

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Análisis de la diversidad de bacterias Gram-positivas presentes en aguamiel y en el inicio de la fermentación del pulque, por técnicas microbiológicas y moleculares.

TESIS

Que para obtener el título de:
QUÍMICA DE ALIMENTOS

Presenta
Martha Celia Lozano Pérez Lara

México, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Dra. Biserka Sveshtarova Pekarkova
Vocal	Dra. Ma. Del Carmen Wachter Rodarte
Secretario	Dr. José Adelfo Escalante Lozada
1^{er} suplente	Dra. Amelia Ma. De Guadalupe Farrés González
2^o suplente.	Dr. Francisco Ruiz Terán

Sitio donde se desarrolló el tema: Ceparío, Dpto. de Biología, Facultad de Química, UNAM y Laboratorio Bolívar-Gosset, Dpto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos.

Durante el desarrollo de este proyecto se contó con el apoyo económico de CONACYT. P46052-2

Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Asesor

QFB Martha Giles Gómez
Supervisor Técnico

Martha Celia Lozano Pérez Lara
Sustentante

Esta tesis está dedicada con todo mi cariño y agradecimiento a:

*Mis padres **Rafael Lozano** y **Martha Pérez Lara** que con todo su amor y esfuerzo, me impulsaron cada día a seguir adelante con mis estudios y ser una mejor persona.*

*A ti, **RAGF** que con tu amor, apoyo y comprensión estuviste a mi lado durante la parte experimental y la escrita de este proyecto.
Gracias... por todo.*

A mi familia y amigos de la infancia, de la carrera, del IBT a todos, por su cariño y apoyo.

*A la **UNAM** por ser mi escuela querida, que me ha dado los mejores años de mi vida y las bases para ser una excelente profesionista.*

A Eugene, Cookie, Kiara y Lula por acompañarme mientras escribía.

Agradecimientos Especiales

Por todo el apoyo, tiempo y conocimientos que me brindaron:

- * A mis asesores Adelfo Escalante y Martha Giles.
- * Laboratorio Bolívar-Gosset del IBT a Georgina Hernández, Ma. Inés Chavez, Telma Pariente, Delia Caro, Marcelo Espin, Karla Martinez, Andrea Sabido, Katy Juárez, Dr. Gossett, Gerardo Huerta, César Aguilar, Eugenio Mesa, Mercedes Enzaldo De la Cruz y Montserrat Orencio.
- * Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT a Jorge Yañéz.
- * Cepario, Facultad de Química a QFB. Alejandro Camacho, Laura Ortiz, Rodrigo Conca, Enrique Sánchez, QFB. Antonieta Silva, Carlo Rojas, Guadalupe Sánchez y Guadalupe Martínez.
- * Facultad de Química a la Dra. Carmen Wachter, Dr. Guillermo Aguilar y QFB. Luciano Hernández.
- * Unidad de Microscopía, Instituto de Fisiología, UNAM. Dra Araceli Patrón y Bióloga Rosa Ma. Picasso.
- * Biblioteca Facultad de Química al Coordinador José Orozco.

CONTENIDO

	Pág.
1. Resumen	4
2. Introducción	10
3. Objetivos	12
4. Antecedentes	14
4.1 Maguey, Aguamiel, Pulque	14
4.2 Bacterias Lácticas	23
4.3 Técnicas Microbiológicas y Moleculares utilizadas para el aislamiento e identificación de bacterias de interés.	28
5. Material y Métodos	34
5.1 Toma de muestra del pulque	34
5.2 Cuantificación de azúcares y productos de fermentación por HPLC.	34
5.3 Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) de las muestras de aguamiel y después de inocular.	35
5.4 Determinación de cuentas viables para bacterias Gram- positivas en medio APT.	35
5.5 Aislamiento, purificación de 80 colonias de cada una de las muestras.	35
5.6 Tipificación molecular de colonias aisladas por medio de la técnica de Análisis de Restricción de ADNr (ARDRA)	36
5.6.1 Lisis Celular	36
5.6.2 Amplificación de los genes que codifican los ARNr16s (ADN16s) por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.	36
5.6.3 Tipificación molecular por la técnica de ARDRA.	37
5.7 Identificación mediante la comparación de secuencias de ADNr 16S de los aislados.	38

5.8 Construcción del Árbol filogenético con las secuencias de los aislados.	39
5.9 Conservación de aislados de interés identificados.	40
6. Resultados y Discusión	41
6.1 Cuantificación de bacterias lácticas, carbohidratos y productos de fermentación.	41
6.2 Análisis de las muestras de Aguamiel y al inicio de la fermentación por MEB.	43
6.3 Aislamiento, purificación e identificación por análisis de secuencias de ADNr 16S de bacterias lácticas.	46
7. Conclusiones	55
8. Perspectivas	56
9. Apéndice	57
10. Bibliografía	59
11. Agradecimientos	60

Índice de Tablas

No. Tabla	Título	Página.
1	Análisis químico del pulque	15
2	Microbiología del pulque.	18
3	Microorganismos detectados en muestras de pulque de diferentes localidades por medio de análisis de secuencias de ADNr 16S.	22
4	Diferencias en las bacterias lácticas	26
5	Biopreservación por bacterias lácticas	27
6	Bacterias lácticas detectadas en bebidas alcohólicas	28
7	Ventajas y desventajas de algunos métodos moleculares utilizados en el estudio de la diversidad microbiana aislada de una muestra ambiental.	31
8	Cuantificación de azúcares y productos de fermentación por HPLC y determinación de cuentas totales.	43
9	Microorganismos únicos en aguamiel.	47
10	Microorganismos únicos al inicio de la fermentación.	49

Índice de Figuras

No. Figura	Título	Página.
1	Partes de una planta de maguey.	16
2	Vía metabólica producción de etanol por <i>Zymomonas mobilis</i> .	21
3	Vías heterofermentativa y homofermentativa en bacterias lácticas.	25
4	Micrografía electrónica de barrido de aguamiel.	44
5	Micrografía electrónica de barrido de aguamiel más inóculo de pulque fermentado.	45
6	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de aguamiel.	46
7	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de la muestra al inicio de la fermentación.	48
8	Árbol filogenético de las secuencias parciales de ADNr 16S.	54

1. RESUMEN

El pulque es una bebida fermentada alcohólica tradicional elaborada a partir del aguamiel (savia) extraído de varias especies de maguey. Esta bebida es producida y consumida principalmente en la región central de México. Para su elaboración, el aguamiel recién extraído es transportado y transferido a tinajas en donde tiene lugar la fermentación, la cual varía de pocas horas a toda la noche, dependiendo del productor, obteniendo así el pie de cuba, que después se añade al aguamiel fresco y se deja fermentar hasta obtener pulque.

Los reportes sobre el análisis de la diversidad bacteriana en muestras de pulque, determinada por medio de técnicas de cultivo tradicionales, son escasos y los que se incluyen en el presente trabajo señalan la presencia de diferentes grupos bacterianos entre los que destacan: *Zymomonas mobilis*, *Leuconostoc mesenteroides* y diversas especies de lactobacilos. Sin embargo, es importante destacar que no se ha especificado el origen geográfico de la muestra, el momento de la fermentación en el que se toma o los cambios fisicoquímicos asociados al crecimiento microbiano.

En este trabajo, se reporta la cuantificación, el aislamiento y caracterización molecular de 80 colonias de bacterias lácticas aisladas a partir de una muestra de aguamiel fresco (AM) y otra de aguamiel inoculada con una muestra de pulque previamente fermentado (MO), las muestras fueron colectadas de la localidad de Huitzilac, Morelos. Así mismo se efectuó una caracterización fisicoquímica cuantificando los azúcares presentes y los productos de fermentación mediante el uso de Cromatografía de líquido en alta presión (HPLC).

Por primera vez se caracterizaron bacterias lácticas en el sustrato (aguamiel) y en el momento de inoculación cuando inicia la fermentación del pulque.

El análisis de las colonias aisladas por medio de la técnica de ARDRA, permitió la detección de 5 tipos genéticos únicos, los cuales fueron

identificados por análisis de las secuencias de sus ADNr 16S en Aguamiel como *Leuconostoc citreum* (56.75%), *L. mesenteroides* (20.27%), *L. kimchii* (13.51%) y *Lactococcus lactis* (9.45%) y en la muestra de aguamiel más inóculo de pulque *Leuconostoc mesenteroides* (53.23%), *L. citreum* (35.49%), *Lactococcus lactis* (3.22%) y *Bacillus licheniformis* (3.22%).

De estos microorganismos *Leuconostoc kimchi*, *Lactococcus lactis*, *L. citreum* y *Bacillus licheniformis*, se reportan por primera vez en una muestra de pulque.

Se determinaron por HPLC las concentraciones de azúcares fermentables (sacarosa, glucosa y fructosa) en ambas muestras obteniendo valores mayores en el aguamiel mientras que en los productos de fermentación (etanol, ácido láctico y ácido acético) las concentraciones son menores en el aguamiel. La temperatura de ambas muestras fue de 17°C, mientras que el pH de aguamiel 5.96 es menos ácido que el de la muestra de aguamiel inoculada con pulque.

Como resultado del análisis por Micrografía Electrónica de Barrido, se obtuvieron por primera vez imágenes microscópicas del aguamiel donde se detectaron 4 morfologías distintas y de la muestra al momento de la inoculación con pulque, en la cual se observan 5 morfologías.

2. INTRODUCCIÓN

El pulque es una bebida fermentada alcohólica tradicional obtenida a partir de la fermentación de la savia (aguamiel) extraído de diversas especies de maguey (*Agave americana*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. apisaga* y *A. salmiana*).

La fermentación se desarrolla después de inocular una muestra de aguamiel con una porción de pulque previamente fermentado. Esta se desarrolla bajo condiciones no asépticas a temperatura ambiente por lo que su desarrollo depende de los microorganismos presentes en la savia y aquellos que son incorporados durante la inoculación. El proceso tiene una duración variable. Algunas referencias señalan el desarrollo de la fermentación, por algunas horas, todo el día, toda la noche y hasta por varios días, dependiendo de la localidad, productor, etc. (Lappe y Ulloa, 1993; Martínez del Campo, 1999; Martínez, 2003).

A pesar de la importancia económica que el pulque tuvo durante varios siglos, a partir de la década de 1920 (García-Garibay y López-Munguía 1993), su producción y consumo, empezó a decaer de forma importante debido principalmente al incremento en el consumo de cerveza, sobre todo en consumidores jóvenes. En la actualidad no existen datos precisos sobre su producción. Se señala que una compañía que ha desarrollado un proceso de enlatado de pulque, produce anualmente 15 mil latas, de 340 mL, lo que equivale a una producción de 5100 L/año. Sin embargo, aunque no existe información estadística al respecto, esta bebida resulta de gran importancia en nuestros días en algunas regiones del centro del país, en donde se produce desde un nivel doméstico-semi-industrial.

Durante la fermentación del pulque se desarrollan tres tipos de fermentación que definen las características de esta bebida: fermentación alcohólica (producción de etanol), fermentación ácida (producción de ácido acético y láctico) y fermentación viscosa (producción de exopolisacáridos). Debido a estas características el pulque representa un ambiente de gran

interés desde el punto de vista biotecnológico, de este ambiente es posible aislar microorganismos con características de interés industrial.

Tradicionalmente los microorganismos se han caracterizado fenotípicamente, por sus propiedades celulares observables y por la estructura de sus componentes celulares. El cultivo es un prerrequisito para examinar dichas propiedades, por lo que la posibilidad de contar con medios de cultivo que permitan el aislamiento de la mayor parte de los microorganismos presentes en una muestra ambiental, resulta de gran importancia poder tener en laboratorio a las bacterias cultivables para su posterior caracterización/identificación.

En el presente trabajo se busca el aislamiento, purificación y caracterización de bacterias lácticas presentes en el aguamiel y en la muestra de aguamiel con inóculo de pulque utilizando técnicas moleculares.

En este contexto el presente trabajo se ubica dentro de un proyecto de investigación cuyo objetivo es el caracterizar la diversidad bacteriana cultivable y no cultivable de una muestra de pulque obtenida de la localidad de Huitzilac, Morelos; con la finalidad de detectar y aislar genes de interés biotecnológico involucrados en el transporte de carbohidratos, producción de etanol, ácidos orgánicos (láctico y acético) y producción de exopolisacáridos.

3. OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar la diversidad de bacterias Gram-positivas cultivables, presentes en el aguamiel y al inicio de la fermentación, de una muestra de pulque de la localidad de Huitzilac, Morelos.

Objetivos Particulares:

1. Cuantificar las bacterias lácticas, así como los siguientes parámetros: pH, temperatura, la concentración de los azúcares, y de los productos de fermentación, en: a) Aguamiel recién extraído (AM) y b) Inicio fermentación del pulque (M0)
2. Visualizar la microbiota por microscopía electrónica de barrido del aguamiel y la muestra al inicio de la fermentación del pulque.
3. Tipificar molecularmente 80 colonias de cada muestra.
4. Identificar los aislados únicos por análisis de secuencias de **ADNr 16S**.

4. ANTECEDENTES

4.1 Maguey, Aguamiel y Pulque

El **pulque** (*del náhuatl poliuhqui, podrido, descompuesto*) es una bebida alcohólica (4–7 °G.L.) que se obtiene por fermentación del **aguamiel**, (líquido translúcido color ambarino, de olor herbáceo y sabor dulce agradable) que es la savia de varias especies de magueyes pulqueros, principalmente *Agave atrovirens*, aunque existen varias clases de magueyes productores de pulque como *Agave salmiana*, *A. mapisaga*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. americana*. (García Garibay y López Munguía;1993 Martínez, 2003).

El **maguey** es una planta mexicana, que pesa entre una y dos toneladas y puede producir de 100–250 litros de aguamiel cada tres meses, pertenece al orden de las Amarilidáceas y al género de los Agaves. El agave, era considerado una planta sagrada en el México antiguo y ocupaba un lugar privilegiado tanto en la vida religiosa y ritual como en la mitológica y la económica. Los distintos tipos de agave pulquero se dan prácticamente en toda la República Mexicana, la principal área de cultivo abarca los estados de México, Querétaro, Michoacán, Tlaxcala e Hidalgo. La zona limítrofe entre estos dos últimos estados es, sin duda, donde el cultivo del maguey es más intenso (Lappe y Ulloa, 1993; Martínez, 2003)

El pulque es una bebida consumida principalmente en regiones rurales por diversos grupos sociales e indígenas: como los nahuas del D.F., Edo de México, Tlaxcala, Morelos, Guerrero, Michoacán, Guanajuato, Hidalgo, San Luis Potosí, Veracruz; los mazahuas del Edo. de México; los matlazincas o pirindas de Morelos y Edo. de México, y los mestizos de estas regiones del país (Lappe y Ulloa, 1993; Martínez del Campo, 1999).

El maguey florece sólo una vez, la edad en la que florece depende de factores como especie y variedad, características del terreno, el clima y los cuidados agrícolas. En magueyes cultivados la floración se presenta entre los 8 y 12 años, en los silvestres es más tardía. Durante la floración la planta emite en su tallo central un tallo o pedúnculo floral llamado quiote, que se desarrolla entre 5 y 6 semanas, el tallo mide más

de 5 metros y termina en un enorme racimo compuesto por ramificaciones llenas de flores erguidas de color verde-amarillento (Martínez del Campo, 1999).

El aguamiel contiene de 7 a 14% de azúcares (glucosa, sacarosa, bajas concentraciones de gomas y manitol); después de la fermentación estos disminuyen a 0.5–2 %, mientras que su contenido alcohólico aumenta de 3–6.5 %. La acidez (ácido láctico y acético) fluctúa entre 0.1% y 2%, mientras que el contenido proteico es de 0.2 a 0.5%. Su análisis químico completo se presenta en la Tabla 1.

El pulque al ser una bebida con propiedades alimenticias y medicinales constituye una buena fuente energética, por su contenido de etanol (4–6%) e hidratos de carbono (azúcares reductores 0.2–0.5%), ácido láctico alrededor de 1.5/L una buena fuente vitamínica ya que puede satisfacer las recomendaciones diarias de vitamina C y tiamina. (Coppola, 1933; Martínez, 2003)

Tabla 1. Análisis químico de pulque

	Aguamiel	Pulque
Humedad (g %)	91.7	97
Cenizas (g %)	0.25	0.20
Proteína (g %)	0.44	0.44
Calcio (mg %)	14	10
Fósforo (mg %)	35	10
Hierro (mg %)	1.8	0.7
Tiamina (mg %)	0.03	0.02
Riboflavina (mg %)	0.02	0.02
Niacina (mg %)	0.47	0.30
Vitamina C (mg %)	4.5	6.2

Tomado de Ulloa y Herrera, (1976)

Elaboración del pulque

El proceso de elaboración del pulque, que en forma tradicional se ha mantenido hasta la época actual, presenta una variación acorde con la región geográfica en la que se produzca. La descripción gráfica del maguey se presenta en la Figura 1.

La extracción del aguamiel requiere diversas operaciones previas: la “castración” que es cortar el brote floral, (quiote o huevo) esto se realiza aproximadamente entre los 8 y 12 años de plantado, y consiste en cortar las púas laterales de las pencas hasta llegar al corazón, este se corta y se le extrae un trozo del extremo inferior. El maguey se deja reposar de seis meses a un año para que se concentre y aumente el contenido de azúcares en el aguamiel, éstos se acumulan en la cavidad realizada en la cabeza del maguey o mezontete mediante la “picazón”. Los tejidos blandos de la cavidad se raspan periódicamente con una cuchara elíptica, se limpia la cavidad, se extrae la raspadura que quedó dentro de ella y se abren los vasos de la planta para que fluya el aguamiel al cabo de uno o dos días. la producción por día es de 1-2 L en promedio (Lappe y Ulloa, 1993; Martínez del Campo, 1999; Martínez 2003).

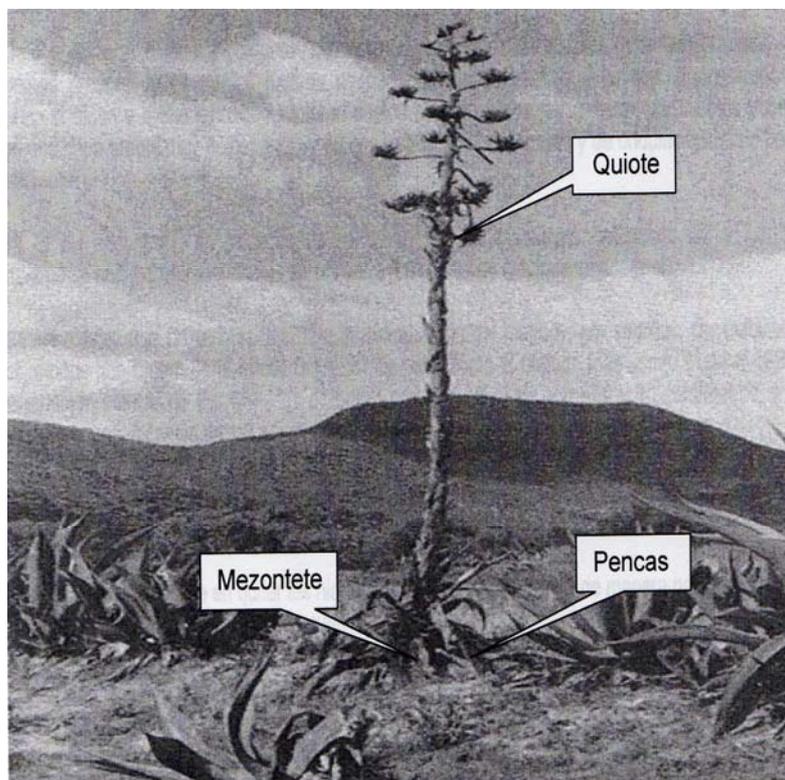


Figura 1. Partes de una planta de maguey.

Generalmente, el **aguamiel** también llamado *tlachique*, es extraído de los magueyes por los tlachiqueros, (quienes tradicionalmente succionan el aguamiel con un guaje o acocote, hecho de un fruto hueco y seco de calabaza), se transporta tradicionalmente dentro de recipientes peculiares, hechos de piel de becerro o de cerdo, para posteriormente ser vaciado en unos recipientes llamados tinacales (grandes tinas de madera). En estos recipientes de madera se realiza una fermentación espontánea durante unas horas hasta varios días; la principal fuente de microorganismos está en las paredes de los tinacales de madera que son utilizados en las sucesivas fermentaciones de aguamiel para convertirlo en pulque. Un elemento fundamental para la fermentación es la “semilla”, “nana”, “madre” o “pie de cuba” que constituye uno de los grandes secretos de los productores de pulque, ya que puede prepararse de diferentes modos y con distintas sustancias; pero en general es preparado mediante fermentación natural de aguamiel, durante 25 a 30 días. Una vez establecido el “pie de cuba” se inocula el resto de las tinas hasta que a juicio del catador, deba suspenderse este proceso para vaciarlo en barriles y ponerlo a disposición de los consumidores.

Todo el proceso se realiza en condiciones no asépticas, por lo tanto la mezcla de microorganismos que participan en la fermentación, provienen del aguamiel y los que se incorporan durante su extracción, transporte, inoculación, proceso de fermentación y manipulación.

El pulque se encuentra frecuentemente curado, lo que implica su formulación con semillas, frutas, hortalizas o productos de origen animal. Aunque muchas veces esto se hace para ocultar una posible desviación de la fermentación, que puede generar sabores distintos y desagradables (Ulloa y Herrera, 1976; Garcia-Garibay y López-Munguía, 1993; Lappe y Ulloa 1993).

La siguiente sección describe el proceso de elaboración de pulque de acuerdo con la explicación proporcionada por el proveedor de aguamiel y pulque utilizados para el desarrollo de este trabajo. Es importante considerar las semejanzas y diferencias entre la información reportada en la literatura con lo que se presenta a continuación.

“El maguey se deja crecer entre 6 y 7 años, se corta el corazón se deja reposar tres días y después se rasca la jícama o mezontete para que empiece a brotar el aguamiel o mexal, con un castrador metálico (que es una cuchara con dientes para raspar), se rasca o raspa ligeramente por la mañana y por la tarde para que dure el maguey dando aguamiel entre 4-5 meses. El aguamiel de la mañana y la tarde se colecta en cualquier recipiente limpio de plástico y se deja fermentar por un día, obteniendo pulque o pie de cuba. La proporción de aguamiel a pie de cuba para obtener pulque listo para tomarse es de 2:3. Cada litro se vende a \$10.”

Microbiología del pulque

Los primeros estudios sobre la microbiología del pulque datan de la década de 1860, en la Tabla 2 se presenta una recopilación de las bacterias descritas en el pulque por diversos autores.

Tabla. 2 Microbiología del pulque (Bacterias reportadas)

Año	Microorganismo o grupo biológico
1864	Primera observación microscópica de las bacterias y levaduras del pulque. ^c
1867	<i>Bacterium aceti</i> ^b
1870	Observación de cuerpos microscópicos con movimiento browniano. ^{a,c}
1884	Observación de partículas denominadas “sacarobios” y “alcoholobios”. Se señala que la transformación del aguamiel se realiza por un alga del género <i>Cryptococcus</i> . ^c
1891	Posible presencia de <i>Leuconostoc</i> ^c
1892	Multitud de bacterias suspendidas por un mucilago. ^c
1896	<i>Bacillus viscosus</i> , <i>Bacterium aceti</i> , <i>Cladothrix</i> , cocos, un diplococo encapsulado, <i>Micrococcus luteus</i> , <i>M. cinnabareus</i> , un micrococo rosado (<i>M. roseus</i>), <i>M. translucidus</i> . Se señala que estas bacterias se encontraron de forma constante en la bebida, exceptuando <i>Cladothrix</i> . ^{a,c}
1901	<i>Bacillus</i> y micrococos dispuestos en forma de diplos. <i>Saccharomyces cerevisiae agavica</i> ^c
1911	Un diplococo zooglea. ^c

Tabla 2. Continuación.

1917	<i>Micoderma aceti</i> . ^c
1924	<i>Thermobacterium mobile</i> denominado posteriormente <i>Pseudomonas lindneri</i> . Se señala sinonimia entre este microorganismo y <i>Zymomonas mobilis</i> . ^c
1925	<i>Bacillus acidificans</i> (considerado como <i>Lactobacillus delbrueckii</i>) <i>Bacillus xylinus</i> , <i>Diplobacter viscosum</i> , <i>Granulobacter amylalcoholicum lindner</i> , <i>Leuconostoc</i> del pulque, <i>Sarcina corrosa</i> , <i>S. mayor</i> , <i>S. minor</i> , <i>Streptococcus corrosus</i> . ^c
1926	<i>Bacterium tridescens</i> , <i>B. vermiforme</i> , <i>B. xylinum</i> , <i>Pseudomonas lindneri</i> y dos bacterias mucosas. ^{a,b,c}
1928	<i>Bacillus acidificans longissinus</i> , bacilo viscoso "Yucatán", algunas espirilas, <i>Granulobacter amylalcoholicum</i> ^c
1927-1930	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> . ^c
1930	<i>Bacterium viscosum</i> (sinonimia con <i>Streptococcus corrosus</i>) <i>S. aguamieli major</i> , <i>S. aguamieli minor</i> y <i>Thermobacterium tridiscens</i> . ^c
1932	Un filamento que incluye al género <i>Cellulomonas</i> y <i>Leuconostoc pierofrieti</i> . <i>Bacillus esterificans</i> , <i>Escherichia formica</i> , <i>E. wekanda</i> , posiblemente <i>Salmonella</i> , <i>Pseudomonas lindneri</i> . ^{a,b,c}
1938	<i>Lactobacillus patonii</i> en aguamiel y pulque. ^{a,c}
1940	<i>Leuconostoc viscosum</i> (que puede ser <i>Streptococcus corrosus</i> y que corresponde a <i>S. viscosus</i> .) ^{a,c}
1948	<i>Leuconostoc dextranicum</i> y <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. del pulque. <i>Bacillus teres</i> , <i>Micrococcus candidus</i> , <i>M. roseus</i> , <i>M. ruizi</i> , <i>Sarcina flava</i> . ^{a,c}
1949	<i>Bacterium</i> , <i>Hansenia</i> (posiblemente <i>Hanseniospora</i> y <i>Mycoderma</i>). ^c
1951	<i>Pseudomonas sinuosa o fermentans</i> , <i>Achromobacter eurydice</i> . ^c
1979	<i>Acetobacter aceti</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Leuconostoc dextranicum</i> y <i>Zymomonas mobilis</i> . ^c

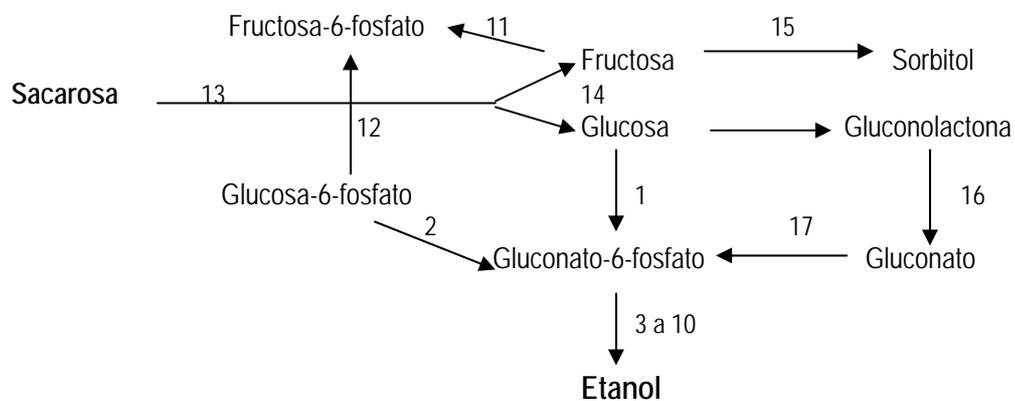
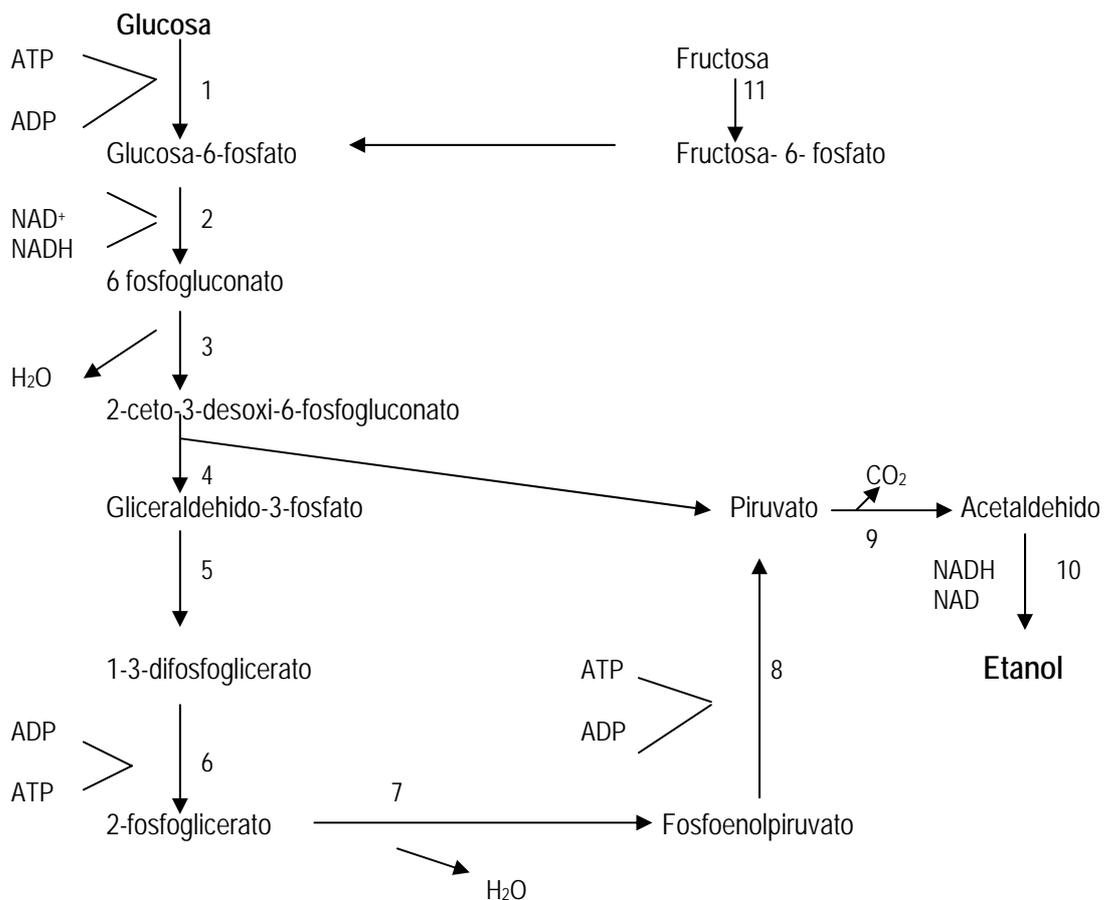
Tomado de ^a Brechtel, 1948, ^b Monroy, 1951, ^c Godoy, 1987.

García-Garibay y López-Munguía (1993), presentan una relación de los géneros bacterianos presentes en el pulque. Los géneros bacterianos son: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Hansenula*, *Streptococcus*, *Diplobacter*, *Saccharomyces*, *Acetobacter aceti*, *Bacillus terres*, *Lactobacillus buchneri*, *Leuconostoc dextranicum*, *Micrococcus candidus*, *M. luteus*, *M. roseus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata* y *Sarcina flava*.

Los microorganismos más importantes para el proceso son: *Zymomonas mobilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Sacharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus* sp. La primera es una bacteria Gram-negativa heterofermentativa capaz de fermentar fructosa, glucosa y sacarosa, responsable del inicio de la fermentación alcohólica, produce 1.9 moles de etanol por cada mol de glucosa fermentada por la vía Entner-Doudoroff (Figura 2), la segunda es responsable de la producción de dextranas solubles e insolubles (ramificadas), además de una levana a partir de sacarosa, es decir la fermentación viscosa del pulque, la tercera es una levadura responsable de la producción de etanol mediante fermentación aneróbica y la última es una bacteria láctica homofermentativa responsable de la fermentación ácida (Rivera, 1964; Garcia Garibay y López-Munguía, 1993; Cassani, 1997; Madigan, 1999; Neves, et al/2005).

La relación de bacterias reportadas por Godoy (1987) presenta nombres de microorganismos que no son válidos en la actualidad, mientras que la relación de microorganismos presentada por García-Garibay y López-Munguía (1993), se puede considerar como aquellas bacterias presentes en el pulque.

Es importante mencionar que en la mayoría de las descripciones señaladas en la Tabla 2 y por García-Garibay y López-Munguía (1993) no se hace referencia sobre si los microorganismos reportados provienen de aguamiel o pulque, o del origen geográfico de la muestra analizada.



ENZIMAS

1 glucocinasa, 2 glucosa 6 fosfatodeshidrogenasa, 3 6-fosfogluconatodeshidratasa, 4 2-fosfo-2-ceto-3-desoxigluconatoaldolasa, 5 gliceraldehidofosfodeshidrogenasa, 6 fosfoliceratocinasa, 7 fosfopiruvato deshidratasa, 8 piruvato cinasa, 9 piruvato descarboxilasa, 10 alcoholdehidratasa, 11 fructocinasa, 12 glucosa-6-fosfato isomerasa, 13 levansacarasa + invertasa, 14 glucosaisomerasa, 15 glucosafructosa oxidoreductasa, 16 gluconolactonasa, 17 gluconatocinasa.

Figura 2. Vía metabólica producción de etanol por *Zymomonas mobilis*.
Tomado de Sprenger, (1996)

Escalante *et al.* (2004) realizaron un estudio de la diversidad bacteriana de tres muestras de pulque procedentes de diferentes localidades (Edo. de México, Hidalgo y Morelos) utilizando una aproximación basada en técnicas no dependientes del cultivo microbiano (Tabla 3).

Tabla 3. Microorganismos detectados en muestras de pulque diferentes localidades por medio de análisis de secuencias de ADNr 16S.

Microorganismo	Aculco, Edo. de México.	Tizayuca, Hidalgo	Huitzilac, Morelos.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Presente	Presente	Presente
<i>L. kefir</i>	Presente		Presente
<i>L. acetotolerans</i>	Presente		Presente
<i>L. hilgardii</i>		Presente	
<i>L. plantarum</i>			Presente
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Presente	Presente	Presente
<i>L. pseudomesenteroides</i>		Presente	
<i>Microbacterium arborescens</i>			Presente
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>			Presente
<i>Acetobacter pomorium</i>		Presente	
<i>Gluconobacter oxydans</i>		Presente	
<i>Zymomonas mobilis</i>		Presente	Presente
<i>Hafnia alvei</i>	Presente		Presente

Tomado de Escalante *et al.* (2004)

En los resultados de este trabajo se observa que existen sólo dos microorganismos que se pueden considerar como comunes para las 3 muestras de pulque analizadas: *Lactobacillus acidophilus* y *Leuconostoc mesenteroides*, que son los responsables de la fermentación ácida y de la viscosa respectivamente, mientras que cuatro se encuentran en dos muestras y los restantes únicamente en una u otra muestra.

Es importante mencionar también, que en este trabajo se reportó por primera vez como microorganismos del pulque *Lactobacillus acidophilus*, *L. kefir*, *L. acetotolerans*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Microbacterium arborescens*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Acetobacter pomorium*, *Gluconobacter oxydans* y *Hafnia alvei*.

4.2 Bacterias Lácticas

Las bacterias lácticas pertenecen al Phylum *Firmicutes*, Clase *Bacilli*, Orden 2 *Lactobacillales*, las diferentes familias se especifican en la Tabla 4. Son cocos o bacilos Gram-positivos, normalmente inmóviles, no esporuladas, catalasa (-), tienen bajo contenido de G+C en su ADN, el producto principal de su metabolismo fermentativo es el ácido láctico; obtienen la energía sólo por fosforilación a nivel del sustrato. Son anaerobias aerotolerantes, para su crecimiento necesitan requerimientos nutritivos complejos como aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas, por esto se les llama fastidiosas. Son oxidasa, gelatinasa, lactato y bencidina negativos, no reducen nitratos.

Constituyen un grupo diverso de microorganismos asociados con plantas (col, maíz, ensilados), carne y productos lácteos. Son conocidas como cultivos iniciadores en la manufactura de productos lácteos como leches acidificadas, yogurt, mantequilla, queso cottage, quesos suaves y duros. Además son importantes comercialmente en el proceso de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales. A pesar de tener efectos benéficos en la industria alimenticia por la capacidad de producir compuestos aromáticos y potenciadores de sabor, en algunas ocasiones pueden considerarse como contaminantes al producir sabores no deseados.

Nuevas investigaciones sugieren la utilización de bacterias lácticas para proveer una microbiota intestinal que pueda competir contra microorganismos potencialmente dañinos, previniendo así enfermedades.

El tipo y la cantidad de ácido láctico que producen durante la fermentación es crítico en la producción de alimentos y juega un papel muy importante en la clasificación taxonómica de las bacterias lácticas. Se caracterizan de forma primaria por su habilidad de formar varios isómeros de ácido láctico a partir de la fermentación de glucosa. Es la habilidad de rotar a la luz, si es a la derecha se les llama dextrógiros (D) y si es a la izquierda levógiros (L). Las diferencias de los géneros se muestran en la Tabla 4.

Estas bacterias se agrupan como homofermentativas y heterofermentativas basado en los productos finales de su fermentación. Las bacterias **homofermentativas** (*Streptococcus* y *Pediococcus*) no poseen fosfoacetolasa y el lactato es el único producto final. Las bacterias lácticas **heterofermentativas** (*Leuconostoc* y un subgrupo de *Lactobacillus*) producen una variedad de compuestos reducidos además de lactato, como ácido acético, etanol, bióxido de carbono y no tienen la enzima glicolítica clave, la aldolasa; en su lugar utilizan la fosfoacetolasa y siguen la vía de las pentosas, convirtiendo las hexosas en pentosas por la enzima fosfoacetolasa que produce acetil fosfato (Bu'lock, 1991; Boone y Castenholz, 2001; Carr y Chill, 2002). La forma esquemática se presenta en la Figura 3.

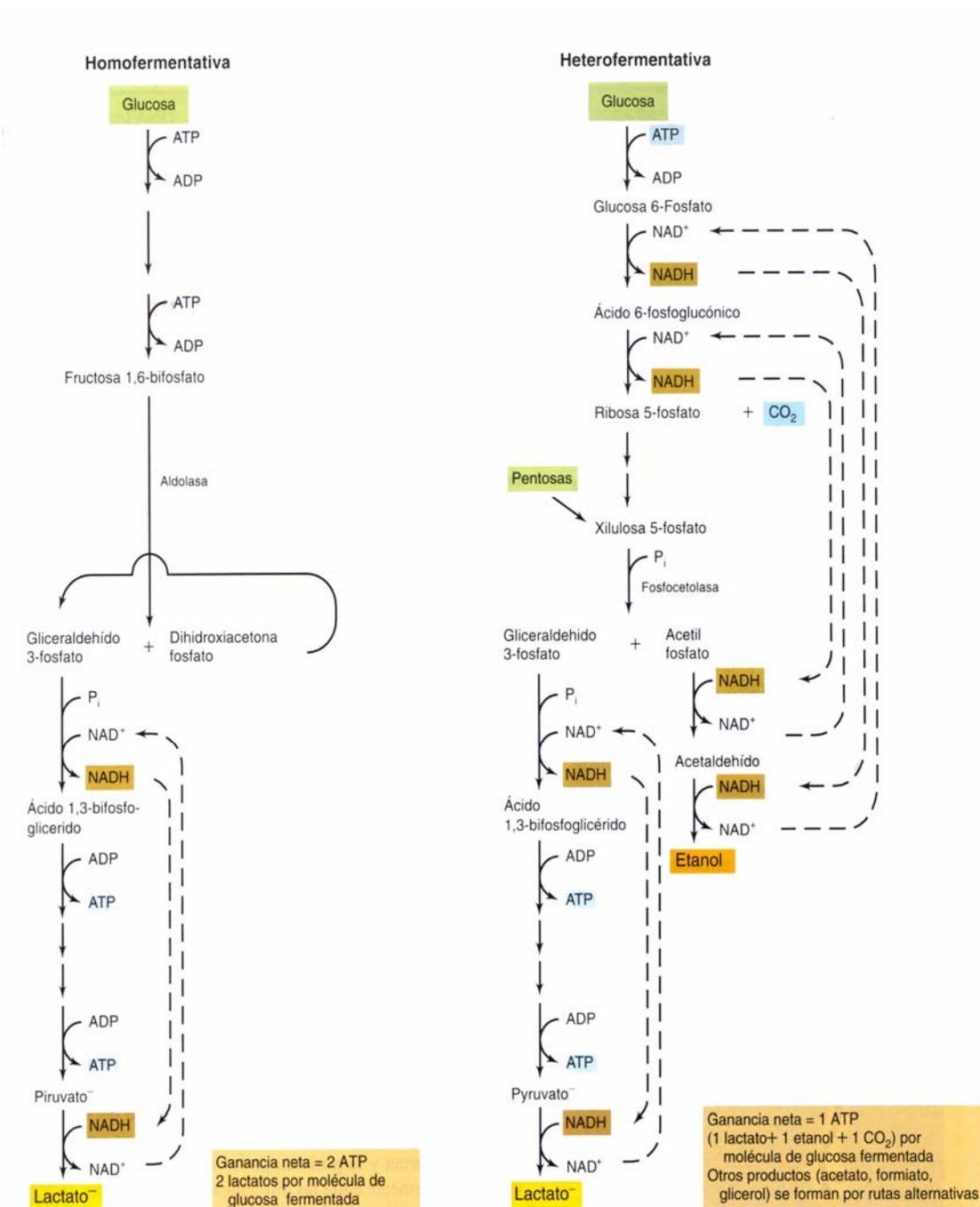


Figura 3. Vías heterofermentativa y homofermentativa en bacterias lácticas.

Tomado de Madigan, (1999)

Tabla 4. Diferencias en las bacterias lácticas.

Género	Morfología Gram +	Familia	Temperatura óptima crecimiento °C	Tipo ácido láctico	CO ₂ de Glucosa	Ribosa fermentada	Gluconato fermentado	Arginina Hidrolizada
Homofermentativo								
<i>Streptococcus</i>	Cocos ovoides cadenas	Streptococcaceae (VI)	37	L(+)	-	(-/+)	ND	V
<i>Pediococcus</i>	Cocos pares, tetradas	Lactobacillaceae (I)	25-40	DL, L(+)	-	V	-	V
<i>Lactococcus</i>	Cocos pares, cadenas	Streptococcaceae (VI)	30	D(-), L(+)	-	-	-	V
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos pares	Lactobacillaceae (I)	30-40	DL	-	(+/-) ^{a,b}	(+/-) ^{a,b}	-
Heterofermentativo								
<i>Betabacteria (Lactobacillus)</i>	Cocos pares, cadenas	Lactobacillaceae (I)	30-40	DL	+	+	+	+
<i>Leuconostoc</i>	Cocos pares, cadenas	Leuconostocaceae (V)	20-30	D(-)	+	V	(-/+)	-

* + Indica resultado de la prueba positivo, - indica negativo, (+/-) indica casi todas las cepas positivo una ocasional negativa, (-/+) indica casi todas las cepas negativo una ocasional positiva. V indica resultado variable, algunos resultados son + y otros -, ND indica que no hay datos, L(+) indica ácido levógiro, D(-) indica ácido láctico dextrógiro, DL indica mezcla de D y L.

a Streptobacteria y Betabacteria subgrupos de *Lactobacillus*, positivos para ribosa y gluconato.

b Thermobacteria subgrupo de *Lactobacillus* negativo para ribosa y gluconato.

Tomada de Holt, *et al* 1994; Boone y Castenholz, 2001; Carr y Chill, 2002.

Las bacterias lácticas han sido asociadas frecuentemente a las fermentaciones de productos lácteos, vegetales y cárnicos, se encuentran también formando parte de la microbiota presente en bebidas alcohólicas fermentadas (Tabla 5).

Tabla 5. Biopreservación por bacterias lácticas.

Producto	Microorganismos	Substrato
Vino, cerveza	Bacterias lácticas	uvas, granos
Pan	Bacterias lácticas	trigo, granos
Queso cheddar	<i>Lactococcus (cremoris, lactis)</i> <i>Leuconostoc</i>	leche
Queso suizo	<i>Lactobacillus (delbrueckii, bulgaricus, helveticus)</i>	leche
Yogurt	<i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>L. bulgaricus</i>	leche
Kefir	<i>Lactococcus. L.kefir</i>	leche
Carne fermentada	<i>Pediococcus, Staphylococcus</i>	puerco, res
Sauerkraut	<i>L. lactis, L. mesent., Lactobacillus (sake, brevis, plantarum, curvatus)</i>	col
Salsa de soya	<i>Lactobacillus</i>	granos de soya
Vegetales	<i>Lactococcus, (cremoris, lactis) Lactobacillus (plantarum casei)</i>	vegetales
Pescado	<i>Carnobacterium (piscicola, divergens)</i>	pescado

Tomado de Ross y Morgan, 2002.

También se han reportado como microorganismos importantes en diversos tipos de fermentaciones alcohólicas tanto tradicionales como de tipo industrial (Sánchez-Marroquín y Hope 1953; Simpson y Petterson, 2001; Van Beek y Priest, 2002; Escalante *et al* 2004), en donde se les ha asociado un papel importante en el desarrollo de las características sensoriales del producto final (Tabla 6).

Tabla 6. Bacterias lácticas detectadas en bebidas alcohólicas.

Microorganismo	Bebida Alcohólica
<i>Lactobacillus brevis</i>	Whisky
<i>L. fermentum</i>	Whisky
<i>L. paracasei</i>	Whisky
<i>L. pentosus</i>	Whisky
<i>L. plantarum</i>	Whisky y pulque
Otras	Whisky
<i>L. acidophilus</i>	Pulque
<i>L. kefir</i>	Pulque
<i>L. hilgardi</i>	Whisky y pulque
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Pulque
<i>L. pseudomesenteroides</i>	Pulque
<i>L. crispatus</i>	Whisky

Tomado de Van Beek, S. y Priest, F.G., 2000; Simpson y Petterson, 2001; Escalante *et al*, 2004.

4.3 Técnicas Microbiológicas y Moleculares, utilizadas para el aislamiento e identificación de bacterias de interés.

Cultivo y aislamiento en placa

El cultivo es un prerrequisito para examinar propiedades bioquímicas, fisiológicas, genéticas y otras características, por lo que la posibilidad de contar con medios de cultivo que permitan el aislamiento de la mayor parte de los microorganismos presentes en una muestra ambiental, resulta de gran importancia poder tener en laboratorio a las bacterias cultivables para su posterior caracterización e identificación.

Un **cultivo puro** es aquel que contiene solo una clase de microorganismo, para obtenerlo se requieren los nutrimentos y condiciones adecuados que le permitan crecer, además es muy importante evitar que otros microorganismos entren al cultivo y puedan causar una contaminación.

Una vez que se aísla el microorganismo se pueden estudiar su bioquímica, fisiología, genética y otras características. El medio de cultivo que se utilizará para el aislamiento y purificación, se dispone en cajas de Petri, donde las células microbianas pueden crecer y formar masas visibles denominadas colonias. Este debe esterilizarse inmediatamente después de su preparación para eliminar los microorganismos que lo contaminan. Es indispensable tomar las debidas precauciones durante el manejo posterior del medio que será todo el tiempo en condiciones asépticas. (Dale y Von Schantz, 2002; Pepper y Dowd, 2002)

El medio de cultivo utilizado para el aislamiento de cada microorganismo se escoge conociendo su capacidad biosintética es decir el potencial de sintetizar todos los constituyentes orgánicos celulares a partir de un compuesto carbonado sencillo. La muestra se coloca en la superficie de la caja petri para la selección y extensión de una colonia aislada, es un método muy importante para obtener cultivos puros a partir de comunidades microbianas que contienen muchos organismos diferentes. (Bruns y Buckley, 2002)

Medios para el aislamiento de bacterias lácticas

El cultivo de bacterias lácticas requiere de medios de enriquecimiento y selectivos, esto depende de la necesidad de aislar un género en particular a partir de una mezcla de microorganismos o de mantener los aislados en cultivo. Es importante ajustar el pH para el grupo o género en particular que se aislará. Si es menor a 4.5 se puede diferenciar *Lactobacillus* y *Pediococcus* de *Leuconostoc*.

Los medios para el aislamiento de lácticas son: agar APT, agar Rogosa o agar MRS y después se utiliza un medio diferencial entre homofermentativas y heterofermentativas o MRS modificado. En el medio diferencial heterofermentativos aparecen como colonias blancas y las homofermentativas en color azul o verde. El medio MRS se usa como un medio general o basal para pruebas de tolerancia a temperatura, pH, alcohol y sal.

El agar SL de Rogosa, Mitchell y Wiseman es un medio utilizado para cultivar y aislar selectivamente a lactobacilos basado en el bajo pH, la presencia de Tween 80 y acetato. Se ha usado para aislar lactobacilos del tracto oral e intestinal. Existen muchos medios de cultivo para los Streptococos como agar leche citrato semisólido, agar arginina tetrazolio, Caldo Lemco glucosa y agar Elliker. Este último es utilizado en la industria láctea para el crecimiento de *Streptococcus lactis* y *S. cremoris*. Otro medio utilizado en esta industria es el M17 con un pH de 6.8, es selectivo para el aislamiento de *Streptococcus thermophilus* del yogurt, para este microorganismo también se utiliza el agar extracto de Levadura con lactosa. El medio MRS ya sea en caldo o en agar es adecuado para el cultivo de *Leuconostoc* y *Pediococcus*. La producción de dextranos del género *Leuconostoc* puede probarse con agar soya tripticasa o agregándole al MRS 5% de sacarosa, se incuba aeróbicamente de 3–5 días. *Leuconostoc* crece mejor en condiciones reductoras, mientras que *Pediococcus* crece de forma exponencial en condiciones anaerobias (Carr y Chill, 2002; Hébert y Raya, 2004).

Técnicas moleculares utilizadas para la tipificación e identificación de microorganismos aislados.

Los microorganismos se han caracterizado tradicionalmente de acuerdo a sus características fenotípicas, propiedades celulares observables y la estructura de sus componentes celulares. Sin embargo este tipo de criterios pueden verse afectados por características ambientales, la edad del cultivo, fase de acostumbramiento, fase de crecimiento o fase estacionaria.

El desarrollo de técnicas moleculares basadas en el análisis de los ácidos nucleicos, ha permitido la posibilidad de discriminar entre una gran cantidad de cepas aisladas del medio ambiente, para así agrupar en tipos genéticos únicos que posteriormente son identificados por comparación de las secuencias de ADNr 16S con secuencias de microorganismos previamente caracterizados y depositadas en bases de datos. La Tabla 7, muestra algunas de las técnicas moleculares utilizadas para el análisis de la estructura microbiana aislada a partir de un ambiente.

Tabla 7. Ventajas y desventajas de algunos métodos moleculares utilizados en el estudio de la diversidad microbiana aislada de una muestra ambiental.

Método	Ventajas	Desventajas.
Guanina + Citosina	No es afectado por artefactos del PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Incluye todo el ADN extraído cuantitativo. Incluye miembros raros de la comunidad.	Requiere cantidades grandes de ADN Depende de la eficiencia del método de lisis y extracción. Nivel grueso de resolución.
Reasociación e Hibridación de ácidos nucleicos	ADN total extraído No es afectado por artefactos del PCR. ADN o ARN Puede ser analizado <i>in situ</i>	Carece de sensibilidad Requiere que los genes a detectar se encuentren en grandes cantidades. Depende de la eficiencia del método de lisis y extracción.
Microarreglos de ADN/Hibridación de ADN	Mismas que Hibridación. Se pueden analizar cientos de genes simultáneamente. Si se usan genes o fragmentos de ADN, se incrementa su especificidad	Solo es posible detectar especies más abundantes. Requiere del cultivo de microorganismos Solo es precisa en ambientes con una diversidad baja.
Electroforesis en gradiente de Temperatura (TGGE) y en gel en gradiente desnaturante (DGGE)	Es posible analizar grandes cantidades de muestras simultáneamente. Reproducibile y rápido	Afectado por artefactos del PCR. Depende de la eficiencia de lisis y extracción. La manipulación de la muestra puede afectar la diversidad observable. Una banda puede representar varios microorganismos. Sólo detecta especies dominantes.

Tabla 7. Continuación.

Método	Ventajas	Desventajas.
Polimorfismo de la conformación de cadena sencilla (SSCP)	Mismas que para DGGE y TGGE	Afectado por artefactos del PCR. Algunos ADN de cadena sencilla pueden formar más de una conformación estable.
Análisis de restricción de ADNr (ARDRA), polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP)	Detecta cambios estructurales en la comunidad microbiana.	Afectada por artefactos del PCR. Patrones de bandeo complejos.
Análisis de polimorfismos de restricción terminales (t-RFLP)	Patrones de bandeo simples Posibilidad de automatización Comparar diferencias entre comunidades microbianas.	Depende de la eficiencia de lisis y extracción. Afectada por artefactos de PCR. El tipo de polimerasa puede influir la variabilidad Selección de oligonucleotidos universales. La enzima de restricción puede afectar la tipificación de la comunidad.
Análisis del espaciador intergénico ribosomal (RISA)/ análisis automatizado del espaciador (ARISA)	Perfiles de comunidades muy reproducibles.	Requiere grandes cantidades de ADN.

Tomado de Tiedje, *et al* 1999, Ranjard, *et al* 2000 y Kirk, *et al* 2004.

ARDRA (análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado)

El ARDRA es una técnica utilizada para demostrar cambios en la estructura genética bacteriana, que ha sido expuesta a cambios ambientales o compuestos tóxicos, también para la identificación taxonómica de poblaciones bacterianas, requiere una enzima de restricción y un producto de PCR. No sirve como herramienta para medir la diversidad o detección de grupos filogenéticos específicos. Provee mayor resolución que los Análisis de polimorfismos de restricción terminales (T-RFLP), ya que todos los fragmentos de restricción independientemente de su tamaño son utilizados en el análisis.

Esta técnica puede utilizarse en productos de PCR de cultivos puros, productos de PCR amplificados directamente de ADN y en productos de PCR de librerías de clonas que se mantienen en *E. coli* (Tiedje, *et al* 1999).

En un análisis informático de sitios de digestión en los ribosomas de 100 cepas ambientales, se observó que al usar 4 enzimas de restricción (endonucleasas) la mediana de la diferencia en las secuencias fue de 97.4%.

La ventaja es su conveniencia, ya que no requiere ningún desarrollo especial y su limitación principal es escoger adecuadamente las enzimas de restricción para obtener resultados óptimos (Ranjard *et al*, 2000).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Toma de muestra del pulque

Una muestra de aguamiel fresco y una de pulque previamente fermentado se obtuvieron de un productor de la localidad de Huitzilac, Morelos. Las muestras se transportaron en recipientes de plástico nuevos al laboratorio, el tiempo de traslado hasta el momento de iniciar los muestreos fue de aproximadamente 15 minutos. Se inoculó el aguamiel (1.6 L) con una muestra de pulque fermentado (2.4 L); (de acuerdo a las indicaciones del productor). El inóculo fue previamente filtrado con una gasa estéril en un vaso de 5 L, para evitar el paso de larvas de insectos. Todo lo anterior fue realizado registrando los cambios de la temperatura (°C) y el pH con un potenciómetro, en la campana de flujo laminar.

De acuerdo a los objetivos de este trabajo, la toma de muestras y los análisis a desarrollar se realizaron en las dos etapas: a) Aguamiel (AM) y b) Inicio de la fermentación (aguamiel + pulque) (MO).

5.2 Cuantificación de azúcares y productos de fermentación por HPLC

Los análisis se realizaron en un equipo *Waters HPLC system*, (bomba binaria 650E, inyector automático 717, índice de refracción 2410 y detector de arreglo de diodos 996). Para la determinación de ácidos orgánicos (acético y láctico), carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa) y etanol; las muestras se centrifugaron 5 min. a 12000 rpm en una centrifuga (*Eppendorf 5410*) y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 μm . Se inyectaron 20 μL a una columna Aminex HPX-87H (300x7.8mm, Bio-Rad). La fase móvil fue H_2SO_4 5 mM / H_2O con un flujo de 0.5 mL/min. a 50°C. Todos los metabolitos se identificaron por tiempo de retención y en su caso espectro de luz UV, contra estándares previamente inyectados.

Se generó una curva patrón (concentración (g/L) vs altura) con 5 estándares, los parámetros de correlación (R^2) fueron siempre superiores a 0.993, lo que demuestra la linealidad; los valores de altura correspondientes de cada muestra, se ajustan al intervalo de cada curva.

5.3 Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) de las muestras de aguamiel y después de inocular.

El análisis de MEB fue realizado en la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. La preparación de las muestras se siguió de acuerdo a la siguiente metodología: 1 mL de la muestra de AM y MO, se fijan con 1 volumen de una solución de glutaraldehído al 4% con O_5O_4 0.1%. Las muestras fijadas, se deshidratan sucesivamente con etanol al 30%, 50%, 70% y 100% para posteriormente ser congeladas al punto crítico del CO_2 en un aparato Sandro-780 (Tousimis) y cubiertos con partículas de oro en un equipo "ion Sputter" JFC-110(JEOL). Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSMS410LV.

5.4 Determinación de cuentas viables para bacterias Gram + en medio APT.

A partir de cada muestra se realizaron diluciones decimales seriales en agua Peptonada al 0.1% p/V (DIFCO) hasta llegar a una concentración de 10^{-6} mL de muestra. Cada dilución se plaqueó 0.1 mL por triplicado por extensión superficial en placas de agar-APT (DIFCO). Se incubaron las placas durante 24-48 hrs a 30 ± 2 °C. Se determinó la caja representativa (aquella que tuviera entre 25-250 UFC) y se calculó el promedio del número de UFC/mL para cada muestra analizada.

5.5 Aislamiento, purificación de 80 colonias de cada una de las muestras.

Se aislaron aproximadamente 80 colonias de la caja representativa de cada muestra analizada. Se evaluó la pureza de cada colonia inoculando por agotamiento en cuadrantes en agar APT (DIFCO) y por medio de la tinción de Gram, tomando como criterio la uniformidad en tamaño, asociación y Gram del frotis. Cada colonia pura aislada se conservó en viales con APT semisólido (Caldo APT DIFCO, con 0.3% de agar Bacteriológico). Para evitar la acidificación del medio se incorporó durante su preparación la punta de una espátula de carbonato de calcio ($CaCO_3$), como agente neutralizante.

5.6 Tipificación molecular de colonias aisladas por medio de la técnica de Análisis de Restricción de ADNr (ARDRA)

I. Lisis Celular

Las colonias aisladas se cultivaron en 5 mL en caldo APT con 20% de sacarosa en tubos de 13x100 mm, incubándose durante 24–48 hrs a 30°C. Se transfirieron 1.5 mL de cultivo a un tubo eppendorf, para lisarlas, por una modificación del protocolo reportado por Smit, *et al* 2000, esta metodología fue reportada como una alternativa de lisis eficiente para bacterias Gram–positivas y Gram–negativas

1. Centrifugar 1 min a 12000rpm (Centrifuge 5410 Eppendorf) eliminar el sobrenadante
2. Añadir 150 µL de **Solución SET** (TRIS HCl 0.05M, EDTA 0.05M pH=8 + sacarosa al 8%) Mezclar en vortex hasta que se resuspenda el pellet.
3. Añadir 150 de solución lisis Hidróxido de Sodio (NaOH) al 0.4 N y docecil sulfato de sodio (SDS) al 2%,(1:1) agitar por inversión.
4. Incubar 15 min en ebullición
5. Centrifugar (15 min a 12000 rpm,) guardar el sobrenadante a –20°C.

II. Amplificación de los genes que codifican los ARNr16s (ADN16s) por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa

Un µL del extracto celular fue utilizado como templado para la amplificación por PCR de los ADNr16s.

La mezcla y condiciones de reacción fueron las citadas a continuación. (Escalante, *et al* 2004)

Templado	1 µL
Buffer 10x (B9004S Biolabs)	5 µL
dnTP´s (200 µM)	1 µL
Primer Fw (EU530F)	0.5 µM
Primer Rv (EU1449R)	0.5 µM
Enzima Vent DNA polimerasa Biolabs	0.5 µL
H ₂ O mQ	17.5 µL
Volumen final de reacción	= 25 µL

La mezcla de reacción se colocó en un tubo de 0.2 mL y se realizó la amplificación en un termociclador *GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer*, bajo las siguientes condiciones.

ETAPA	CONDICIONES	No. CICLOS
Desnaturalización	T = 95°C, t= 10 min	1 ciclo
Amplificación	1. T = 95°C, t= 1 min	30 ciclos
	2. T = 42°C, t= 1 min	
	3. T = 72 °C, t = 1.5 min	
	T = 72 °C, t = 1.5 min	1 ciclo

El par de primers utilizados, **EU530F** (5 '-TGA-CTG-ACT-GAG-TGC-CAG-CAG-CCG-CGG-3') y **EU1449R** (5 '-TGA-CTG-ACT-GAG-GCT-ACC-TTG-TTA-CGA-CCT-3') permiten la amplificación de un fragmento de ADN correspondiente a 1000 pares de bases (pb) de los ADNr16s, son universales para Eubacterias (Borneman, *et al* 1996).

De cada tubo de reacción se tomaron 4 µL y se analizaron por electrofóresis en gel (agarosa al 1.2% con 4 µL de Bromuro de Etidio) en buffer TBE 1X a 130 Volts, utilizando un marcador de peso molecular de 1Kb para evaluar la presencia de una banda de 1kb, el gel se visualizó en un analizador de imágenes *Eagle Eye II, (Stratagene)*.

III. Tipificación molecular por la técnica de ARDRA.

Se tomaron 4 µL del producto de PCR del ADNr16s, para digerirse con la enzima de restricción ***Hae III*** (Biolabs) a 37°C durante 2 hrs.

La mezcla y condiciones de reacción fueron las citadas a continuación (*Escalante, et al 2004*).

DNA 16S (PCR)	4 μ L
Buffer NE2	2 μ L
Enzima <i>Hae III</i>	0.3 μ L
H ₂ O mQ	13.3 μ L

Volumen final de reacción = 20 μ L

La reacción de digestión se analizó por electroforesis en gel (Agarosa al 2.5% con 4 μ L de Bromuro de Etidio) y buffer TBE a 100 Volts, utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb. Los perfiles de restricción fueron visualizados en *Eagle Eye II, Stratagene*, identificándose aquellos perfiles únicos de restricción.

5.7 Identificación mediante la comparación de secuencias de ADNr 16S de los aislados.

Se realizó una amplificación por PCR, utilizando como templado 1 μ L del producto de PCR previamente obtenido de las colonias seleccionadas de cada grupo ARDRA y que se identificó como aislado único, bajo las mismas condiciones de reacción, cambiando únicamente el volumen final a 50 μ L. Después de visualizar el gel, se purificó el producto de PCR utilizando un Kit Marligen Biosciences Inc.

La mezcla de reacción para la secuenciación y la reacción se preparó en tubos de 0.2 mL, en las proporciones que se describen a continuación.

ADN purificado	2 μ L
Primer Fw (EU530F) 10 pM	1 μ L
H ₂ O mQ	13 μ L

Volumen final de reacción = 16 μ L

La reacción de secuenciación se realizó con un kit Big Dye Terminator v 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing las reacciones fueron analizadas en un equipo DNA Analyzer, ABI PRISM 3700 en la **Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT.**

Las secuencias fueron visualizadas en el programa Bioedit y la identidad se obtuvo por comparación contra las secuencias de ADNr 16S o ARNr 16S depositadas en la base de datos del Genbank, utilizando la aplicación en línea BLAST en www.ncbi.nlm.nih.gov

5.8 Construcción del Árbol filogenético con las secuencias únicas.

Se formó un archivo con las secuencias encontradas y las secuencias de referencia reportadas en la base de datos del Genbank, dichas secuencias se alinearon en el programa Clustal W (Thompson, *et al* 1994). Se obtuvo un archivo que se analizó con el programa Phylip 3.66 (Felsenstein, 1989). La metodología que se siguió fue:

1. Se generaron 100 réplicas del archivo de alineación (bootstrapping) con la aplicación secboot.exe.
2. El archivo con las 100 réplicas se utilizó para generar una matriz de distancia con la aplicación dnadist.exe con el algoritmo de Jukes-Cantor.
3. Se construyó un árbol filogenético utilizando el algoritmo de neighbor-joining, por medio de la aplicación neighbor.exe. Se definió como grupo externo la secuencia de *Sulfolobus acidocaldarius* introduciendo aleatoriamente las secuencias.
4. El archivo de salida de neighbor-joining (outtree) fue utilizado para alimentar la aplicación consense.exe para obtener un árbol consenso de las 100 réplicas generadas.
5. El árbol consenso (outtree cons) fue visualizado en el programa Treeview (Page, 1996).

5.9 Conservación de aislados de interés identificados

Aquellas colonias identificadas como únicas se les realizó un cultivo en 5 mL de caldo APT + sacarosa al 20% en tubos de 13x100 mm, incubándose 24-48 hrs a 30°C. En condiciones asépticas y por duplicado, se tomó 1 mL del cultivo de cada colonia y se transfirió a un criovial (Corning) al cual se añadió previamente 1 mL de glicerol al 50% (estéril), la mezcla se homogeneizó y se congeló en hielo seco, los crioviales se conservaron en un ultracongelador REVCO a -70°C.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cuantificación de bacterias lácticas, carbohidratos y productos de fermentación.

6.1.1 Aguamiel

La cuenta en el agar APT para el aguamiel (AM) fue de 32×10^7 UFC/mL, esto indica la presencia de un número muy importante de bacterias lácticas en la savia. El aguamiel, es la savia del maguey utilizada como materia prima para el desarrollo de la fermentación del pulque. La composición química encontrada en este sustrato se muestra en la Tabla 1. Como resultado del análisis por HPLC de la cantidad de azúcares detectada en este sustrato (Tabla 8), se observó que la fructosa es el azúcar más abundante, seguido de la glucosa y sacarosa.

Los resultados de la cuantificación de productos de fermentación (etanol, ácido láctico y ácido acético), indican un cierto grado de fermentación (Tabla 8). En el presente trabajo se reporta por primera vez la cuenta total de bacterias lácticas, investigaciones previas indican que el aguamiel contiene de 7 a 14% de azúcares (glucosa, sacarosa, bajas concentraciones de gomas y manitol), la concentración inicial de sacarosa (5–11%), contenido alcohólico 3% y la acidez (ácido láctico y acético) fluctúa entre 0.1% y 2% (Coppola, 1933; Martinez, 2003).

Cuando el maguey es manipulado para obtener el aguamiel, la savia se acumula en el mezontete, bajo estas condiciones es posible que los microorganismos asociados al equipo, o herramientas utilizadas para realizar la cavidad y sobre todo de aquellos relacionados naturalmente a la planta, puedan crecer en el aguamiel e iniciar la fermentación.

6.1.2 Inicio fermentación (aguamiel e inóculo de pulque)

La inoculación del aguamiel con una muestra de pulque previamente fermentado (MO) presentó una cuenta en el agar APT de 15×10^7 UFC/mL. Se observó una disminución en la concentración de azúcares y un incremento en la concentración de los productos de fermentación comparado con la muestra de aguamiel.

Este resultado, puede atribuirse a un efecto de la dilución del aguamiel con el volumen del pulque en el caso de la disminución de la concentración de azúcares y en la disminución de la cuenta total de bacterias lácticas, mientras que el incremento de los productos de fermentación, se puede explicar como el resultado de la adición de estos compuestos al aguamiel durante la inoculación (Tabla 8).

La fermentación del pulque inicia en el aguamiel como resultado del crecimiento de las bacterias y levaduras presentes en la savia al utilizar los azúcares presentes como fuente de carbono. El proceso es acelerado por la adición de un inóculo, una muestra de pulque previamente fermentada. La duración de la fermentación es variable, pero se reporta en la literatura que el principal criterio para definir que el proceso ha terminado, es el desarrollo de la viscosidad característica de esta bebida fermentada. De acuerdo a lo anterior, los microorganismos presentes en el aguamiel serían los responsables del desarrollo de la fermentación (García-Garibay y López-Munguía, 1993).

En un estudio previo, se reportó la presencia de bacterias lácticas en muestras de pulque de diferente origen, indicando que este grupo microbiano puede tener un papel importante durante el desarrollo de la fermentación (Escalante, *et al* 2004).

Tabla 8. Cuantificación de Azúcares y Productos de Fermentación por HPLC y determinación de cuentas totales.

Parámetro	Aguamiel	Inóculo Pulque + Aguamiel
Temperatura (°C)	17	17
pH	5.96	4.5
Sacarosa (g/L)	9.5613	5.15
Glucosa (g/L)	15.0868	5.5810
Fructosa (g/L)	96.1647	33.9147
Etol (g/L)	0.1060	15.0994
Ácido Láctico (g/L)	1.2801	2.2118
Ácido Acético (g/L)	0.9095	1.0805
Cuenta en APT (UFC/mL)	32 x 10 ⁷	15 x 10 ⁷

6.2 Análisis de las muestras de Aguamiel y al inicio de la fermentación por Micrografía Electrónica de Barrido MEB.

Las figuras 4 y 5 muestran el resultado del análisis por MEB del aguamiel y la muestra inoculada. Es importante señalar que en las fotografías correspondientes al aguamiel se observan en su gran mayoría bacterias, señaladas con flechas negras, mientras que en las fotografías de la muestra inoculada, se observa la presencia prácticamente de los mismos grupos bacterianos (basado en su morfología), pero hay un incremento muy importante en el número de levaduras.

Este resultado indica que las levaduras están prácticamente ausentes en el aguamiel, mientras que en el pulque están en una gran proporción. El análisis visual de las fotografías 4 y 5, permiten observar la presencia de 5 grupos morfológicos en aguamiel y 4 en la muestra después de haber sido inoculada.

Es importante señalar la presencia de cadenas de cocos, con superficie rugosa, lo que indica la posible capacidad productora de polisacáridos extracelulares (Cassani, 1997).

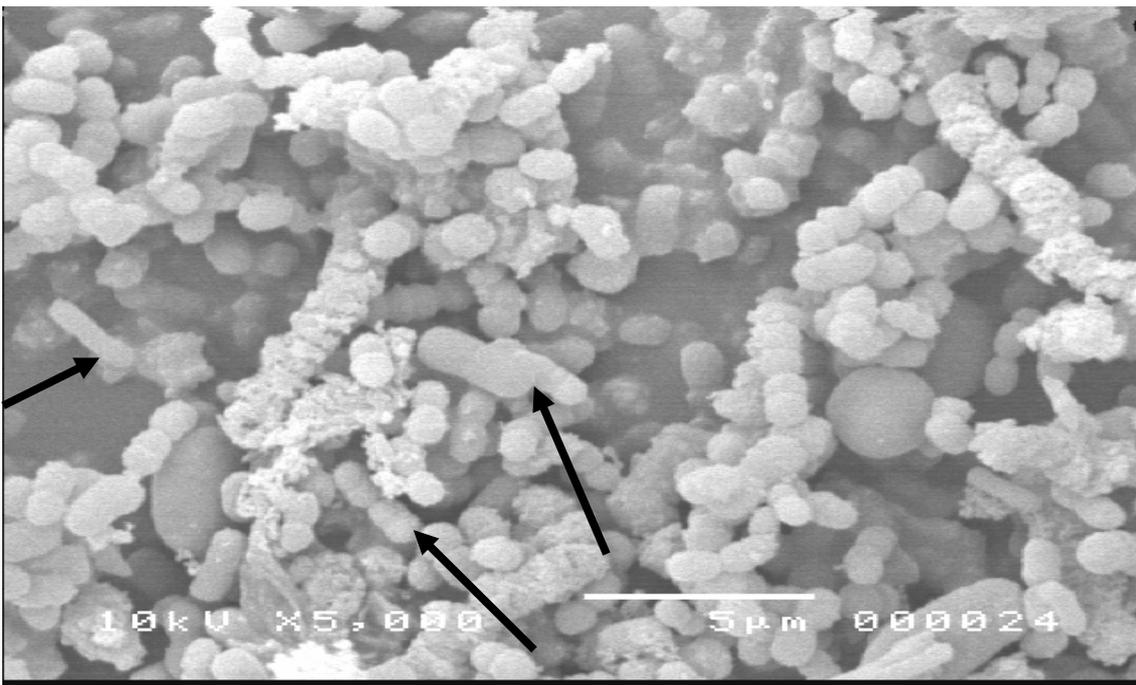
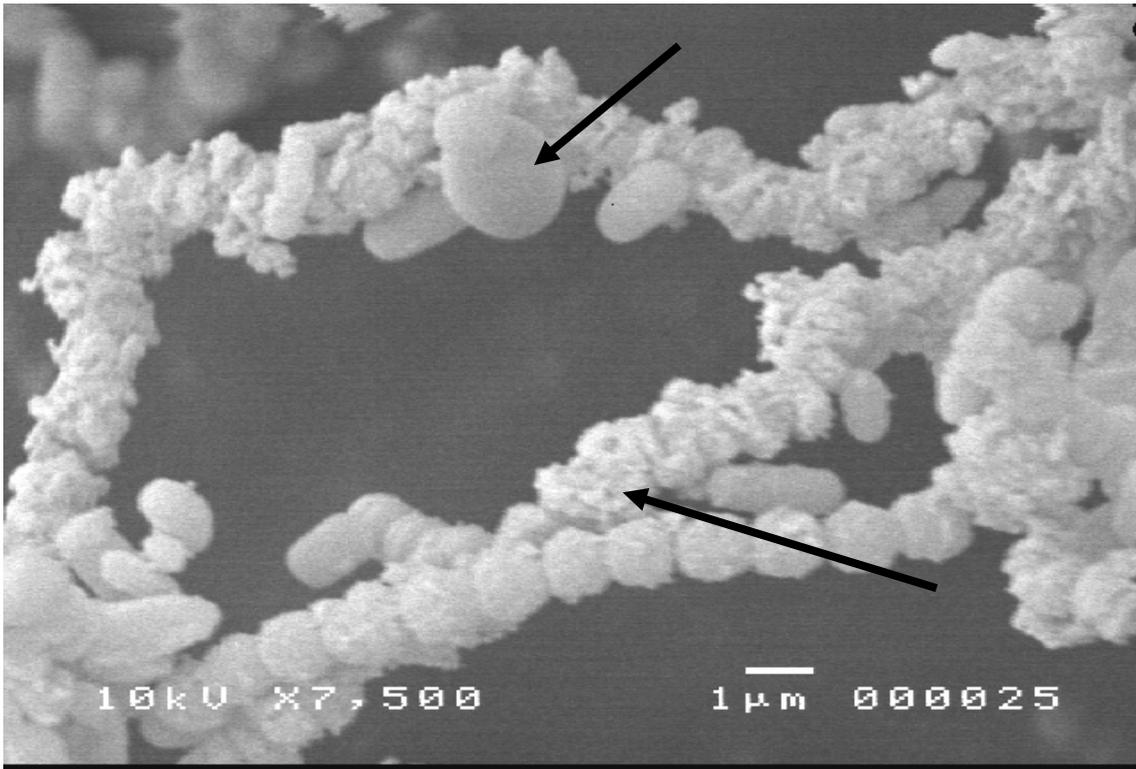


Figura 4. Micrografías Electrónicas de la muestra de Aguamiel, se visualizan 5 microorganismos con morfologías distintas. Las flechas indican la morfología de cada uno de los microorganismos, Levaduras, cocos en cadena, cocos rugosos en cadena, bacilos delgados y grandes.

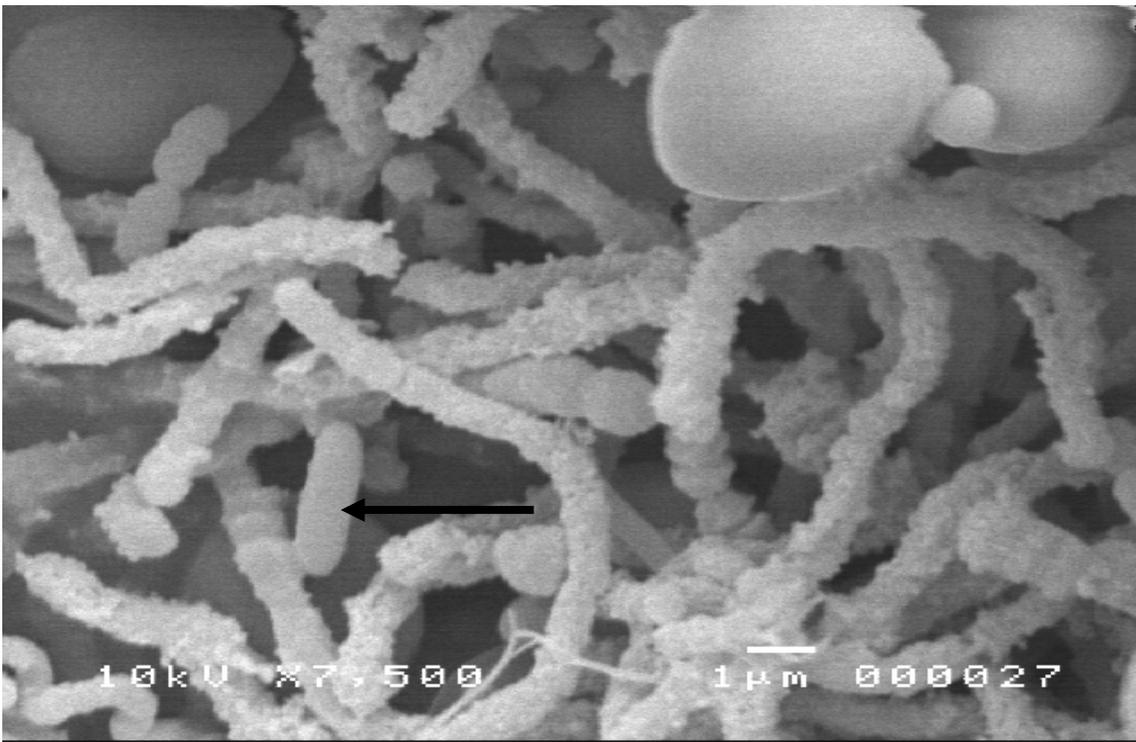
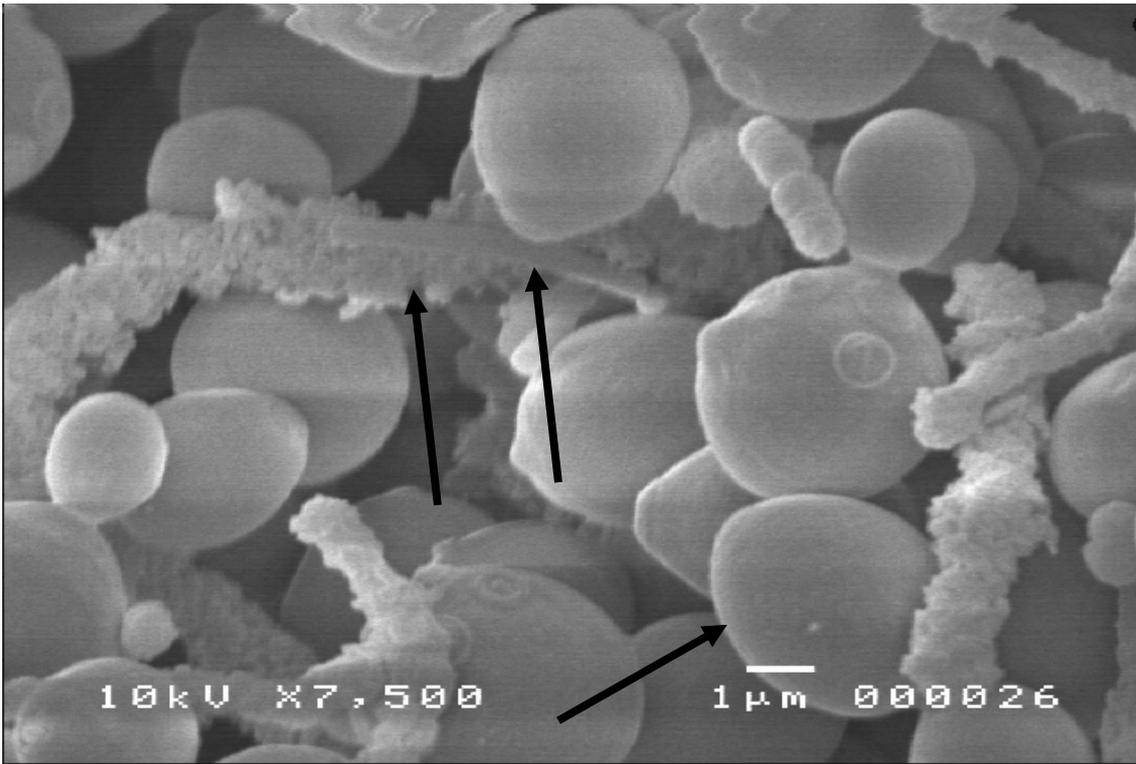


Figura 5. Micrografía Electrónica de la muestra de aguamiel más inoculo de pulque, se visualizan 4 microorganismos con morfologías distintas. Las flechas indican la morfología de cada microorganismo: Levaduras, cocos rugosos en cadena, bacilos delgados y grandes.

6.3 Aislamiento, purificación e identificación por análisis de secuencias de ADNr 16S de bacterias lácticas.

6.3.1 Aguamiel

Durante el aislamiento de bacterias lácticas a partir de la muestra de aguamiel en agar APT, se obtuvieron 80 colonias que fueron evaluadas microscópicamente para verificar su pureza y caracterizadas por la tinción de Gram. Todas las colonias aisladas fueron Gram-positivas, en su mayoría cocos de diferentes tamaños asociados en cadenas. El análisis por ARDRA de estos aislados permitió observar 4 tipos únicos basados en su perfil de restricción (Figura 6). El resultado de la comparación de las secuencias de ADNr 16S de los aislados únicos en la base de datos del GenBank www.ncbi.nlm.nih.gov, permitió identificar las colonias aisladas como *Lactococcus lactis cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. citreum* y *L. kimchi* (Tabla 9).

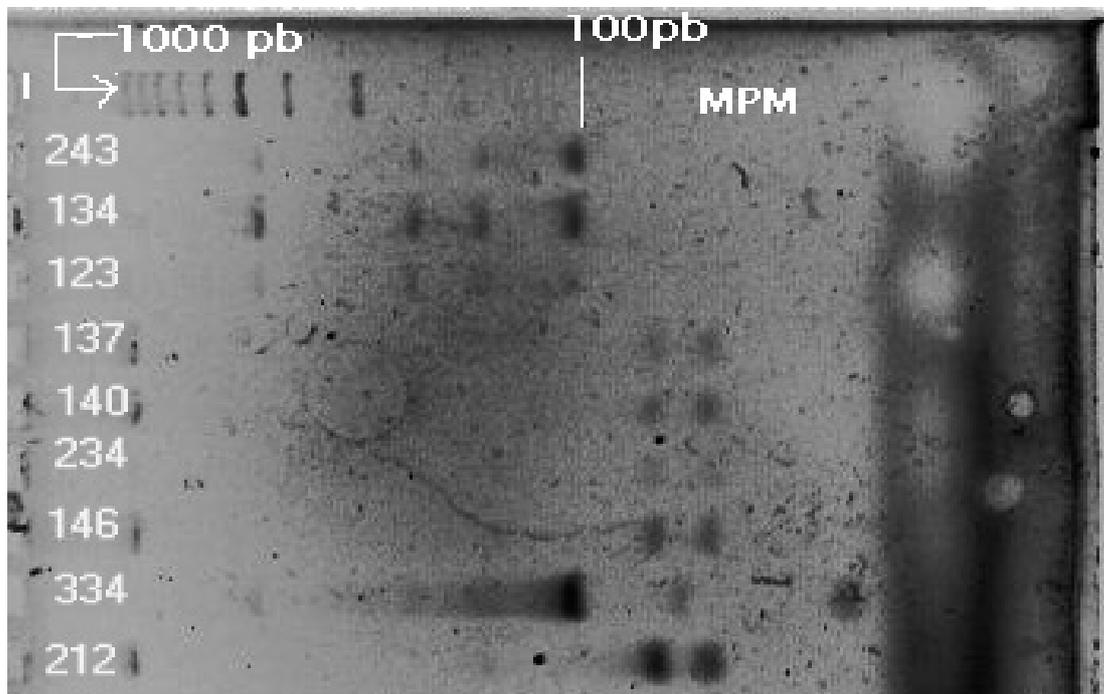


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de digestiones con *Hae III* de ADNr 16S de microorganismos aislados de aguamiel (AM)

Tabla 9. Microorganismos únicos en Aguamiel.

Aislado único ^a	Morfología ^b	Identidad ^c	% Identidad ^c	No. Accesoión ^c
AM123, AM134 y AM243 (9.45%)	Diplococos y estreptococos Ovoides G(+)	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	99%	AY533298
AM212 (20.27%)	Diplococos y estreptococos G (+)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> LM2	98%	AY675249.1
AM140 y AM137 (56.75%)	Diplococos y estreptococos G (+)	<i>Leuconostoc citreum</i> IH22	98%	AF111949
AM146 y AM234 (13.51%)	Diplococos y estreptococos G (+)	<i>Ln. kimchii</i>	96%	AF173986

^a Basado en ARDRA

^b Observación Microscópica

^c Análisis en Genbank

6.3.2 Inicio fermentación (aguamiel + inóculo de pulque)

Durante el aislamiento de bacterias lácticas a partir de la muestra de aguamiel e inóculo de pulque en agar APT, se obtuvieron 70 colonias a las que se les verificó su pureza y se les realizó un análisis por ARDRA. La figura 7 muestra los perfiles de ARDRA de los aislados correspondientes a la muestra de aguamiel inoculada con pulque fermentado. A partir de esta muestra solo fueron identificados 3 tipos únicos; la colonia AM212, se visualiza en la figura 6.

La Tabla 10 presenta los microorganismos aislados a partir de esta muestra, se identificaron 4 especies.

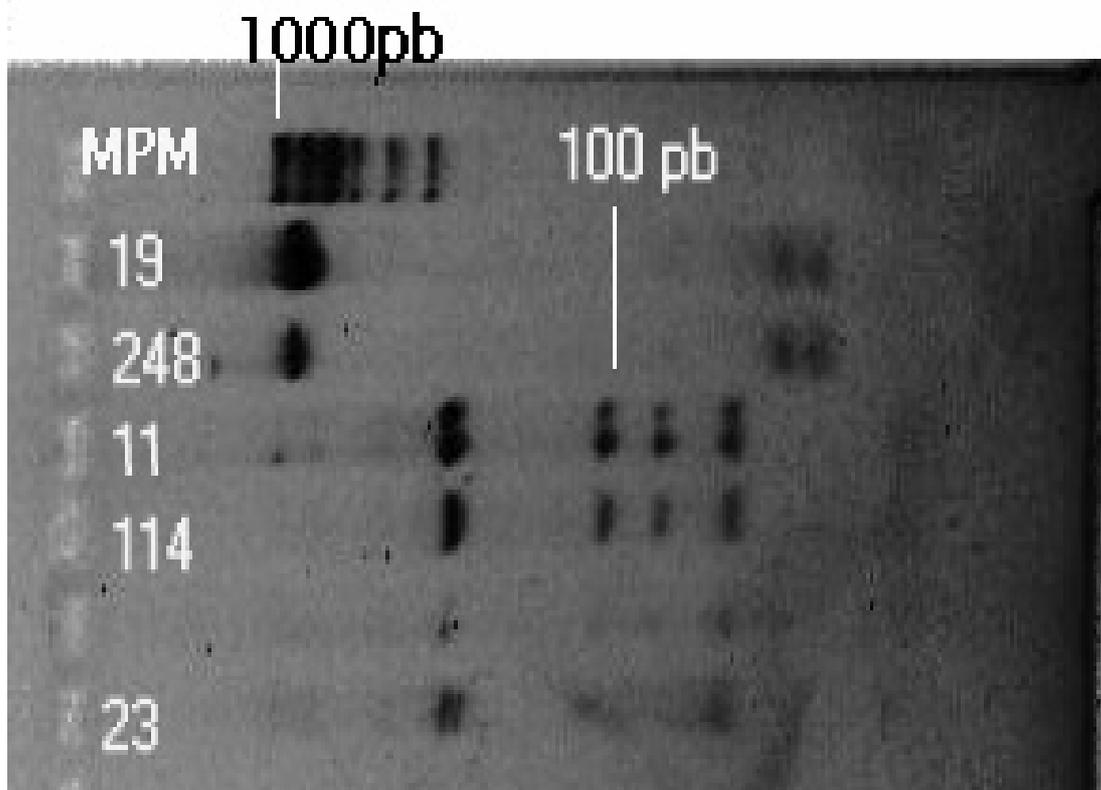


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de digestiones con *Hae III* de ADNr 16S de microorganismos aislados únicos del inicio de la fermentación (MO)

Tabla 10. Microorganismos únicos al inicio de la fermentación del pulque.

Aislado único ^a	Morfología ^b	Identidad ^c	% Identidad ^c	No. Accesoión ^c
MO11 y MO114 (3.22%)	Diplococos y estreptococos ovoides G (+)	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	99%	AY533298
AM212 (53.23%)	Diplococos y estreptococos G (+)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> LM2	98%	AY675249.1
MO19 y MO248 (35.49%)	Diplococos y estreptococos ovoides G (+)	<i>Leuconostoc citreum</i> IH22	99%	AF111949
MO23 (3.22%)	Bacilo medio G (+)	<i>Bacillus licheniformis</i> FO-074b	99%	AF234859

^a Basado en ARDRA

^b Observación Microscópica

^c Análisis en Genbank

De acuerdo a los resultados obtenidos, se detectaron solamente 4 bacterias lácticas: *L. mesenteroides*, *L. citreum*, *L. lactis cremoris* y *L. kimchii*. *Bacillus licheniformis* que no es una bacteria láctica se supone proviene de una contaminación externa a la fermentación y es el único microorganismo “aportado” por la inoculación con una muestra de pulque fermentada ya que *L. mesenteroides*, *L. citreum* y *L. lactis cremoris* se detectaron previamente en aguamiel.

Las bacterias lácticas encontradas tanto en aguamiel como al inicio de la fermentación del pulque tienen en común ser cocos Gram-positivas, anaerobios facultativos, catalasa negativa; todas con excepción de *L. lactis* son heterofermentativas y en particular *L. mesenteroides* se reporta en todas las investigaciones anteriores del pulque como la responsable de la viscosidad característica de esta bebida (Sánchez Marroquin y Hope, 1953). Es posible que la morfología de cadenas observadas con una superficie rugosa en las micrografías de MEB, pudieron corresponder a este microorganismo.

Leuconostoc citreum es un coco, anaerobio facultativo que descompone el citrato en diacetilo y acetoína, produciendo un pigmento amarillo limón, cuando se cultiva con sacarosa, puede producir también el polisacárido dextrina y en presencia de fructosa produce otros polímeros como la levana, no produce dextranas (Holt, *et al* 1994; Madigan, 1999; Choi, *et al* 2003).

Leuconostoc kimchii es un coco anaerobio facultativo que puede presentarse solo o en pares, produce dextrina a partir de sacarosa y gas a partir de glucosa. Además produce ácido láctico a partir de glucosa, lactosa, arabinosa, entre otros azúcares (Kim, *et al* 2000).

El pH de las muestras de AM y MO fue de 5.9 y 4.5, respectivamente, se ha reportado que los microorganismos del género *Leuconostoc* en general requieren un pH neutro o ligeramente ácido comparado con otras bacterias lácticas. Es posible que esta condición ambiental restrinja el crecimiento de lactobacilos en el inicio de la fermentación, ya que estos microorganismos no fueron detectados en las muestras analizadas, pero si fueron aislados en estudios complementarios a partir de las tres horas de fermentación (resultados no mostrados).

Lactococcus lactis cremoris es una bacteria con metabolismo homofermentativo anaerobio facultativo, que convierte el 95% de la glucosa a lactato por medio de la lactato deshidrogenasa (Neves, *et al*/ 2005).

Bacillus licheniformis es una bacteria Gram-positiva, mesófila, fermentativa que hidroliza caseína y almidón, produce esporas ovoides cilíndricas con pared delgada. Sus habitats principales son leche, harina, yogurt, queso y gelatina. La presencia de este microorganismo en el pulque se puede atribuir a una posible contaminación durante alguna etapa del proceso de elaboración (colecta, extracción de aguamiel o transporte). Es considerado como GRAS (según la Administración de Alimentos y Drogas generalmente reconocido como seguro) aunque también se considera potencialmente patógeno para los seres humanos y se ha encontrado como contaminante en varios procesos industriales. Estos microorganismos son capaces de sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y secado (De Clerck y De Vos, 2004).

En general, las bacterias lácticas disminuyen el rendimiento de la producción de etanol en las fermentaciones alcohólicas donde el microorganismo principal y responsable de la producción de etanol es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que las primeras compiten con ésta por los azúcares disueltos en el medio para crecer y obtener energía produciendo ácido láctico. Su crecimiento es mayor ya que utilizan factores de crecimiento que las levaduras excretan al crecer.

La concentración final de etanol o el rendimiento final también se ve afectado, porque las bacterias lácticas al ser microorganismos exigentes requieren factores de crecimiento como vitaminas. En el caso de la biotina, tanto las bacterias lácticas como las levaduras la requieren, por lo tanto como las bacterias crecen más rápido consumen estos factores y en consecuencia disminuye el crecimiento de las levaduras y sus funciones catalíticas. La disminución en el rendimiento de etanol, al final de la fermentación establece una relación directamente proporcional a la concentración inicial de bacterias lácticas en el sustrato (Narendranath, *et al*/1997).

La función principal de las bacterias lácticas en las fermentaciones alcohólicas es dar características de sabor y cuerpo por los productos finales de su metabolismo. En algunos casos estas características son las ideales y en otros se les consideran como contaminación (Topisirovic, *et al* 2006)

En el presente trabajo las concentraciones de ácido láctico encontradas en el aguamiel y en la muestra de aguamiel más inóculo de pulque se atribuyen al metabolismo fermentativo de *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. citreum* y *L. kimchii*, mientras que la concentración de etanol y ácido acético se atribuyen a las mencionadas anteriormente excepto *Lactococcus lactis*, por tener esta última un metabolismo homofermentativo (Kim, *et al* 2000; Choi, *et al* 2003; Neves, *et al* 2005).

Tradicionalmente las bacterias reportadas en el pulque han sido *Leuconostoc mesenteroides* (bacteria láctica) y *Zymomonas mobilis* (α -proteobacteria) (Sánchez-Marroquín y Hope, 1953; Godoy, 1987; García-Garibay y López-Munguía, 1993).

Los métodos que dependen de un cultivo previo, subestiman la diversidad bacteriana en una comunidad, particularmente en ambientes complejos como bebidas y alimentos fermentados (Van Beek y Priest, 2002). Además los métodos de caracterización fenotípica clásicos, es decir, pruebas bioquímicas son menos confiables, por esto se han desarrollado técnicas moleculares como PCR utilizando primers específicos para cada especie que son más confiables y rápidos, aún cuando se traten de poblaciones mixtas en una muestra (Lee, *et al* 2000).

Ya que en el presente estudio se partió de una selección al azar de colonias desarrolladas en un medio de cultivo es posible que no se haya tomado la diversidad total del grupo en estudio.

La técnica de ARDRA ha demostrado que el uso de patrones de bandeo a partir de muestras aisladas o ADNr 16S amplificados y clonados, puede ser utilizado para comparar la estructura en una comunidad bacteriana presente en un ambiente enriquecido en este caso, como el pulque (Tiedje, *et al* 1999). El uso de esta técnica para el análisis de bacterias

lácticas a partir del aguamiel y pulque permitió realizar una discriminación rápida de tipos morfológicos similares. La posterior identificación de estos tipos genéticos únicos permitió obtener la identidad de estos aislados.

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas y la construcción de un árbol con las secuencias de referencia depositadas en la base de datos del genbank, permitió corroborar la filiación taxonómica de los aislados únicos (Figura 8).

La combinación de técnicas tradicionales de cultivo y el análisis por ARDRA de los aislados permitió la identificación y detección de las bacterias lácticas *Leuconostoc mesenteroides*, *L. kimchii*, *L. citreum*, *Lactococcus lactis cremoris* y *Bacillus licheniformis*. De estos microorganismos; *L. kimchii*, *L. citreum*, *Lactococcus lactis cremoris* y *Bacillus licheniformis* se reportan por primera vez en el pulque.

La fermentación del pulque se inicia con las bacterias presentes en el aguamiel que son *Leuconostoc mesenteroides*, *L. kimchii*, *L. citreum*, y *Lactococcus lactis cremoris*, en el inóculo ya no se detectó la presencia de *L. kimchii* y se encontró otra bacteria *Bacillus licheniformis*.

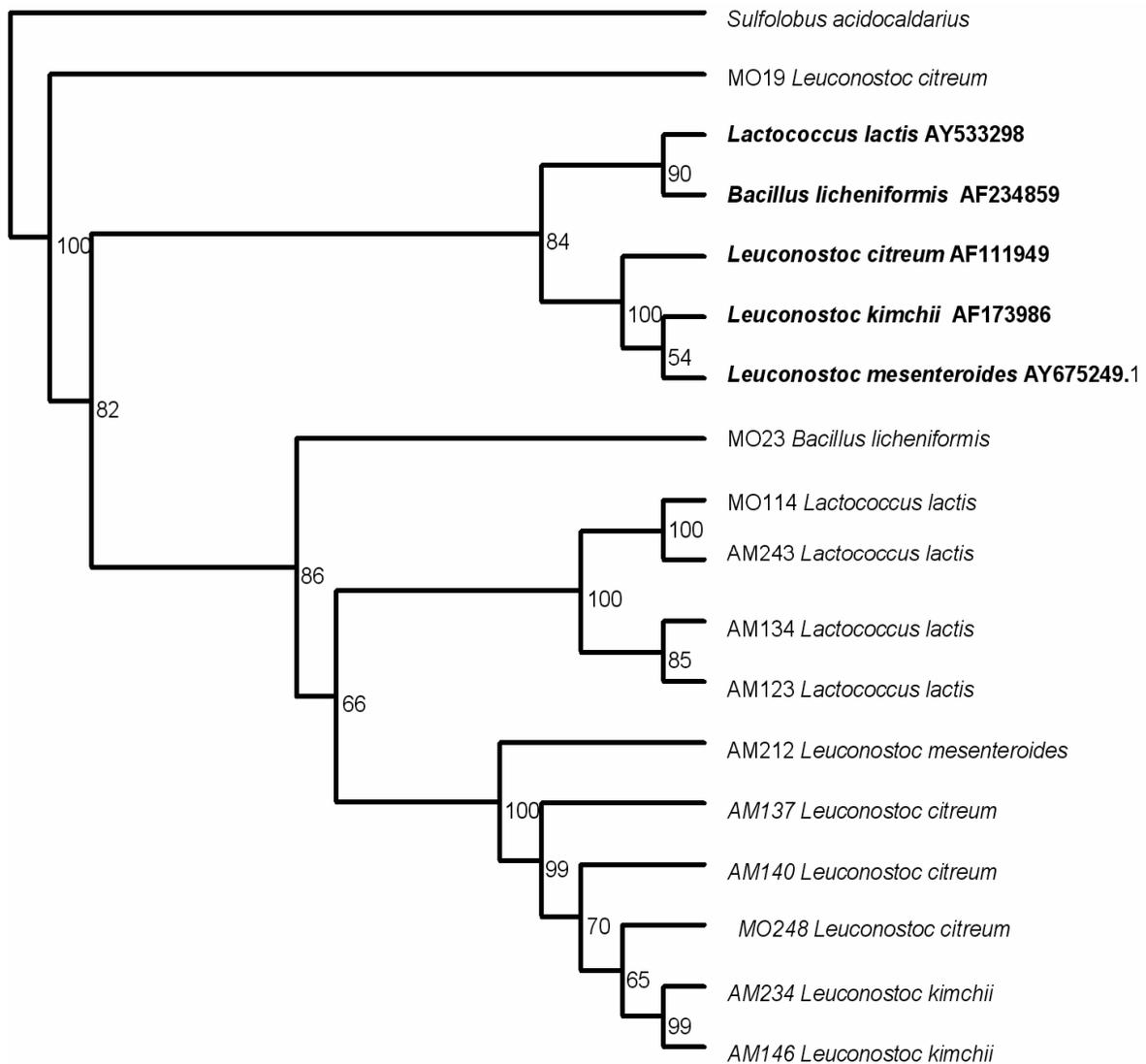


Figura 8. Árbol filogenético de las secuencias parciales de ADNr 16S del aguamiel y la muestra al momento de la inoculación y las secuencias parciales de ADNr 16S o ARNr 16S de los vecinos más cercanos de bacterias identificadas en el banco de datos del NCBI. Se indican los números de Acceso de las secuencias de referencia. El grupo externo es la secuencia de ADNr 16S de *Sulfolobus acidocaldarius*. Las secuencias encontradas se anteceden por la clave de la muestra a la que pertenecen, AM (aguamiel) y MO (momento de inoculación con pulque). Se hizo bootstrapping con secboot.exe, la matriz de distancia se realizó con la aplicación dnadist.exe con el algoritmo Jukes-Cantor.

7. CONCLUSIONES

Se determinaron las cuentas viables de bacterias lácticas en el medio APT, encontrándose tanto en aguamiel como en el momento de la inoculación con pulque en el orden de 10^7 UFC/ml.

Del aguamiel y del inicio de la fermentación del pulque se caracterizaron las bacterias lácticas por técnicas de cultivo y tipificación molecular; encontrándose en total 4 tipos diferentes de lácticas, *Lactococcus lactis cremoris*, *Leuconostoc kimchii*, *L. citreum*, *L. mesenteroides* y *Bacillus licheniformis*, que no pertenece a este grupo y se atribuye a una contaminación. Reportándose por primera vez en el pulque a; *Leuconostoc kimchii*, *L. citreum*, *Lactococcus lactis cremoris* y *Bacillus licheniformis*.

Por primera vez se caracterizaron bacterias lácticas tanto en las etapas iniciales de la fermentación del pulque como en el sustrato (aguamiel).

Como resultado del análisis por MEB, se obtuvieron por primera vez imágenes microscópicas del aguamiel y de la muestra al momento de la inoculación con pulque.

8. PERSPECTIVAS

Analizar muestras de pulque de diferentes localidades que sean importantes productores de pulque a nivel nacional, para así conocer la diversidad de bacterias lácticas presentes en el aguamiel y en el transcurso de la fermentación, hasta la obtención del pulque.

Realizar cultivos con cada una de las cepas aisladas para determinar el tipo de productos de fermentación producidos a partir de las fuentes de carbono presentes en el aguamiel.

Buscar otros microorganismos no reportados con actividades enzimáticas importantes, fuera del grupo de bacterias lácticas.

Realizar un análisis con microscopía electrónica de barrido a una mezcla de los cultivos aislados, para visualizar las distintas morfologías y hacer un estudio similar a éste, asignando una identidad a cada morfología observada en las micrografías de aguamiel y al inicio de la fermentación.

APÉNDICE

Medios de cultivo

* Caldo APT (DIFCO)	g / L
Extracto de Levadura	7.5
Caseína (digerido pancreático)	12.5
Dextrosa	10
Citrato de Sodio	5
Tiamina	0.001
Cloruro de Sodio	5
Fosfato dipotásico	5
Cloruro de Manganeso	0.14
Sulfato de Magnesio	0.8
Sulfato Ferroso	0.04
Polisorbato 80	0.2
pH = 6.7 +/- 0.2	

Se esterilizó en autoclave a 121°, 15 lb/plg² durante 15 minutos. Cuidando de que el medio no caramelizará por la adición de Sacarosa al 10%.

Tinción de Gram

1. Limpiar portaobjetos y en condiciones asépticas poner una gota de agua con el asa microbiológica.
2. Preparar un frotis tomando una asada de la colonia aislada y colocarla en la gota de agua, extendiéndola en el portaobjetos.
3. Fijar el frotis pasando tres veces por el mechero
4. Poner una gota de colorante cristal violeta para Gram sobre el frotis, dejarlo actuar 1 min. y enjuagar con agua destilada.
5. Poner una gota de lugol, dejarlo actuar 1 min. y enjuagar.
6. Poner tres gotas de solución alcohol-acetona para Gram.
7. Poner una gota del colorante de contraste Safranina y dejarlo actuar 1 min., enjuagar y esperar a que se seque.

8. Observar con objetivo de inmersión en el microscopio electrónico añadiendo aceite de inmersión.

PCR reacción en cadena de la polimerasa

Este método se basa en la amplificación de un segmento de ADN utilizando una ADN polimerasa termoestable (p.e Taq Pol, Vent polimerasa, Elongasa, etc.) y oligonucleótidos (*primers*) que hibridan con la cadena complementaria a la secuencia a amplificar (templado), para obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo teóricamente de una sola copia. Hay tres pasos fundamentales en la reacción de PCR, descritos a continuación.

Pasos: 1. Desnaturalización: la doble hebra del ADN es separada al calentar entre (91–95) °C. Esta temperatura no daña a la enzima.

2. A continuación se producirá la **hibridación de los oligonucleótidos (*primers*) con el templado**. Para esto es necesario que la temperatura descienda hasta un valor que es específico para cada par de *primers* a utilizar (según sea el caso entre 42°C y 65°C). Estos *primers* actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada

3. Extensión: La temperatura se eleva a 72°C, que es la temperatura óptima de extensión de la mayoría de las polimerasas en una reacción de PCR. La polimerasa produce hebras de ADN complementarias comenzando por los primers. La extensión tiene una velocidad en promedio de 1000 bases/minuto.

Al término del primer ciclo se obtiene dos hebras dobles de ADN de cada una con las que comenzamos el PCR, una de estas hebras pertenece al templado original y la otra es sintetizada durante la reacción (Dale y Von Schantz, 2002).

Al final de la reacción, se obtienen aproximadamente 1×10^9 hebras dobles de ADN.

BIBLIOGRAFÍA

Bu'lock, J. (1991). Biotecnología básica. Editorial Acribia, España, Pág. 36

Boone, R., Castenholz, R. (Eds.) (2001). Bergey's Manual of systematic bacteriology, 2ª edición, Editorial Springer, USA, Vol. 1 pág. 148-150,153,163

Borneman, J., Skroch, P.W, (1996). Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. Applied and Environmental Microbiology. 62:1935-1943

Brechtel, P., (1948). Contribución al estudio de las bacterias que viven en aguamiel y pulque. Tesis de Licenciatura Biólogo, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F. 50 Pág.

Bruns, M., Buckley, D. (2002). Isolation and purification of microbial community nucleic acids from environmental samples. en Hurst, C. (ed) Manual of Environmental Microbiology. 2ª Edición, ASM Press, USA. Pág.: 564- 568

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

Cassani, J., (1997). Estudio de la producción de polisacáridos de *Leuconostoc mesenteroides*. Tesis de Maestría, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM. 54 Pág.

Choi, I., Jung, S., Kim, B., Park, S., (2003). Novel *Leuconostoc citreum* starter culture system for the fermentation of kimchii a fermented cabbage product. Antonie van Leeuwenhoek. 84:247-253.

Coppola, P., (1933). Investigación del ácido láctico en el pulque. Tesis de Licenciatura Químico Fármaco Biólogo, Facultad de Química, UNAM, México, D. F. 15 Pág.

Dale, J., Von Schantz, M. (2002). From genes to genomes: Concepts and Applications of DNA Technology. Editorial John Wiley & Sons. USA

De Clerk, E., De Vos, P., (2004) Genotypic diversity among *Bacillus licheniformis* strains from various sources. FEMS Microbiology Letters. **231**:91–98

Escalante, A., Rodriguez, M.E., Martínez A., López–Munguía, A., Bolivar, F., Gosset, G. (2004). Characterization of bacteria diversity in Pulque a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. FEMS Microbiology Letters. **235**:273–279.

Felsenstein, J. (1989). PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). Cladistics **5**: 164–166.

García–Garibay, M., López–Munguía, A., (1993). Bebidas alcohólicas no destiladas. En: García–Garibay, M., Quintero, R., López–Munguía, A., (Eds.) Biotecnología Alimentaria, 1ª Edición, Limusa, España. Pág.: 301–306

Godoy, A. (1987). Recopilación bibliográfica sobre aspectos: histórico, etnobiológico, microbiológico y químico de bebidas alcohólicas no destiladas, indígenas de México. Tesis de Licenciatura Biólogo, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F.

Hébert, E., Raya, R., (2004). Nutritional Requirements of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* in a Chemically Defined Medium. Current Microbiology. **49**: 341–345.

Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J., William, S., (Eds.) (1994). Bergey's Manual of systematic bacteriology. 9ª edición, Library of Congress, USA. Pág. 528–533, 541,567

Kim, J., Chun, J., Han, H.U., (2000). *Leuconostoc kimchii*. sp. nov., a new species from kimchii. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **50**: 1915–1919

Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J., (2004). Methods of studying soil microbial diversity. Journal of Microbiological Methods. **58**:169–188

Lappe, P., Ulloa, M., (1993). Alimentos Fermentados Indígenas de México. 1ª Edición, UNAM, México, D. F. Pág.: 75–80

Lee, H., Young. S., Park, S. Y., (2000). Multiplex PCR-based detection and identification of *Leuconostoc* species. FEMS Microbiology Letters. **193**:243–247.

Madigan, M.T., (1999). Brock Biología de los Microorganismos. 8ª Edición, Prentice Hall, España. Pág: 15,78, 116,514, 456, 718–722

Martínez, M., (2003). Producción de etanol por *Zymomonas mobilis* a partir de aguamiel. Tesis de Licenciatura, Químico en Alimentos, Facultad de Química, UNAM, México, D. F. 62 Pág.

Martínez Del Campo, M.G., (1999). Determinación cuantitativa e hidrólisis de inulina en aguamiel de agave pulque, *agave atrovirens*. Tesis de Licenciatura, Química en Alimentos, Facultad de Química, UNAM, México, D. F. 92 Pág.

Monroy, E., (1951). Contribución al estudio de bacterias gram–negativas en aguamiel y pulque. Tesis de Licenciatura, Biólogo, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F. 40 Pág.

Narendranath, N., Hynes, S., Thomas, K. C., Ingledew, W., (1997). Effects of Lactobacilli on Yeast–catalized Ethanol Fermentations. Applied and Environmental Microbiology. **63**:4168–4153

Neves, A., Pool, W., Kok, J., Kuipers, O., Santos, H., (2005). Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* - The input from in vivo NMR. FEMS Microbiology Letters. **29**:531–554

Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences. **12**: 357–358

Pepper, I., Dowd, S., (2002). PCR Applications for Plant and Soil Microbes, en Hurst, C. (Eds.) Manual of Environmental Microbiology. 2^a Ed. ASM Press, USA. Pág. 573

Ranjard, L., Poly, F., Nazaret, S., (2000). Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. Research Microbiology **151**: 167–177

Rivera, A. (1964). Algunos aspectos bioquímicos de *Zymomonas mobilis*. Tesis Licenciatura Químico Fármaco Biólogo, Facultad de Química, UNAM. México D. F. 49 Pág.

Ross, R. P., Morgan, S. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. International Journal of Food Microbiology. **79**:3–16

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

Simpson, K.L., Petterson, B., Priest, F., (2001). Characterization of lactobacilli from scotch malt whisky distilleries and description of *Lactobacillus feintoshens* sp. nov., a new species isolated from malt whisky fermentations. Microbiology. **147**:1007–1016

Smit, E., Leeflang, P., Sommans, S., (2001) Seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as

determined by cultivation and molecular tools. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 2284–2291

Sprenger, G. A. (1996). Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis* a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology letters*. **145**:301–307

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

Thompson, J. D., Higgins, D.G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions–specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**:4673–4680

Topisirovic, L., Kojic, M., Fila, D., Golic, N., Strahinic, I., Lozo, J., (2006). Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. Article in press.

Ulloa, M., Herrera, T. (1976). Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche y tepache. *Anales del Instituto de Biología UNAM*. Pág.: 47–53, 145–163

Van Beek, S., Priest, F., (2000). Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation. *Microbiology*. **66**:5322–5328

Van Beek, S., Priest, F., (2002). Evolution of the Lactic Acid Bacterial Community during Malt Whisky Fermentation: a Polyphasic Study. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**:297–305