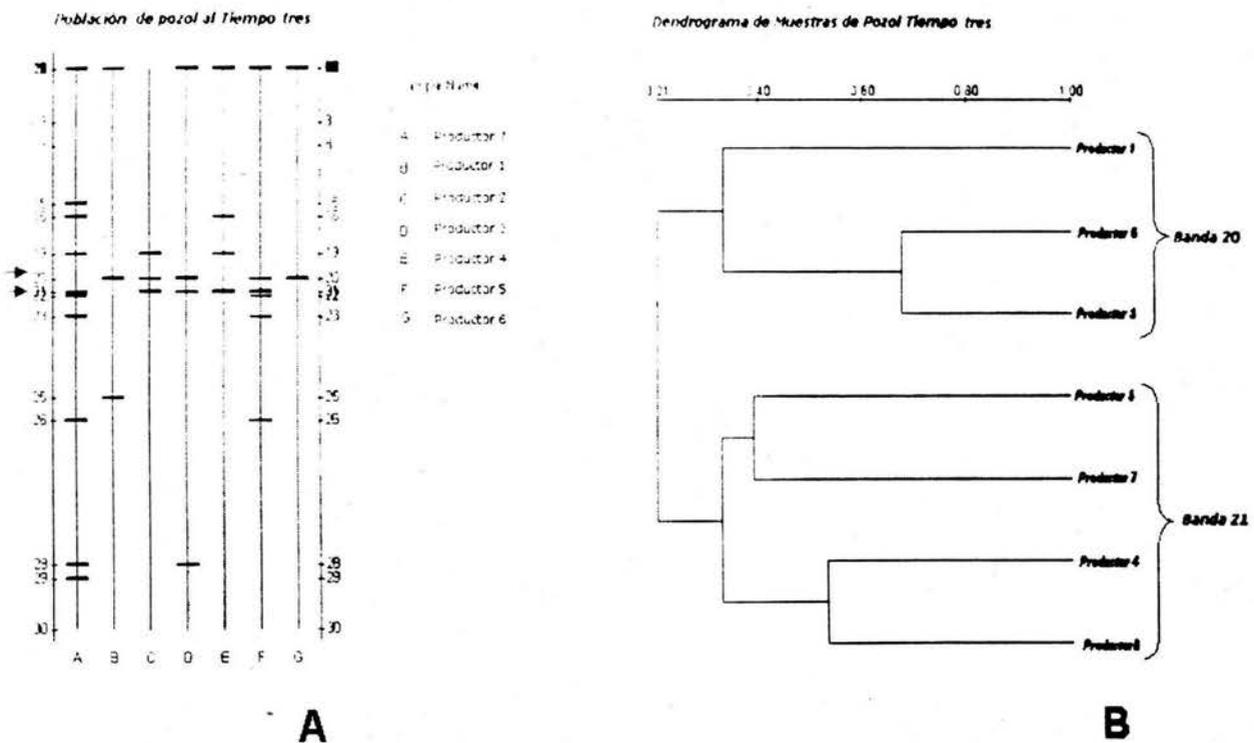


Fig 18 **A** Diagrama de patrones de bandas de la superficie de pozo de diferentes productores a las 72 horas de fermentación. **B** Dendrograma de patrones de bandas de pozo obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD .

Para el centro de la muestra, se observó en la Figura 16A que existen dos bandas, la 20 y la 21 que son comunes en la mayoría las muestras, sin embargo, las muestras que presentan la banda 20 no presentan la banda 21. Lo anterior se muestra en la Figura 16B en donde se observa la formación de 2 grupos. El primer conjunto que contiene a la banda 20, agrupa a las muestras de los productores 1, 6 y 3. Mientras que el segundo conjunto que contiene a la banda 21 agrupa a las muestras de los productores 5, 7, 4 y 2. No obstante, aquí se forma un subgrupo que divide a las muestras en dos conjuntos. El primero contiene a los productores 5 y 7, y el segundo a los productores 4 y 2.

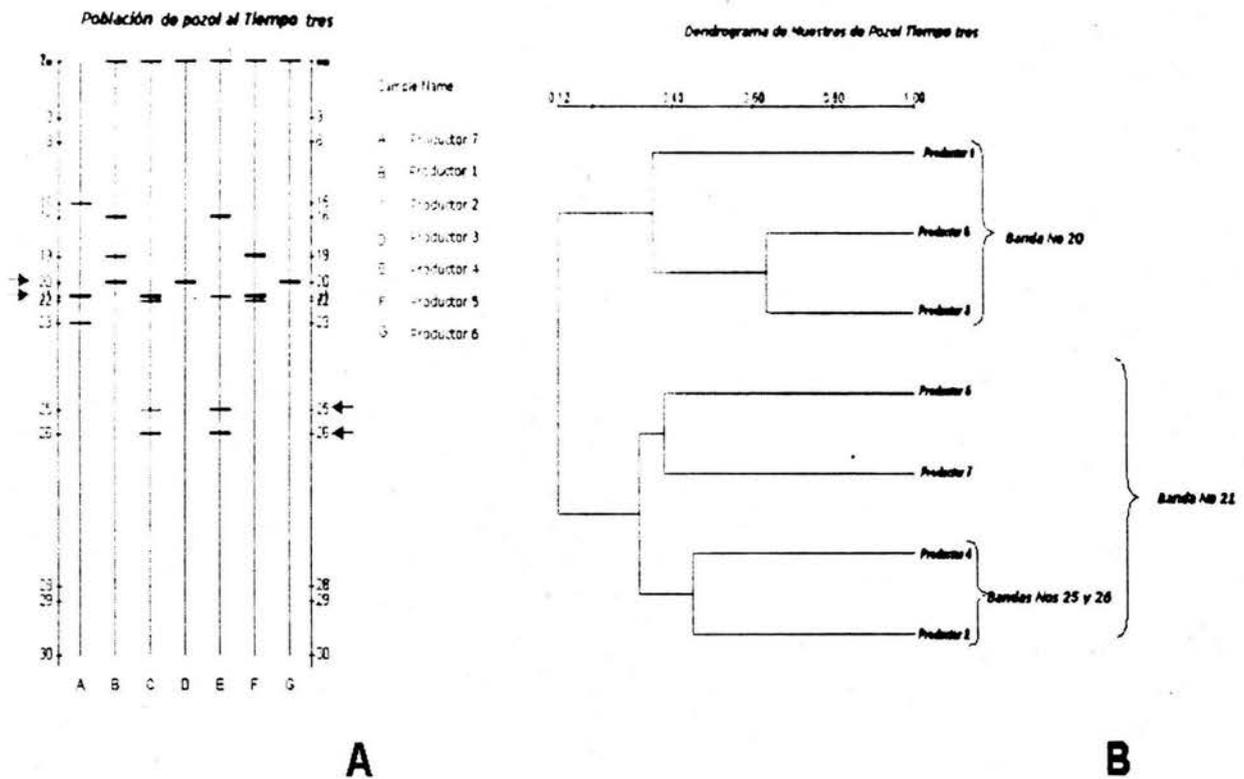


Fig 19 **A** Diagrama de patrones de bandas de muestras del centro de pozol de diferentes productores a las 72 horas de fermentación. **B** Dendrograma de patrones de bandas de pozol obtenidas con el coeficiente de similitud de Dice SD .

RESUMEN

La fermentación del pozol es efectuada por una microbiota natural que es consecuencia de la contaminación del nixtamal durante la molienda; por lo que durante el transcurso de la misma, los microorganismos "dominantes" prevalecieron a lo largo de la misma. Lo anterior se reflejó en la variabilidad de los patrones de bandas y en la tendencia al agrupamiento en las últimas etapas de la fermentación. Aunque haya gran variedad de microorganismos al inicio de la fermentación, en las últimas etapas ya se habrá definido un patrón y dentro de éste se encontrarán los microorganismos dominantes.

6.3 IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE GELES DE DGGE

6.3.1 Secuenciación.

Con base en los resultados antes mencionados, se observó que si bien existe variabilidad entre los patrones de bandas de las muestras de masa recién molida de cada productor, después de la fermentación tendieron a predominar las mismas bandas en todas las muestras. En la Figura 20 se representa con dos geles (productores 7 y 3) a los patrones de bandas de masa recién molida y de pozol a diferentes tiempos de fermentación. La masa recién molida (MRM) tiene 2 bandas para el productor 7 y 10 para el productor 3 (Fig. 20). Sin embargo, se observa que durante la fermentación tres bandas permanecieron constantes (20, 21 y 29). Estas bandas estuvieron presentes en la mayoría de las muestras tanto en la superficie como en el centro. Algunas veces se observaron bandas adicionales entre la 20 y 21 y abajo de 29. Con base en los resultados obtenidos, se seleccionaron estas bandas como las más importantes en el perfil de la comunidad bacteriana, por lo que se cortaron y reamplificaron para secuenciarlas.

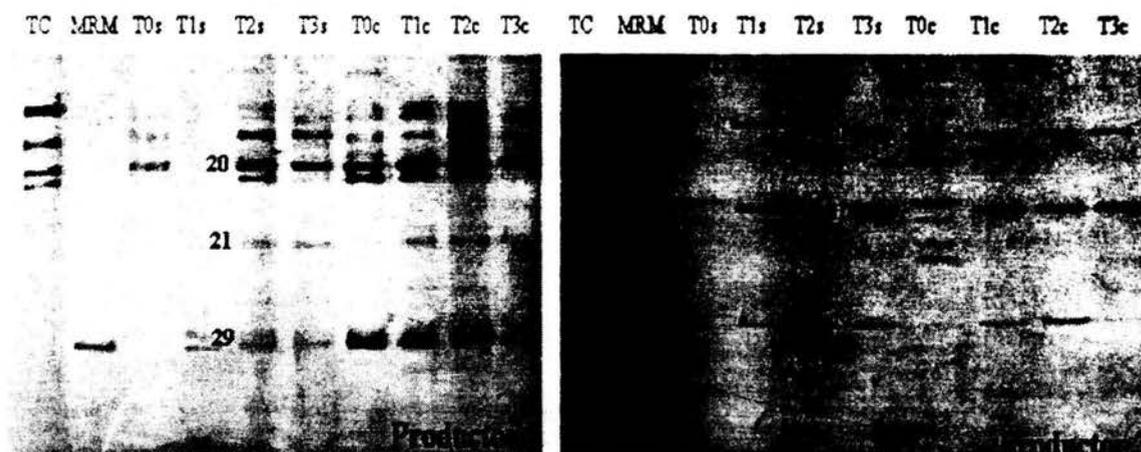


Fig. 20 Representación en gel de DGGE de la huella de comunidades microbianas de muestras de pozol de dos productores diferentes. Se observan las 3 bandas seleccionadas (20, 21 y 29) que fueron cortadas y reamplificadas. Estas permanecieron constantes en casi todos los tiempos de fermentación. TC.-Todas las cepas de pozol; MRM.- masa recién molida; T1s-T3s .- Tiempos de fermentación (0,1,2 y 3 días)de la superficie de la muestra de pozol; T1c-T3c.- Tiempos de fermentación del centro de la muestra de pozol.

La identificación de la banda 21 se realizó directamente después de cortarla del gel de DGGE, reamplificarla y mandarla a secuenciar. Mientras que las bandas 20 y 29 revelaron productos de PCR que contenían ADN de más de un organismo o de comunidades de microorganismos. Lo anterior se debió tal vez a que dos o más muestras tuvieron la misma migración en el gel de DGGE, o bien que la migración entre bandas fue muy parecida y al momento de cortar una, se incluyó parte de otra. Para separar e identificar cada componente, se hizo una clonación con el ADN amplificado y posteriormente se secuenció. Los resultados de las bandas extraídas de los geles de DGGE se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Secuencia de bandas cortadas del gel de DGGE y de la identificación de bandas de comunidades de acuerdo a un patrón de cepas puras de pozol previamente elaborado.

Muestra	Identificación de bandas de comunidades de pozol respecto al patrón de cepas puras	Resultados de secuenciación de la región V3 del gen ARNr 16S	% de identidad (comparación de secuencias)
*Banda 20	<i>W. confusa</i> <i>Lact. raffinolactis</i>	<i>W. cibaria</i>	98
		<i>W. kimchii</i>	98
		<i>W. confussa</i>	97
Banda 21	<i>S. sp</i>	<i>A. sp</i>	100
		<i>A. viridans</i>	100
		<i>Pediococcus urinae-equi</i>	100
*Banda 29	Ausente en el patrón	<i>S. suis</i>	96
Banda 25	<i>Lact. lactis lactis</i>	NO SE REALIZÓ	
Banda 26	No hubo relación con el patrón de cepas puras.		

*Resultados de secuenciación mediante clonación.

6.3.2 Banda No. 20.

La banda 20 que se presentó en todas las muestras de pozol y en casi todos los tiempos de fermentación, fue identificada como un organismo perteneciente al género *Weissella*.

El género *Weissella* surgió a partir de una de las líneas evolutivas del género *Leuconostoc* (phylum Firmicutes). Fue hasta 1990 cuando la filogenia de las bacterias clasificadas dentro del género *Weissella* se aclaró mediante el uso de secuencias del ARNr 16 y 23S, (Martínez-Murcia y Collins, 1990; Martínez-Murcia *et al.*, 1993). En él se agrupó a un conjunto de bacterias que se distinguían claramente de los miembros pertenecientes al género *Leuconostoc*. Rápidamente se fueron incorporando nuevas especies como *W. thailandensis* (Tanasupawat *et al.*, 2000), *W. cibaria* (Björkroth *et al.*, 2002) y *W. kimchii* (Choi *et al.*, 2002).

Según Björkroth *et al.*, (2002) en la actualidad las especies que conforman el género *Weissella* son: *W. confusa*, *W. halotolerans*, *W. hellenica*, *W. kandleri*, *W. minor*, *W. paramesenteroides*, *W. thailandensis*, *W. viridescens*, *W. cibaria* y la más reciente, *W. kimchii*.

6.3.2.1 Características del género *Weissella*.

Son células Gram positivas, crecen en pares o formando cadenas cortas, carecen de movilidad, las colonias son pequeñas, son catalasa negativa, aerobios facultativos, heterofermentativas, acidodúricas, crece a 15, 37 y 45°C, pero no a 4°C (Collins *et al.*, 1993).

Las cepas de *Weissella* se han aislado de distintas fuentes y muchas de ellas están asociadas con alimentos tradicionales fermentados:

Las cepas tipo de *W. cibaria* sp. nov., se aislaron del chili bo en Malasia, aunque también se han aislado de muestras clínicas en humanos y en animales. (Björkroth *et al.*, 2002).

Las cepas tipo de *W. kimchii*, fue aislada del Kimchi, que es un platillo fermentado tradicional de Korea elaborado a base de vegetales.

Las cepas de *W. confusa* se han detectado en azúcar de caña, jugo de zanahoria y ocasionalmente en leche bronca y drenajes (Hammes y Vogel, 1995), así como en el pozol (Ampe *et al.*, 1999).

El género *Weissella* es relativamente joven, por lo que en los últimos años se han aislado cepas de diferentes hábitats, principalmente de alimentos fermentados tradicionales. Sin embargo, se requiere más trabajos al respecto, ya que hasta el momento sólo se le considera como organismo contaminante en las fermentaciones (Tanasupawat *et al.*, 2000).

6.3.3 Banda No. 21.

La banda 21 que se presentó en casi todas las muestras de pozol y en casi todos los tiempos de fermentación, mostró de acuerdo a su secuencia ser un organismo perteneciente al género *Aerococcus*.

El género *Aerococcus* fue creado por Williams *et al.*, en 1953 para agrupar a algunas bacterias que se distinguían claramente de los miembros pertenecientes al género *Streptococcus*. En sus inicios el género *Aerococcus* sólo contenía a la especie *A. viridans* (Williams *et al.*, 1953), organismo que había sido reportado esporádicamente como patógeno humano (Colman, 1967; Jonosek *et al.*, 1980; Nathavitharana *et al.*, 1983; Taylor y Trueblood, 1985); sin embargo, recientemente se han incorporado varios miembros como son: *A. urinae* (Aguirre y Collins, 1992) aislada de diferentes hábitats como son aire, vegetación, polvo, suelo y carne salada. Su presencia en diversos ambientes, la hacen una especie

cosmopolita, por lo que no es sorprendente su presencia en el pozol. También ha sido asociada con infecciones de las vías urinarias en humanos (Franklam y Elliott, 1995). *A. christensenii* (Collins *et al.*, 1999) aislada de vagina humana. *A. sanguicola sp* (Lawson *et al.*, 2001) aislada de sangre humana. *A. urinachominis sp* (Lawson *et al.*, 2001) aislada de orina humana.

6.3.3.1 Características del género *Aerococcus*.

Son cocos Gram positivos, catalasa negativa (pseudocatalasa), presentan tendencia a dividirse en dos planos rectos formando tétradas y son tolerantes a la sal, características que hacen que se confundan fácilmente pediococos con micrococos y con aerococos.

Se ha encontrado que existe una estrecha relación filogenética entre los miembros del género *Aerococcus* y los del género *Pediococcus*, principalmente entre las especies *A. viridans* y *P. urinae-equi*. Collins *et al.*, (1990) demostraron que *P. urinae-equi* es un miembro del género *Aerococcus*. De acuerdo con los resultados de secuenciación del 16S ADNr, ambas cepas difieren sólo en 2 nucleótidos (99.9% homología de la secuencia) por lo que fue transferido al género *Aerococcus* (Stiles y Holzapfel, 1997)(Fig. 21).

6.3.3.2 Características de *P. urinae-equi*.

Produce menos ácido láctico que otros *Pediococcus* y crece en medios con valores de pH alcalinos Collins *et al.*, 1990). No se ha reportado en alimentos fermentados, por lo que sería interesante aislarlo para estudiarlo.

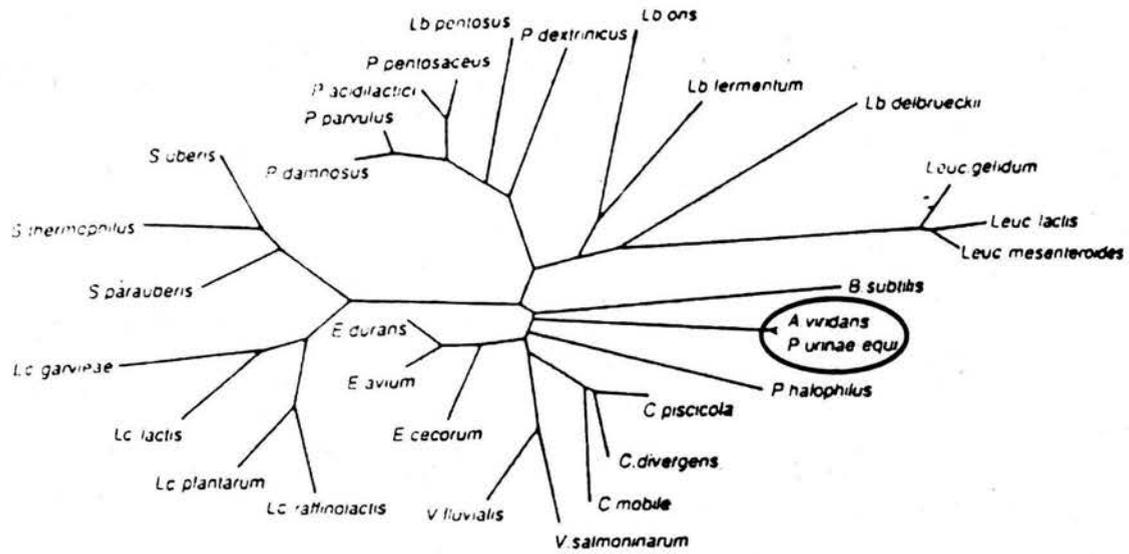


Fig. 21. Árbol filogenético obtenido por análisis de secuencias de ARNr 16S, donde se muestra la relación entre organismos del género *Pediococcus* y otras especies. (De Collins *et al.*, 1990).

La banda 29 que estuvo presente en la mayoría de las muestras de pozol y en casi todos los tiempos de fermentación, fue identificada como un organismo perteneciente al género *Streptococcus*.

La clasificación del género *Streptococcus* ha sufrido modificaciones importantes con base a las similitudes de las secuencias del ARNr 16S. En la actualidad, dentro de este género existen aproximadamente 40 especies, de las que destacan los estreptococos orales y patogénicos.

6.3.4.1 Características del género *Streptococcus*.

Los estreptococos son células Gam positivas, esféricas u ovoides, se les encuentra comúnmente en pares o formando cadenas. Estos cocos son anaerobios facultativos, homofermentativos, no forman esporas, son catalasa negativa y poseen requerimientos nutricionales complejos.

S. suis es un importante patógeno de cerdos que produce neumonía, poliserositis, endocarditis, meningitis y artritis, principalmente a lechones. Este organismo es considerado en algunos países asiáticos y europeos como un importante agente zoonótico, siendo la principal causa de meningitis en humanos; sobre todo en granjeros, carniceros, trabajadores de rastro, personas de industrias cárnicas y zootecnistas. Sin embargo, existen otros países en donde no se le ha notificado como agente zoonótico debido a que la enfermedad es subdiagnosticada o confundida con otros agentes. Tal es el caso de México, en donde hasta la fecha no existen reportes de enfermedades de meningitis en humanos ocasionados por *S. suis* (Talavera *et al.*, 2001). Para el caso de alimentos fermentados, *S. suis* fue detectado en el pozol por Escalante *et al.*, (2001). Por otro lado, organismos pertenecientes al género *Streptococcus* también han sido aislados de quesos (Georgalaki, *et al.*, 2000; Coppola *et al.*, 2001).

La presencia e importancia del género *Streptococcus* entre las bacterias lácticas del pozol fue reportada previamente mediante la técnica del DGGE, determinando la huella de la comunidad microbiana en una muestra de pozol. La banda más intensa correspondió a especies de *Streptococcus*. *S. bovis* fue el pariente más cercano al presentar su secuencia una homología del 99%, esta especie se encontró en todos los tiempos de fermentación (Ampe *et al.*, 1999).

Recientemente se demostró que dentro del grupo de bacterias lácticas amilolíticas del pozol, *Streptococcus* presenta la mayor actividad amilolítica, confirmando así su importancia durante la fermentación del pozol (Díaz *et al.*,

2003). La presencia e importancia de *S. bovis* entre las bacterias lácticas del pozol durante la fermentación podría relacionarse con sus características fisiológicas de sobrevivir a valores altos de pH y a temperaturas altas, las que seguramente promueven su permanencia después del proceso de nixtamalización del maíz y facilitan su desarrollo durante la fermentación del pozol; por otro lado, la capacidad para crecer muy rápido en presencia de almidón y la conversión eficiente de sustrato en biomasa; podría representar una ventaja ecológica para estas bacterias. Díaz et al., (2003)

El género *Streptococcus* incluye cepas capaces de crecer a pH de 9.6, algunas son termodúricas su crecimiento se inhibe cuando el pH baja (Hardie y Whiley, 1995).

Díaz-Ruiz *et al.*, reportaron la presencia de *S. bovis* durante todo el proceso de fermentación del pozol, a pesar de la disminución de pH a valores de 4.8-4.4. Se sugiere que la sobrevivencia de *S. bovis* en masa acidificada podría deberse a la formación de microambientes de pH más alto (mantenidos después del tratamiento alcalino de maíz). Asumiendo además que el principal papel de *S. bovis* en el pozol fuera el de proveer maltooligosacáridos de bajo peso molecular a la microbiota no amilolítica durante las primeras etapas de la fermentación de la masa (Díaz, 2003).

6.4 Comparación de patrones de bandas de microorganismos identificados.

Uno de los principales problemas presentes en el análisis de los patrones de las comunidades microbianas, fue el fenómeno de microheterogeneidad. Esto complicó la elaboración de un patrón con las cepas de pozol previamente identificadas. En un gel de agarosa (Fig. 22) se corrió en el primer carril una mezcla de productos de PCR de cada una de las ocho cepas de pozol previamente identificadas, que sería el patrón de correlación. En los carriles posteriores se corrió por separado cada una de las cepas ya identificadas.

Como se observa en la Figura 22, el que fungiría como patrón (carril c) presentó un número de bandas por arriba del esperado. Por otro lado, se observó que las cepas puras presentaron más de una banda por microorganismo.

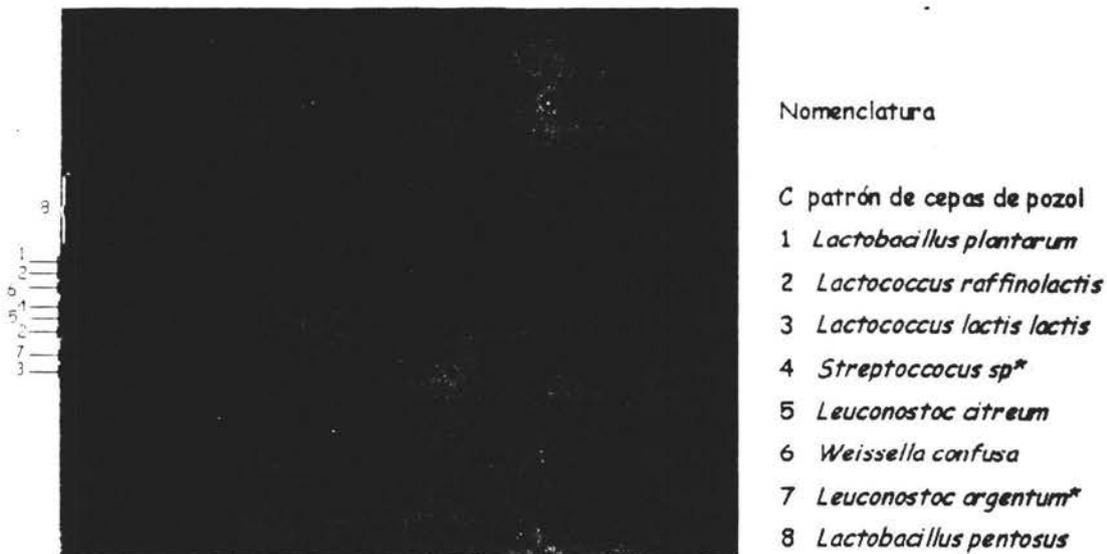


Fig. 22 Gel de DGGE de muestras de cepas puras de pozol donde se observa microheterogeneidad en cada una de ellas.

Lo antes mencionado se complementa con la Tabla 15, en la cual se muestra el número de copias del gen ribosomal 16S para cada cepa y donde también se hace un listado de las bandas que son compartidas con otras cepas, este punto dificultó la elaboración de un patrón real. Se observa (Tabla 15) que *Lb. pentosus* presentó al menos 8 copias del gen ribosomal y *Leuc. citreum* presentó 4, mientras que todas las demás cepas exhibieron al menos dos copias.

En la huella de comunidades bacterianas de las muestras de pozol de cada productor, fue difícil asignar cada banda a un solo microorganismo, debido a que también se observó microheterogeneidad. Sin embargo, con ayuda del software DIVERSITY DATABASE Versión 2.2 para Windows (BIORAD) y con la distancia de migración, se relacionaron los patrones de las cepas conocidas con las

obtenidas en las comunidades microbianas, de tal forma que se obtuvo un patrón de referencia (Fig. 23).

Tabla 15. Microheterogeneidad de cepas puras de pozol.

No de carril en el gel	Cepa pura de pozol	Heterogeneidad (más de una banda para cada microorganismo puro).	Microorganismos que comparten bandas.
1	<i>Lact. plantarum</i>	2	
2	<i>Lact. raffinolactis</i>	2	<i>Lact. pentosus</i>
3	<i>Lact. lactis lactis</i>	2	
4	<i>S. sp</i>	2	
5	<i>Leuc. citreum</i>	4	
6	<i>W. confusa</i>	2	<i>Leuc. citreum</i>
7	<i>Leuc. argentum</i>	2	<i>Leuc. citreum</i>
8	<i>Lb. pentosus</i>	8	<i>Lact. raffinolactis</i> <i>W. confusa</i> <i>S. sp</i>

Como se observa en la Figura 23, existen cepas que están relacionadas dos veces con bandas diferentes, debido a que presentan más de una copia del operón del gen ARNr 16S. La banda 20 identificada de acuerdo con su secuencia como un organismo perteneciente al género *Weissella*, en este patrón correspondió a *W. confusa* / *Lact. raffinolactis*. Mientras que la banda 21, que fue identificada de acuerdo a su secuencia como *Aerococcus*, en este patrón correspondió a *S. sp*. Este dato no resulta absurdo, si se considera que los géneros *Aerococcus* y *Streptococcus* guardan una estrecha relación, como ya se había mencionado (Fig.21). Se debe considerar además que el fragmento secuenciado fue muy pequeño (menos de 200pb) y esto podría influir en el resultado. Por último la banda 29 no tuvo relación con ninguna de las cepas puras de pozol con las que se hizo el patrón.

Aunque el porcentaje de similitud obtenido fue bajo (96%), existe un trabajo previo (Escalante *et al.*, 2001) en donde se identificó a *S. suis* como un organismo

abundante al estudiar la diversidad de las bacterias ácido lácticas del pozol determinadas mediante el análisis de ARNr 16S. También se ha reportado que en términos de importancia, los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus* representan el 50% de la población activa del pozol (Ampe et al., 1999).

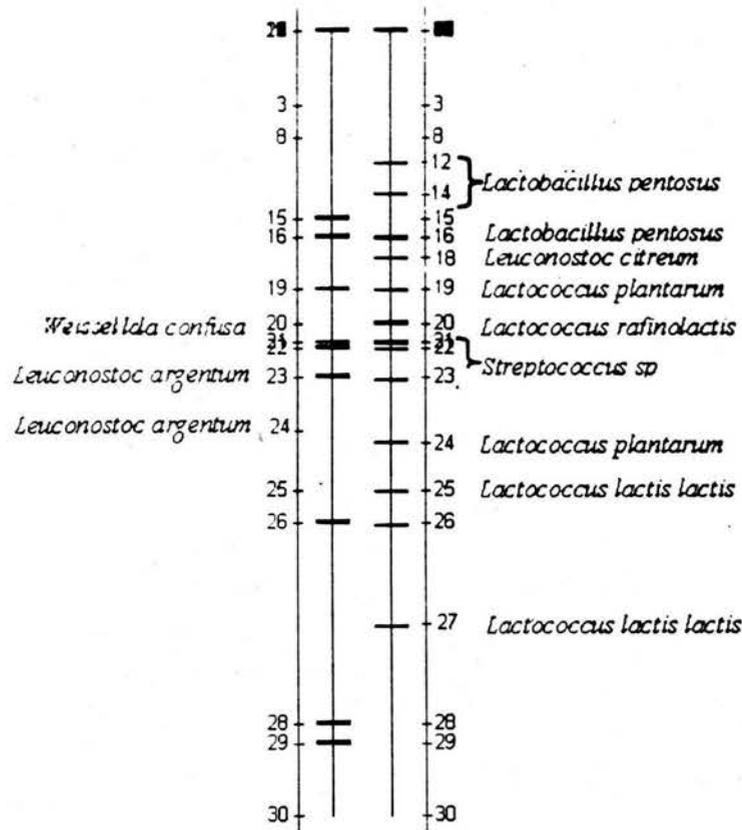


Fig 23. Patrón de cepas de pozol en la huella de comunidades microbianas.

RESUMEN

Con base en el patrón de cepas de pozol, se identificaron por correlación algunas de las bandas que fueron comunes en la mayoría las muestras de superficie y centro del pozol. Éstas pertenecieron a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Weissella*. Sin embargo, hubieron bandas que no pudieron ser correlacionadas.

Si bien existió variabilidad entre los patrones de bandas de las muestras de masa recién molida de cada productor, después de la fermentación tendieron a predominar 3 bandas en los geles de las comunidades de pozol. Éstas se identificaron como organismos pertenecientes a los géneros *Aerococcus/Pediococcus*, *Weissella* y *Streptococcus*.

El género *Weissella* se ha aislado de diferentes hábitats y muchas especies están asociadas con alimentos tradicionales fermentados, para los cuales se sabe poco acerca de su aportación en la comunidad.

El género *Aerococcus* también ha sido aislado de diferentes hábitats, considerándosele como una especie cosmopolita. Por la estrecha relación filogenéticamente entre los géneros *Aerococcus* y *Pediococcus*, principalmente entre las especies *A. viridans* y *P. urinae-equi*, no se identificó con exactitud la especie presente en el pozol. Aunque *P. urinae-equi* no se ha reportado en alimentos fermentados.

El género *Streptococcus* ya había sido reportado previamente en el pozol. Y en alimentos fermentados como quesos. La especie *S. Suis*, también previamente reportada en el pozol, es considerada como un importante agente zoonótico.

Los fenómenos de microheterogeneidad, co-migración y amplificación preferencial, complicaron la identificación total de los microorganismos presentes en las muestras de pozol. Al no poder afirmar que cada microorganismo está representado por una sola banda en el gel. Con base en lo anterior la relación entre el patrón de cepas puras con el de las huellas de las comunidades de pozol, para la identificación de los microorganismos, sólo fue aproximado.

6.5 ANÁLISIS DE HUELLAS DE COMUNIDADES MICROBIANAS.

El análisis de las huellas de las comunidades microbianas de las diferentes muestras de pozoles, se realizó monitoreando las comunidades y calculando los índices de riqueza, diversidad y dominancia a través del tiempo (Nübel *et al.*, 1999; Shannon-Weaver, 1963; Simpson, 1949).

6.5.1 Análisis de las comunidades de cada muestra a través del tiempo.

Los geles de DGGE que contenían el patrón de comunidades de muestras de pozol, fueron digitalizados utilizando el software DIVERSITY DATABASE Versión 2.2 para Windows (BIORAD). Posteriormente se hizo una comparación para cada productor con base en el monitoreo que se realizó en la comunidad de microorganismos, durante los diferentes tiempos de fermentación ocurridos en la muestra de pozol tanto en el centro como en la superficie de la bola.

6.5.1.1 Productor 1.

Para el productor 1 no se contó con la muestra de masa recién molida por lo que se desconoció el perfil de los microorganismos presentes en esta etapa (Fig. 24); sin embargo, se observó que la banda 20 (*W. cibaria*, *W. confusa*, *W. kimchii*, *Lact. raffinolactis*) fue constante en todo el proceso de fermentación, tanto en el centro como en la superficie. En esta última, la intensidad de la banda fue moderada en los primeros tiempos, sin embargo, fue aumentando conforme se desarrollaba el proceso de fermentación.

La banda 22 (no identificada) se presentó al inicio de la fermentación en la superficie de la bola con una intensidad moderada, mientras que en el centro, se mantuvo durante toda la fermentación y la banda fue intensa.

La banda 28 (no identificada) apareció en las últimas etapas de la fermentación tanto en la superficie como en el centro, siendo una banda muy intensa en ambos casos.

La banda 29 (*S. suis*) estuvo presente en toda la fermentación en la superficie de la bola; la banda fue intensa y constante. Para el centro de la bola, la banda 29 solo apareció al principio de la fermentación.

La banda 19 (*Lb. plantarum*), se hizo presente a la mitad de la fermentación en la superficie y se mantuvo presente durante toda la fermentación en el centro de la bola, donde se mostró como una banda muy intensa que fue disminuyendo conforme se dio el proceso de fermentación. Lo anterior difiere con lo reportado para otros alimentos fermentados, principalmente africanos, donde el género *Lactobacillus* predomina al final de la fermentación (Morlon-Guyot *et al.*, 1998; Figueroa *et al.*, 1997; Giraud *et al.*, 1991; Agati *et al.*, 1998; Sanni *et al.*, 2002).

La banda 15 (no identificada) estuvo presente al inicio de la fermentación tanto en la superficie como en el centro y para ambos casos la banda desapareció al final de la fermentación.

Se presentaron otras bandas como la 25 (*Lact. lactis*), 16 (*Lb. pentosus*) y las 26 y 2 (no identificadas) con una aparición breve. La banda 25 se presentó sólo al final de la fermentación en la superficie y con tendencia a desaparecer. Para el centro, la banda 25 se mantuvo solo en los primeros tiempos y repentinamente desapareció. Por último, la banda 26 se presentó sólo al inicio de la fermentación en la superficie de la bola; y las bandas 2 y 16, se observaron sólo en algunas muestras.

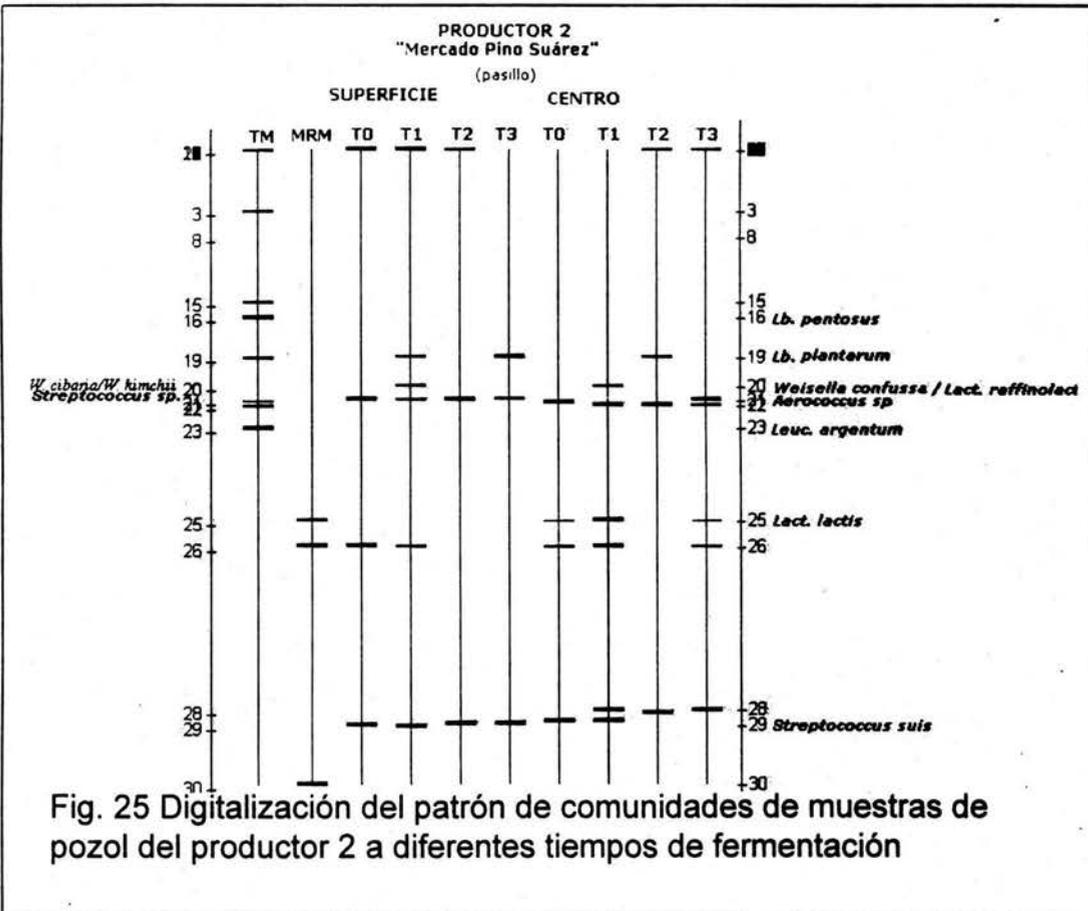
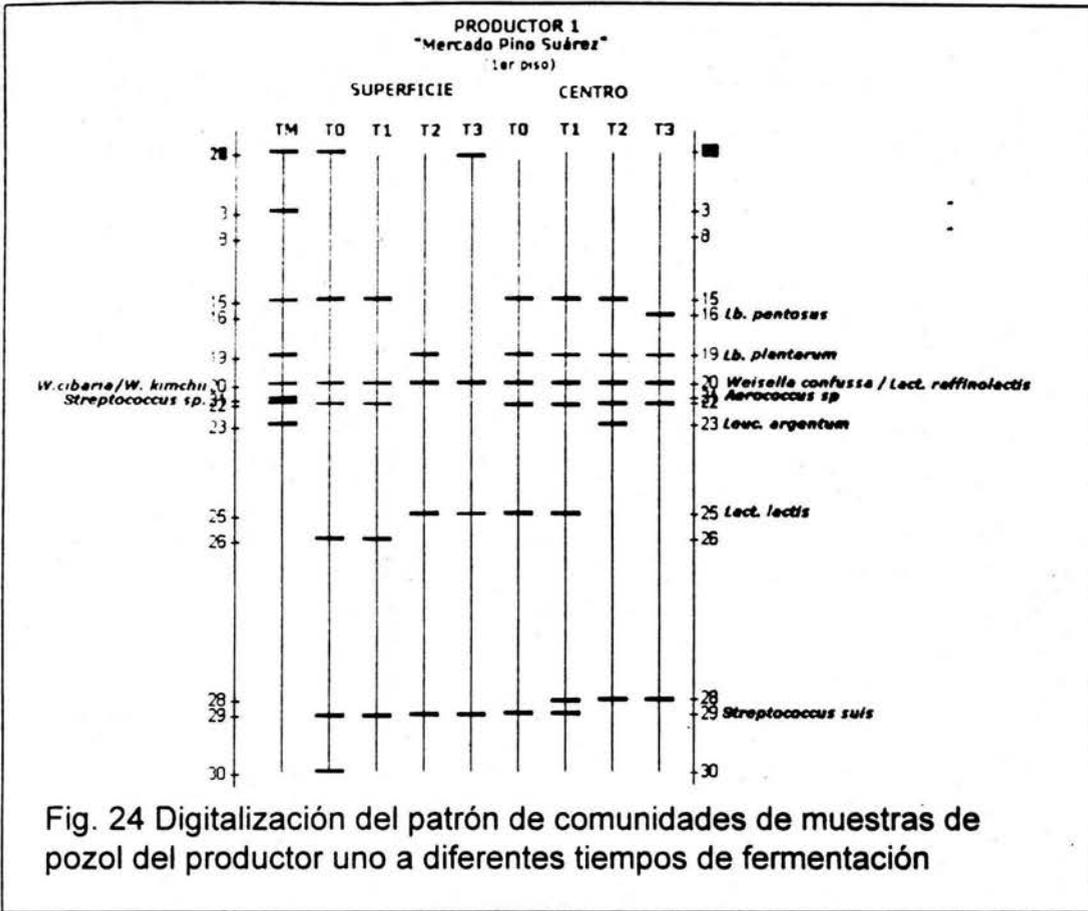
6.5.1.2 Productor 2.

Para el productor 2 se observó (Fig. 25) la banda 21 (*A. sp./ S. sp*) durante todos los tiempos de la fermentación tanto en superficie como en centro de la bola de pozol. A las 24 y 72 horas fue menos densa para la superficie. Por su parte, la intensidad de la banda para el centro permaneció durante toda la fermentación.

La banda 29 (*S. suis*) se observó durante toda la fermentación en la superficie de la bola con una intensidad acrecentada. Para el caso del centro de la muestra, la banda apareció sólo al inicio de la fermentación.

La banda 26 (no identificada) apareció intensamente desde la muestra de masa recién molida, se mantuvo en superficie en los primeros tiempos de fermentación, sin embargo, la intensidad fue disminuyendo hasta que desapareció. Por su parte, para el centro de la muestra de pozol, la banda apareció tenuemente al inicio de la fermentación; teniendo su mayor intensidad a las 24 horas. Posteriormente desapareció y volvió a resurgir al final de la fermentación. Este mismo caso se dio para la banda 25 (*Lact. lactis*) que se presentó sólo en el centro de la muestra.

Se observaron otras bandas como la 2 (no identificada), 19 (*Lb. plantarum*), 20 (*W. cibaria*, *W. confusa*, *W. kimchii*, *Lact. raffinolactis*) y 30 (no identificada), sin embargo, no fueron muy relevantes ya que su aparición fue transitoria, con lo cual disminuyó su relevancia.



6.5.1.3 Productor 3.

En la muestra del productor 3 (Fig. 26) se observaron tres bandas predominantes: la 20 (*W. cibaria*, *W. confusa*, *W. kimchii*, *Lact. raffinolactis*), la 22 (*no identificada*.) y la 29 (*Streptococcus suis*). Se notó que la banda 20 predominó durante toda la fermentación, tanto en la periferia como en el centro de la bola de pozol (Fig. 26), apareció desde la muestra de masa recién molida aunque con baja intensidad; sin embargo, ésta se fue incrementando conforme se desarrolló la fermentación. En la superficie de la bola, la intensidad de la banda 20 disminuyó en la etapa final de la fermentación.

La banda 22 se presentó con una intensidad discreta a partir del inicio de la fermentación en la superficie de la bola, sin embargo, se fue incrementando de tal forma que al final de ésta, la banda fue muy intensa. En el centro de la muestra, la banda 22 se presentó solo al tiempo cero.

Con lo que respecta a la banda 29, en la superficie, apareció intensamente a mitad de la fermentación, manteniéndose hasta la etapa final. Para el caso del centro de la bola, la banda 29 apareció desde los primeros tiempos de fermentación, manteniéndose intensamente durante todo el proceso.

Se distinguieron otras bandas como la 16 (*Lb. pentosus*), la 19 (*Lb. plantarum*) y la 23 (*Leuc. argentum*) que aparecieron sólo al inicio de la fermentación en el centro de la bola; o solo al inicio en la periferia (banda 19).

6.5.1.4 Productor 4.

En la muestra del cuarto productor (Fig. 27) se observaron como bandas principales las correspondientes a los números 16 (*Lb. pentosus*), 21 (*A.sp./ S. sp*) y 29 (*S. suis*). La banda 16 apareció desde la muestra de masa recién molida. Al inicio de la fermentación la banda fue intensa, sin embargo, en las etapas finales

se redujo la intensidad tanto en superficie como centro, aunque en este último la disminución fue mínima.

La banda 21 estuvo presente durante toda la fermentación. Para la superficie se presentó constantemente como una banda muy intensa, mientras que para el centro, la banda tendió a disminuir al final de las últimas etapas de la fermentación.

La banda 29 apareció intensamente desde la muestra de masa recién molida hasta el final de la fermentación tanto para el centro como para la superficie de la muestra. Tanto la presencia como la intensidad fueron constantes en todo el proceso.

Se observaron otras bandas como la 19 (*Lb. plantarum*), 25 (*Lact. lactis*), 26 y 30 (no identificadas) que aparecieron sólo al inicio de la fermentación en el centro de la bola; o solo al inicio en la periferia (banda 19).

6.5.1.5 Productor 5.

En la muestra de pozol del productor 5 (Fig. 28), se presentaron 2 bandas constantes durante la fermentación. La banda 21 (*A. sp./ S. sp*) apareció tenuemente al inicio de la fermentación en la superficie de la muestra, sin embargo, fue aumentando conforme transcurrió el proceso. En el centro de la bola de pozol, la banda 21 apareció desde el principio de la fermentación, manteniéndose durante todo el proceso con una intensidad de alta a moderada para las últimas etapas.

La banda 28 (no identificada) se observó desde la muestra de masa recién molida y fue constante en presencia durante toda la fermentación en la superficie de la bola. Para el centro de la muestra, la banda 28 (no identificada) desapareció al final del proceso. En cuanto a intensidad, ésta fue abundante y se mantuvo constante tanto en superficie como en centro.

La banda 29 (*S. suis*) apareció en las últimas etapas de la fermentación con una intensidad moderada. Para el centro de la bola, la banda se presentó intensamente al inicio de la fermentación, aunque al final de la primera etapa de fermentación, al intensidad disminuyó.

Se distinguieron otras bandas como la 2 (no identificada), la 15 (no identificada), la 19 (*Lb. plantarum*) y la 26 (no identificada), que aparecieron sólo en tiempos puntuales durante la fermentación, por lo que se vio disminuida su relevancia.

6.5.1.6 Productor 6.

En la muestra de pozol del productor 6 (Fig. 29), existieron tres bandas constantes durante la fermentación. La banda 20 (*W. cibaria*, *W. confusa*, *W. kimchii*, *Lact. raffinolactis*), la 22 (no identificada) apareció desde la muestra de masa recién molida, aunque con una baja densidad. Esta banda se mantuvo constante durante todo el proceso de fermentación y con una fuerte intensidad tanto para la superficie como para el centro de la muestra.

La banda 29 (*S. suis*) se observó desde el inicio de la fermentación y se mantuvo constante en presencia tanto en superficie como en centro. Se percibió una disminución en la intensidad de la muestra en la etapa final de la fermentación para el centro de la muestra.

La banda 28 (no identificada) surgió en las últimas etapas de la fermentación con una intensidad moderada. Para el centro de la bola se presentó moderadamente al inicio de la fermentación hasta desaparecer al final del proceso.

Se observaron otras bandas como la 15 (no identificada), 22 (no identificada), 23 (*Leuc. argentum*) y 30 (no identificada) que se presentaron al inicio de la fermentación únicamente en la superficie de la muestra, con intensidades de discretas a moderadas.

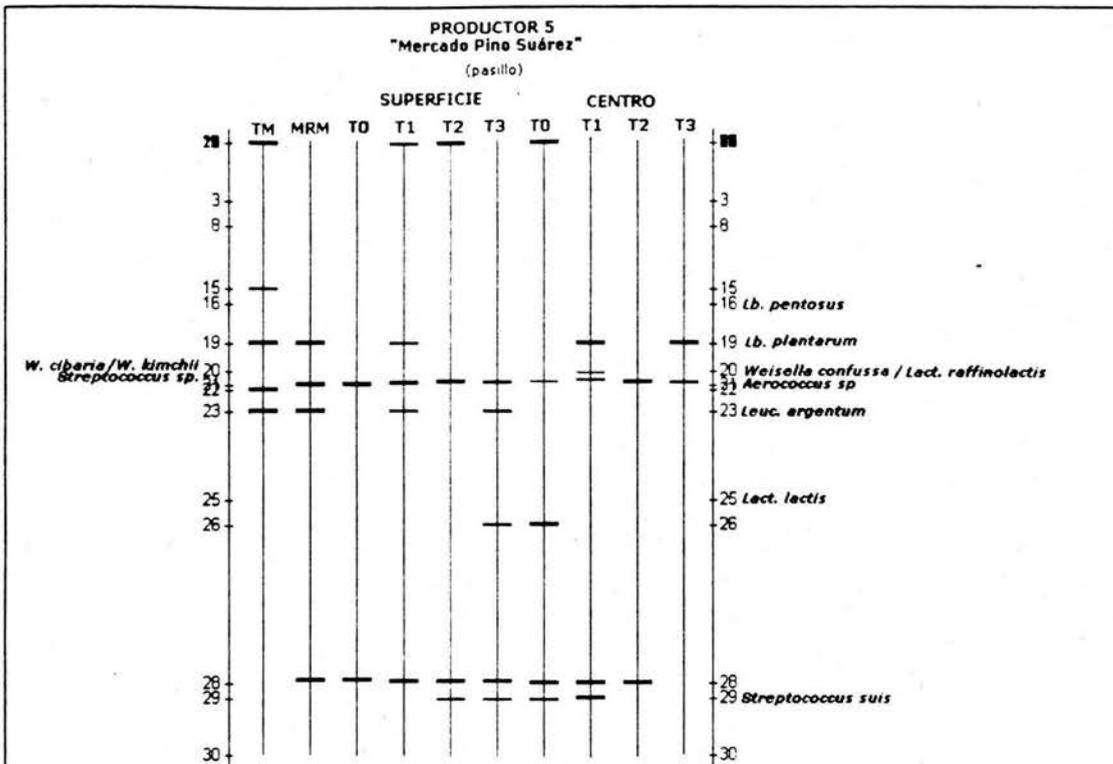


Fig. 28 Digitalización del patrón de comunidades de muestras de pozol del productor 5 a diferentes tiempos de fermentación

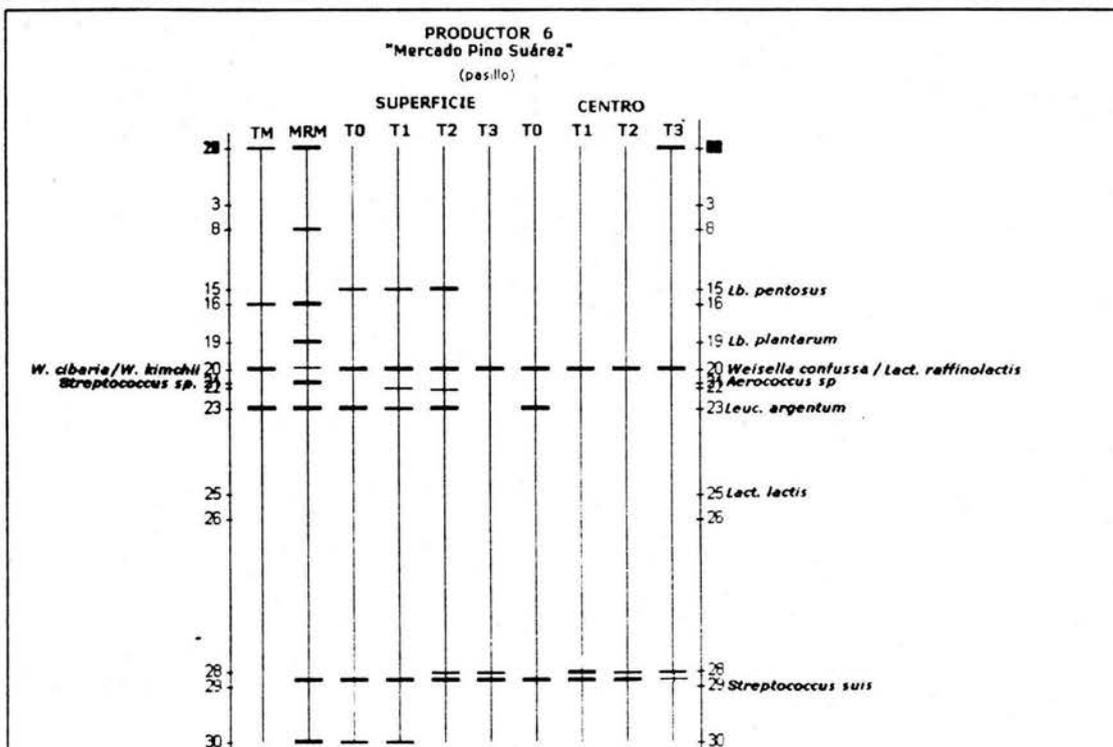


Fig. 29 Digitalización del patrón de comunidades de la muestras de pozol del productor 6 a diferentes tiempos de fermentación

6.5.1.7 Productor 7.

Para el productor 7 (Fig. 30), las bandas 21 (*A. sp./ S. sp*) y 23 (*Leuc. argentum*) se presentaron constantes durante la fermentación con una intensidad de muy alta ligeramente disminuida en las últimas etapas.

La banda 29 (*S. suis*) apareció al finalizar la primera etapa de fermentación y se mantuvo hasta el término del proceso en la superficie de la bola; la banda fue intensa al inicio y disminuyó conforme se dio la fermentación. Para el centro de la bola, la banda 29 fue constante durante la fermentación. Se presentó con intensidad moderada, aunque a las 24 horas tuvo su máxima intensidad.

Las bandas 15 (no identificada) y 16 (*Lb. pentosus*) se observaron intensamente al inicio de la fermentación en la superficie de la muestra, sin embargo, en ambos casos desaparecieron al finalizar esta etapa y resurgieron al término del proceso.

La banda 26 (no identificada) se observó intensamente al final de la fermentación en la superficie de la muestra. Para el centro de la bola, la banda 26 apareció en las primeras etapas del proceso con una intensidad moderada para desaparecer al finalizar de la fermentación.

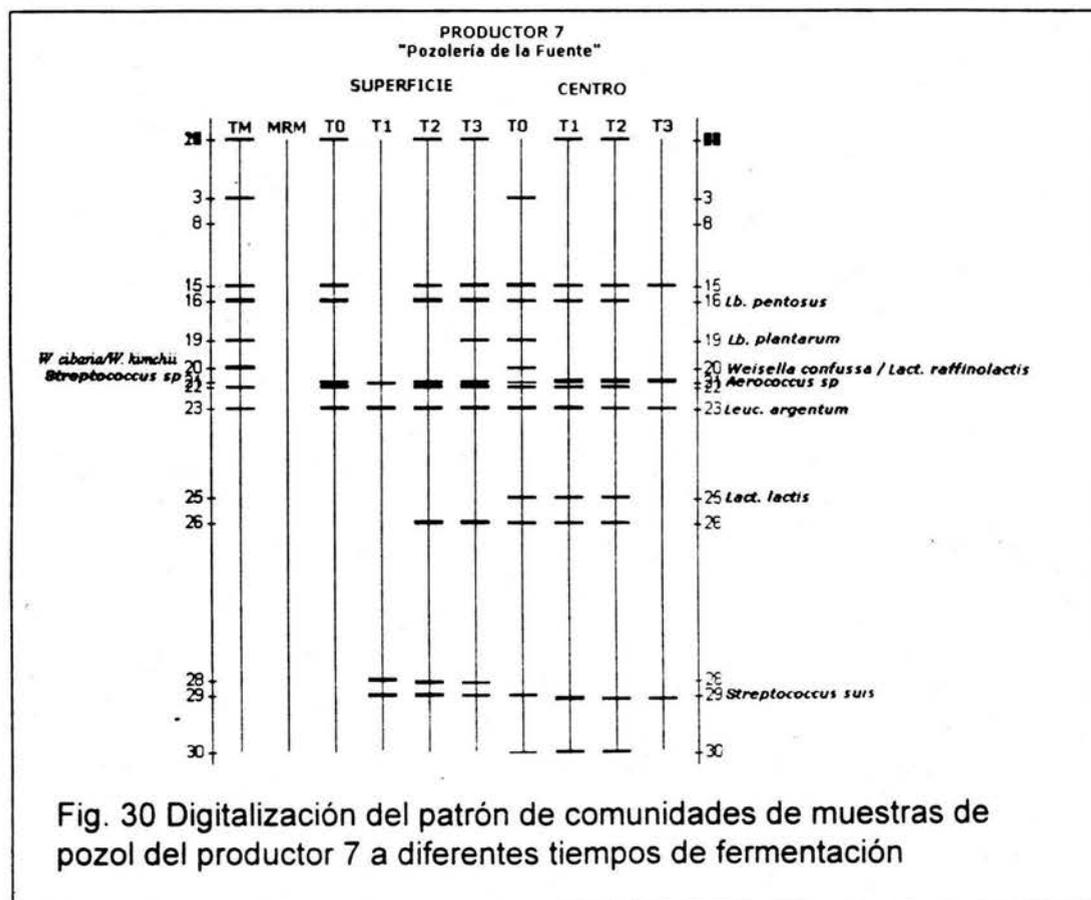
La banda 25 (*Lact. lactis*) apareció sólo en el centro de la muestra, la intensidad fue moderada, y se mantuvo constante hasta las 48 horas de la fermentación .

La banda 28 (no identificada) se presentó sólo en la superficie de la bola de pozol y se mantuvo constante en presencia hasta finalizar el proceso. Apareció intensamente, sin embargo, conforme se dio el proceso de fermentación fue disminuyendo.

La banda 2 (no identificada) se hizo presente en las primeras horas superficie y centro) y al finalizar la fermentación (superficie). La intensidad de la banda fue moderada en todos los casos.

La banda 19 (*Lb. plantarum*) se observó con una intensidad baja en la etapa final de la fermentación, en la superficie de muestra y al iniciar el proceso fermentativo para el caso del centro de la bola.

Se presentaron otras bandas como la 3 (no identificada), la 20 (*W. cibaria*, *W. confusa*, *W. kimchii*, *Lact. raffinolactis*) y la 30 (no identificada) con una aparición breve, lo que les restó relevancia.



Al analizar las huellas de comunidades microbianas de diferentes productores de pozol, se observó que las bandas predominantes durante la fermentación fueron la 20 (*W. cibaria*, *W. confusa*, *W. kimchii*, *Lact. raffinolactis*), la 21 (*A. sp./S. sp.*), la 29 (*S. suis*) y la 28 la cual no se identificó, sin embargo, se sugiere hacerlo por su presencia constante en el centro de las muestras.

Se ha reportado que los métodos de cultivo tradicionales no identifican correctamente algunos géneros como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus* (Nuraida *et al.*, 1995). Y que con los métodos que no dependen del cultivo de los microorganismos (Ampe *et al.*, 1999), se han encontrado microorganismos antes no detectados con métodos tradicionales, como el género *Streptococcus*. Sin embargo, haciendo uso de ambos métodos se han podido aislar microorganismos difíciles. Un ejemplo reciente es el caso del género *Streptococcus*, el cual requiere para su crecimiento, que el medio contenga almidón (Díaz-Ruiz *et al.*, 2003).

En todos los trabajos anteriores referidos al pozol, se había partido de una o dos muestras para realizar los estudios, por lo que éste es el primero en donde se hace un monitoreo de las comunidades en espacio y tiempo durante 72 h de fermentación. De tal manera que esto permitió un acercamiento más real a la dinámica poblacional que ocurrida en la fermentación del pozol; donde a pesar de que la fermentación es espontánea, tiende a predominar un patrón de microorganismos.

RESUMEN

Se observaron algunas diferencias entre las muestras de pozol procedentes de diferente maíz nixtamalizado. En las muestras de los productores 2, 3, 5 y 6 predominaron los géneros *Aerococcus*, *Streptococcus*, y *Weissella*. Sin embargo, en las muestras de los productores 7, 4 y 1, se presentaron microorganismos pertenecientes a los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Estos géneros también son importantes en la fermentación de alimentos. Las especies de *Lactococcus* se han aislado de plantas, tales como maíz fresco y congelado, frijoles, coles, lechuga, chícharos, trigo, papas, calabazas y melón. Las subespecies de *Lact. lactis* son de gran importancia económica y se han estudiado mucho sus características bioquímicas y fisiológicas, así como su efecto en los alimentos (Díaz, 2003). *Leuconostoc* es el género predominante entre las bacterias lácticas de plantas. Se le asocia con la manufactura de vino, la producción de compuestos aromáticos a partir del citrato en fermentaciones lácticas y la producción de dextranas (Holzapfel y Schillinger, 1991).

El género *Lactobacillus* estuvo presente en todas las muestras de masa recién molida, sin embargo, éste no se desarrolló a lo largo de la fermentación como se ha reportado para otros alimentos como son: la yuca fermentada de Nigeria y de Congo (Figuroa *et al.*, 1997; Giraud *et al.*, 1991), el ogi de Nigeria (Agati *et al.*, 1998), alimentos fermentados tradicionales de Nigeria (Sanni *et al.*, 2002).

En comparación con alimentos tradicionales africanos, pareciera que el pozol es un ecosistema alimenticio en el que se desarrollan otros tipos de bacterias lácticas. La predominancia del género *Streptococcus*, posiblemente se deba a la capacidad que tiene para sobrevivir a valores altos de pH y a temperaturas altas, como las que prevalecen durante el proceso de obtención del nixtamal, razones que explican también la ausencia del género *Lactobacillus* (Díaz *et al.*, 2003).

6.5.2 Índices de riqueza, diversidad y dominancia.

A. Índice de riqueza (R).

El índice de riqueza fue calculado con base al número de bandas visibles presentes en cada gel y para cada tiempo de fermentación. Los patrones de bandas mostraron un promedio máximo de 6 y un mínimo de 5 para superficie (Fig. 31) y para centro de las muestras (Fig. 32). La riqueza podría considerarse constante para las primeras 48h de la fermentación en centro y en superficie, aunque en esta última, se presentó una caída al tiempo cero. En ambos casos, la riqueza disminuyó en la etapa final de la fermentación, llegando a valores cercanos a 4 (Figs 31 y 32).

No se encontraron diferencias significativas entre los valores de riqueza de la superficie y del centro de la bola de pozol (Anexo IV) durante las 72h de fermentación. Sin embargo, se observó una tendencia más estable para el centro de la muestra.

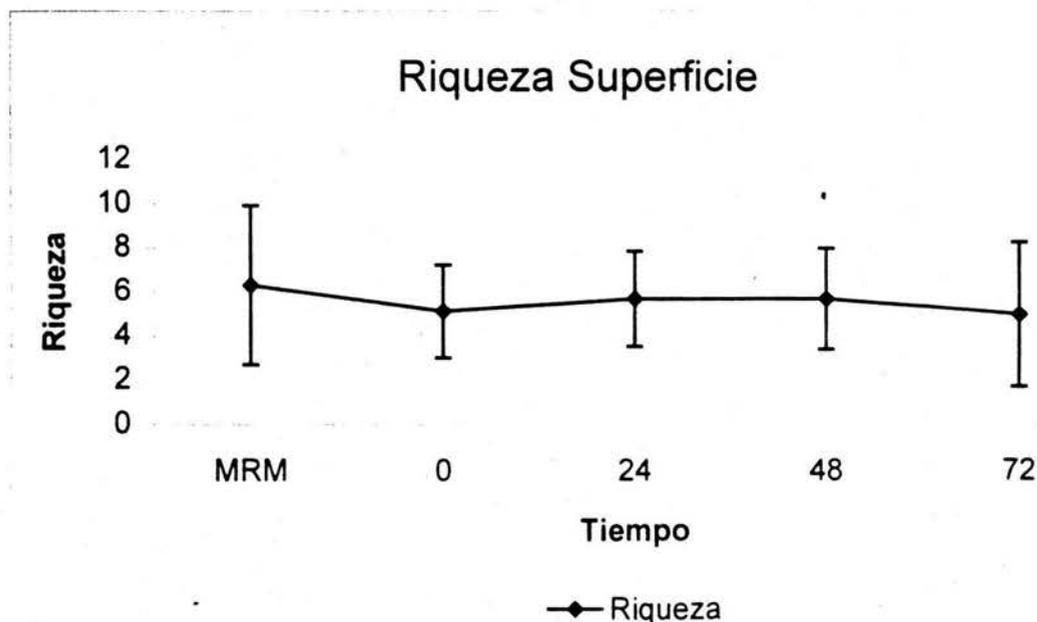


Fig. 31 Promedios de riqueza de bacterias lácticas en la superficie de muestras de pozol de diferentes productores a diferentes tiempos de fermentación (MRM.-masa recién molida, 0, 24, 48 y 72h).

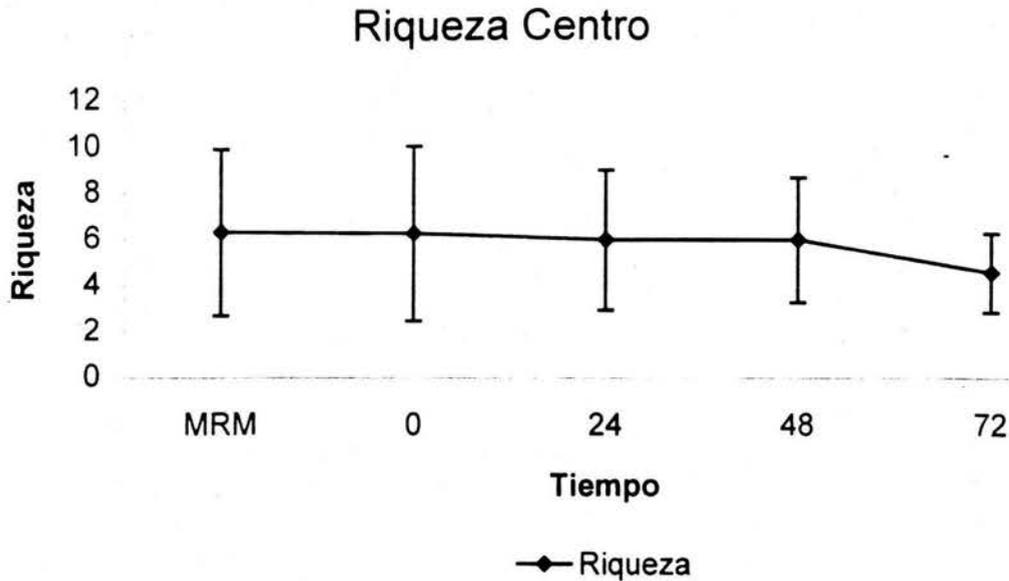


Fig. 32 Promedios de riqueza de bacterias lácticas en el centro de muestras de pozol de diferentes productores a diferentes tiempos de fermentación (MRM.-masa recién molida, 0, 24, 48 y 72h).

B. Índice de diversidad (S) e índice de dominancia (D).

Algunos índices matemáticos aunados a los conceptos de diversidad y dominancia son fundamentales en ecología para el estudio de las comunidades. Los índices matemáticos, con los que se describen la riqueza y la distribución de especies en la comunidad, son los índices de diversidad de especies, y se utilizan para describir el conjunto de poblaciones de una comunidad (Pielou, 1975). El índice de diversidad de Shannon-Weaver (1949) y el índice de dominancia de Simpson (1963), fueron introducidos al campo de la ecología a mediados del siglo pasado y son actualmente muy utilizados en macroecología. Los índices de diversidad raramente se han aplicado a las comunidades microbianas debido a las dificultades técnicas para clasificar los numerosos microorganismos que requieren su utilización.

En este trabajo se utilizó el índice de Shannon-Weaver como medida para calcular la diversidad en los perfiles de las comunidades de pozol. Este índice fue aplicado directamente a los geles de DGGE, empleando el número y la intensidad relativa de bandas de ARNr.

La diversidad en las muestras de pozol de diferentes productores no presentó mucha variación durante el proceso de fermentación. Para la superficie de la muestra, se percibió (Fig. 33) que a las cero horas de fermentación hubo un decremento mínimo comparado con la MRM, sin embargo, se recuperó para las 24 h. En el caso del centro de la muestra de pozol, la diversidad fue constante con valores que oscilaron entre 2.1 y 2.4 (Fig. 34) hasta las 48h de fermentación. Para ambos casos (superficie y centro), la diversidad disminuyó en la etapa final de la fermentación llegando a valores cercanos a 2.0 (Figs 33 y 34).

La diversidad en comunidades es inversamente proporcional a la dominancia. Cuando en una comunidad hay mucha diversidad es porque los organismos dominantes no se han definido, sin embargo, cuando en una comunidad se distinguen organismos dominantes es porque la diversidad ha disminuido.

Para el índice de dominancia, se observó (Figs 35 y 36) que las muestras de la superficie y del centro se comportaron de manera semejante. Presentaron valores bajos en las primeras etapas de la fermentación, cuando la diversidad era mayor (Figs 33 y 34). Al cabo de 72 h de fermentación y con valores ácidos de pH, se observó que, al inicio de la fermentación se da poca dominancia de los microorganismos presentes porque hay una elevada diversidad. Sin embargo, conforme pasa el tiempo de fermentación y la diversidad va disminuyendo, algunos de los microorganismos que se mantienen tienden a ser dominantes, por lo que los valores de S aumentan.

De acuerdo con lo anterior, se observa que existe variación en la riqueza, diversidad y dominancia, aún cuando se utilice el mismo tipo de maíz; ya que como se ha reportado, en la molienda se incorpora la mayoría de los microorganismos (Wacher *et al.*, 1993). Entonces, es posible que se incorporen diferentes microorganismos para el pozol de cada productor. En los gráficos se observó un incremento de 0.2 (en las primeras horas de fermentación) a 0.3 (al final de la fermentación). Aunque estadísticamente ($\alpha = 0.05$) no se encontraron diferencias significativas entre los valores de diversidad y dominancia de la superficie y del centro de la bola de pozol (Anexo IV) durante las 72 h de fermentación. Sin embargo, pudiera ser que estas variaciones sí fueran significativas para el proceso de fermentación; viéndose reflejadas en la producción y/o concentración de sustancias de interés para este ecosistema alimenticio conformado por una microbiota compleja.

Existe un trabajo previo realizado por Ampe y Miambi, (2000) en donde se compararon las comunidades bacterianas de tres alimentos fermentados de maíz (pozol, poto-poto y ogi) y donde se calcularon los índices de riqueza, diversidad y dominancia. Se encontró que la microbiota del pozol mostró valores altos de riqueza y de diversidad, mientras que los valores de dominancia fueron bajos (Tabla 16). Comparando los índices ecológicos de otros alimentos fermentados elaborados a partir de maíz con los del este estudio, se observó que en el pozol el índice de riqueza es mayor; sin embargo, los valores de diversidad y dominancia fueron muy parecidos.

Comparando los valores del pozol obtenidos por Ampe *et al.*, (2000) con los que se alcanzaron en este trabajo, se observa que en estas muestras de pozol la riqueza y la diversidad son menores y que los microorganismos que se mantienen durante la fermentación son más dominantes que lo reportado. Aunque ya existe un reporte de los índices de riqueza, diversidad y abundancia en pozol, éste es el primer trabajo en el que se calculan dichos índices en más de una muestra de pozol y siguiendo el proceso de fermentación durante 72 h; lo cual resulta más

representativo y se acerca más a los valores reales de los parámetros ecológicos estudiados.

Tabla 16. Valores promedio de los Índices de Riqueza (R), Diversidad (H) y Dominancia (S) calculados a partir de las huellas de comunidades bacterianas de geles de DGGE (Ampe *et al.*, 2000). * Valores obtenidos en este trabajo.

Alimento	Riqueza (R)	Diversidad (H)	Dominancia (S)
Ogi (Benin)	5.2 +/- 1.1	2.5 +/- 0.2	0.19 +/- 0.02
Poto-Poto (Congo)	5.7 +/- 0.6	2.1 +/- 0.2	0.24 +/- 0.03
Pozol (México)	11 +/- 3.5	3.3 +/- 0.4	0.11 +/- 0.03
*Pozol (7 productores)	7.86 +/- 6.2	2.32 +/- 0.73	0.21 +/- 0.14

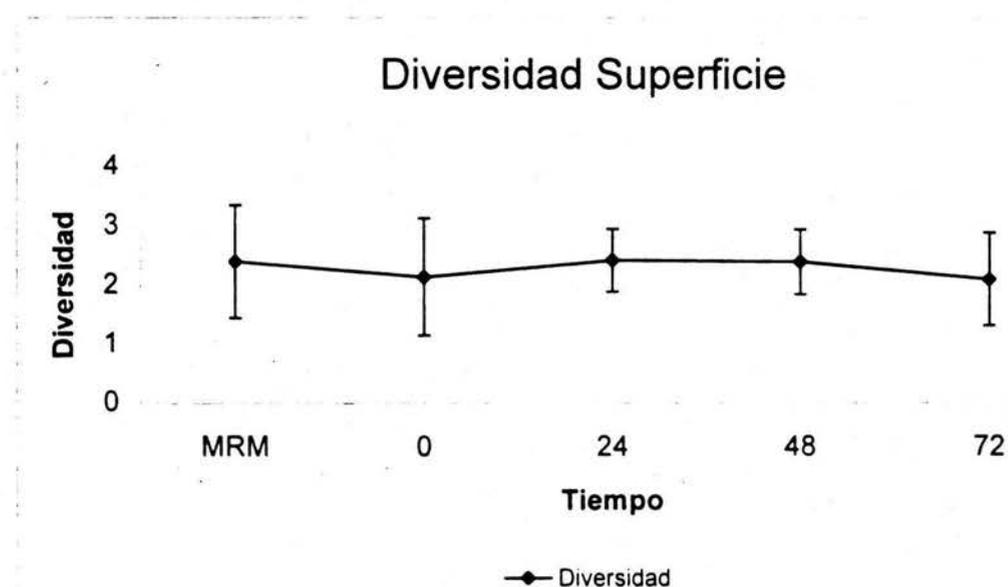


Fig. 33 Promedios de diversidad de bacterias lácticas en la superficie de muestras de pozol de diferentes productores a diferentes tiempos de fermentación (MRM.- masa recién molida, 0, 24, 48 y 72h).

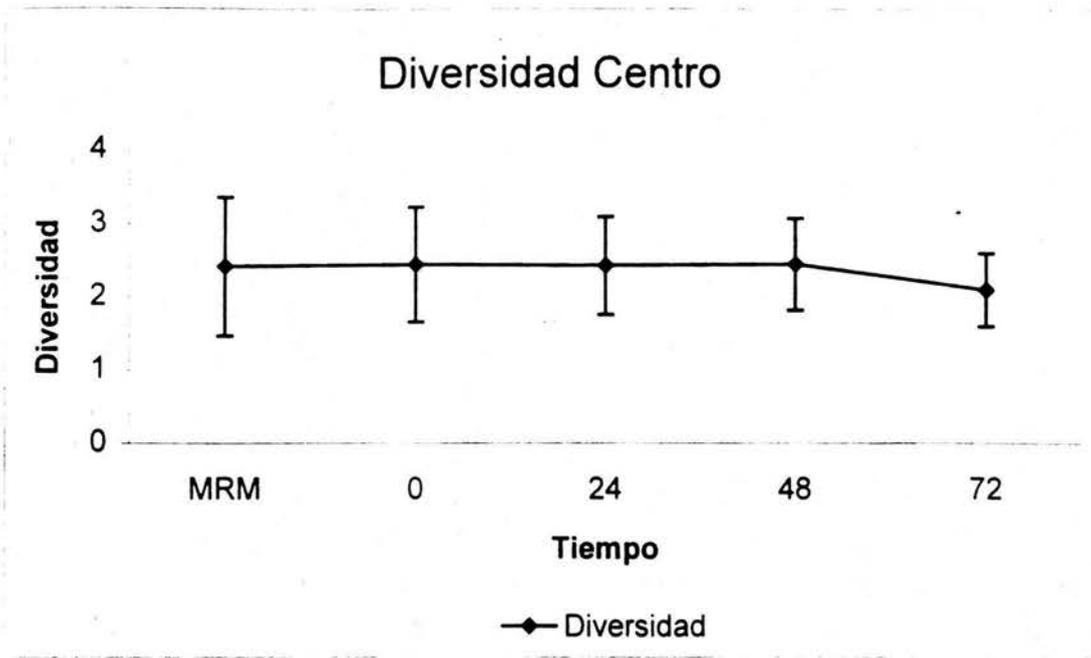


Fig. 34 Promedios de diversidad de bacterias lácticas en el centro de muestras de pozol de diferentes productores a diferentes tiempos de fermentación (MRM.-masa recién molida, 0, 24, 48 y 72h).

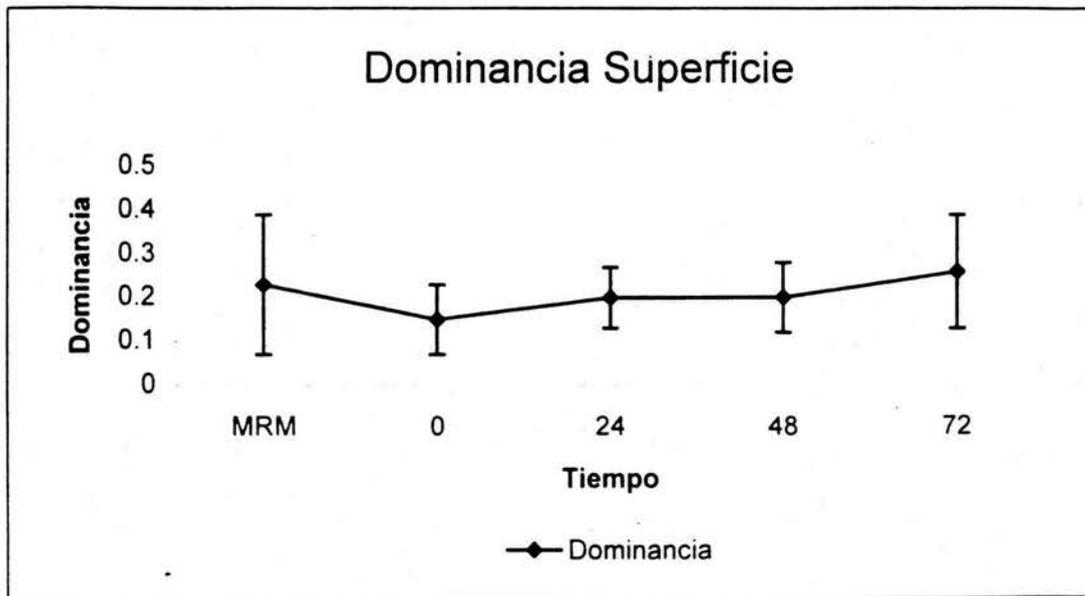


Fig. 35 Promedios de dominancia de bacterias lácticas en la superficie de muestras de pozol de diferentes productores a diferentes tiempos de fermentación (MRM.-masa recién molida, 0, 24, 48 y 72h).

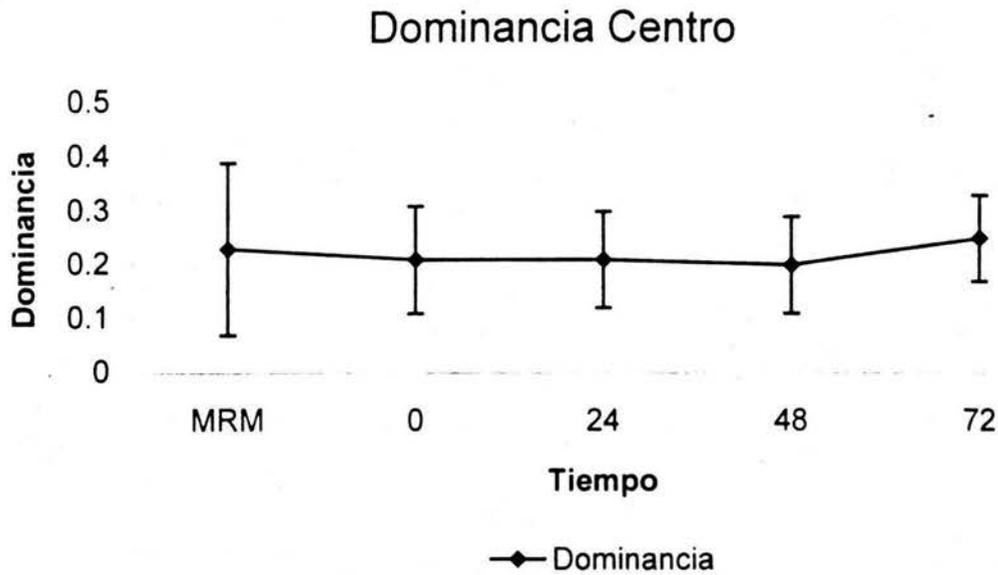


Fig. 36 Promedios de dominancia de bacterias lácticas en el centro de muestras de pozol de diferentes productores a diferentes tiempos de fermentación (MRM.- masa recién molida, 0, 24, 48 y 72h).

RESUMEN

Al calcular los índices ecológicos de riqueza, diversidad y dominancia en muestras de pozol de 7 productores diferentes, durante 72 h de fermentación; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores del centro de la muestra con los de la superficie. Sin embargo, sí existió mucha variabilidad microbiológica entre las muestras, lo cual se reflejó en los valores de las desviaciones estándar, que fueron muy grandes. Con lo anterior se sugiere que posiblemente esto sí sea significativo para la comunidad microbiológica, si se considera que en el pozol participa una microbiota compleja que está íntimamente relacionada.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

- Existe una gran variación en la composición microbiológica de pozoles de diferentes productores al inicio de la fermentación; sin embargo, al avanzar la fermentación se va estructurando la comunidad microbiana.
- En la composición microbiológica del pozol se detectan microorganismos cuya presencia es constante en la mayoría de las muestras.
- Se identificaron 3 bandas constantes en los geles de las comunidades de pozol. Estas se identificaron como organismos perteneciente a los géneros *Aerococcus/Pediococcus*, *Weissella* y *Streptococcus*.
- Se encontraron organismos perteneciente a los géneros *Aerococcus/Pediococcus* y *Streptococcus* en todas las muestras tanto en centro como en superficie.
- El género *Lactobacillus* se encontró en casi todas las muestras de masa recién molida (MRM), sin embargo, tendió a desaparecer a lo largo de la fermentación.
- Organismos de los géneros *Leuconostoc* y *Lactococcus* se encontraron presentes esporádicamente a lo largo de la fermentación.
- No existieron diferencias significativas ($\alpha= 0.05$) en cuanto a la riqueza, diversidad y dominancia del centro y superficie de las muestras de pozol.

CAPÍTULO 8. REFERENCIAS

- **Agati V., J. P. Guyot, J., Morlon-Guyot, P. Talamond y D. J. Hounhouigan.** 1998. Isolation and characterization of new amyolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe and ogi) from Benin. *J. Appl. Microbiol.* **85**:512-520.
- **Aguirre, M. y M. D., Collins.** 1992. Phylogenetic analysis of some Aerococcus-like organisms from urinary tract infections: description of *Aerococcus urinae* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 401-405.
- **Amann R. I., W. Ludwig y K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.
- **Ampe F., N. ben Omar, C. Moizan, C. Wacher y J. P. Guyot.** 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Env. Microbiol.* **65**(12):5464-5473.
- **Ampe F. y E. Miambi.** 2000. Cluster analysis, richness and biodiversity indexes derived from denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints of bacterial communities demonstrate that traditional maize fermentations are driven by the transformation process. *Int. J. Food Microbiol.* **60**:91-97.
- **Ampe F., A. Sirvent y N. Zakhia.** 2001. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridation. *Int. J. Food Microbiol.* **65**:45-54.
- **Ampe F., N. ben Omar y J. P. Guyot.** 1999a. Culture-independent quantification of physiologically active microbial groups in Mexican pozol, a lactic acid fermented dough, using rRNA-target oligonucleotide probes. *J. Appl. Microbiol.* **87**:131-140.
- **Atlas R. M.** 1984. Diversity of microbial communities. *Adv. In Microbial. Ecol.* **7**:1-47.
- **ben Omar N. y F. Ampe.** 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough Pozol. *Appl. Env. Microbiol.* **66**(9):3664-3673.
- **Björkroth K. J., U. Schillinger, R. Geisen, N. Weiss, B. Hoste, W. Holzapfel, H. J. Korkeala y P. Vandamme.** 2002. Taxonomic study of

Weissella confusa and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:141-148.

- **Cañas A. O., E. Bárzana, J. D. Owens y M. C. Wachter.** 1993. La elaboración del pozol en Los Altos de Chiapas. *Ciencia.* **44**:219-229.
- **Casillas L. E. y L. A. Vargas.** 1984. La alimentación entre los mexicanos. En: *Historia General de la Medicina en México*, Tomo I, México Antiguo, F. Martínez Cortés (Ed.). Academia Nacional de Medicina y Facultad de Medicina, UNAM, México, pp. 133-156.
- **Choi H. J., C. I. Cheigh, S. B. Kim, J. C. Lee, D. W. Lee, S. W. Coi, J. M. Park y Y. R. Pyun.** 2000. *Weissella kimchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:1915-1919.
- **Cilia V., B. Lafay y R. Christen.** 1996 Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Mol. Biol. Evol.* **13**(3):451-461.
- **Cocolin L., L. F. Bisson y D. A. Mills.** 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* **189**:81-87.
- **Cocolin L., M. Manzano, C. Cantón y G. Comi.** 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA Gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of italian sausages. *Appl. Env. Microbiol.* **67**(11):5113-5121.
- **Colman G.** 1967. *Aerococcus*-like organisms isolated from human infections. *J. Clin. Pathol.* **20**:294-297.
- **Collins M. D., J. Samelis, J. Metaxopoulos y S. Wallbanks.** 1993. Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* **75**:595-603.
- **Collins M. D., A.M. Williams y S. Wallbanks.** 1990. Phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiol Lett.* **70**:225-262.
- **Collins M. D., P.A. Monasterio, R. Falsen, E. Sjöden, B. y R. R. Facklam.** 1999. *Ignavigranum ruoffiae* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:97-101.

-
- **Cooke R. D., D.R. Twiddy y Reilly, P.J.A.** 1987. Lactic fermentation as a low-cost means of food preservation in tropical countries. *FEMS Microbiology Reviews* **46**: 369-379.
 - **Coppola S., G. Blaiotta, D. Ercolini, y G. Moschetti.** 2001. Molecular evaluation of microbial diversity in different types of Mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.* **90**:414-420.
 - **Cruz-Ulloa y M. Ulloa.** 1973. Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y en otros países latinoamericanos. *Rev. de la Soc. Mex. De la Hist. Nat.* **24**:423-457.
 - **Dahllöf I., H. Baillie, S. Kjelleberg.** 2000. *rpoB*-Based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl. Env. Microbiol.* **66**(8), 3376-3380.
 - **De Vuyst L. y E. J. Bañadme.**1994. "Antimicrobial potential of lactic acid bacteria". Blackie Academic and Professional, London. pp 152-221
 - **Díaz Ruiz, G.** 2003. Fermentación del almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol. Tesis de Doctora en Ciencias (Bioquímica). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 120 pp.
 - **Díaz-Ruiz, J.P. Guyot, F. Ruiz-Teran, J. Morlon-Guyot y C. Wachter.** 2003. Microbial and physiological characterization of weak amyolytic but fast growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in Pozol. *Appl. Env. Microbiol.* **69**(8), 4367-4374.
 - **Escalante A., C. Wachter y A. Farrés.** 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **64**:21-31.
 - **Escamilla-Hurtado M. L., J.R. Velázquez-Corona, M. I. Virgen-García, N. C. Oropeza-Beivide, M. E. Vázquez Osorno, F. Brouzes.** 1991. Manual productos Fermentados Tradicionales de Maíz. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Instituto Nacional del Consumidor, Dirección General de Culturas Populares, Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, 39p.
 - **Figueroa C., A.M. Dávila y J. Pourquié.** 1997. Original properties of ropy strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from the sour cassava starch fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **82**: 68-72.
 - **Flores Espinosa, Ma. T.** 1996 Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

-
- **Franklam R., y J. A. Elliott.** 1995. Identification, clasificación, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:479-495.
 - **Fromin N., J. Hamelin, S. Tarnawski, D. Roesti, K. Jourdain-Miserez, N. Forestier, S. Teyssier-Cuvelle, F. Gillet, M. Aragno y P. Rossi.** 2002. Statical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Env. Microbiol.* **11**:634-643.
 - **Fuentes I., Herrera T. y Ulloa.** 1974. Descripción de una especie nueva de *Pseudomonas*, *P. mexicana*, y determinación de *Escherichia coli* var. *neopolitana* aislada del pozol. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* **16**:99-103.
 - **Georgalaki M. D., P. Sarantinopoulos, E. S. Ferreira, L. De Vuyst, G. Kalantzopoulos, y E. Tsakalidou.** 2000. Metabolic properties of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from Greek Kasser cheese. *J. Appl. Microbiol.* **88**:817-825
 - **Giraud E., A. Brauman, S. Keleke, B. Lelong y M. Raimbault.** 1991. Isolation and physiological study of an amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:379-383.
 - **Hammes W. P. y R. F. Vogel.** 1995. The genus *Lactobacillus*, p. 19-54. En: B. J. B. Wood and W. H. Holzappel (ed), *The lactic acid Bacteria Volume 2. The genera of lactic acid bacteria.* Blackie Academic and professional. Bishopbriggs, Glasgow.
 - **Hardie J. M. y R. A. Whiley.** 1995. The genus *Streptococcus*, p. 55-124. En: B. J. B. Wood and W. H. Holzappel (ed.), *The lactic acid Bacteria. The genera of lactic acid bacteria, Vol. 2.* Blackie Academic and professional. Bishopbriggs, Glasgow.
 - **Holzapfer W. H. y U. Schillinger.** 1991. The genus *Leuconostoc*, p. 1508-1534. En: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes, Vol. II, 2nd edition.* Springer-Verlar, New York.
 - **Johansson M. L., A. Sanni, C. Lönner y G. Molin.** 1995. Phenotypically based taxonomy using API 50CH of lactobacilli from nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *Int. J. Food Microbiol.* **25**:159-168.
 - **Jonosek J., Eckert, J. y Hudac, A.** 1980. *Aerococcus viridans* as a causative agent of infectious endocarditis. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol Immunol.* **24**:92-96.

-
- **Lawson P., A. Falsen, E. Ohlén, M. y M. D. Collins.** 2001. *Aerococcus urinaehominis* sp. nov., isolated from human urine. *J. Appl. Bacteriol* **51**:683-686.
 - **Martínez-Murcia A. J. y M. D. Collins.** 1990. A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**:73-84.
 - **Martínez-Murcia A. J. Harland, N.M. y M.D. Collins.** 1993. Phylogenetic analysis of some leuconostocs and related organisms as determined from large-subunit rRNA gene sequences: assessment of congruence of small- and large subunit rRNA derived trees. *J. Appl. Bacteriol.* **74**:532-541.
 - **Miambi E., Guyot J.P., y F. Ampe.** 2003. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. of Foods.* **82**:111-120.
 - **Morlon-Guyot J., J. P. Guyot, B. Pot, I. Jacobe de Haut y M. Raimbault.** 1998. *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:1101-1109.
 - **Muyzer G., E. C. de Waal y A. G. Uitterlinder.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695-700.
 - **Muyzer G., A. Teske, C.O. Wirsen y H.W. Jannasch.** 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol.* **164**:165-172.
 - **Muyzer G. y K. Smalla.** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**:127-141.
 - **Nathavitharana K., A. Arseculeratne, S. N. Alonso H. A., R. Vijeratnam, L. Jayasena y C. Navaratnam.** 1983. Acute meningitis in early childhood caused by *Aerococcus viridans*. *Br. Med. J.* **286**:1248.
 - **Nieto E. y E. Vázquez.** 1993. Las Fermentaciones Tradicionales del Maíz. Resultados de una Encuesta. *Alimentos Fermentados Indígenas de México.* M. C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras). Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 47-51.

- **Nout M. J. R., F. M. Rombouts y A. Havelaar.** 1989. Effect of accelerated natural lactic fermentation of infant food ingredients on some phatogenic microorganisms. *Int. J. of Food Microbiol.* **8**:351-361.
- **Nübel U., F. García-Pichel, M. Kühl y G. Muyzer.** 1999. Quantifying microbial diversity: Morphotypes, 16S rRNA Genes, and Carotenoids of Oxygenic Phototrophs in Microbial Mats. *Appl. Environ. Microbio.* **65**:422-430.
- **Nuraida L., C. Wacher y J. D. Owens.** 1995. Microbiology of pozol, a mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**:567-571.
- **Papathanasopoulous M., A. F. Krier, R. Junelles, G. Lefebvre, J.P. Le Caer, A. von Holy, J. Hastings.** 1997. Multiple bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* TA33a and other *Leuconostoc-Weissella* strains. *Current. Microbiol. Dec.* **35**(6):331-335.
- **Pielou E. C.** 1975. Ecological diversity. John Wiley & Sons, Inc., New York, 165 pp.
- **Randazzo C. L., S. Torriani, A. D. L. Akkermans, W. M. de Vos y E. E. Vaughan.** 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(4):1882-1892.
- **Rio D.** 1999 Etude de la production, de la distribution et de la consommation du pozol dans le sud –est du Mexique (Villahermosa, Tabasco). Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées (D.E.S.S.) Nutrition et Alimentation dans les Pays en Développement. Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- **Rivera Noriega, A.** 2001. Efecto de la acción de microorganismos amilolíticos en la fermentación del pozol. Tesis. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. 62 pp.
- **Sainz T., C. Wacher, J. Espinoza, D. Centurión, A. Navarro, J. Molina. A. Inzunza, A. Cravioto y C. Eslava.** 2001. Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* **71**:169-176.
- **Salinas Ch. C.** 1958. Etnobiología e introducción a la bacteriología del pozol. Tesis profesional, Fac. de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 63 p.

- **Sanni A., J. Morlon-Guyot y J. P. Guyot.** 2002. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.* **72**:53-62.
- **Sekiguchi H., N. Tomioka, T. Nakahara, y H. Uchiyama.** 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol. Lett.* **23**:1205-1208
- **Shannon C., y W. Weaver.** 1963. The mathematical theory of communication, 5th ed. Urbana University of Illinois Press, Chicago, Ill.
- **Simpson E. H.** 1949. Measurement of diversity. *Nature* **163**:688.
- **Stiles M. E, WH. Holzapfel.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.* **36**(1):1-29.
- **Talavera M. R., V. V Ordóñez, E. M. del Campo y G. A. Troncoso.** 2001. Frecuencia y patrón de sensibilidad de *Streptococcus suis* serotipo 2 en canales de cerdos sacrificados en rastros del Valle de Toluca, México. *Revista Científica Multidisciplinaria de la Universidad Autónoma del Estado De México.* (3) 10:18-21.
- **Taylor P. W. y M. C. Trueblood.** 1985. Septic arthritis due to *Aerococcus viridans*. *J. Rheumatol.* **12**:1004-1005.
- **Tanasupawat S., O. Shida, S. Okada y K. Komagata.** 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:1479-1485.
- **Technical Manual.** pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Promega.
- **Teuber M.** 1995. The Genus *Lactococcus*, 225-227. En: B. J. B. Wood y W. H. Holzapfel (ed.), The Genera of lactic acid bacteria II. Vol. II. Blackie Academic and Professional, Glasgow, United Kingdom.
- **Ulloa M., y T. Herrera.** 1974. Mycofloral succession in pozol from Tabasco, México. *Bol. Soc. Mex. Microbiol.* **8**:17-48.
- **Ulloa M., y T. Herrera.** 1972. Descripción de dos especies nuevas aisladas del pozol: *Agrobacterium azotophilum* y *Acromobacter pozolis*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* **14**:15-24.

-
- **Ulloa M., T. Herrera y J. Taboada.** 1983. Mexican pozol. En Handbook of Indigenous Fermented Foods. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp. 226-233.
 - **Ulloa M., T. Herrera y P. Lappe.** 1987. Pozol. En: Fermentaciones tradicionales indígenas de México. *Instituto Nacional Indigenista*. **16**:13-20.
 - **Valderrama P. y C. Ramírez.** 1993. Alimentos de maíz y fermentados en Cuetzalan, Puebla. *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. M. C. Wacher y P. Lappe (Compiladoras). Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 63-67.
 - **van Beek S., y F. G. Priest.** 2002. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a plyphasic study. *Appl. Environ. Microbio.* **68**(1):297-305.
 - **van Hannen E.J., P. Gzwart, van Agterveld, H. J. Gons, J. Ebert y H. J. Laanbroek.** 1999. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:795-801.
 - **Wacher M. C., A. Cañas, P. E. Cook, E. Bárzana y J. D. Owens.** 1993. Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**:226-274.
 - **Wacher Rodarte, M. C.** 1995. Estudios sobre la microbiología del pozol. Tesis de Doctora en Ciencias (Bioquímica). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
 - **Wacher C., A. Cañas, E. Bárzana, P. Lappe, M. Ulloa y J. D. Owens.** 2000. Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiol.* **17**:251-256.
 - **Wang F. R., Z. D. Zhang, B. Z. Jiao y Z. Y. Wang.** 1981. Experimental studies of lung adenocarcinoma in mice induced by corn flour inoculated with *Aspergillus flavus*. *Food Microbiol.* **3**(2):91-3.
 - **Walters F., C. W. van Niel, Ch. Fendtner y M. M. Garrison.** 2000. *Lactobacillus* therapy for acute infections diarrhea in children. A. *Meta-analysis. Pediatric.* **109**: 678-84.
 - **Ward J. H.** 1963. Hierarchical groupings to optimize an objective function. *J Am Stat Assoc* **58**:236-246
 - **Williams R. E., A. Hirch y S. T. Cowan.** 1953. *Aerococcus*, a new bacterial genus. *J. Gen. Microbiol.* **8**:475-480.

-
- **Wintzingerode F. von; U.B. Gobel, E. Stackebrandt.** 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 213-229.
 - **Woese C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:221-271.

CAPÍTULO 9. ANEXOS

ANEXO I

A1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA ELABORACIÓN DE GELES DE DGGE

Acrilamida al 40% 37.5:1

REACTIVO	CANTIDAD
Acrilamida	38.93 g
Bis-acrilamida	1.07 g
dH ₂ O	Para 100.0 ml

Filtrar a través de una membrana de 0.45 μ y almacenar a 4°C en un frasco ámbar.

Buffer TAE 50 X

REACTIVO	CANTIDAD	CONCENTRACIÓN FINAL
Tris base	242.0 g	2 M
Ácido Acético glacial	57.1 ml	1 M
EDTA 0.5M, pH 8.0	100.0 ml	50 mM
dH ₂ O	para 1,000.0 ml	

Posterior a la mezcla, colocar en autoclave durante 20-30 min. Almacenar a temperatura ambiente.

Acrilamida al 40% 37.5:1

REACTIVO	CANTIDAD
Acrilamida	38.93 g
Bis-acrilamida	1.07 g
dH ₂ O	Para 100.0 ml

Almacenar a 4°C en un frasco ámbar.

Persulfato de Amonio (APS) al 10%

REACTIVO	CANTIDAD
APS	0.1 g
dH ₂ O	1.0 ml

Se prepara al momento de utilizarlo. No se recomienda almacenarlo.

Buffer TAE 1 X para la electroforesis.

REACTIVO	CANTIDAD
Buffer TAE 50 X	140 ml
dH ₂ O	6,860 ml
Volumen final	7,000 ml

Buffer de carga

REACTIVO	CANTIDAD
2% de Azul de bromofenol	1.4 ml
2% de Cianol - xileno	6.0 ml
Glicerol al 100%	7.0 ml
dH ₂ O	2.5 ml
Volumen final	20.0 ml

ANEXO II**PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA ELABORACIÓN DE GELES PERPENDICULARES DE DGGE PARA ACOTAR EL INTERVALO DE DESNATURALIZACIÓN REQUERIDO PARA BACTERIAS LÁCTICAS.****Solución desnaturalizante al 20%**

REACTIVO	CANTIDAD
Acrilamida al 40%	20 ml
Buffer TAE 50 X	2 ml
Formamida	40 ml
Urea	42 g
dH ₂ O	para 100.0 ml

Desgasificar durante 10 – 15 min. Filtrar a través de una membrana de 0.45 μ y almacenar a 4°C en un frasco ámbar hasta por un mes.

Solución desnaturalizante al 70%

REACTIVO	CANTIDAD
Acrilamida al 40%	14 ml
Buffer TAE 50 X	1.4 ml
Formamida	28 ml
Urea	29.4 g
dH ₂ O	para 100.0 ml

Desgasificar durante 10 – 15 min. Filtrar a través de una membrana de 0.45 μ y almacenar a 4°C en un frasco ámbar hasta por un mes.

ANEXO III

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA ELABORACIÓN DE GELES PARALELOS DE DGGE CON UN INTERVALO DESNATURALIZANTE DE 30 A 60% REQUERIDO PARA BACTERIAS LÁCTICAS.

Solución desnaturalizante al 30%

REACTIVO	CANTIDAD
Acrilamida al 40%	20 ml
Buffer TAE 50 X	2 ml
Formamida	12 ml
Urea	12.6 g
dH ₂ O	para 100.0 ml

Desgasificar durante 10 – 15 min. Filtrar a través de una membrana de 0.45 μ y almacenar a 4°C en un frasco ámbar hasta por un mes.

Solución desnaturalizante al 60%

REACTIVO	CANTIDAD
Acrilamida al 40%	20 ml
Buffer TAE 50 X	2ml
Formamida	24 ml
Urea	25.2 g
dH ₂ O	para 100.0 ml

Desgasificar durante 10 – 15 min. Filtrar a través de una membrana de 0.45 μ y almacenar a 4°C en un frasco ámbar hasta por un mes.

ANEXO IV

A. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. INDICE DE RIQUEZA (R)

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Grupos				
Columna 1	5	27.89	5.578	0.28157
Columna 2	5	29.19	5.838	0.52667

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.169	1	0.169	0.41819262	0.53594859	5.31764499
Dentro de los grupos	3.23296	8	0.40412			
Total	3.40196	9				

ANEXO IV

B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. INDICE DE DIVERSIDAD (H)

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
	Columna 1	5	11.49	2.298	0.02537
	Columna 2	5	11.8	2.36	0.02295

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00961	1	0.00961	0.3977649	0.5458367	5.31764499
Dentro de los grupos	0.19328	8	0.02416			
Total	0.20289	9				

ANEXO IV

C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. INDICE DE DOMINANCIA (S)

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	5	1.04	0.208	0.00167
Columna 2	5	5	1.1	0.22	0.0004

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00036	1	0.00036	0.34782609	0.57162299	5.31764499
Dentro de los grupos	0.00828	8	0.001035			
Total	0.00864	9				