



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LAS ENTEROBACTERIAS PRESENTES EN EL ATOLE
AGRIO DE VILLAHERMOSA, TABASCO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ALICIA KARINA ESQUIVEL MEDINA



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Olga del Carmen Velázquez Madrazo**

VOCAL: **Profesor: Gloria Díaz Ruiz**

SECRETARIO: **Profesor: Martha Giles Gómez**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Francisco Ruiz Terán**

2° SUPLENTE: **Profesor: María del Carmen Wachter Rodarte**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 324, Edificio "E", Departamento de alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM

Dra. Gloria Díaz Ruiz

Asesor del tema

Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte

Supervisor técnico

Alicia Karina Esquivel Medina

Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quisiera agradecer a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por haber sido mi segunda casa y haberme acogido 4 años y 6 meses maravillosos llenos de sangre, sudor y lágrimas, por enseñarme que con esfuerzo y dedicación se llega al final de la meta.

A la Dra. Gloria Díaz Ruiz por haberme apoyado siempre, por sus consejos, por las pláticas, por la paciencia, por las enseñanzas y sobre todo por confiar en mí y en mi trabajo durante estos dos años... Gracias.

A la Dra. Ma. Del Carmen Wachter Rodarte por los consejos y recomendaciones hechas durante el desarrollo de mi servicio social-estancia estudiantil-tesis.

A las profesoras Dora Centurión y Judith Espinoza por haber sido tan atentas y colaborar en este proyecto junto con su grupo de trabajo de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

A Kati Väkeväinen (Finlandia), Montserrat Nácher, Rosa Aznar, Beatriz Padilla y Carmen Belloch (España) por haberme enseñado las técnicas moleculares aplicadas.

Al Dr. Carlos Eslava y su equipo por haberme ayudado a la realización de la prueba del vitek2®.

A la Biol. Ma. Teresa Flores Espinoza, por los consejos, pláticas, reuniones organizadas y por ser un apoyo incondicional en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio 324: Ricardo (a pesar de todo y por todo), Adalberto, Ana, Anita (por el viaje, el conteo a las 3am y permitirme ayudar con tu trabajo), Andrea, Arely, Bárbara, Bety, Caro, Gris, David Hernández, David Zayas, Isra, Lila, Mariana, Marisol, Nalle, Sandra, Sarah y sobre todo a mi mano izquierda, hombro para llorar y apoyo incondicional: Carlos. Gracias chicos por todo el tiempo juntos, reuniones de cumpleaños, rica comida, pláticas en la campana, por su amistad.

A una parte esencial de este trabajo, ya que sin su presencia no hubiera hecho nada, las bacterias: “He tomado mi gota de agua estéril de la inmensidad de la creación, y la he tomado llena de los elementos convenientes para el desarrollo de seres inferiores. Y espero, observo, inquiere de ella, suplicándole que comience de nuevo para mí el hermoso espectáculo de la primera creación. Pero está muda... muda desde el mismo comienzo de estos experimentos hace varios años; está muda porque la he mantenido alejada de la única cosa que el hombre no puede producir —de los gérmenes que se alimentan en el aire— de la vida, porque la vida es una bacteria y una bacteria es vida.” *Louis Pasteur.*

RECONOCIMIENTOS

Se agradece por el financiamiento al proyecto de Ciencia Básica de CONACYT CB-2008-01 No. 101784 "Metagenómica funcional de alimentos fermentados tradicionales de maíz: Búsqueda de enzimas de interés biotecnológico y estudio de la diversidad microbiana".

DEDICATORIAS

Quisiera dedicar este trabajo en primer lugar a Dios por haberme dado el privilegio de vivir esta vida, por darme todo lo que tengo sin pedir nada a cambio. Por haberme dado el don de la curiosidad, vocación y la constancia necesaria para haber llegado hasta aquí feliz y satisfecha. A la Virgen de Guadalupe y San Judas Tadeo por iluminarme durante los exámenes.

A Salito (mi señor padre) por ser tan buen papá y levantarse conmigo todos los días a las 5:00am, por esperarme a que saliera de clases a las 9:00pm, por presionarme para terminar en tiempo y con buenas calificaciones durante toda mi vida. Porque todo el tiempo has sido un buen ejemplo de honradez, trabajo, esfuerzo.

A mi hermano Pepe, por esperarme "5 minutos" cuando se me hacía tarde, por ser mi compañero y amigo, por las peleas y las pláticas... por los juegos de microempresarios y ampliar mi léxico. Te admiro por tu esfuerzo, porque sabes tus debilidades y aún así de has superado. Te quiero hermanito!

A mis abuelos: Micos y Chucho, porque ustedes son parte de lo que soy, por apoyarme y aguantar frustraciones y estrés... por consentirme y quererme mucho.

A mis tíos: Chuchín y Maggy por traerme insumos para mis clases (litros de leche) y ayudar en las tareas. A mi madrina: Licha, por enseñarme que nunca es tarde para superarse y que nos podemos levantar de cualquier caída, por ser tan valiente a pesar de todo.

A mis primos: Ximena, Pedro, Chuchino y Juan Pablo, por permitirme ser un ejemplo para ustedes, espero nunca defraudarlos y saben que pueden contar conmigo para todo. Aunque no iba a sus fiestas por tener tarea, exámenes, etc.

A Pennylane por haber llegado en el momento adecuado, por la compañía ya que fuiste la única que se desvelaba conmigo, los paseos, por siempre recibirme con un movimiento de cola incomparable y por quererme incondicionalmente.

A mi mejor amigo desde hace 17 años: Miguel, por estar conmigo siempre, por escucharme, darme consejos y cuidarme.

A mis amigos de la macetota... por los juegos, los cumpleaños y pasteles, por la Karifesta y crecer junto conmigo estos casi 5 años.

A mis amigos QA's por estar conmigo en las clases, por trabajar conmigo y enseñarme a trabajar en equipo además por ser buenos amigos y compañeros.

A Rosme, Rosmerita, Rosmery, Rosmita, Rosqui (mi mamá) por ser mi mamá, por darme la vida, por ser mi primer maestra y enseñarme todo lo que sé y soy. Por ser la mejor enfermera, chef, psicóloga, nutrióloga, abogada, piloto, diseñadora, porrista y súper heroína. Por ser mi cómplice y mi mejor amiga. Por ser tan paciente conmigo y aguantar alegrías y tristezas. Por ser la mejor compañera y apoyarme... por despertar todos los días junto conmigo y ser la mejor mamá del mundo. Por los consejos y escuchar mis historias imaginarias y reales, por ser sensata y regañarme cuando lo necesito. Gracias por darme todo tu amor.

*There are places I'll remember
All my life though some have changed
Some forever not for better
Some have gone and some remain
All these places had their moments
With lovers and friends I still can recall
Some are dead and some are living
In my life I've loved them all.*

Lennon/ McCartney



ÍNDICE

ÍNDICE	i
INDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Alimentos fermentados.....	3
2.1.1 Fermentación alcohólica	3
2.1.2 Fermentación láctica	4
2.1.3 Fermentación propiónica.....	6
2.1.4 Fermentación ácido-mixta	7
2.2 Alimentos fermentados a partir de cereales.....	8
2.2.1 Alimentos fermentados a partir de maíz.....	9
2.3 Atole agrio	11
2.4 <i>Enterobacteriaceae</i>	13
2.4.1 Géneros más comunes de Enterobacterias y sus características	17
2.5 Identificación de microorganismos por métodos fenotípicos.....	20
2.5.1 Identificación mediante el sistema API®20E.....	22
2.5.2 Identificación mediante el sistema Vitek2®.....	23
2.6 Identificación de microorganismos por métodos genotípicos.....	24
2.6.1 Perfiles ISR	26
2.6.2 Perfiles RAPD	27
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	30



5. OBJETIVOS	31
5.1 Objetivo general	31
5.2 Objetivos particulares	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1 Diagrama general de trabajo	32
6.2 elaboración del atole agrio	33
6.3 Muestreo y monitoreo del procedimiento para elaborar atole agrio	34
6.3.1 Muestreo de la materia prima para la elaboración del atole agrio	34
6.3.2 Muestreo de la fermentación líquida y sólida del atole agrio	34
6.3.3 Determinación de pH.....	37
6.4 Aislamiento y purificación	37
6.4.1 Aislamiento de enterobacterias	37
6.4.2 Purificación de cepas de enterobacterias	38
6.5 Conservación de las cepas puras	40
6.6 Identificación de las cepas de enterobacterias por métodos fenotípicos	40
6.6.1 Sistema Vitek2®.....	40
6.6.2 Tiras api®20E.....	42
6.7 Identificación de las cepas por métodos genotípicos.....	43
6.7.1 Extracción de ADN	43
6.7.2 Perfiles ISR	45
6.7.3 Perfiles RAPD	48
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
7.1 Muestreo de materias primas y proceso de elaboración.....	51
7.1.1 Materias primas.....	51
7.1.2 Limpieza y desgranado del maíz.....	51
7.1.3 Agua.....	52
7.1.4 Molienda del maíz	53
7.1.5 Fermentación líquida.....	57
7.1.6 Fermentación sólida	61



7.1.7 Seguimiento de pH.....	63
7.1.8 Cocción del atole agrio.....	65
7.1.9 Producto final	66
7.2 Aislamiento de enterobacterias.....	67
7.3 Purificación de las cepas.....	70
7.3.1 Pruebas bioquímicas convencionales.....	74
7.4 Identificación de las cepas por métodos fenotípicos.....	77
7.4.1 Identificación de las enterobacterias por medio del sistema VITEK2®.....	77
7.4.2 Identificación de las enterobacterias por medio de tiras api®20E. Muestreo del 2010.....	81
7.5 Identificación de las cepas por métodos genotípicos.....	85
7.5.1 Extracción de ADN	85
7.5.2 Identificación de las enterobacterias por medio de la obtención de perfiles ISR	89
7.5.3 Identificación de las enterobacterias por medio de la obtención de la prueba RAPD	92
8. CONCLUSIONES.....	98
9. PERSPECTIVAS	99
10. BIBLIOGRAFÍA	100
11. ANEXOS	110
Anexo I: Preparación de los medios de cultivo utilizados para este proyecto.....	110
Anexo II: Tinción de Gram.....	116
Anexo IIIa: Substratos bioquímicos Vitek 2® para las tarjetas GN	117
Anexo IIIb: Pruebas y reacciones de las tiras Api20E®.....	118
Anexo IVa: Reactivos para la extracción de ADN	119
Anexo IVb: Reactivos para el gel de agarosa	119
Anexo V: Glosario de abreviaturas.....	120



INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fermentación homoláctica	4
Figura 2: Fermentación heteroláctica	6
Figura 3: Fermentación propiónica.....	7
Figura 4: Fermentación ácido-mixta	7
Figura 5: Proceso de elaboración de atole agrio.....	12
Figura 6: Filogenia de los seres vivos	13
Figura 7: Estructura de la célula Gram-negativa.....	14
Figura 8: Distribución de los diferentes géneros de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	15
Figura 9: Tira API®20E para la identificación de enterobacterias.....	22
Figura 10: Métodos de evaluación de las comunidades microbianas de los alimentos.....	25
Figura 12: Metodología general llevada a cabo para el estudio.....	32
Figura 20: Molino utilizado para moler maíz	54
Figura 21: Maíz molido.....	54
Figura 23: Masa utilizada para la fermentación sólida del atole agrio	61
Figura 24: Fermentación sólida del atole agrio	61
Figura 25: Fermentación del atole agrio. Crecimiento de las enterobacterias en medio BRVGA. Valores de pH durante la fermentación.	64
Figura 27: Calentamiento hasta ebullición de la masa fermentada.	66
Figura 30: Características macroscópicas de una enterobacteria aislada del medio BRVGA de la fermentación líquida.....	68
Figura 31: Características microscópicas de una colonia de enterobacteria de la fermentación líquida	69
Figura 32: Características macroscópicas de una enterobacteria aislada del medio BRVGA de la fermentación sólida.....	69



Figura 33: Características microscópicas de una colonia de enterobacteria de la fermentación sólida 69

Figura 34: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN extraído de las cepas puras a 90V durante 30minutos 88

Figura 35: Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de la amplificación del espacio intergénico (ISR) 89

Figura 36: Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de la amplificación polimórfica al azar del ADN (RAPD)..... 92



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Alimentos y bebidas más comunes hechos a base de maíz.....	10
Tabla 2: Ventajas y Desventajas del uso de los sistemas automatizados (García, 2002).....	23
Tabla 3: Medios de cultivo utilizados para la cuantificación de los distintos grupos microbianos	35
Tabla 4: Características de las colonias por cada medio de cultivo e intervalo de sensibilidad para cada medio de cultivo.....	36
Tabla 5: Cebadores utilizados para la amplificación del espacio intergénico	46
Tabla 6: Cóctel de la reacción, método ISR.....	47
Tabla 7: Cebador utilizado para la Amplificación Polimórfica al azar del ADN	49
Tabla 8: Cóctel de la reacción de RAPD.....	49
Tabla 9: Cuantificación de grupos microbianos presentes en las materias primas utilizadas en la elaboración del atole agrio	55
Tabla 10: Crecimiento de microorganismos reportados para la mazorca del maíz (Capparelli y Mata, 1975) y lo obtenido en este estudio.	56
Tabla 11: Cuantificación de grupos microbianos presentes en la fermentación líquida durante la elaboración del atole agrio (UFC/g) y pH.	58
Tabla 12: Cuantificación de grupos microbianos presentes en la fermentación sólida durante la elaboración del atole agrio (UFC/g) y pH.....	58
Tabla 13: Crecimiento microbiano producto final atole agrio.	67
Tabla 14: Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas y purificadas de las materias primas del atole agrio de Villahermosa, Tabasco en el agar bilis rojo violeta glucosa.	70
Tabla 15: Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas y purificadas de la fermentación sólida del atole agrio de Villahermosa, Tabasco en el agar bilis rojo violeta glucosa	71



Tabla 16: Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas de la fermentación líquida del atole agrio de Villahermosa, Tabasco en el agar bilis rojo violeta glucosa.....	72
Tabla 17: Pruebas bioquímicas convencionales aplicadas a las enterobacterias aisladas de la materia prima, fermentación sólida y fermentación líquida del atole agrio	76
Tabla 18: Identificación de las enterobacterias aisladas de las materias primas para elaborar el atole agrio por medio del sistema Vitek2®.....	77
Tabla 19: Identificación de las enterobacterias aisladas de la fermentación sólida del atole agrio por medio del sistema Vitek2®.....	78
Tabla 20: Identificación de las enterobacterias aisladas de la fermentación líquida del atole agrio por medio del sistema Vitek2®.....	79
Tabla 21: Características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas y purificadas del atole agrio. Muestreo 2010.....	82
Tabla 22: Identificación por medio del sistema api20E de las enterobacterias aisladas del atole agrio. Muestreo del 2010.....	83
Tabla 23: Características macroscópicas y microscópicas da las cepas de identidad conocida utilizadas como control.....	85
Tabla 24: Asignación de claves a las cepas de identidad conocida y las obtenidas en este estudio para la identificación genotípica.....	86
Tabla 25: Cuantificación de ADN de las bacterias de identidad conocida y las obtenidas en el presente estudio mediante el espectrofotómetro.....	87
Tabla 26: Porcentaje de alineación para cada cepa utilizada con los primers utilizados en este estudio <i>in silico</i>	97



RESUMEN

El atole agrio es un alimento fermentado elaborado a partir de maíz (de dobla o tierno), el cual es sometido a una molienda, que puede ser elaborado a partir de dos tipos de proceso: una fermentación sólida y una líquida; para la fermentación sólida se forman bolas de masa que llevan a cabo un proceso de fermentación de aproximadamente 12 horas, para después agregar agua. Por el contrario, para el proceso en líquido se agrega agua justo después de la molienda para después dejar fermentar durante 12 horas. Después de transcurrido este tiempo, es necesario colar ambos procesos para después hervirlos a ebullición durante 30 minutos.

El atole agrio es consumido en la zona Sureste de México, abarcando los estados de Tabasco, Chiapas y el sur de Veracruz. La microbiota de este alimento fermentado no ha sido estudiada, y debido a las precarias condiciones que conlleva su elaboración; ya que es un procedimiento manual, en el que la falta de higiene hace que la contaminación microbiana sea frecuente, es necesario estudiar la presencia de un grupo de microorganismos de suma importancia para la salud, debido a que algunas causan enfermedades gastrointestinales: las enterobacterias.

Se llevó a cabo el aislamiento y purificación de las enterobacterias provenientes de la materia prima, así como de aquellas provenientes de diferentes etapas de la fermentación, tanto de la fermentación líquida como de la fermentación sólida del atole agrio elaborado en Villahermosa, Tabasco.

Se aislaron en total 168 colonias provenientes de dos distintas fermentaciones llevadas a cabo en los años 2010 y 2011. A partir de estas colonias se seleccionaron las que tuviesen morfología macroscópica diferente y que microscópicamente presentaran una morfología de bacilos Gram-negativos, se



conservaron 80 cepas (que cumplieron con los criterios anteriores), y 53 de esas cepas se identificaron mediante: tiras Api20E y sistema vytek2®.

Se obtuvieron las siguientes especies de enterobacterias: *Serratia marcescens*, *Raoultella terrigena*, *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Morganella morganii* spp. *sibonii*. Además se identificaron las bacterias Gram-negativas pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae*: *Pseudomonas luteola* y *Pseudomonas aeruginosa*.

También, se llevaron a cabo los métodos moleculares ISR (Intergenic Space Region) y RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) para la tipificación de las cepas. Sin embargo, el patrón de bandas no fue suficiente, por lo que no se logró una identificación mediante estas técnicas.



1. INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de la civilización humana ha existido una relación entre los alimentos y las actividades fermentativas de los microorganismos. La fermentación de los alimentos surgió más por accidente que por esfuerzos guiados. Por miles de años los procesos de fermentación se llevaron a cabo sin el conocimiento del mecanismo microbiológico, fue hasta el siglo XIX cuando se desarrollaron los primeros estudios. En los últimos años el conocimiento de la diversidad microbiana de los alimentos fermentados se ha incrementado debido al uso de métodos moleculares.

La fermentación es uno de los más viejos y económicos métodos de producir y preservar alimentos; es una manera natural de realzar el valor nutritivo y la apariencia de los alimentos así como su inocuidad. Se estima que los alimentos fermentados contribuyen aproximadamente con la tercera parte de la dieta mundial. Sin embargo, actualmente, el propósito principal de la fermentación de los alimentos no es preservar, desde que se conocen otras técnicas de conservación, el objetivo es producir una variedad de productos fermentados con un sabor, aroma y textura específicos.

Los microorganismos responsables de la fermentación forman parte de la microbiota autóctona presente en el sustrato, o pueden ser añadidos como un cultivo iniciador.

Los alimentos fermentados son producidos alrededor del mundo utilizando diversas técnicas, materias primas y microorganismos. Se conocen cuatro principales procesos de fermentación: alcohólica, ácido láctico, ácido acético y ácido mixto.

El atole agrio es un producto fermentado altamente consumido en la zona Sureste de México, abarcando los estados de Tabasco, Chiapas y el sur de Veracruz. La



microbiota de este alimento fermentado no ha sido estudiada, y debido a las precarias condiciones en las que se elabora; ya que es un procedimiento manual, en el que la falta de higiene hace que la contaminación microbiana sea frecuente, es necesario estudiar la presencia de un grupo de microorganismos de suma importancia para la salud, debido a que, en ese grupo, algunos causan enfermedades gastrointestinales: las enterobacterias.

Las enterobacterias constituyen un grupo de microorganismos que pueden colonizar diversos ambientes llegando algunos a ser patógenos de humanos, plantas, insectos, etc. La presencia de determinados microorganismos en los alimentos se puede aprovechar como un indicador potente sobre algunos aspectos fundamentales relacionados con los mismos. Este tipo de microorganismos indicadores y su investigación y cuantificación nos puede aportar información sobre la seguridad y calidad sanitaria del alimento, su grado de alteración, o nivel de envejecimiento, el proceso de elaboración, etc. La presencia de microorganismos que modifican o degradan las características organolépticas de los productos, aunque no causen intoxicaciones, incapacitan los alimentos para su consumo o disminuyen su vida comercial.



2. ANTECEDENTES

2.1 ALIMENTOS FERMENTADOS

La fermentación es uno de los más viejos y económicos métodos de producir y preservar alimentos; es una manera natural de realzar el valor nutritivo y la apariencia de los alimentos así como su inocuidad.

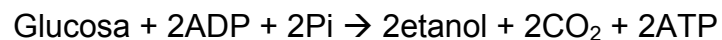
La fermentación es el proceso metabólico catabólico anaeróbico en el que un compuesto orgánico sirve al mismo tiempo como donador y como aceptor de electrones y en el que el ATP se produce por fosforilación a nivel de sustrato (Madigan *et al.*, 2008).

Los alimentos fermentados son aquellos alimentos que han estado sujetos a la acción de microorganismos o enzimas, de tal forma que, los cambios originados en éstos, causan modificaciones significativas en los alimentos (Campbell-Platt, 1987).

Los alimentos fermentados son producidos alrededor del mundo utilizando diversas técnicas, materias primas y microorganismos. Se conocen cuatro principales procesos de fermentación: alcohólica, ácido láctica, propiónica y ácido-mixta.

2.1.1 Fermentación alcohólica

Es la transformación de la glucosa que se lleva a cabo exclusivamente por las levaduras y *Zymomonas* (Madigan *et al.*, 2008) y cuya ecuación balanceada es la siguiente:





2.1.2 Fermentación láctica

Se puede dividir en dos tipos de fermentación.

a) Fermentación homoláctica

También llamada glucólisis o vía de Embden-Meyerhoff, degrada a la glucosa y se divide en tres etapas principales. La primera es preparativa, con reacciones que no son de oxidación-reducción, sin liberación de energía y con formación de dos intermediarios de tres átomos de carbono cada uno. En la segunda etapa, sí ocurren reacciones de oxidación-reducción con liberación de energía, formación de ATP por fosforilación a nivel de sustrato y producción de dos moléculas de piruvato. En la tercer etapa, nuevamente ocurren reacciones de oxidación-reducción, el piruvato se reduce a ácido láctico por acción de la enzima lactato deshidrogenasa, actuando en NADH como donador de electrones (Varela y Grotiuz, 2008). La ecuación balanceada es la siguiente:



Los microorganismos *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* llevan a cabo este tipo de fermentación, para lo cual poseen la fructosa 1,6-bifosfatasa y la fosfato aldolasa. En este tipo de fermentación no se produce CO₂ (Figura 1).

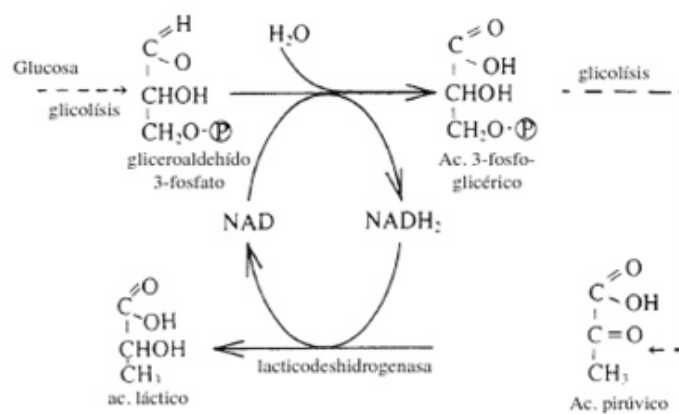
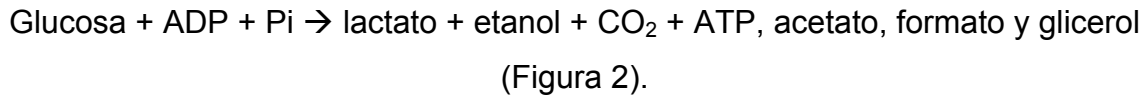


Figura 1: Fermentación homoláctica (Madigan et al., 2008).



b) Fermentación heteroláctica

Esta ruta usa la vía de las pentosas. Como primer paso, la glucosa se transforma en xilulosa-5-fosfato; transformación en donde participa la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Después, por la adición de piruvato y con acción de la enzima fosfopentosa fosfocetolasa, la xilulosa-5-fosfato se transforma en gliceraldehído-3-fosfato y acetil-fosfato. Posteriormente, el gliceraldehído-3-fosfato es transformado en lactato por la vía Embden-Meyerhof, la fosfotriosa isomerasa puede dar origen a glicerina como sistema de reoxidación de $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$; el acetil-fosfato puede dar origen a acetato y a etanol (McGilvery, 1977). Estas transformaciones se pueden expresar por medio de la reacción:



Los microorganismos *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* llevan a cabo este tipo de fermentación y no poseen la fructosa 1,6-bifosfatasa ni la fosfato aldolasa, pero sí la fosfocetolasa (Thompson y Gentry-Weeks, 1994).

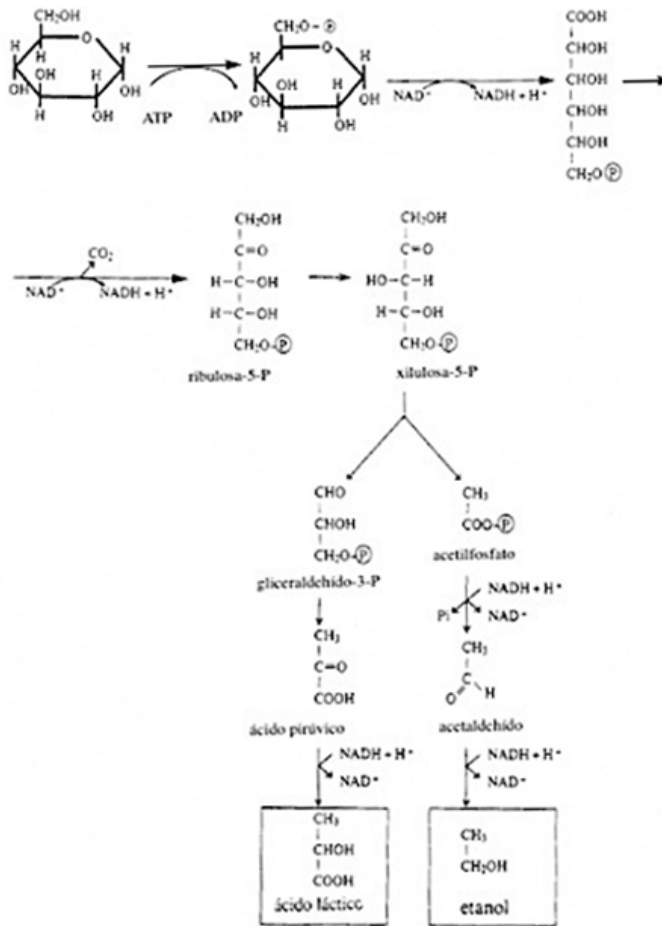


Figura 2: Fermentación heteroláctica (Madigan *et al.*, 2008).

2.1.3 Fermentación propiónica

Las bacterias que presentan este tipo de fermentación se pueden utilizar tanto azúcares como lactato como puntos de partida para el proceso. La ruta es un proceso complejo en el que se genera acetato, CO₂ y ácido propiónico como productos finales (Figura 3).

Esta ruta fermentativa la presentan las bacterias del tipo *Propionibacterium* y otras anaerobias estrictas presentes en el rumen de herbívoros donde llevan a cabo una fermentación secundaria de los productos de las fermentaciones lácticas primarias (Madigan *et al.*, 2008).

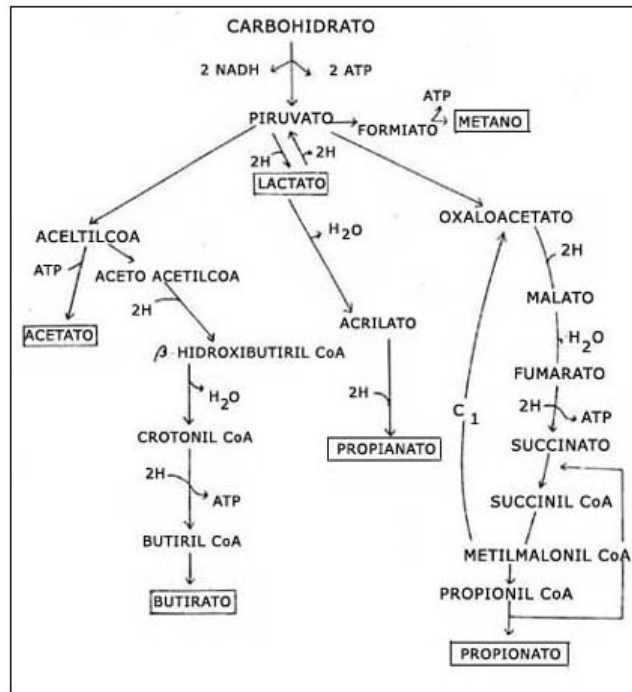


Figura 3: Fermentación propiónica (Madigan *et al.*, 2008).

2.1.4 Fermentación ácido-mixta

Es aquella fermentación que llevan a cabo las enterobacterias debido a la presencia de la enzima formiato-liasa, donde se producen ácido acético, etanol, H₂, CO₂ y proporciones diferentes de ácido láctico o propiónico (o fórmico) según las especies (Figura 4). En esta ruta de fermentación se produce ATP además de la reoxidación del NADH+H⁺ (Madigan *et al.*, 2008).

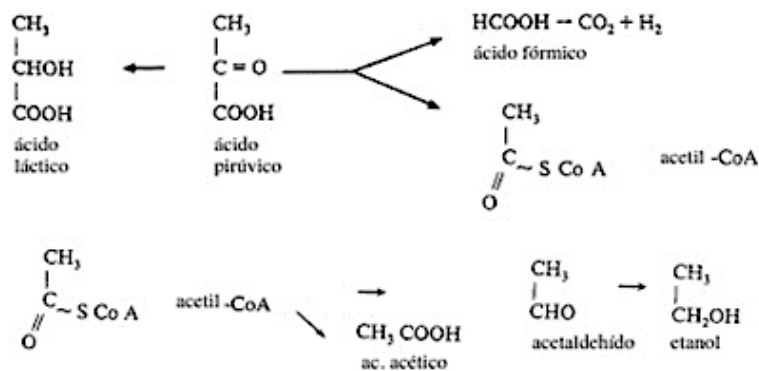


Figura 4: Fermentación ácido-mixta (Madigan *et al.*, 2008).



2.2 ALIMENTOS FERMENTADOS A PARTIR DE CEREALES

Los granos de cereal son considerados como uno de los más importantes grupos alimentarios ya que tienen un alto aporte de proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales y fibra. Sin embargo, su calidad nutricional y sensorial es muchas veces opacada cuando es comparada, por ejemplo con las de la leche o sus derivados (Gil, 2010).

De acuerdo con Steinkraus (1996), la fermentación tradicional de los alimentos tiene diversas funciones:

- Enriquecimiento de la dieta a través del desarrollo de diversos sabores, aromas y texturas en los sustratos alimenticios.
- Enriquecimiento de los alimentos con proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales y vitaminas.
- Desintoxicación durante el procesamiento de los alimentos fermentados.
- Disminución del tiempo de cocción.

En general, la fermentación natural de los cereales conduce a una disminución en el nivel de carbohidratos, así como algunos poli y oligosacáridos no digeribles. La fermentación provee también un óptimo pH para la degradación enzimática del fitato, que está presente en los cereales en la forma de un complejo polivalente catiónico de hierro, zinc, calcio, magnesio y proteínas; esta reducción del fitato puede incrementar la cantidad de hierro, zinc y calcio soluble. El efecto de la fermentación en los niveles de proteína y aminoácidos es un tema controversial. Por ejemplo, durante la fermentación del maíz, las concentraciones de lisina, metionina y triptófano disponible aumentan (Haard *et al.*, 1999).

La fermentación origina un aumento general en la vida de anaquel, textura, sabor y aroma del producto final. Durante la fermentación de los cereales se forman muchos compuestos volátiles representativos: ácido láctico, etanol, ácido acético, el propiónico y el butírico, el ácido diacetil acético, entre los ácidos grasos



volátiles, además del succínico, el metano, hidrógeno y CO₂. Todos ellos se obtienen a partir de la glucosa o fructosa que se liberan de los distintos carbohidratos y que fermentan las bacterias siguiendo las vías catabólicas descritas previamente (Blandino *et al.*, 2003).

Los alimentos fermentados tradicionales son preparados con diferentes tipos de cereales, tales como arroz, trigo y maíz. Muchos son utilizados como especias, bebidas, bases para preparar otros platillos y desayunos o almuerzos ligeros (Steinkraus, 1996).

La microbiología de muchos de estos productos es complicada y no conocida. En la mayoría de estos productos la fermentación es natural e involucra cultivos mixtos de levaduras, bacterias y hongos. Algunos microorganismos pueden participar paralelamente, mientras otros actúan secuencialmente cambiando la biota dominante durante el transcurso de la fermentación. Las especies de bacterias más comunes de la fermentación de cereales son *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* y *Bacillus*. Los hongos son: *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichothecium*; las levaduras más comunes son las especies del género *Saccharomyces*. El tipo de microbiota desarrollada en cada alimento fermentado depende en la actividad del agua, pH, concentración salina, temperatura y composición de la matriz alimentaria (Blandino *et al.*, 2003).

2.2.1 Alimentos fermentados a partir de maíz

En la Tabla 1 se encuentran los alimentos y bebidas más comunes hechos a base de maíz y consumidos en el mundo.



Tabla 1: Alimentos y bebidas más comunes hechos a base de maíz (Adaptada de Blandino *et al.*, 2003).

Producto	Uso y Características del producto	Región
Atole	Bebida basada en masas de maíz	Sureste de México.
Banku	Masa	Ghana
Busaa	Bebida alcohólica	Nigeria, Ghana
Chicha	Bebida alcohólica no destilada	Perú
Chikokivana	Bebida alcohólica	Zimbabwe
Jamin-bang	Pan	Brasil
Kaanga-Kopuwai	Suave, viscoso	Nueva Zelanda
Kaffir beer	Bebida alcohólica	Sudáfrica
Kenkey	Masa fermentada que se consume durante la cena	Ghana
Koko	Potaje/ papilla	Ghana
Mawe	Base para la preparación de diferentes platillos	Sudáfrica
Mirin	Sazonador líquido	Japón
Miso	Pasta usada como sazónador	Japón y China
Ogi	Pasta como alimento básico	Nigeria, Oeste de África
Pozol	Bebida refrescante no alcohólica a base de bolas adicionada con diversos ingredientes como chocolate.	México
Rabdi	Puré semisólido	India
Seketeh	Bebida alcohólica	Nigeria
Tesgüino	Bebida alcohólica	Norte de México
Tobwa	Bebida no alcohólica	Zimbabwe
Uji	Papilla	Kenia, Uganda.



2.3 ATOLE AGRIO

El atole agrio (del náhuatl *xocoatolli*; *xococ*: agrio, *atolli*: atole) es una bebida típica del Sureste de México, es consumido en Tabasco, Chiapas y el sur de Veracruz; por comunidades mazatecas. Se prepara a partir de maíz, ya sea tierno o de dobla. Generalmente, cuando el maíz se encuentra en la etapa de madurez fisiológica se cosecha y se deja secar, para obtener el maíz maduro. El maíz recién cosechado o tierno contiene aproximadamente 30% de humedad, por lo que los microorganismos presentes podrían desarrollarse fácilmente. Para evitar esto, el maíz se dobla dentro de la misma planta y se deja que pierda humedad. La mazorca está protegida del ataque microbiano, ya que sigue siendo parte de la planta, que cuenta con sistemas antimicrobianos. El doblado del tallo de la planta se realiza alrededor de treinta días antes de cosechar (Valderrama, en revisión).

Antiguamente, las comunidades prehispánicas de esta zona, consumían el atole agrio durante las festividades de *Hueytozoztli* (gran vigilia) del calendario Azteca que era el período de adoración de los dioses del maíz (Castro, 2006).

Tradicionalmente, es consumido por mujeres que acaban de dar a luz y se encuentran en el periodo de lactancia, ya que se cree que este aumenta la cantidad de leche que se produce. También se prepara para la celebración del día de Muertos para colocarlo en las ofrendas dedicadas a los difuntos que disfrutaban de esta bebida. Para su elaboración, se lleva a cabo a partir de dos tipos de fermentación: una sólida y una líquida (Figura 5).

De acuerdo con un estudio previo, dónde se analizó la ecología microbiana del atole agrio, se cuantificaron los siguientes grupos microbianos: bacterias ácido lácticas, bacterias ácido lácticas amilolíticas, mesófilos aerobios totales, coliformes totales, así como hongos y levaduras. En el aislamiento e identificación de las bacterias ácido lácticas se encontraron las siguientes especies: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* (Valderrama, en revisión).

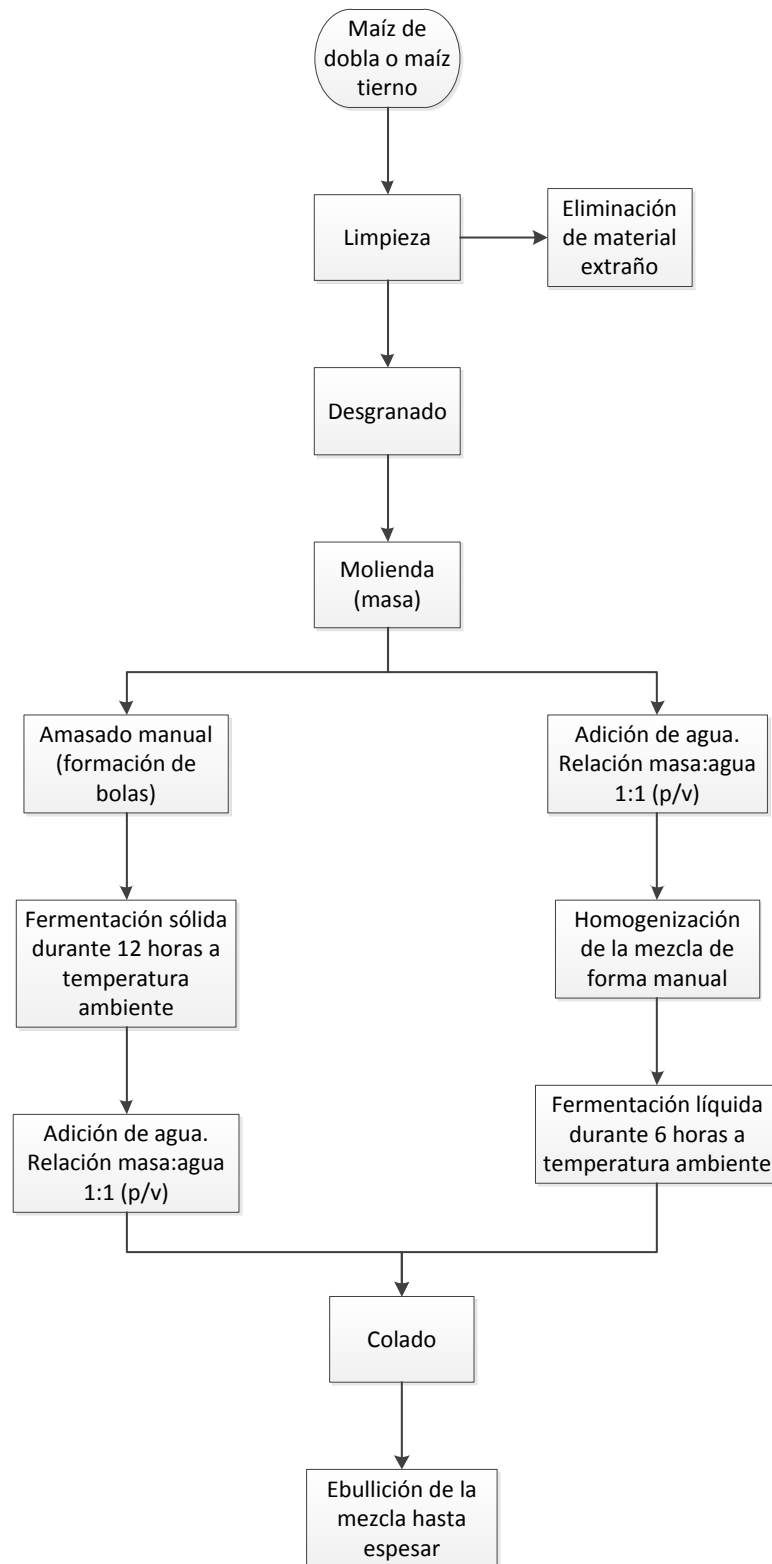


Figura 5: Proceso de elaboración de atole agrio (Valderrama, en revisión).



2.4 ENTEROBACTERIACEAE

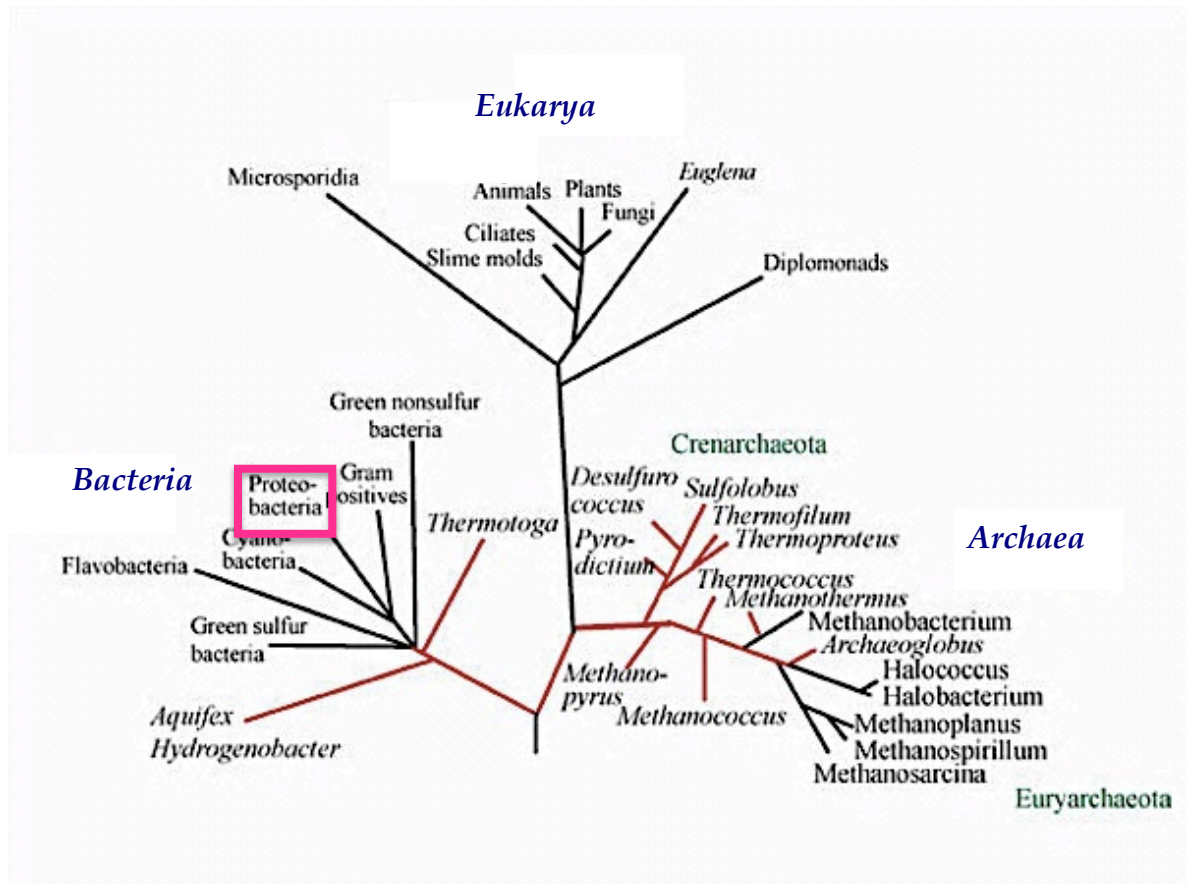


Figura 6: Filogenia de los seres vivos (Madigan *et al.*, 2008).

La familia *Enterobacteriaceae* son organismos procariotes que pertenece al filum de Proteobacteria clase γ -Proteobacteria (Figura 6) (Madigan *et al.*, 2008).

Microscópicamente, los miembros de esta familia son bacilos rectos, usualmente de 0.3-1.8 μ m. Son organismos Gram-negativos (Figura 7). Son móviles por flagelos peritricos, excepto *Tatumella* en las que algunas cepas son inmóviles. Son anaerobios facultativos y quimioorganótrofos, poseen un metabolismo tanto respiratorio como fermentativo. La mayoría de las especies crecen mejor entre 15-30°C y su metabolismo es más activo a estas temperaturas. Algunas producen ácido y gas a partir del catabolismo de D-glucosa y otros carbohidratos por medio



de la fermentación ácido mixta (Madigan *et al.*, 2008). Son oxidasa-negativo y catalasa-positivo, excepto *Shigella dysenteriae* O Grupo 1, y las especies de *Xenorhabdus* que no sean *X. luminescens*. Reducen nitratos, excepto *Arsenophonus*, un número de especies de *Erwinia*, la mayoría de especies de *Xenorhabdus*, y algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Yersinia*. Los distintos géneros y especies de esta familia pueden ser identificados a partir de su capacidad para fermentar carbohidratos específicos, para utilizar ciertos sustratos (citrato) como única fuente de carbono, y para dar productos finales característicos como son el indol a partir de triptófano, amoníaco a partir de urea y sulfuro de hidrógeno (Davis *et al.*, 1990).

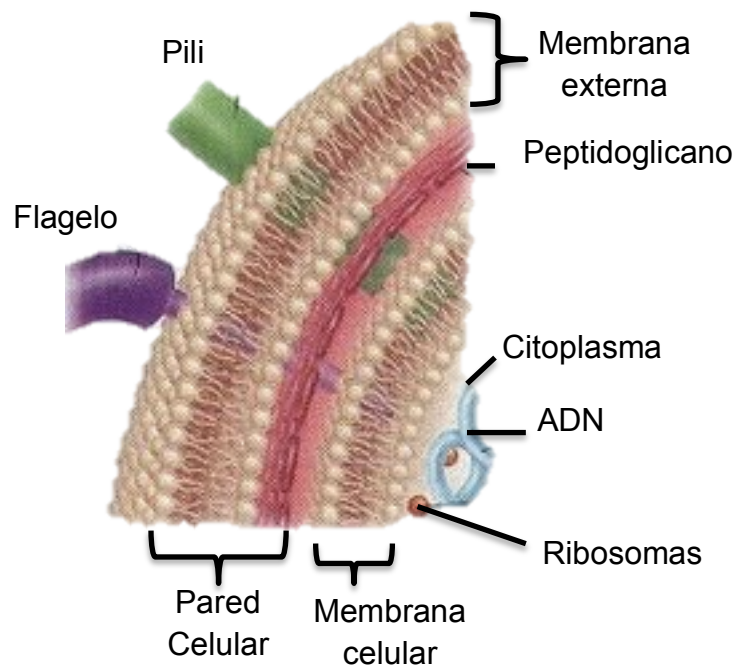


Figura 7: Estructura de la célula Gram-Negativa (Tortora *et al.*, 2007).

Las enterobacterias están distribuidas mundialmente. Se encuentran en el suelo, la tierra, las frutas, los vegetales, los granos, las plantas y los árboles; así como



también formando parte de la biota bacteriana normal de casi todos los animales de sangre caliente, incluido el hombre (Figura 8) (Janda y Abbott, 2006).

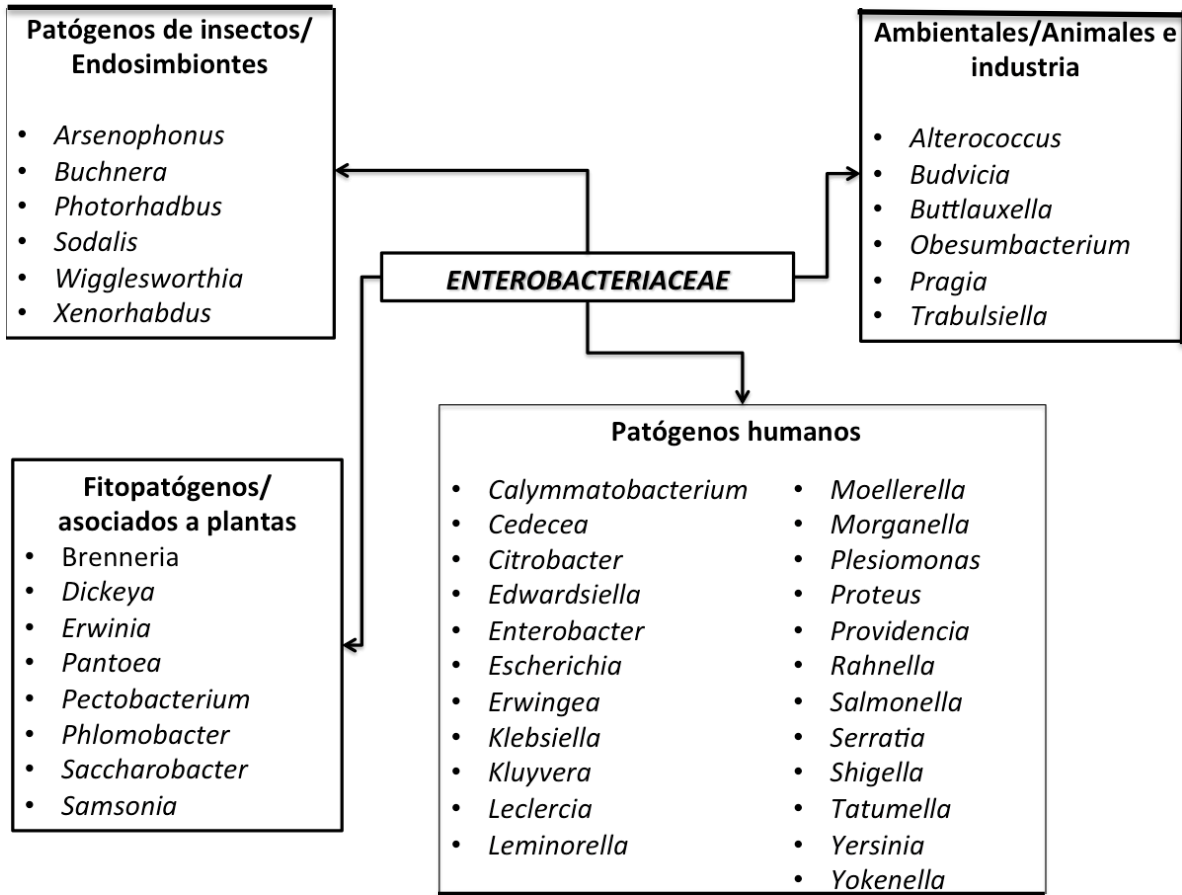


Figura 8: Distribución de los diferentes géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (Janda y Abbott, 2006).

Algunas enterobacterias provocan un alto número de enfermedades gastrointestinales incluyendo fiebre tifoidea y disentería bacilar. Muchas especies no asociadas normalmente con enfermedades gastrointestinales a menudo se conocen como patógenos oportunistas. La mayoría de estas, así como las especies que causan enfermedades diarreicas, puede causar una variedad de infecciones extraintestinales como bacteremia, meningitis, en el tracto respiratorio y urinario, así como infecciones en heridas (Holt, 2000). El evento inicial para la



colonización de los tejidos epiteliales del huésped por estos microorganismos es la adherencia a las células, y dicho proceso conduce a la formación de verdaderos hábitats ecológicos distintivos que juegan un papel importante en la fisiología y defensa de las mucosas por parte del huésped ante el agente extraño. Este fenómeno de adherencia no es dañino en sí, pero favorece en el caso de cepas patógenas, la integración de factores de patogenicidad con sitios blanco en el huésped (Salyers y Whitt, 1994).

Las enterobacterias se han usado por años en Europa como microorganismos indicadores de la calidad de los alimentos y como índices de seguridad de alimentos, ya que la presencia de este grupo microbiano implicaría unas precarias condiciones de procesamiento, por ejemplo: una pasteurización inadecuada o insuficiente. En la leche cruda se han detectado enterobacterias como *Salmonella*, *E. coli* y *Yersinia*, sin embargo, después de los tratamientos de pasteurización por largo tiempo a baja temperatura (LTLT) y de alta temperatura por corto tiempo (HTST) las enterobacterias son destruidas; por lo que si se detectase este grupo de microorganismos después de este tratamiento, se concluiría que el tratamiento fue inadecuado o que la contaminación se dio en condiciones de almacenamiento precarias (Jay *et al.*, 2009).

Sin embargo, hay alimentos como el huevo donde su presencia no significa un mal procesamiento, sino un signo de contaminación fecal. Por ejemplo, los huevos frescos no reciben ningún tipo de tratamiento térmico, los huevos de gallina recién puestos no suelen estar contaminados, pero en algunos países en los últimos años ha habido un incremento en los casos de infecciones alimentarias por el consumo de huevo contaminado con *Salmonella*, la contaminación por los microorganismos, en este caso enterobacterias, ocurre por el contacto con materia fecal, polvo, embalaje y durante el almacenamiento del huevo (Leyva *et al.*, 1996).

Se prefiere utilizar a las enterobacterias en lugar de a los coliformes ya que los coliformes sólo limita la identificación de bacilos Gram-negativos que fermentan la



lactosa, por lo que bacterias como *Salmonella* y *Shigella*, que no fermentan lactosa no son detectadas lo que puede conllevar a una peligrosa falsa conclusión ya que también son capaces de colonizar el tracto gastrointestinal (Ootsubo *et al.*, 2003). La enumeración de las enterobacterias como microorganismos indicadores se encuentra en la norma ISO 7402:1993 “Methods for microbiological examination of food and animal feeding stuffs. Enumeration of *Enterobacteriaceae*”.

2.4.1 Géneros más comunes de Enterobacterias y sus características

Citrobacter: Forma parte del denominado grupo de coliformes. Bacterias móviles, fermentadores variables de la lactosa, algunos son citrato positivos y otros negativos. *C. freundii* es un habitante normal del tracto gastrointestinal del humano, pero todas las especies de *Citrobacter* son considerados como patógenos oportunistas del humano. *Citrobacter* spp. se encuentra en muchos alimentos, incluyendo carne, pescado y especias.

Enterobacter: Existen once especies. Son fermentadores de glucosa con la producción de ácido y gas, son móviles y tienen flagelos en la periferia. Algunas cepas con antígeno K poseen cápsula. *Enterobacter* spp. normalmente existe como saprófito en el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Ha sido aislado de diversos alimentos como por ejemplo productos lácteos, carnes, ensaladas de vegetales, especias y fórmulas infantiles (Lund y Baird-Parker, 2000).

Escherichia: Existen seis especies, de las cuales cuatro son conocidas de provocar enfermedades humanas. La más conocida es *Escherichia coli*, que contiene numerosos serotipos que están relacionados con enfermedades específicas. Un número de cepas de *E. coli* pueden producir enterotoxinas u otros factores de virulencia, incluyendo aquellos asociados con la invasión. Algunas cepas poseen una cápsula con el antígeno K. También forman parte del grupo de coliformes. Hay una cepa con un específico interés en alimentos: *E. coli* O157:H7 ya que causa una grave infección intestinal en los humanos. Se ha reportado la



presencia en ensaladas, quesos frescos, hamburguesas, leche cruda, embutidos, yogurt, lechuga, agua, etc. (Janda y Abbott, 2006).

Hafnia alvei: el género *Hafnia* contiene una sola especie, *H. alvei*. Crece fácilmente en cualquier medio y es generalmente móvil. Ha sido aislada de mamíferos, reptiles, aves, suelo, agua y alimentos. *H. alvei* se ha aislado de productos como carne empacada de res, puerco y pescado, así como de leche, crema, queso y miel (Janda y Abbott, 2006).

Klebsiella: contiene cinco especies y cuatro subespecies. Anteriormente, cuatro especies nombradas *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis* y *Klebsiella aerogenes* son ahora clasificadas como subespecies de *K. pneumoniae*; siendo la más común *K. pneumoniae* subespecie *aerogenes*. No son móviles y poseen cápsula. Son parte del grupo de coliformes. *K. pneumoniae* se ha aislado de diferentes productos de carne, leche y lácteos, vegetales frescos y frutas, así como del suelo, polvo, aire y agua asociados con contaminación fecal. Puede crecer en el queso mozzarella y en pescados. Se ha demostrado ser causante de gastroenteritis en pacientes no inmunocomprometidos (Lund y Baird-Parker, 2000).

Morganella morganii: el género *Morganella* sólo contiene una especie: *Morganella morganii*, que está dividida en dos subespecies. Posee motilidad con flagelos peritricos, pero algunas cepas no son móviles por arriba de 30°C. Su estudio se ha dado principalmente por la capacidad que tiene de producir histamina, toxina presente en los alimentos, en los pescados (Lorca *et al.*, 2001).

Proteus: Existen cuatro especies de *Proteus*, de las cuales tres causan enfermedades. Todas las cepas son ureasa negativas y móviles. Son resistentes a la polimixina B y colistina. Es un importante patógeno nosocomial, y puede producir infecciones en los humanos después de habitar el tracto intestinal. Se ha aislado de jamón, huevos y carne fresca (Riemann *et al.*, 2006).



Salmonella: Es la principal bacteria causante de enfermedades gastrointestinales en el mundo, siendo la principal especie *Salmonella entérica*, los principales serotipos: Typhimurium, Enteritidis y Typhi. Ha sido aislada de una gran cantidad de alimentos, entre los que se encuentran: huevos contaminados, aves de corral, carnes rojas, leche o jugos no pasteurizados, quesos, frutas y verduras crudas, especias y nueces (CDC, 2012).

Serratia: el género *Serratia* contiene diez especies y dos subespecies: *Serratia liquefaciens* y *Serratia marcescens*, el último produce un pigmento rojo llamado prodigiosina cuando crece a 20°C. La mayoría son móviles. *S. marcescens* es generalmente un patógeno oportunista causando infecciones en pacientes inmunocomprometidos. Se han reportado aislamientos de esta bacteria a partir del suelo y del agua (Stanier *et al.*, 1992).

Shigella: Existen cuatro especies, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*. No poseen motilidad. *Shigella* es un patógeno intestinal de los humanos y otros primates; en países subdesarrollados, donde la higiene es muy precaria, por lo que es el principal agente causal de disentería. Se ha asociado su presencia a alimentos “listos para consumirse” que están en contacto con personas infectadas, como por ejemplo en ensaladas, vegetales, atún, camarones, macarrones, pollo, leche, productos lácteos y agua (Riemann *et al.*, 2006).

Yersinia: Contiene once especies, tres de las cuales (*Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis*) son patógenos conocidos para animales y humanos. *Y. enterocolitica* causa una enfermedad enterocolítica relacionada con el consumo de carne de cerdo contaminada con esta bacteria. Otros alimentos de los cuales han sido aisladas cepas de *Y. enterocolitica* son: mariscos, carne de res, pollo y cordero, leche no pasteurizada y agua (Lampel, 2011).



2.5 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POR MÉTODOS FENOTÍPICOS

Se basan en la información derivada del fenotipo o características que expresa un organismo. Estos métodos constituyen la base de las descripciones formales taxonómicas desde familia, género, especie y subespecies. Las características fenotípicas clásicas de las bacterias comprenden su morfología, fisiología y bioquímica.

Dentro de las técnicas fenotípicas se encuentra la tipificación por:

- Crecimiento y características morfológicas.
- Características bioquímicas
- Características serológicas
- Características funcionales o fisiológicas

Dichas técnicas se llevan a cabo por procedimientos estándares donde se observan las características microscópicas y macroscópicas de las bacterias; como características macroscópicas se encuentra la morfología del cultivo: medios de cultivo y requisitos de crecimiento en relación a atmósfera, temperatura y nutrición; así como pruebas bioquímicas. Existen cuatro tipos de pruebas bioquímicas:

1) Pruebas que se utilizan en la identificación preliminar y con lectura inmediata como la catalasa y oxidasa; 2) otras pruebas rápidas, con lectura en menos de 6 h tal y como la β -galactosidasa (ONPG), las aminopeptidasas, la ureasa y el indol; 3) pruebas lentas, con lectura de 18 a 48 h que incluirían la óxido-fermentación, reducción de nitratos, rojo de metilo, Voges-Proskauer, Agar hierro de Kligler, fermentación de azúcares, hidrólisis de la esculina, coagulasa, fenilalanina-desaminasa, DNasa, hidrólisis de la gelatina, decarboxilasas, lipasa, lecitinasa, utilización de citratos, utilización de malonato, y prueba de CAMP entre las más frecuentes, y 4) pruebas basadas en caracteres de resistencia a ciertas sustancias



tal y como optoquina, bacitracina, solubilidad en bilis, y crecimiento en caldo hipersalino.

Es importante destacar que existen en el mercado numerosos sistemas o equipos multipuebas con el fin de conseguir una mayor rapidez en la identificación de algunas bacterias. Todos exigen unas condiciones muy precisas de concentración del inóculo, de inoculación, de incubación y de lectura, que si no se observan pueden dar lugar a importantes errores; además que están diseñados para microorganismos aislados de muestras clínicas. Estos sistemas pueden ser manuales y automatizados. Entre ellos:

- *Sistemas comerciales manuales o galerías multipuebas:* Se trata de celdillas aisladas con sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Los resultados de las pruebas se expresan de forma numérica (los resultados de las pruebas se agrupan de tres en tres, de manera que el resultado de cada trío de pruebas queda reducido a un dígito). Cada especie está definida por un código numérico, resultado de la codificación de las reacciones a las pruebas que se hubieran utilizado. El código numérico se obtiene sumando los valores de las tres pruebas. Los límites inferior y superior del código son 0 y 7 respectivamente. Ante un microorganismo problema, no tenemos más que buscar el código numérico y comprobar a qué bacteria pertenece. Estos son algunos de los sistemas disponibles en el mercado: API (bioMérieux), Enterotube (BBL), Oxi/FermTube (BD), RapIDsystems y MicroID (Remel), Biochemical ID systems (Microgen), etc.
- *Sistemas comerciales automatizados:* Hay en el mercado galerías multipuebas, como las descritas en el apartado anterior pero cuya inoculación, incubación y lectura se efectúan de modo automatizado. También hay paneles en los que además de encontrarse los sustratos para el desarrollo de pruebas bioquímicas, se encuentran diversos antimicrobianos a distintas concentraciones, con lo que se



realiza simultáneamente la identificación y antibiograma del microorganismo objeto de estudio. Existen distintos paneles para distintos grupos de microorganismos. La inoculación y la lectura de estos paneles se suele hacer de forma automática, incorporándose los datos obtenidos en una computadora, la cual proporciona con un índice alto de fiabilidad la identificación del microorganismo. Estos son algunos de los sistemas en paneles comerciales más extendidos disponibles en el mercado: MicroScan, Vitek, ATB, Pasco, Wider, Phoenix, etc. (Fernández *et al.*, 2010).

2.5.1 Identificación mediante el sistema API®20E

El API® 20E es un sistema estandarizado que permite la identificación de 51 especies pertenecientes a *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram-negativos no exigentes, que incluyen 21 pruebas bioquímicas miniaturizados, así como una base de datos.

La galería del sistema API® 20E se compone de 20 microtubos que contienen los substratos deshidratados. Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteriana que reconstituyen las pruebas. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos (Figura 9).



Figura 9: Tira API®20E para la identificación de enterobacterias

Para la identificación, es necesario recurrir a un software llamado ApiWeb diseñado por Biomerieux® que compara los perfiles obtenidos con los de una base de datos para obtener el nombre del microorganismo correspondiente (Biomérieux SA, 2007).



2.5.2 Identificación mediante el sistema Vitek2®

Este método se basa en el estudio de susceptibilidad por medio de diferentes métodos (reacción colorimétrica) que detectan el desarrollo bacteriano en micropaneles que contienen diluciones del sustrato bioquímico o del antimicrobiano. Las ventajas y desventajas de este sistema automatizado se encuentran en la Tabla 2:

Tabla 2: Ventajas y Desventajas del uso de los sistemas automatizados (García, 2002).

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none">• Rapidez en el informe de resultado (6-18horas)• Proceso de inoculación e incubación corto.• Contienen una librería taxonómica amplia.• Aumento de la reproducibilidad intra e inter-laboratorio.• Reducción de costos en materiales de laboratorio como medios de cultivo.• Optimización de tiempo.• Sencillez de manejo.• Mínimo espacio útil requerido.• Disminución de residuos.	<ul style="list-style-type: none">• Alto costo de inversión.• No incluye características esenciales de ciertas especies.• Grado de resolución menor en algunos grupos bacterianos.• Es indispensable que el cultivo se encuentre puro.

El sistema VITEK automatiza todas las etapas necesarias para la realización de las pruebas de identificación y antibiograma con las tarjetas VITEK. Está constituido por un inoculador/sellador, un incubador/lector, una computadora y una impresora. El inoculador/sellador permite la inoculación de las tarjetas en pocos



minutos. El incubador/lector asegura simultáneamente la incubación y la lectura de las tarjetas para una capacidad que varía de 32 a 480 tarjetas según el modelo. La computadora equipada con los programas de VITEK efectúa un control permanente de las operaciones en curso, memoriza los valores e interpreta los resultados.

Cada tarjeta de identificación posee 64 pocillos que contienen los substratos bioquímicos en forma deshidratada. No es necesario añadir ningún reactivo, lo cual evita cualquier riesgo de olvido o error. La identificación VITEK cubre más de 300 especies encontradas en el campo de la microbiología clínica e industrial (Pincus, Biomérieux, Inc.).

2.6 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POR MÉTODOS GENOTÍPICOS

Se basan en la información derivada de los ácidos nucleicos. Estos permiten distinguir microorganismos al nivel de especie y de cepa. Idealmente, estas técnicas son universalmente aplicables, reproducibles, fáciles, altamente discriminatorias y han reemplazado en muchos laboratorios a las técnicas clásicas (Maslow *et al.*, 1993). Cuando se aplican en alimentos, las técnicas moleculares nos permiten tener datos confiables sobre la diversidad e identificación taxonómica de los microorganismos del alimento, datos cuantitativos que describan los cambios en la población microbiana durante la producción, el impacto de factores intrínsecos, extrínsecos sobre el crecimiento, sobrevivencia y actividad en los microorganismos, lo que a su vez permite producir los alimentos en condiciones controladas y asegurar su calidad.

Para la determinación de la estructura microbiana de los alimentos se utilizan dos tipos de metodologías (Figura 10) una incluye el aislamiento de los microorganismo para su tipificación; otra es utilizar métodos que no dependen del cultivo, en los que se extraen los ácidos nucleicos directamente del alimento (Díaz y Wachter, 2003).

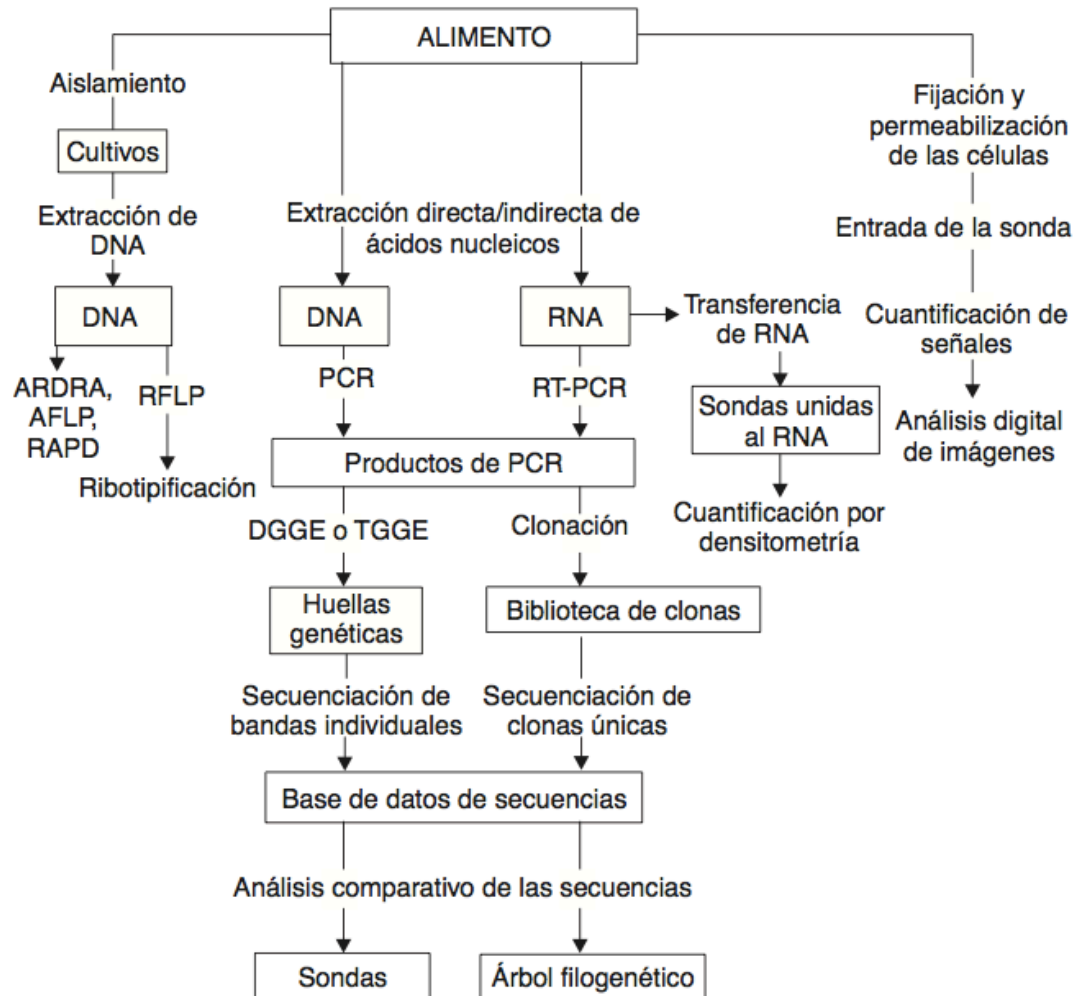


Figura 10: Métodos de evaluación de las comunidades microbianas de los alimentos (Díaz y Wachter, 2003).

El uso de las técnicas moleculares para el estudio de varios grupos de bacterias incluyendo la familia de *Enterobacteriaceae* estaba poco desarrollado en la década de 1960. Durante esta década, la única técnica molecular utilizada exitosamente fue el porcentaje del contenido de Guanina+Citosina. En la década de 1970, Don Brenner y sus colegas en el Center for Disease Control and Prevention y el Walter Reed Army Institute of Research redefinieron los géneros y especies dentro de la familia *Enterobacteriaceae* con el uso de ensayos de hibridación ADN-ADN. Desde ese entonces, se han publicado una serie de



estudios de la taxonomía, evolución y tipificación enterobacteriana. Siendo el principal método de análisis la secuenciación de la subunidad 16S del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) (Janda y Abbott, 2006).

2.6.1 Perfiles ISR

La amplificación del espacio intergénico “*Intergenic Spacer Region*” (ISR) entre el ARNr 16S y 23S, utilizando cebadores universales dirigidos a secuencias conservadas en el final del gen de ARNr 23S y el inicio del 16S, genera un patrón de bandas que corresponde a los distintos operones de ARNr. Esta técnica se encuentra bajo presión selectiva mínima y, a menudo varían entre las cepas, mientras que los genes ARNr que flanquean están muy conservados. La amplificación del ISR por lo tanto, se puede realizar con cebadores universales dirigidos a sitios conservados en los genes 16S y 23S ARNr. El análisis del ISR se puede realizar en todos los organismos y, sin embargo tiene la capacidad de discriminar entre las especies y cepas. El ISR 16S-23S se cree que está involucrado en el procesamiento del ARNr precursor y en algunos organismos, tales como *E. coli* y contiene secuencias que codifican para las moléculas de ARNt (Seurinck *et al.*, 2003).

Se ha reportado el uso de la tipificación de bacterias aisladas a partir de diversos alimentos, por ejemplo:

En la identificación de bacterias ácido lácticas de alimentos fermentados como el queso “Fior di latte” (Blaiota *et al.*, 2004), la carne turca fermentada (Ben Belgacem *et al.*, 2009), de chorizos fermentados españoles (Aymerich, 2003) y la tipificación de diversos probióticos (McCartney, 2002). En la detección de *Salmonella* en carne, pollo y leche entera (Chiu *et al.*, 2004). Para la identificación de diversas especies de *Bacillus* aislados de los frijoles de soya del meju (Mo *et al.*, 2010).



2.6.2 Perfiles RAPD

La técnica de amplificación del ADN Polimórfico al Azar “*Random Amplified Polymorphic DNA*” (RAPD) es un método de identificación genética de alta resolución para cepas cercanas entre sí, generalmente miembros de una sola especie. La razón de llevar a cabo un perfil RAPD-PCR viene de la necesidad de estudiar la similitud de una cepa o una caracterización genética poblacional. El RAPD-PCR es fácil y rápido de realizar. No existen requerimientos técnicos específicos y no se requiere un conocimiento de la secuencia del organismo en estudio. La principal crítica que recibe este método, es la reproducibilidad. Sin embargo, cuando las condiciones de la reacción se mantienen estrictamente constantes, se puede obtener una reproducibilidad bastante razonable entre laboratorios. Por lo tanto, es importante verificar la reproducibilidad de la técnica con controles positivos antes de introducir la muestra problema (Bardakci, 2001).

El RAPD-PCR utiliza sólo un cebador bajo condiciones de PCR poco astringentes. El cebador hibrida en dirección *forward* y en la hebra complementaria en dirección *reverse*, por lo tanto genera un producto de PCR. La hibridación ocurre simultáneamente en varias partes del genoma, y de este modo se genera un patrón de bandas características (Figura 11). Las cepas que tengan una secuencia del genoma idéntica darán el mismo patrón de bandas (Reddy, 2007).

Debido a la simplicidad y el bajo costo de la técnica RAPD, se han encontrado varias aplicaciones en muchas áreas de la biología. Como por ejemplo:

- Mapeo Genético
- Desarrollo de marcadores genéticos
- Estudio de la población y evolución genética
- Crianza animal y vegetal (Bardakci, 2001).

El RAPD es la técnica que más se ha utilizado para el análisis de colecciones microbianas aisladas de alimentos fermentados (Díaz y Wachter, 2003). Por



ejemplo, se reportó el uso de esta técnica para caracterizar los distintos tipos de *Lactobacillus* aislados de una masa de maíz fermentada de Ghana (Hayford *et al.*, 1999), también para caracterizar de distintas especies de lactobacilos aislados de salchichas tradicionales de Veneto, Italia (Andrighetto *et al.*, 2001), para identificar las bacterias ácido lácticas predominantes aisladas de productos vegetales fermentados tradicionales del Este de los Himalayas (Tamang *et al.*, 2005), por mencionar algunos usos.

Otras aplicaciones en alimentos del RAPD-PCR es el estudio de un primer para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos (Aznar, 2002); también, para tipificar a larga escala *Bacillus cereus* en leche (Nilsson *et al.*, 1998).

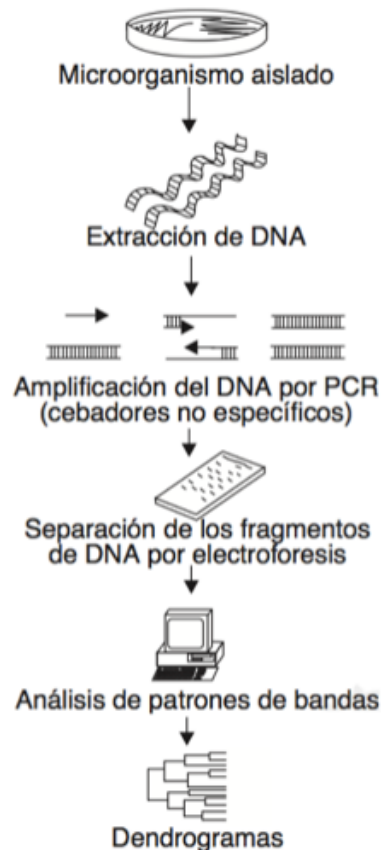


Figura 11: Análisis de microorganismos por medio de la técnica RAPD (Díaz y Wachter, 2003).



3. JUSTIFICACIÓN

La tradición ancestral indígena de nuestro país es muy rica, incluye diversos alimentos y bebidas regionales elaboradas con materias primas de alto consumo nacional, como el maíz. Dichos productos, por su carácter regional, solo se producen y consumen localmente, por lo que carecen de popularidad en el resto del país y su estudio no se ha llevado a cabo. Tal es el caso del atole agrio, una bebida fermentada elaborada con maíz, muy popular en las comunidades mazatecas (Norte de Oaxaca, Tabasco y sur de Veracruz). Se sabe que la bebida aporta una cantidad de nutrimentos a quienes lo consumen, ya que contiene un alto nivel de carbohidratos, proteínas, vitaminas, minerales y fibra.

Por esta razón, es necesario estudiar el proceso de elaboración de la bebida. Debido a que su producción es artesanal, también es relevante el estudio de la microbiota nativa, específicamente de las enterobacterias, ya que su presencia podría estar asociada con el desarrollo de enfermedades de transmisión por alimentos (ETA) y por lo tanto con la seguridad del producto, así como identificar los puntos de contaminación. La aplicación de métodos microbiológicos tradicionales y técnicas moleculares avanzadas permitirán identificar las colonias aisladas de este grupo de microorganismos.



4. HIPÓTESIS

El atole agrio es una bebida fermentada de maíz que se elabora mediante un proceso tradicional que involucra la manipulación en condiciones deficientes de higiene tanto de la materia prima, como por parte del elaborador y del equipo utilizado hasta la obtención del producto. La calidad e inocuidad del producto podría verse comprometida por la presencia de enterobacterias. Las enterobacterias presentes serán principalmente patógenos oportunistas y patógenos del maíz.



5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar las enterobacterias provenientes de la materia prima y de diversas etapas de la elaboración del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Describir las principales etapas del proceso de elaboración del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.
- Identificar los puntos críticos de llegada de microorganismos.
- Aislar y purificar enterobacterias presentes en la materia prima y durante las principales etapas de elaboración del atole agrio.
- Identificar las enterobacterias aisladas mediante técnicas microbiológicas tradicionales (API y Vitek2)
- Identificar las enterobacterias aisladas mediante técnicas microbiológicas moleculares (ISR y RAPD).



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

En la Figura 12 se presenta la estrategia experimental llevada a cabo durante el estudio.

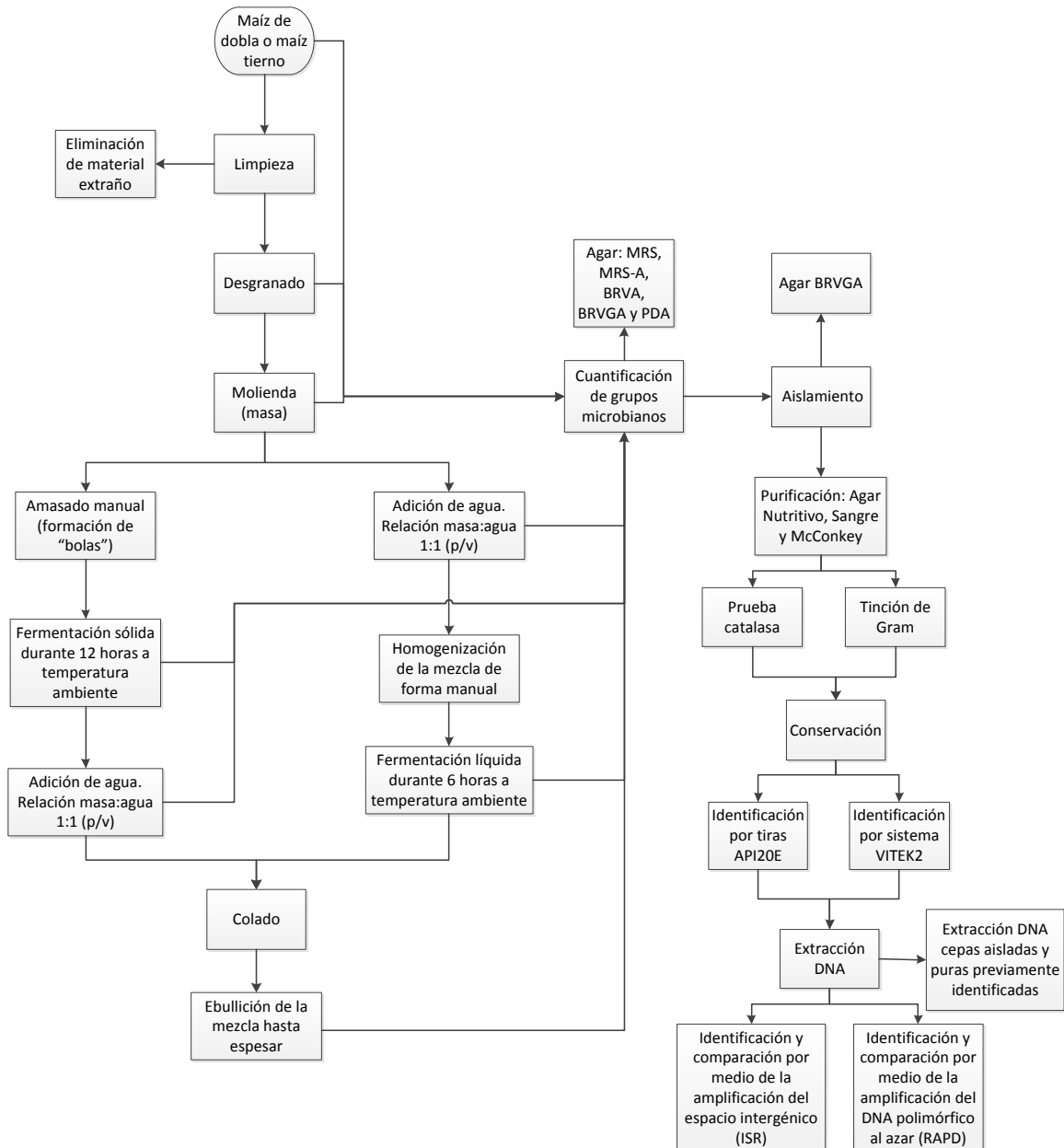


Figura 12: Metodología general llevada a cabo para el estudio.



6.2 ELABORACIÓN DEL ATOLE AGRIO

El domingo 1 de mayo del 2011 se compraron en el mercado Pino Suárez de Villahermosa, Tabasco, cien mazorcas de maíz blanco, tierno; dichas mazorcas se almacenaron en bolsas de plástico a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) y no recibieron tratamiento alguno previo.

El lunes 2 de mayo del 2011, la señora María Gómez elaboró el atole agrío en su hogar, por lo que en primer lugar fue necesario sacar las mazorcas de la bolsa y limpiarlas: se eliminaron todas las hojas y los olotes del maíz, además se eliminaron los insectos presentes en las mazorcas. A continuación, se desgranaron las mazorcas para obtener granos, el desgranado se llevó a cabo con un cuchillo que fue sanitizado con alcohol antes de realizar la operación; los granos obtenidos se recolectaron en una tinaja de plástico, que de igual manera fue sanitizada con alcohol. Después, se llevó a cabo la molienda, el maíz se molió en un molino eléctrico, sin marca que no tuvo ninguna limpieza previa; la molienda se llevó a cabo rápidamente y no se añadió agua.

La masa obtenida se dividió en dos lotes, en dos bandejas de plástico para poder separar la fermentación sólida de la líquida. Para la fermentación líquida fue necesario añadir agua a la masa (1:1), después se disolvió la masa en el agua con la mano y se dejó reposar a temperatura ambiente con una cubierta de manta de cielo durante 12 horas en el laboratorio de microbiología de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) a temperatura ambiente (34°C). Y, para la fermentación sólida, solamente se dejó la masa reposando durante 12 horas a temperatura ambiente con una cubierta de manta de cielo (no se pudo amasar la masa debido a que se trataba de maíz tierno que posee una gran cantidad de agua).

Después de las 12 horas, a la fermentación sólida se le agregó agua (1:1) y se homogenizó la mezcla con la mano.



La masa fermentada se coló a través de un colador de metal y se calentó hasta ebullición, una vez que se llegó a esta temperatura, se dejó hervir durante 20 minutos más.

6.3 MUESTREO Y MONITOREO DEL PROCEDIMIENTO PARA ELABORAR ATOLE AGRIO

El proceso de elaboración y muestreo del atole agrio se llevó a cabo en Villahermosa, Tabasco entre el domingo 1 de mayo y el 2 y 3 de mayo del año 2011. Se tomaron las siguientes muestras:

6.3.1 Muestreo de la materia prima para la elaboración del atole agrio

La mazorca sin limpiar: con guantes de látex se tomó una mazorca y se colocó en una bolsa de plástico, se agregaron 225ml de agua peptonada al 0.1% y se agitó vigorosamente.

Granos: Ya que se desgranó la mazorca con un cuchillo, se pesaron 25g de granos y se colocaron en una bolsa de plástico, después se agregaron 225ml de agua peptonada al 0.1% y se agitó.

Los granos rotos y la masa se muestrearon de la misma manera.

El agua para la fermentación líquida: se midieron 25ml del agua que se utilizó para la fermentación líquida y se agregaron 225ml de agua peptonada al 0.1% estéril.

Una vez que se obtuvo la masa, se colocó en dos lotes: uno para la fermentación líquida y otro para la fermentación sólida.

6.3.2 Muestreo de la fermentación líquida y sólida del atole agrio

Fermentación líquida: Se agregó a la masa aproximadamente 1L de agua, por cada kilogramo de masa, se homogenizó perfectamente hasta la disolución de la masa en el agua. Esta operación se realizó de manera manual. En ese momento se tomaron 25ml de atole en una bolsa de plástico y se agregaron 225ml de agua peptonada estéril al 0.1% y se llevaron a cabo las diluciones seriadas correspondientes, para esto fue necesario tomar 0.5ml de la muestra y se



colocaron en un tubo con 4.5ml de agua peptonada estéril al 0.1% (p/v); para cada tiempo de fermentación se tomaron muestras (cada hora por un periodo de seis horas y una final a las 12 horas); después, de realizar las diluciones decimales seriadas, se tomaron 0.1ml de cada dilución y se inocularon en las placas del medio correspondiente (Tabla 3) con su respectiva réplica. El inóculo se esparció con ayuda de un asa triangular por extensión superficial en la placa con el agar correspondiente; al final, se incubó cada placa de la manera indicada en la tabla 3:

Tabla 3: Medios de cultivo utilizados para la cuantificación de los distintos grupos microbianos

Medio de cultivo*	Abreviatura	Grupo microbiano a cuantificar	Condiciones de incubación
Agar Bilis Rojo Violeta	BRVA	Coliformes totales	37°C / 24 horas
Agar Bilis Rojo Violeta con Glucosa	BRVGA	Enterobacterias	37°C / 24 horas
Agar Cuenta en Placa	PCA	Mesófilos totales	37°C / 24 horas
Agar Man Rogosa y Sharpe	MRS	Bacterias lácticas	30°C / 24 horas
Agar Man Rogosa y Sharpe-Almidón	MRS-A	Bacterias amilolíticas	30°C / 24 horas
Agar Papa Dextrosa	PDA	Hongos y levaduras	30°C / 24 horas

*La preparación de cada uno de los medios se encuentra en el Anexo I

Fermentación sólida: Se reposó la masa y se tomaron muestras cada dos horas en un lapso de doce horas. Para la toma de cada muestra, fue necesario pesar 25g de masa y se colocó en una bolsa de plástico, después se agregaron 225ml de agua peptonada estéril al 0.1% y se agitó vigorosamente, para después realizar las diluciones decimales seriadas correspondientes, y se siguió el mismo procedimiento que en la fermentación líquida. Después de 24 horas se llevó a



cabo el conteo de cada una de las placas de acuerdo con las características de cada medio de cultivo y la sensibilidad para cada grupo microbiano (Tabla 4).

Tabla 4: Características de las colonias por cada medio de cultivo e intervalo de sensibilidad para cada medio de cultivo

Medio de cultivo	Características de las colonias	Intervalo de sensibilidad de colonias por placa
BRVA	<ul style="list-style-type: none">• Fermentadores de lactosa: colonias de color púrpura a rojo con o sin zona de precipitado.• No fermentadores de lactosa: Colonias incoloras o transparentes, puntiformes.	15 a 150 colonias por placa
BRVGA	<ul style="list-style-type: none">• Fermentadores de lactosa: colonias de color púrpura a rojo con o sin zona de precipitado.• No fermentadores de lactosa: Colonias incoloras o transparentes, puntiformes.	15 a 150 colonias por placa
PCA	<ul style="list-style-type: none">• Diversidad de colonias, se cuentan todas las presentes en el medio	25 a 250 colonias por placa
MRS	<ul style="list-style-type: none">• Colonias generalmente pequeñas, blanco-grisáceos, lisas y rugosas	25 a 250 colonias por placa
MRS-A	<ul style="list-style-type: none">• Colonias generalmente pequeñas, blanco-grisáceos, lisas y rugosas con la aparición de un halo transparente	25 a 250 colonias por placa
PDA	<ul style="list-style-type: none">• Las levaduras se observan como colonias de color crema o blanco.• Los hongos crecen como colonias difusas y de varios colores.	10 a 150 colonias por placa



6.3.3 Determinación de pH.

Al mismo tiempo, para cada muestra de la fermentación sólida, se tomaron 2g de masa y se le agregaron 5ml de agua destilada, para la medición del pH con ayuda del potenciómetro.

Para la fermentación líquida se colocaron 10ml de muestra y se midió el pH con el potenciómetro marca Hanna Meter.

6.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

El aislamiento y purificación se llevó a cabo en el laboratorio 324, del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

6.4.1 Aislamiento de enterobacterias

Se aislaron entre tres y cinco colonias para cada tiempo de fermentación (fermentación líquida y sólida) y de las muestras de la mazorca, la mazorca desgranada, los granos rotos y la masa, que estaban presentes en el medio BRVGA después de 48 horas de incubación de acuerdo con las características descritas en la tabla 4, las colonias tenían que estar perfectamente separadas y ser distintas en el color, tamaño y forma de la colonia. El aislamiento se llevó a cabo por medio de la técnica de estriado en cuadrante radial en medio BRVGA hasta asegurar el agotamiento del inóculo. Al final se colocó cada placa en la incubadora a 37°C por un periodo de 18 a 24 horas. Pasado este tiempo, se revisó el crecimiento y la morfología de cada una de las colonias y se llevó a cabo la tinción de Gram y la prueba de catalasa.

6.4.1.1 Tinción de Gram

Se prepararon los *frotis* bacterianos a partir de las colonias aisladas con un crecimiento no mayor a 18 horas de incubación. Después se realizó la tinción de Gram (Anexo II). Las preparaciones fueron examinadas al microscopio con un



aumento total de 1000x. Debido a que se trataba de enterobacterias, la morfología buscada eran bacilos Gram-negativos.

6.4.1.2 Prueba de catalasa

Se tomó una colonia aislada, y se distribuyó sobre una gota de peróxido de hidrógeno colocada sobre un porta objetos. La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2). Las enterobacterias al ser catalasa-positivo producen esta reducción observándose la formación de burbujas.

6.4.2 Purificación de cepas de enterobacterias

Para llevar a cabo la purificación, se seleccionaron aquellas colonias que fuesen Gram-negativas y catalasa-positivas. El aislamiento se llevó a cabo por medio de la técnica de estriado en cuadrante radial para asegurar el agotamiento del inóculo en medio BRVGA. Al final se colocó cada placa en la incubadora a 37°C por un periodo de 18 a 24 horas. Pasado este tiempo, se revisó el crecimiento y la morfología de cada una de las colonias, se consideraron los siguientes criterios: homogeneidad en la placa, que por lo menos hubiese una colonia aislada en la placa y que el color de la colonia fuese morado o lila debido a que en el medio BRVGA el rojo neutro es el indicador de pH; todas las enterobacterias fermentan la glucosa, esto produce la acidificación del medio y el viraje del indicador de pH a un color rojo intenso, debido a esto, se observan colonias de color rojo púrpura, rodeadas, generalmente de una zona rojiza de bilis precipitada. Después se llevó a cabo la tinción de Gram, la prueba de catalasa, oxidasa, hemólisis y fermentación de la lactosa.

6.4.2.1 Prueba de oxidasa

Se mojó un papel filtro con una solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetramil-*p*-fenilendiamina (reactivo de Kovac's) y se colocó en una placa de Petri, a continuación se colocó con un palillo estéril una colonia aislada; este reactivo tiñe las colonias oxidasa-positivas en color azul en un tiempo de 5 a 10 segundos



(MacFaddin, 2003). Las enterobacterias son oxidasa-negativas, por lo que no debe presentarse coloración en las colonias. Como control positivo para esta prueba se utilizó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 proveniente del cepario de la Facultad de Química.

6.4.2.2 Prueba de hemólisis

Para realizar esta prueba, las cepas se inocularon en agar sangre (Anexo I). La infusión de músculo de corazón y la peptona de caseína proporcionan la fuente de nitrógeno, carbono, aminoácidos y proteínas; el extracto de levadura provee vitaminas y aminoácidos esenciales, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico; fue desarrollado por Brown en 1919 y por este método podemos tener los siguientes tipos de hemólisis (incompleta: se presenta una zona de glóbulos rojos parcialmente lisados que rodean a la colonia, acompañada por un color verde tenue, con tendencia a dar un color café con decoloraciones en la placa, alrededor de la superficie de las colonias. Completa: da una zona totalmente decolorada alrededor de la colonia que indica hemólisis de los glóbulos rojos). En el agar sangre, las colonias de enterobacterias pueden dar hemólisis parcial o incompleta, y son generalmente colonias de medianas a largas, brillantes y grises; sin embargo, algunas especies tienen morfologías características. Por ejemplo, *Klebsiella* puede dar colonias mucoides y *Yersinia* son colonias generalmente pequeñas y puntiformes. Adicionalmente, algunas especies, por ejemplo: *Serratia marcescens*, *Serratia rubidea*, *Enterobacter sakazakii* y *Pantoea agglomerans*, producen un pigmento (De la Maza *et al.*, 2004).

6.4.2.3 Fermentación de lactosa

Las cepas se sembraron en agar MacConkey (Anexo I) para observar la fermentación de la lactosa, este medio contiene cristal violeta y sales biliares como inhibidores de organismos Gram-positivos. Las colonias aisladas de bacterias que fermentan la lactosa son rosadas y pueden estar rodeadas de una zona de precipitado de sales biliares el cual es debido a una caída en el pH por la fermentación de la lactosa; las colonias que no fermentan la lactosa permanecen



incoloras. Las enterobacterias pueden ser lactosa-positivo o lactosa-negativo (Holt, 2000).

6.5 CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS PURAS

Para llevar a cabo la conservación de las cepas puras de enterobacterias (Gram-negativas y catalasa-positivas), se inoculó una colonia, proveniente del BRVGA en agar nutritivo (Anexo I), para después incubar durante 24 horas a 37°C para obtener colonias jóvenes. Al paso de este tiempo, se inoculó una colonia del agar nutritivo en un tubo con 5ml de caldo infusión cerebro corazón BHI (Anexo I), se incubó durante 24 horas a una temperatura de 37°C. Después, se colocó 1.7ml de este cultivo en un tubo que contenía 0.3 ml de glicerol estéril al 20% (J.T. Baker). Al final cada cultivo se guardó a -60°C en el ultracongelador (Puffer Hubbard).

6.6 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE ENTEROBACTERIAS POR MÉTODOS FENOTÍPICOS

6.6.1 Sistema Vitek2®

Para la identificación de las cepas de enterobacterias se utilizó el sistema VITEK2® completamente automatizado con una capacidad de 60 tarjetas. Las tarjetas correspondían a la serie de GRAM Negativas: GN card ref 21341 (Figura 13).

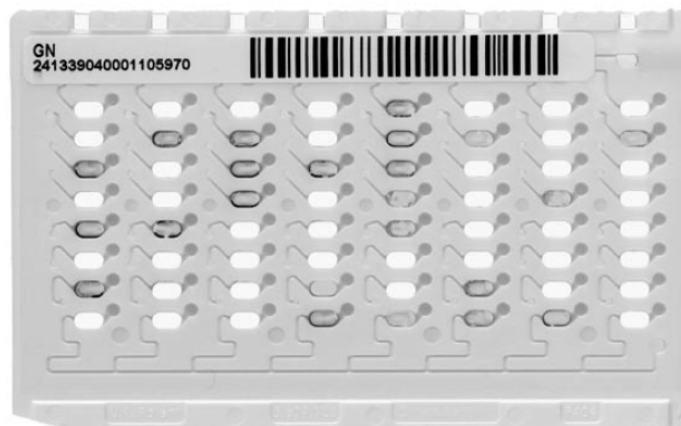


Figura 13: Tarjeta de identificación colorimétrica GN para Vitek2®



Los principales usos del sistema vitek2® (BioMerieux-Industry, USA) son:

- Identificación de bacterias y levaduras.
- Test de susceptibilidad antibiótica (AST) y detección de mecanismos de resistencia.
- Reporte de tendencias de epidemiología.

El sistema está constituido por un inoculador/sellador (Figura 14), un incubador/lector (Figura 15), una computadora y una impresora.



Figura 14: Sistema vitek2® inoculador/sellador

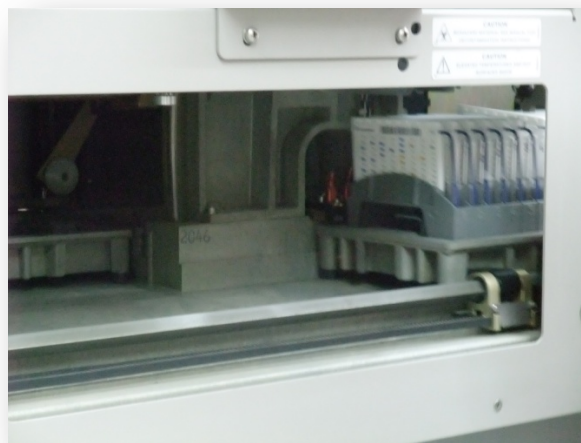


Figura 15: Sistema vitek2® incubador/lector



Para llevar a cabo la identificación por medio del VITEK, fue necesario colocar 3 ml de solución salina al 0.45% en tubos de plástico con capacidad de 5 ml; después se inoculó con cada uno de los cultivos jóvenes (24 horas) que provenían de agar soya tripticaseína (Anexo I) hasta obtener una densidad óptica de 0.5-0.6 equivalente a la escala de MacFarland No. 2 que se midió en el DensiCheck™. Después se introdujo la tarjeta VITEK que se presenta en envase unitario, lo cual garantiza una perfecta conservación de las pruebas hasta el momento de su empleo, es del tamaño de una tarjeta de crédito, no ocupa espacio, ni para su conservación, ni para su eliminación. A continuación se ingresaron los datos de la muestra y de la tarjeta en la computadora y se colocaron en la cámara VITEK donde se inoculó y cerró cada tarjeta. Una vez inoculada, la tarjeta, se encuentra herméticamente cerrada, y por tanto es manipulable sin riesgo de contaminación; cada tarjeta de identificación posee 64 pocillos que contienen los substratos bioquímicos (Anexo IIIa) en forma deshidratada por lo que no es necesario añadir ningún reactivo. Los substratos miden diversas actividades metabólicas como la acidificación, alcalinización, hidrólisis de enzimática, el crecimiento en presencia de sustancias inhibitorias; una película óptica en ambas partes de la tarjeta permite una adecuada transmisión de oxígeno (Pincus, Biomérieux, Inc.)

Después de 24 horas, la computadora equipada con los programas de VITEK efectúa un control permanente de las operaciones en curso, registra los valores, trata e interpreta los resultados.

6.6.2 Tiras api®20E

La preparación de la galería (BioMerieux-Industry, USA) se realizó de la siguiente manera: se reunió el fondo y la tapa de una cámara de incubación y se repartieron 5ml de agua destilada en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda. Después se sacó la galería del envase y se inoculó la galería, para esto fue necesario colocar en 5ml de NaCl 0.85% estéril una colonia proveniente de un cultivo joven (18-24 horas) de cada una de las colonias provenientes de agar nutritivo y se suspendió hasta homogenizar en el medio, después, se debe introducir la



suspensión bacteriana en los tubos de la galería (Anexo IIIb) con la ayuda de una pipeta (inclinando la cámara ligeramente para evitar la formación de burbujas); para las pruebas citrato, Voges Proskauer y gelatina, se llenó el tubo y la cúpula; para las otras pruebas, se llenó únicamente los tubos y para las pruebas; Arginina dihidrolasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, H₂S, ureasa, se creó una atmósfera anaerobia llenando la cúpula con aceite de parafina. Terminando la inoculación, se procedió a cerrar la cámara de incubación y se incubaron las galerías a 36±2°C durante 18-24horas.

Concluido el tiempo de incubación, se realizó la lectura de la cámara de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Terminando este paso, se obtuvo un perfil numérico de 7 cifras, y con la ayuda del software de identificación Apiweb™(BioMerieux-Industry, USA) se introdujo el código de 7 cifras y se obtuvo el perfil de identificación de cada muestra.

6.7 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS POR MÉTODOS GENOTÍPICOS

6.7.1 Extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN se procedió a descongelar y reactivar las cepas que, previamente identificadas, fuesen de distintos géneros y especies. Por lo que se colocaron 200µl del cultivo en glicerol en un tubo con 4ml de caldo BHI y se incubó durante 24 horas a 37°C, al término se observó el crecimiento y se procedió a sembrar por el método de estría radial en placas con agar TSA, se incubaron las placas durante 24 horas a 37°C. Después de este tiempo, dado que hubo un buen crecimiento, se procedió a realizar la extracción del ADN utilizando un método químico-enzimático (Lawson *et al.*, 2001).

A partir de las placas se tomó una colonia aislada que fue suspendida en 500µl de amortiguador TES 1X (Anexo IVa), a continuación se procedió a adicionar 20µl de lisozima (20mg/ml Sigma-Aldrich (Anexo IVa)) y se agitó con vórtex, después, se incubó en una incubadora con agitación (Eppendorf, Thermomix comfort) a 37°C de 15 a 60 minutos hasta que la solución se tornó viscosa. Al término de ese



tiempo, se adicionaron 8 μ l de pronasa 20mg/ml Sigma-Aldrich (Anexo IVa) y 8 μ l de RNAasa 20mg/ml Sigma-Aldrich (Anexo IVa) se agitó con el vórtex y se incubó a 65°C durante una hora. Después se adicionaron 120 μ l de detergente SDS al 10% (Anexo IVa), se agitó vigorosamente y se colocaron los tubos en el baño con agitación a 65°C durante 10 minutos más. Se retiraron los tubos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. A continuación, se adicionó 600 μ l de fenol-cloroformo (Sigma®) y se agitaron los tubos en el vórtex hasta formar una emulsión blanca. Se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 14,000rpm y la fase superior se colocó en un tubo nuevo; se agregaron 600 μ l de fenol-cloroformo y se agitaron los tubos en el vórtex hasta formar una emulsión blanca. Se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 14,000rpm y la fase superior se colocó en un tubo nuevo. Después se agregaron 500 μ l de etanol absoluto frío, se agitó suavemente cada tubo y se centrifugaron a 14,000rpm por 10 minutos; se desechó el etanol y se dejaron reposar las muestras durante 12 horas destapadas para eliminar el etanol residual. Al finalizar, se adicionaron 50 μ l de agua destilada, se colocaron los tubos en la incubadora con agitación a 65°C durante una hora.

Para comprobar la pureza e integridad del ADN extraído, se preparó un gel de agarosa al 1% (Invitrogen®), se colocaron 5 μ l de muestra junto con 1 μ l de amortiguador de carga con colorante en cada uno de los pozos del gel, usando un pozo por muestra y uno extra para colocar 5 μ l de marcador de peso molecular de 1Kbp de la marca InvitroGen®. A continuación se corrió el gel en una cámara para electroforesis de Pharmacia Biotech, modelo GNA 100 a 90V por 30 minutos, usando el equipo Bio-Rad Power Pac 30 como fuente de poder. Después de este tiempo, se tiñó el gel en una solución de Bromuro de etidio al 2% por 15 minutos para después observarlo en un transiluminador marca Fotodyne modelo FotoUV/15. La imagen se capturó con el equipo Kodak Image Station y el programa Carestream. La formación de bandas en el gel mostró el ADN presente y su integridad; que dieron un criterio preliminar de la pureza y concentración del mismo.



6.7.1.1 Medición de la concentración y pureza del DNA

Se midió la concentración del ADN en el espectrofotómetro UV-Visible marca Agilent modelo 8453E. Para esto fue necesario colocar en una celda de cuarzo (Agilent) 10 μl de la muestra de ADN, después la celda se colocó en el espectrofotómetro y se realizó la lectura a 260 nm y 280 nm; como blanco se utilizó agua destilada.

Para conocer la concentración de ADN fue necesario realizar la siguiente operación:

La densidad óptica obtenida en el espectrofotómetro a 260nm se multiplicó por 5 debido al paso óptico de la celda y si se llevó a cabo una dilución, por el factor de dilución, después se sabe que 1 densidad óptica equivale a 50ng/ μl de ADN:

$$\text{Concentración de ADN} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) = (\text{DO}_{260\text{nm}})(5)(\text{factor de dilución}) \left(50 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right)$$

Para evaluar la pureza de la muestra fue necesario determinar la relación $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}}$, dónde se buscó que la relación fuese de 1.8 a 2.0 ya que a este valor la absorción es causada por los ácidos nucleicos (Sambrook *et al.*, 1989).

6.7.2 Perfiles ISR

El análisis de las moléculas de ADN o ARN se ha utilizado en un gran número de estudios sobre la taxonomía y tipificación de las bacterias para diversos estudios. Indudablemente, estos métodos son consecuencia del avance tecnológico y sirve para reflejar las relaciones naturales del ADN. El análisis de familias multigénicas como los operones *rrn* y los genes del ARNt ha demostrado ser extremadamente útil. El espacio intergénico 16S-23S ADNr fue denotado como un espaciador interno de transcripción (ITSs), como regiones del espacio intergénico (ISRs), y como largas regiones del espacio intergénico (LISRs) (Gürtler y Stanisich, 1996).



Los ISRs son áreas menos conservadas que las regiones adyacentes (genes 16S-23S ADNr) como resultado de una menor presión de selección durante la evolución, exhibiendo así una gran cantidad de variaciones en la secuencia y en la longitud a nivel de género y especie. Este último es, en parte porque las variaciones en el número y tipo de secuencias con roles funcionales (genes ARNr) que se pueden encontrar también en el ISR. Como consecuencia, el análisis del polimorfismo de la longitud del espacio 16S-23S y la secuencia de la variabilidad se ha demostrado ser un importante suplemento a la secuenciación del 16S ADNr para la diferenciación de especies de bacterias e incluso para procariotes, ahora su uso siendo más frecuente para estudios de tipificación, evolución y diversidad de muchos grupos bacterianos (Ben Belgacem *et al.*, 2009).

El 16S-23S ISR puede ser un blanco fácil para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para mostrar la longitud del polimorfismo en diferentes operones del genoma del ADNr, basado en la movilidad electroforética en un gel de agarosa. La longitud varía considerablemente entre especies (200-1500pb), usualmente mostrando variaciones significativas a nivel de género y especie y en algunos casos variaciones intra especie (Martínez y Siñeriz, 2004).

Para la amplificación del espacio intergénico (Intergenic Spacer Region) entre el ARNr 16S y 23S, se usan los cebadores señalados en la Tabla 5:

Tabla 5: Cebadores utilizados para la amplificación del espacio intergénico

Cebador	Secuencia 5'-3'	Referencia
1387V	GCC TTG TAC ACW CCG CCC	Chenol <i>et al.</i> , 2003.
118R	GTT NCC CCA TTC RGA	Chenol <i>et al.</i> , 2003.

El cóctel de la reacción de amplificación del espacio intergénico se encuentra en la Tabla 6.



Tabla 6: Cóctel de la reacción, método ISR.

Reactivo	Volumen
Tampón 10X	5 µl
MgCl₂ (25mM)	5 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
Cebador 1387V (50µM)	1 µl
Cebador 118R (50µM)	1 µl
Taq (1U/µl)	1 µl
Agua destilada estéril	31 µl
ADN (40ng/µl)	5 µl
Total	50 µl

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 5 min a 94°C, 35 ciclos de 30s a 94°C, 1 min a 56°C y 45s a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C. El procedimiento se realizó en el termociclador marca Biometra modelo Tpersonal.

Para la visualización de los fragmentos amplificados se preparó un gel de agarosa (InvitroGen®) al 1.2% (Anexo IVb), se colocaron 5 µl de los productos de PCR junto con 1.5µl de amortiguador de carga con colorante en cada uno de los pozos del gel, usando un pozo por muestra y uno extra para colocar 5µl de marcador de peso molecular de la marca InvitroGen® de 1Kpb. Se realizó la electroforesis durante 90 minutos en una cámara para electroforesis de Pharmacia Biotech, modelo GNA 100 a 90V por 30 minutos, usando el equipo Bio-Rad Power Pac 30 como fuente de poder. Después se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio al 2% durante 15 minutos; para después observarlo en un transiluminador marca Fotodyne modelo FotoUV/15. Al final, el gel se fotografió con el equipo Kodak Image Station y se capturó con el software Carestream.



6.7.3 Perfiles RAPD

La tecnología estándar del RAPD utiliza oligonucleótidos sintéticos cortos (10 nucleótidos de largo) de secuencias aleatorias como cebadores para amplificar cantidades de nanogramos de ADN genómico total bajo condiciones de alineación a temperaturas bajas en el PCR. A una temperatura apropiada de alimenamiento durante el ciclo térmico, los oligonucleótidos de secuencias aleatorias enlazan varios sitios de cebado en las secuencias complementarias en el templado del ADN genómico y produce discretos productos de ADN si los sitios de cebado están dentro de una distancia el uno del otro amplificable (Figura 16).

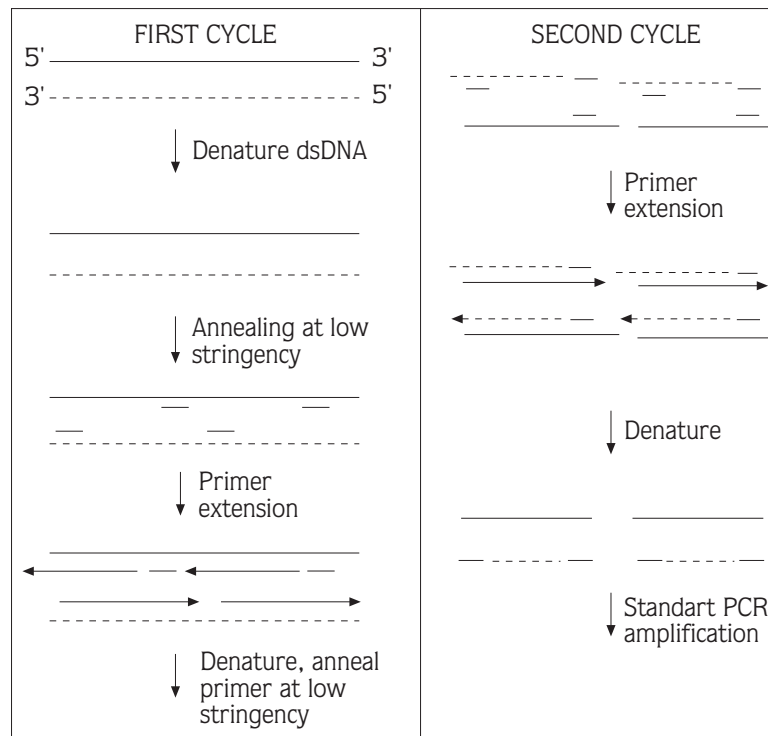


Figura 16: Diagrama esquemático de la reacción del RAPD para 2 loci (Bardacki, 2001)



El perfil del ADN amplificado depende de la homología de la secuencia del nucleótido entre el templado del ADN y el oligonucleótido al final de cada producto amplificado. La variación del nucleótido entre diferentes conjuntos de templado de ADN resultará en la presencia o ausencia de bandas debido los cambios de los sitios de cebado (Bardacki, 2001).

Para la técnica RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) se usó el cebador descrito en la tabla 7:

Tabla 7: Cebador utilizado para la Amplificación Polimórfica al azar del ADN

Cebador	Secuencia 5'-3'	Referencia
M13	GAAACAGCTATGACCATG	Malorny <i>et al.</i> , 2003.

El cóctel de la reacción de amplificación se encuentra en la tabla 8.

Tabla 8: Cóctel de la reacción de RAPD

Reactivo	Volumen
Tampón 10X	5 µl
MgCl ₂ (25mM)	10 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
Cebador M13 (50µM)	5 µl
Taq (1U/µl)	2 µl
Agua destilada estéril	22 µl
ADN (40 ng/µl)	5 µl
Total	50 µl

Las condiciones de amplificación fueron: 5 min a 94°C, 5 minutos a 40°C y 5 minutos a 72°C, seguido de 33 ciclos de 30s a 94°C, 1 min a 43°C y 1 min a 72°C



y una extensión final de 5 min a 72°C en el termociclador marca Biometra modelo Tpersonal.

Para la visualización de los fragmentos amplificados se preparó un gel de agarosa (InvitroGen®) al 1.2% (Anexo IVb), se colocaron 5 µl de los productos de PCR junto con 1.5µl de amortiguador de carga con colorante en cada uno de los pozos del gel, usando un pozo por muestra y uno extra para colocar 5µl de marcador de peso molecular de la marca InvitroGen® de 1 Kpb. Se realizó la electroforesis durante 90 minutos en una cámara para electroforesis de Pharmacia Biotech, modelo GNA 100 a 90V por 30 minutos, usando el equipo Bio-Rad Power Pac 30 como fuente de poder. Después se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio al 2% durante 15 minutos; para después observarlo en un transiluminador marca Fotodyne modelo FotoUV/15. Al final, el gel se fotografió con el equipo Kodak Image Station y se capturó con el software Carestream.



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 MUESTREO DE MATERIAS PRIMAS Y PROCESO DE ELABORACIÓN

El atole agrio fue elaborado el día 2 de mayo de 2011 por la señora María Gómez en su casa en Villahermosa, Tabasco. La casa se encontraba limpia, y la higiene de la señora era buena, no utilizó cofia, ni guantes, ni cubreboca.

7.1.1 Materias primas



Figura 17: Mazorcas utilizadas para la elaboración del atole agrio

La materia prima que se utilizó para elaborar el atole agrio fue maíz tierno adquirido en el mercado Pino Suárez de Villahermosa, Tabasco; se compraron cien mazorcas. El maíz tierno (Figura 17) es muy diferente al maíz de dobla, que comúnmente se utiliza para este tipo de alimento, en esta ocasión no se elaboró con maíz de dobla porque la cosecha del maíz de dobla se había llevado a cabo a principios de abril. El maíz tierno posee

una humedad mucho más alta que el maíz de dobla, por lo que es más susceptible a ser atacado por microorganismos, en especial hongos. El maíz se compró el día 1 de mayo del 2011, previo a la elaboración del atole agrio y se almacenó en bolsas de plástico a temperatura ambiente.

7.1.2 Limpieza y desgranado del maíz

La limpieza se realizó separando las hojas y los olotes del maíz, además eliminando insectos, este paso se realizó con las manos lavadas. El desgranado se realizó manualmente utilizando un cuchillo, que fue



Figura 18: Desgranado del maíz por la señora María Gómez



sanitizado previamente con alcohol, sin embargo, es una fuente de contaminación con microorganismos, debido a que el cuchillo no se limpió entre mazorca y mazorca; los granos se recolectaron en una tinaja de plástico, que aunque fue sanitizada previamente con alcohol, es una fuente de contaminación con microorganismos debido a que el proceso no fue realizado en un área aséptica (Figuras 18 y 19).



Figura 19: Maíz desgranado

7.1.3 Agua

El agua utilizada para la elaboración del atole agrio provenía de la llave de paso de casa de la señora María Gómez, que a su vez era proporcionada por el sistema de agua potable de la red del municipio de Villahermosa, Tabasco.

Es importante mencionar, que de acuerdo con la NOM-127-SSA-1-1994, “Salud ambiental, agua para uso y consumo humano- límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización”, el límite permitido de microorganismos coliformes totales es de 2 UFC/100 ml, lo que indica que la calidad del agua no es aceptable y gran parte de la contaminación microbiana provino del agua, ya que como se observa en la Tabla 9, la cantidad de coliformes presentes en el agua fue de 20×10^2 UFC/100 ml.



7.1.4 Molienda del maíz

En esta operación, se molió el maíz en un molino eléctrico, sin marca (Figura 20); que utiliza la familia para moler maíz nixtamalizado para elaborar tortillas. El molino no tuvo una limpieza previa. El molino es un punto crítico en el proceso de elaboración del atole agrio ya que no se limpia entre cada molienda debido a la dificultad que involucra la limpieza de las aspas del molino ya que no se podían remover. En un estudio realizado con el *pozol* de Chiapas, Wachter y col. (1993), observaron que la contaminación del *pozol* ocurrió en diferentes etapas durante su elaboración. La microbiota existente inicialmente en los granos del maíz, aunque seguramente es eliminada durante el proceso de nixtamalización, puede nuevamente aumentar durante el lavado y el remojo del nixtamal por la existencia de microorganismos presentes en el agua y en los recipientes empleados, sin embargo, el incremento sustancial de éstos ocurre durante la molienda del nixtamal ya que es ahí donde se inoculan, entre otros, los microorganismos fermentativos y por falta de higiene, bacterias patógenas. En dicho estudio, después de la molienda, los reportes de las cuentas totales de enterobacterias fueron aproximadamente 10^4 UFC/g.

Debido a la alta humedad de los granos del maíz, la molienda se llevó a cabo muy rápido y no fue necesaria la adición de agua. La masa obtenida se dividió en dos lotes, en bandejas de plástico. Las características organolépticas de la masa fueron las siguientes: tenía un color amarillo claro, era opaca y olía un poco dulce, la consistencia de la masa obtenida era muy grumosa y aguada por lo que no fue posible amasar (Figura 21).



Figura 20: Molino utilizado para moler maíz



Figura 21: Maíz molido

Tanto en las materias primas como en la masa recién molida, se realizó la cuantificación de los siguientes grupos microbianos: mesófilos aerobios, hongos y levaduras, bacterias ácido lácticas, bacterias amilolíticas, enterobacterias y coliformes totales (Tabla 9).



Tabla 9: Cuantificación de grupos microbianos presentes en las materias primas utilizadas en la elaboración del atole agrio

Muestra	Mesófilos aerobios	Hongos y levaduras	Bacterias lácticas	Bacterias amilolíticas	Coliformes	Enterobacterias
Mazorca (UFC/g)	26x10 ⁵	15x10 ⁵	77x10 ⁴	20x10 ²	18x10 ⁵	10x10 ⁵
Granos enteros (UFC/g)	14x10 ⁶	58x10 ⁵	67x10 ⁵	10x10 ³	66x10 ⁵	44x10 ⁵
Granos rotos* (UFC/g)	53x10 ⁷	24x10 ⁶	12x10 ⁶	30x10 ⁴	70x10 ⁵	50x10 ⁵
Masa (UFC/g)	22x10 ⁸	58x10 ⁶	68x10 ⁶	10x10 ⁶	10x10 ⁷	11x10 ⁷
Agua (UFC/100ml)	26x10 ⁴	11x10 ⁴	10x10 ²	-	20x10 ²	20x10 ²

*Los granos rotos se obtienen cuando los granos enteros se destruyen con la yema de los dedos en condiciones asépticas.

- No se realizó esta cuenta

Como se puede ver en la Tabla 9, la mazorca tiene 10x10⁵ UFC/g de enterobacterias, la cuenta de enterobacterias reportadas en la mazorca para elaborar tortillas fue desde 10x10² UFC/g hasta 10x10⁶ UFC/g (Capparelli y Mata, 1975), por lo que el valor obtenido en las mazorcas, se encuentra dentro de este rango; del mismo modo, se observó que cuando se desgrana y se obtienen los granos enteros, hay un aumento hasta 44x10⁵ UFC/g de enterobacterias lo que indica que el cuchillo con el que se realiza el desgranado podría aportar un incremento a la cuenta de enterobacterias; sin embargo, al romper los granos, la cuenta de enterobacterias aumentó a 50x10⁵ UFC/g de enterobacterias, esto se puede explicar debido a que cuando se realiza la cuenta de los granos, sólo se contabilizan las enterobacterias presentes en la superficie del grano y al romper éste, se contabilizan también las enterobacterias presentes en el interior del grano, lo cual no es un incremento muy significativo ya que de 6.6 logUFC/g aumentó a 6.7 logUFC/g; por lo que en la cuenta de enterobacterias no hay diferencia entre los granos enteros y los granos rotos y se puede concluir también, que en el



interior del grano no hay presencia de enterobacterias sino que éstas sólo están presentes en la superficie. De la misma manera, como se mencionó anteriormente para el pozol, el mayor aumento en la cuenta de enterobacterias se observó después de la molienda: 11×10^7 UFC/g, el doble que lo reportado para el pozol, es decir, cuando se obtuvo la masa, conlleva a una contaminación bastante alta por parte del molino, ya que éste no fue sanitizado antes de realizar la molienda del maíz. Otra fuente muy importante de contaminación podrían ser las manos de la persona que elaboró el alimento, ya que toda la operación se llevó a cabo de manera manual.

Para los demás grupos microbianos, se observó el mismo comportamiento, en el que la mazorca era la muestra que tenía una menor cantidad de microorganismos presentes. Capparelli y Mata (1975) reportaron las siguientes concentraciones de microorganismos en la mazorca para elaborar tortillas (Tabla 10).

Tabla 10: Crecimiento de microorganismos reportados para la mazorca del maíz (Capparelli y Mata, 1975) y lo obtenido en este estudio.

Microorganismo	Rango de crecimiento (log ₁₀)	Valor en la mazorca para elaborar atole agrio
Mesófilos aerobios totales	3-9	6.4
Coliformes	<3-7	6.3
Bacterias lácticas	3-9	5.8
Hongos y levaduras	<3-9	6.1

Cuando se desgranó la mazorca, en todos los grupos aumentó la cantidad de microorganismos sobre todo en el grupo de mesófilos aerobios y bacterias ácido lácticas. Al romper los granos, nuevamente se incrementó la cantidad de microorganismos para todos los grupos microbianos, llegando a una concentración de 53×10^7 UFC/g para la cuenta de los mesófilos aerobios. Al término de la



molienda, en la masa obtenida se incrementó la cantidad de microorganismos, cuando se compara con los granos rotos en condiciones asépticas, lo que nos indica una contaminación por parte del molino.

7.1.5 Fermentación líquida

Para la fermentación líquida, fue necesario añadir agua a la masa (1:1), después se disolvió la masa en el agua con la mano y se dejó reposar a temperatura ambiente con una cubierta de manta de cielo durante 12 horas (Figura 22), durante ese lapso de tiempo, se cuantificaron los grupos microbianos de bacterias lácticas, bacterias lácticas amilolíticas, hongos y levaduras, mesófilos aerobios, coliformes y enterobacterias, los resultados se encuentran en la Tabla 11.



Figura 22: Preparación de la fermentación líquida del atole agrio



Tabla 11: Cuantificación de grupos microbianos presentes en la fermentación líquida durante la elaboración del atole agrio (UFC/g) y pH.

Tiempo (horas)	Bacterias Lácticas	Bacterias Amilolíticas	Hongos y levaduras	Mesófilos aerobios	Coliformes	Enterobacterias	pH
0	10x10 ⁷ v.e.	16x10 ⁵	15x10 ⁷	88x10 ⁸	36x10 ⁶	20x10 ⁸	7.73
1	27x10 ⁷	74x10 ⁵	13x10 ⁷	10x10 ⁹	79x10 ⁶	20x10 ⁸	7.26
2	58x10 ⁸	41x10 ⁶	77x10 ⁷	26x10 ¹⁰	21x10 ⁷	18x10 ⁸	7.18
3	83x10 ⁷	19x10 ⁷	11x10 ⁸	30x10 ⁹	50x10 ⁷	15x10 ⁸	6.91
4	30x10 ⁸	83x10 ⁶	52x10 ⁹	10x10 ⁸	91x10 ⁷	10x10 ⁸	6.37
5	26x10 ⁸	20x10 ¹⁰	36x10 ⁷	46x10 ¹⁰	11x10 ⁷	97x10 ⁷	5.82
6	11x10 ⁸	37x10 ¹⁰	50x10 ⁸	79x10 ⁸	46x10 ⁶	36x10 ⁶	4.81
12	41x10 ⁷	25x10 ⁷	29x10 ⁸	77x10 ⁸	60x10 ⁴	70x10 ⁴	4.33

*v.e. valor estimado.

Tabla 12: Cuantificación de grupos microbianos presentes en la fermentación sólida durante la elaboración del atole agrio (UFC/g) y pH.

Tiempo (horas)	Bacterias Lácticas	Bacterias Amilolíticas	Hongos y levaduras	Mesófilos aerobios	Coliformes	Enterobacterias	pH
0	19x10 ⁷	54x10 ⁵	15x10 ⁶	30x10 ⁷	33x10 ⁷	22x10 ⁷ v.e.	7.49
2	30x10 ⁶	19x10 ⁵	33x10 ⁸	25x10 ⁸	24x10 ⁷ v.e.	14x10 ⁷	7.51
4	62x10 ⁶	24x10 ⁶	85x10 ⁶	9x10 ¹¹ v.e	70x10 ⁶	10x10 ⁷ v.e.	7.0
6	15x10 ⁸ v.e	33x10 ⁷	17x10 ⁹	16x10 ⁸	50x10 ⁶	95x10 ⁶ v.e	6.16
8	24x10 ⁸	23x10 ⁸	39x10 ¹⁰	11x10 ¹¹	15x10 ⁶ v.e.	72x10 ⁶	5.03
10	54x10 ⁸	20x10 ¹⁰	66x10 ⁹	20x10 ⁸	10x10 ⁶	60x10 ⁶	4.69
12	14x10 ⁸	17x10 ⁸	29x10 ¹¹	33x10 ⁸	<10 ⁶ v.e.	30x10 ⁶ v.e.	4.64

Para todos los grupos microbianos al inicio de la fermentación, las cuentas eran muy altas pesar de que no se agregó intencionalmente un inóculo, y para el final de la fermentación en la mayoría de los grupos disminuyó la concentración



microbiana, lo que indica que hubo una inhibición por la acidificación del producto. Para las bacterias lácticas, se observó que hubo un máximo de crecimiento después de dos horas de iniciada la fermentación, después hubo una disminución en el crecimiento; sin embargo, el número de bacterias siempre se mantuvo elevado. Las bacterias lácticas amilolíticas al inicio de la fermentación tenían un crecimiento de 16×10^5 UFC/g, esto es debido a que los carbohidratos no se encuentran disponibles para que se dé un buen desarrollo de este grupo; pero a las cinco horas de fermentación, el crecimiento fue de 20×10^{10} UFC/g, lo que podría deberse a que el almidón se encontraba más disponible; sin embargo, para el tiempo de 12 horas de fermentación, a un pH de 4.33 ocurre un decaimiento de este grupo bacteriano lo cual podría deberse a que parte del almidón fue consumido y comienza a darse el desarrollo de substratos disponibles para que otros grupos de bacterias ácido lácticas se desarrollen en mayor cantidad. Los hongos y levaduras tuvieron un crecimiento constante durante toda la fermentación, a las 4 horas hubo un crecimiento de 52×10^9 UFC/g, siendo el máximo durante toda la fermentación.

Los mesófilos aerobios tuvieron un crecimiento máximo a las 5 horas con un crecimiento de 46×10^{10} UFC/g. Los microorganismos mesófilos aerobios son el grupo más grande de indicadores de calidad de los alimentos. Se definen como un grupo heterogéneo de bacterias capaces de crecer en un rango de temperatura entre 15 y 45°C, con un óptimo de 35°C. En productos terminados son empleados como indicadores de vida útil pero el recuento de la microbiota mesófila aerobia tiene un valor limitado a la hora de juzgar la seguridad de los alimentos, un recuento bajo de mesófilos aerobios no implica o asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de patógena; ahora bien, salvo en alimentos obtenidos por fermentación, no son recomendables recuentos elevados (Alonso y Poveda, 2008), por lo anterior, las cuentas tan altas de mesófilos aerobios obtenidos en el



atole agrio incluyen también la cuenta de bacterias lácticas que se encuentran en gran cantidad en el atole agrio.

La presencia de bacterias coliformes totales en los alimentos no significa necesariamente que hubo una contaminación fecal o que hay patógenos entéricos presentes, algunos géneros no patógenos incluyen a algunas especies del género *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella* (Rembacken *et al.*, 1999); debido a que nuestra matriz de elaboración es de origen vegetal, los principales patógenos de los vegetales son los géneros: *Brenneria*, *Dickeya*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pectobacterium* y *Samsonia* (Young, 2007); además, estos microorganismos, al igual que las enterobacterias, son susceptibles a la disminución de pH, lo que se vio al tiempo de 12 horas dónde ocurrió un descenso de hasta 60×10^4 UFC/g a un pH de 4.33.

Dentro de las enterobacterias, al inicio de la fermentación se observó un máximo de crecimiento de 20×10^8 UFC/g, sin embargo, a las doce horas hubo una disminución hasta 70×10^4 UFC/g cuando había un pH de 4.33, lo que nos indica que las enterobacterias son susceptibles a la presencia del medio ácido, es decir son neutrófilas, a diferencia de las bacterias ácido lácticas que en su mayoría son acidófilas y se pueden desarrollar a un pH menor que 5 (Ostling, 1993). De acuerdo con las características de la familia de las enterobacterias podemos encontrar géneros de diversos hábitats (Holt, 2000): agua e insectos (*Arsenophonus*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Morganella*, *Pantoea*, *Pragia*, *Proteus*, *Rahnella*, *Tatumella*, *Yersinia*), intestino animal (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), vegetales (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Pantoea*); por lo que su presencia en el atole agrio no es un indicativo de contaminación fecal o de deficiencia en el proceso, ya que la materia prima del atole agrio es de origen vegetal: el maíz.



7.1.6 Fermentación sólida

Para la fermentación sólida, se dejó la masa obtenida en la molienda sin la adición de agua, reposando durante 12 horas en el laboratorio de la UJAT a temperatura ambiente (34°C) con una cubierta de manta de cielo, muestreando cada dos horas (Figuras 23 y 24). Durante ese lapso de tiempo, se cuantificaron los grupos microbianos de bacterias lácticas, bacterias lácticas amilolíticas, hongos y levaduras, mesófilos aerobios, coliformes y enterobacterias, los resultados del conteo se encuentran en la Tabla 12.



Figura 23: Masa utilizada para la fermentación sólida del atole agrio



Figura 24: Fermentación sólida del atole agrio



De la misma manera que en la fermentación anterior, todos los grupos microbianos presentaban concentraciones muy altas. Las bacterias ácido lácticas, tuvieron un máximo de crecimiento a las 10 horas de iniciada la fermentación, (54×10^8 UFC/g). En el caso de los hongos y levaduras, también se observaron altas concentraciones después de 12 horas de fermentación (29×10^{11} UFC/g). En especial para las enterobacterias dónde la mayoría del crecimiento era extendido, se alcanzó un máximo de crecimiento al inicio de la fermentación con una cuenta de 22×10^7 UFC/g, pero a partir de este punto, hubo una disminución de la cuenta de enterobacterias hasta llegar a 30×10^6 UFC/g a las 12 horas de fermentación, cuando el pH era de 4.64. Para los coliformes, al igual que en las enterobacterias, se observó un decremento de la concentración una vez iniciada la fermentación, llegando al final de las 12 horas a una concentración $< 10^6$ UFC/g.

Para ambas fermentaciones se observó que todos los grupos microbianos estaban presentes en cantidades muy altas, muchas provenientes de la masa, y que durante el desarrollo de la fermentación aumentaron. Sin embargo, al final de la fermentación, la sólida tuvo una cuenta mayor que la líquida en los siguientes grupos microbianos: bacterias lácticas amilolíticas, hongos y levaduras, coliformes y enterobacterias.

Para el *pozol*, un alimento fermentado tradicional mexicano, se ha reportado una cuenta inicial de 10^3 - 10^4 UFC/g de enterobacterias, sin embargo, se observó que, a pesar de la acidificación del *pozol* durante la fermentación, las enterobacterias no se inhiben y sobreviven después de que se alcanzan los más bajos valores de pH (4.3 y 4.6); los alimentos acidificados fermentados se consideran más seguros que los no fermentados, ya que el crecimiento de las bacterias patógenas se ve comúnmente suprimido; en el *pozol* se observó que después de 8 días de fermentación, las cuentas de enterobacterias se redujeron hasta 10 UFC/g en el *pozol* indígena y 7.6×10^3 UFC/g en el *pozol* mestizo (Wacher *et al.*, 2000).



Para el *ogi*, otro alimento fermentado a base de maíz de origen Africano, después de un tiempo de 24 horas de fermentación, la concentración de enterobacterias era de 1×10^{13} UFC/ml, con un pH reportado de 3.5 (Sherifah y Daodu, 2011).

Como se observa en la figura 25, para ambas fermentaciones la cuenta inicial de enterobacterias era similar, para la fermentación líquida se observó una disminución mayor que para la fermentación sólida, ya que para la fermentación líquida, la disminución significó aproximadamente 3 ciclos logarítmicos; sin embargo, para la fermentación sólida, la disminución ocurrió alrededor de un ciclo logarítmico. Estas diferencias se deben a que ocurre una disminución de pH para la fermentación líquida más rápido que en la fermentación sólida (Figura 25), ya que en la fermentación sólida se alcanzó un pH de 5.03 a las 8 horas de fermentación; mientras que para la fermentación líquida se alcanzó un pH de 5.82 a las 5 horas de la fermentación. Por lo que esta disminución de pH provocó que el crecimiento de las enterobacterias se inhibiera.

7.1.7 Seguimiento de pH

Como se observa en la figura 25, el pH inicial de ambas fermentaciones fue muy cercano entre sí: 7.73 para la fermentación líquida y 7.49 para la fermentación sólida. Para la fermentación sólida se observa una disminución durante todo el transcurso de la fermentación llegando a su mínimo valor de 4.64 a las 12 horas; de la misma manera, en la fermentación líquida, la disminución ocurre durante toda la fermentación, al final de ésta se alcanza un pH de 4.33 (a las 6 horas), siendo el valor más bajo durante todo el proceso de fermentación. En un estudio previo del atole agrio, el pH reportado al inicio de la fermentación líquida fue de 6.5 llegando a un pH al final de la fermentación de 4.05; para la fermentación sólida se reportó al inicio de la fermentación un pH de 6.38 alcanzando un pH final de 4.47 (Valderrama, en revisión).

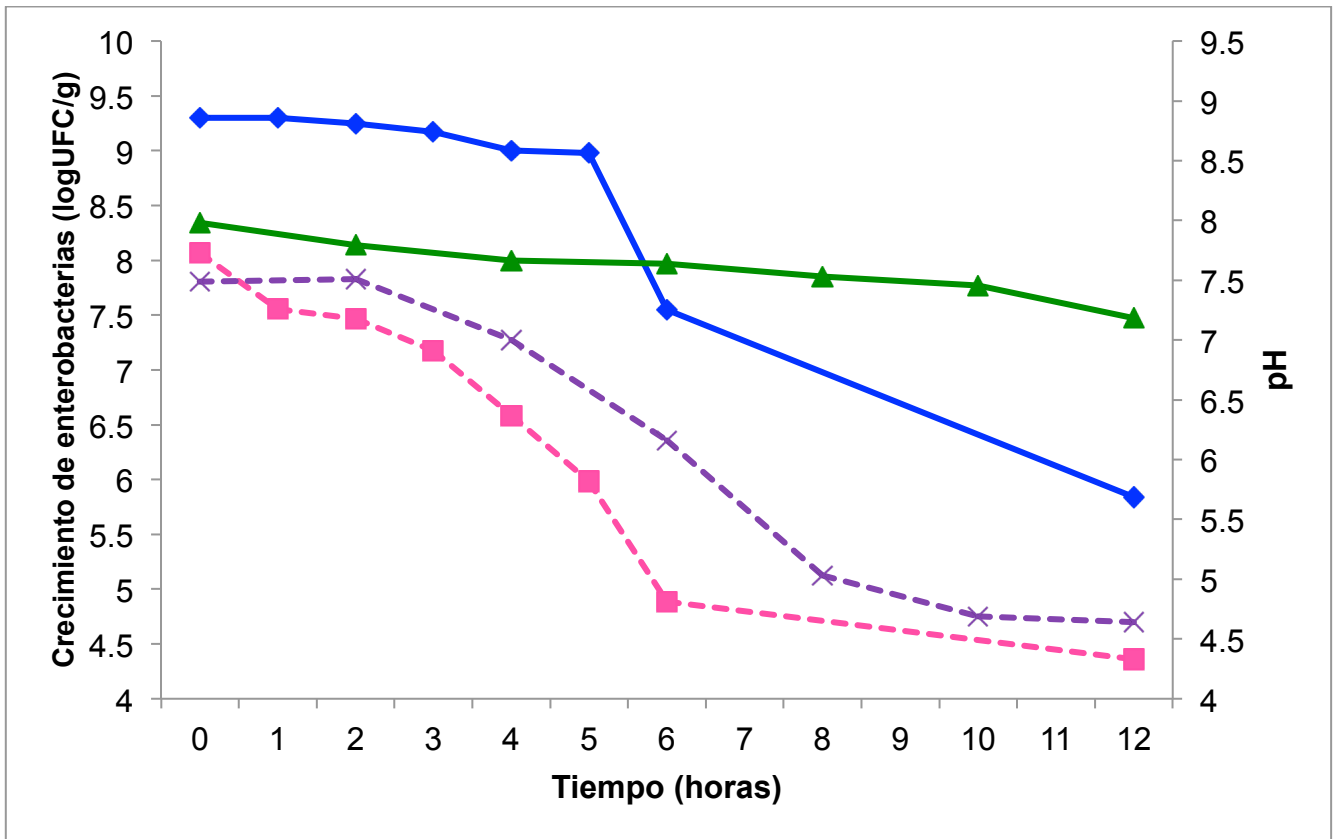


Figura 25: Fermentación del atole agrio. Crecimiento de las enterobacterias en medio BRVGA (línea continua) fermentación líquida (azul), fermentación sólida (verde). Valores de pH durante la fermentación (línea discontinua): fermentación líquida (rosa), fermentación sólida (morado).



7.1.8 Cocción del atole agrio

Una vez transcurrido el tiempo de fermentación, se prosiguió a la cocción del atole agrio para ambas fermentaciones, llevando a cabo el mismo procedimiento.

Para esto, se coló la masa fermentada a través de una coladora de plástico con el fin de eliminar el bagazo y demás sólidos presentes (Figura 26). Las características organolépticas del producto una vez colado fueron las siguientes: se obtuvo un producto blanquecino, olor ácido y consistencia aguada; en el colador, los residuos eran sobre todo cascarillas de maíz triturados y masa con una consistencia espesa. Después la masa se puso al fuego hasta llegar al punto de ebullición; al llegar a este punto, se dejó cocinar durante 20 minutos más, para ambas fermentaciones, para llegar a la cocción necesaria para obtener la consistencia deseada (Figura 27). Tradicionalmente se le puede agregar piloncillo y se bebe dulce; otros pueblos lo utilizan como base para agregar jitomate, chile, etc. En este caso, no se agregó ningún tipo de edulcorante.



Figura 26: Colado de la masa fermentada



Figura 27: Calentamiento hasta ebullición de la masa fermentada.

7.1.9 Producto final

El producto final fue un líquido espeso, color blanco, con un gusto ácido y un olor a maíz (Figuras 28 y 29). Entre ambas fermentaciones, no hubo diferencia en las características organolépticas, por lo que podemos decir que no influye el tipo de fermentación en las características sensoriales. Para el análisis microbiológico se plaqueó directamente de la muestra y dos diluciones más (Tabla 13).



Figura 28: Atole agrio a partir de la fermentación sólida



Figura 29: Atole agrio a partir de la fermentación líquida



Tabla 13: Crecimiento microbiano producto final atole agrio.

Fermentación	Bacterias lácticas	Bacterias amilolíticas	hongos y levaduras	mesófilos aerobios	coliformes	enterobacterias
Líquida	Negativo*	10 colonias*	10 colonias*	10 colonias*	10 colonias*	10 colonias*
Sólida	10 colonias*	10 colonias*	10 colonias*	10 colonias*	10 colonias*	10 colonias*

*Sensibilidad del método: 10UFC/g

En el estudio reportado por Valderrama (en revisión), la cocción del atole agrio proveniente de la fermentación líquida sólo estuvo en ebullición durante seis minutos y hubo un crecimiento de todas los grupos microbianos de aproximadamente 10^3 UFC/ml; sin embargo, para el producto proveniente de la fermentación sólida, la ebullición fue durante 10 minutos y no se detectó ningún grupo microbiano ($<10^2$ UFC/g). El atole agrio elaborado en este estudio recibió una mayor cocción debido a que no alcanzaba la consistencia deseada por la elaboradora, pero dado que hubo un menor crecimiento que el reportado previamente, podemos decir que al final si se logró aumentar la inocuidad del producto final.

7.2 AISLAMIENTO DE ENTEROBACTERIAS.

Para cada tiempo de fermentación y para las materias primas, se aislaron de 4 a 5 colonias de enterobacterias que eran distintas entre sí; ya fuera por diferencias en el color de la colonia, la forma, elevación y textura. En el agar bilis rojo violeta glucosa, la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano, las sales biliares y el cristal violeta inhiben el desarrollo de la microbiota acompañante Gram-positiva, la glucosa es el hidrato de carbono fermentable, y el rojo neutro es el indicador de pH; todas las enterobacterias fermentan la glucosa, esto produce la acidificación del medio y el viraje del indicador de pH al color rojo intenso, debido a esto, se observan colonias de color rojo púrpura, rodeadas, generalmente de una zona rojiza de bilis precipitada. En total se aislaron 76 colonias de enterobacterias. Se observaron las características de las colonias formadas en el medio (Figuras 30 y 32); después se



realizó una tinción de Gram de cada una de ellas y se observaron al microscopio (Figuras 31 y 33), además se realizó la prueba de catalasa.

Se utilizó el siguiente sistema para otorgarle clave a cada colonia aislada:

- Para las muestras provenientes de la materia prima:

C: Mazorca/ G: Grano/ B: Grano Roto/ D: masa/ W: agua

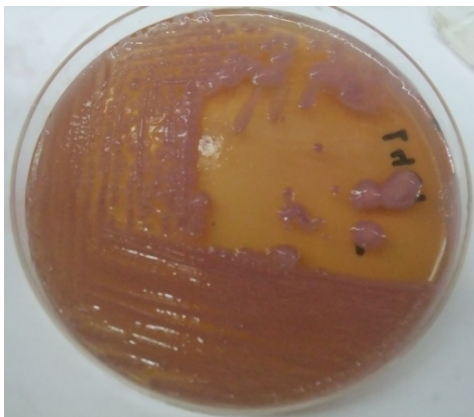
- Para las muestras provenientes de las fermentaciones:

L: Fermentación líquida/ S: Fermentación sólida

0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 o 12: Tiempo de la fermentación

E: Enterobacterias

1, 2, 3, 4, 5: Número de colonia proveniente del medio BRVGA



Clave: L4E1

Forma: circular

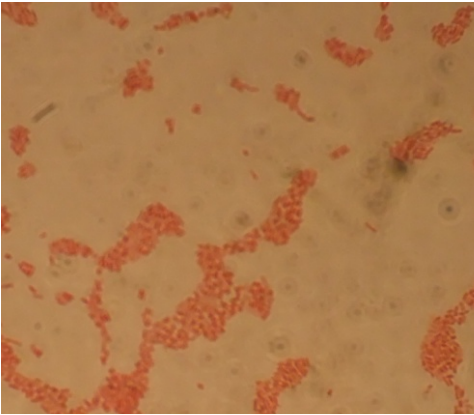
Borde: Entero

Elevación: umbonada

Textura: Viscosa, apariencia mucóide.

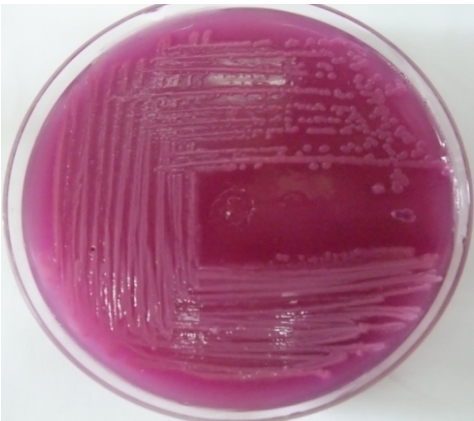
Color: morada con el centro lila

Figura 28: Características macroscópicas de una enterobacteria aislada del medio BRVGA de la fermentación líquida



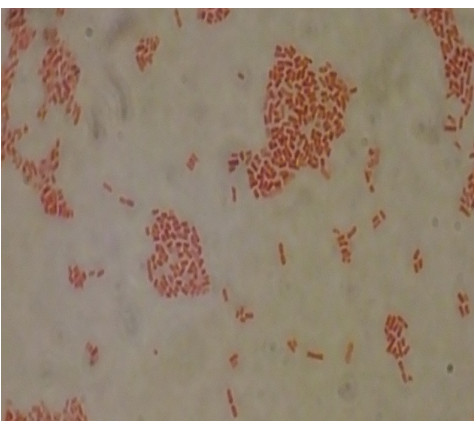
Clave: L4E1
Objetivo: 1000x
Morfología: Bacilos
Extremo: Curvo
Gram: negativo
Catalasa: Positivo

Figura 29: Características microscópicas de una colonia de enterobacteria de la fermentación líquida



Clave: S12E4
Forma: circular
Borde: Entero
Elevación: plana
Textura: Seca
Color: lila

Figura 30: Características macroscópicas de una enterobacteria aislada del medio BRVGA de la fermentación sólida



Clave: S12E4
Objetivo: 1000x
Morfología: Bacilos
Borde: Curvo
Gram: negativo
Catalasa: Positivo

Figura 31: Características microscópicas de una colonia de enterobacteria de la fermentación sólida



7.3 PURIFICACIÓN DE LAS CEPAS

Para llevar a cabo la purificación, se utilizó el agar bilis rojo violeta glucosa, se descartaron aquellas colonias que no fuesen Gram-negativas y catalasa positivas. Las características macroscópicas y microscópicas que se consideraron para la selección de las 36 cepas de enterobacterias aisladas de las materias primas y de las fermentaciones sólida y líquida se muestran en las Tablas 14, 15 y 16.

Tabla 14: Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas y purificadas de las materias primas del atole agrio de Villahermosa, Tabasco en el agar bilis rojo violeta glucosa.

Clave	Caracterización morfológica de las colonias					Caracterización microscópica	
	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color	Morfología	Gram
DE1	R	W	F	B	Blanco con morado	Bacilos	-
CE1	P	W	F	B	Gris	Cocobacilos	-
CE3	R	W	F	B	Lila	Bacilos	-
GE1	R	W	F	B	Morada	Bacilos	-
GE2	R	W	C	B	Blanco con morado	Cocobacilos	-
GE3	R	W	C	B	Blanco con morado	Bacilos	-
BE1	R	W	F	B	Blanco con morado	Bacilos	-
BE3	R	W	F	B	Lila	Bacilos	-
WE1	R	W	C	B	Blanca con morado	Bacilos cortos	-
WE3	R	W	F	B	Morada	Bacilos	-

R: Circular, P: Puntiforme, W: Entero, F: Plana, C: Convexa, B: Butirosa



Tabla 15: Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas y purificadas de la fermentación sólida del atole agrio de Villahermosa, Tabasco en el agar bilis rojo violeta glucosa

Clave	Caracterización morfológica de las colonias					Caracterización microscópica	
	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color	Morfología	Gram
S0E1	R	W	C	B	Morada	Bacilo	-
S0E2	R	W	F	B	Morada	Bacilos	-
S0E3	R	W	H	B	Lila	Bacilos	-
S2E3	R	W	C	B	Lila	Bacilos	-
S4E1	R	W	F	B	Morada	Bacilos	-
S4E3	R	W	H	B	Blanco con morado	Bacilos cortos	-
S4E4	R	W	F	B	Lila	Bacilos cortos	-
S6E4	P	W	F	D	Lila	Bacilos cortos	-
S8E3	R	W	F	B	Morada	Bacilos	-
S8E4	R	W	F	B	Gris con morado	Bacilos	-
S10E1	R	W	F	B	Blanco con morado	Bacilos	-
S10E3	R	W	U	B	Morada	Bacilos	-
S12E4	R	W	F	B	Lila	Bacilos	-

R: Circular, P: Puntiforme, W: Entero, F: Plana, C: Convexa, H: Elevada, U: umbonada B: Butirosa, D: Seca



Tabla 16: Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas de la fermentación líquida del atole agrio de Villahermosa, Tabasco en el agar bilis rojo violeta glucosa

Clave	Caracterización morfológica de las colonias					Caracterización microscópica	
	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color	Morfología	Gram
L0E2	R	W	H	B	Blanco	Bacilos	-
L0E3	R	W	C	B	Blanco	Bacilos	-
L1E1	R	W	F	B	Blanco	Bacilos	-
L1E3	R	W	H	B	Lila	Bacilos	-
L2E1	R	W	F	B	Centro blanco y morado	Bacilos	-
L4E1	R	W	F	B	Morado	Bacilos	-
L4E3	R	W	C	B	Blanco con morado	Bacilos	-
L5E2	R	W	C	B	Morado	Bacilo	-
L5E3	R	W	C	B	Blanco con morado	Bacilos	-
L5E4	R	W	C	B	Blanco	Bacilos cortos	-
L6E4	R	W	C	B	Morado	Bacilos	-
L12E3	R	W	C	B	Lila	Bacilos	-
L12E5	R	W	C	B	Morado	Bacilos	-

R: Circular, P: Puntiforme, W: Entero, F: Plana, H: elevado, C: Convexa, B: Butirosa.



Como se observa en las Tablas 14, 15 y 16, la forma de las colonias aisladas fue circular, exceptuando a las cepas CE1 y S6E4, cuya forma fue puntiforme. El borde de todas las cepas fue entero. Una de las mayores variaciones entre las cepas se encuentra en la elevación, que se puede observar claramente en el momento que se observó de lado las placas con el crecimiento; el 50% de las cepas aisladas presentaban una elevación plana. Otro grupo (36% de las cepas aisladas) presentaban una elevación convexa y el 11% de las colonias tenían una elevación elevada; es importante mencionar que sólo la cepa S10E3 era umbonada. La textura de todas las colonias era butirosa, con excepción del la cepa S6E4 que tenía una textura seca.

Otra de las mayores diferencias de morfología colonial se encontró en el color de las colonias; el color es dependiente del medio y del indicador presente; en este caso, como se mencionó anteriormente, el BRVGA es un medio selectivo que gracias la acidificación del medio, causa un viraje del indicador y provoca que las colonias tengan un color violeta o morado, por lo que era de esperarse que todas las colonias aisladas fueran de color morado o lila, pero muchas de las colonias, aunque eran moradas, presentaban un centro blanco.

Microscópicamente, al ser enterobacterias, las cepas fueron todas bacilos Gram-negativos; hubo unas pequeñas variaciones en el tamaño de los bacilos, ya que algunos eran bacilos largos: BE1, DE1, CE1, etc. y otros como S4E3, S4E4, L0E2, L0E3, etc. se observaban como bacilos cortos, esto es debido a las distintas velocidades de crecimiento, además de que nos sirve como criterio de selección para identificar distintas especies; como por ejemplo, el tamaño de *Bacillus megaterium* es de $1.5 \times 4 \mu\text{m}$ y el tamaño de *Escherichia coli* es de $1 \times 3 \mu\text{m}$ (Madigan *et al.*, 2008).

Por lo anterior, dado que las 36 cepas purificadas cumplieron con los criterios establecidos para las enterobacterias: Bacilos Gram-negativos, catalasa-positivas y moradas en el medio BRVGA; se conservaron en congelación. Las condiciones



de congelación fue en glicerol estéril al 20% a una temperatura de -60°C en el ultracongelador.

7.3.1 Pruebas bioquímicas convencionales

Para la comprobación de que las cepas aisladas fuesen enterobacterias, se aplicaron algunas pruebas bioquímicas convencionales (Tabla 17).

Las 36 cepas se inocularon en agar sangre, que se utiliza para el estudio de reacciones hemolíticas de microorganismos; por este método podemos tener los siguientes tipos de hemólisis: incompleta, se presenta una zona de glóbulos rojos parcialmente lisados que rodean a la colonia, acompañada por un color verde tenue, con tendencia a dar un color café con decoloraciones en la placa, alrededor de la superficie de las colonias. Completa, da una zona totalmente decolorada alrededor de la colonia que indica hemólisis de los glóbulos rojos. Las cepas que presentaron hemólisis incompleta fueron: L0E2, L0E3, L12E3, L12E5, WE1, GE1, S6E4, S10E1, BE1. Las cepas con hemólisis completa: S0E1, S8E4, L5E3, L12E3, GE2, CE1, CE3.

También, se inocularon en agar MacConkey para observar la fermentación de la lactosa, este medio contiene cristal violeta y sales biliares como inhibidores de organismos Gram-positivos. Las colonias aisladas de bacterias que fermentan la lactosa son rosadas y pueden estar rodeadas de una zona de precipitado de sales biliares el cual es debido a una caída en el pH por la fermentación de la lactosa; las colonias que no fermentan la lactosa permanecen incoloras. Las enterobacterias pueden ser lactosa-positivo o lactosa-negativo; dado que todas las cepas aisladas fueron lactosa-negativo, los principales géneros que presentan esta característica son: *Edwardsiella tarda*, *Erwinia cacticida*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella bongori*, *Providencia stuartii*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* y *Yersinia pseudotuberculosis* (Holt, 2000).



Se realizó la prueba de catalasa, la catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno. Las enterobacterias al ser catalasa-positivo producen esta reducción y se forman burbujas, lo que se observó en todas las cepas aisladas.

Otra prueba que se realizó, fue la prueba de oxidasa, que se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa intracelular. Las enterobacterias son oxidasa-negativo, como observamos en la Tabla 17, la colonia CE1 y CE3 son oxidasa-positivas, y al ser bacilos Gram-negativos, podrían pertenecer a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio* que no pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* (Holt, 2000).



Tabla 17: Pruebas bioquímicas convencionales aplicadas a las enterobacterias aisladas de la materia prima, fermentación sólida y fermentación líquida del atole agrio

Clave	Prueba de hemólisis	Lactosa	Prueba de catalasa	Prueba de oxidasa
DE1	-	-	+	-
CE1	C	-	+	+
CE3	C	-	+	+
GE1	I	-	+	-
GE2	C	-	+	-
GE3	-	-	+	-
BE1	-	-	+	-
BE3	-	-	+	-
WE1	I	-	+	-
WE3	-	-	+	-
S0E1	C	-	+	-
S0E2	-	-	+	-
S0E3	-	-	+	-
S2E3	-	-	+	-
S4E1	-	-	+	-
S4E3	-	-	+	-
S4E4	-	-	+	-
S6E4	I	-	+	-

Clave	Prueba de hemólisis	Lactosa	Prueba de catalasa	Prueba de oxidasa
S8E3	-	-	+	-
S8E4	C	-	+	-
S10E1	I	-	+	-
S10E3	-	-	+	-
S12E4	-	-	+	-
L0E2	I	-	+	-
L0E3	I	-	+	-
L1E1	-	-	+	-
L1E3	-	-	+	-
L2E1	-	-	+	-
L4E1	-	-	+	-
L4E3	-	-	+	-
L5E2	-	-	+	-
L5E3	C	-	+	-
L5E4	-	-	+	-
L6E4	-	-	+	-
L12E3	I	-	+	-
L12E5	I	-	+	-

C: Hemólisis completa; I: Hemólisis incompleta.



7.4 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS POR MÉTODOS FENOTÍPICOS

7.4.1 Identificación de las enterobacterias por medio del sistema VITEK2®

La identificación se llevó a cabo para las 36 cepas aisladas y purificadas. En la tabla 18 se indican los resultados de identificación de enterobacterias aisladas de las materias primas, en la Tabla 19 los correspondientes a las cepas aisladas de la fermentación sólida y en la Tabla 20 los datos de identificación para las cepas de la fermentación líquida.

Tabla 18: Identificación de las enterobacterias aisladas de las materias primas para elaborar el atole agrio por medio del sistema Vitek2®

Clave*	Organismo	Calidad de la identificación	%ID	Pruebas complementarias
DE1	<i>Serratia marcescens</i>	Excelente	99%	
CE1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Excelente	99%	
CE3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Excelente	99%	
GE1	<i>Serratia marcescens</i>	Excelente	99%	
GE2	<i>Serratia marcescens</i>	Excelente	99%	
GE3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
BE1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i>	Excelente	99%	
BE3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
WE1	<i>Serratia marcescens</i>	Excelente	99%	
WE3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.



Tabla 19: Identificación de las enterobacterias aisladas de la fermentación sólida del atole agrio por medio del sistema Vitek2®

Clave*	Organismo	Calidad de identificación	%ID	Pruebas complementarias
S0E1	<i>Serratia marcescens</i>	Excelente	99%	
S0E2	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
S0E3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
S2E3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Excelente	96.92%	
S4E1	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
S4E3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
S4E4	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
S6E4	<i>Enterobacter cloacae</i>	Muy buena	90.23%	
S8E3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Muy buena	90.23%	
S8E4	<i>Serratia marcescens</i>	Excelente	99%	
S10E1	<i>Serratia marcescens</i>	Excelente	99%	
S10E3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Muy buena	90.23%	
S12E4	<i>Morganella morganii</i> spp. <i>sibonni</i>	Excelente	99%	



Tabla 20: Identificación de las enterobacterias aisladas de la fermentación líquida del atole agrio por medio del sistema Vitek2®

Clave*	Organismo	Calidad de identificación	%ID	Pruebas complementarias
L0E2	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
L0E3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
L1E1	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
L1E3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
L2E1	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
L4E1	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
L4E3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
L5E2	<i>Serratia marcescens</i>	Excelente	99%	
L5E3	<i>Serratia marcescens</i>	Excelente	99%	
L5E4	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
L6E4	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
L12E3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Débil	50.53%	VP*, fermentación de: melobiosa, ramnosa y movilidad.
L12E5	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i>	Excelente	99%	

*CLAVES VP: Voges Prsokauer

Para las muestras provenientes de la materia prima:

C: Mazorca/ G: Grano/ B: Grano Roto/ D: masa/ W: agua

Para las muestras provenientes de las fermentaciones:

L: Fermentación líquida/ S: Fermentación sólida

0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 o 12: Tiempo de la fermentación

E: Enterobacterias1, 2, 3, 4, 5: Número de colonia proveniente del medio BRVGA

Como se observa en la Tabla 18, en las materias primas se identificaron cuatro cepas como *Serratia marcescens*, identificación que tuvo un nivel de confianza como excelente identificación para todas las cepas de esta especie. *Serratia*



marcescens es una enterobacteria que se encuentra principalmente en el suelo, agua, plantas y animales (Ashelford *et al.*, 2002) y se ha reportado su presencia como parte de la comunidad de bacterias de la raíz del maíz (Prischmann *et al.*, 2008), por lo cual la presencia en el maíz era de esperarse ya que es un hábitat de esta enterobacteria. Se identificaron tres cepas como *Enterobacter cloacae*, para esta especie el nivel de confianza fue débil discriminación. *Enterobacter cloacae* es una enterobacteria que habita principalmente en el tracto intestinal humano y de animales, agua, drenaje y en el suelo; sin embargo se encontró que *Enterobacter cloacae* es una bacteria endofítica simbiote del maíz y se reportó su presencia en los granos de maíz, sobre todo en el endospermo (Hinton y Bacon, 1995). Se identificó una cepa proveniente de los granos rotos como *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae*, que también tuvo una excelente identificación. *Klebsiella pneumoniae* es una enterobacteria que se aísla principalmente a partir del agua, del suelo y de plantas ya que se asocia a las raíces para fijar el nitrógeno del suelo; en el maíz, se encontró la presencia de *Klebsiella pneumoniae* en las raíces y en los granos como bacterias endofíticas (Chelius y Triplett, 2000). También, se identificaron dos cepas como *Pseudomonas aeruginosa* con un nivel de confianza de excelente identificación; cabe aclarar que esta bacteria no es una enterobacteria, sino que pertenece a la familia de *Pseudomonadaceae*; sin embargo, es un bacilo Gram-negativo y puede crecer en medios específicos para enterobacterias. Es comúnmente encontrada en suelo y agua, también se encuentra en la superficie de plantas y algunos animales; y, de hecho, *Pseudomonas aeruginosa* es ocasionalmente un patógeno de plantas (Holt, 2000). También, se ha identificado a *Pseudomonas aeruginosa* como una bacteria endofítica en el tejido del tallo del maíz (Rai *et al.*, 2007).

En la fermentación sólida, el 69% de las cepas se identificaron como *Enterobacter cloacae* con una débil identificación, excepto para S2E3, S6E4 y S8E3 que la identificación fue buena. El 23% se identificó como *Serratia marcescens* con un nivel de confianza de excelente identificación. También se identificó la cepa



proveniente del tiempo final de la fermentación como *Morganella morganii* spp. *sibonii*.

Para la fermentación líquida, el 77% de las cepas se identificaron como *Enterobacter cloacae*. El 15% se identificó como *Serratia marcescens* y sólo la cepa L12E5 se identificó como *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae*.

Para ambas fermentaciones, la especie que se identificó en mayor proporción fue *Enterobacter cloacae*, seguida por *Serratia marcescens* para ambas fermentaciones. Sin embargo, sólo en la fermentación sólida se identificó a *Morganella morganii* spp. *sibonii*, que fue una cepa que no se había encontrado en las materias primas. Con excepción de *Morganella morganii* spp. *sibonii*, las demás especies encontradas en ambas fermentaciones coinciden con las especies identificadas para la materia prima.

7.4.2 Identificación de las enterobacterias por medio de tiras api®20E.

Muestreo del 2010.

En septiembre de 2010, se monitoreó la fermentación sólida y líquida del atole agrio, para ello se hizo un conteo de los siguientes grupos microbianos: coliformes, bacterias lácticas, bacterias amilolíticas, hongos y levaduras (Valderrama, en revisión).

Después se llevó a cabo su aislamiento y purificación a partir de las diferentes etapas de ambas fermentaciones. Cada fermentación se dividió en dos lotes y de cada uno se aislaron 3 colonias por cada tiempo, dando un total de 92 colonias aisladas en agar bilis rojo violeta. Debido a que morfológicamente, muchas eran parecidas, se procedió a eliminar las similares por morfología macroscópica y de la misma manera que se mencionó anteriormente, sólo se purificaron las cepas que fueran bacilos Gram-negativos.

Para la purificación, se aislaron 44 cepas en agar nutritivo, mismas que se conservaron en glicerol estéril al 20% a una temperatura de -60°C en el



ultracongelador. A partir de éstas se seleccionaron 17 cepas que fuesen diferentes morfológicamente. Las características macroscópicas y microscópicas de las 17 cepas seleccionadas se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21: Características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas y purificadas del atole agrio. Muestreo 2010.

Clave*	Caracterización macroscópica					Caracterización microscópica	
	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color	Morfología	Gram
IL0C2	Circular	Entero	convexa	Brillosa	Crema	Cocobacilos	-
IL1C1	Circular	Entero	convexa	Brillosa	Crema	Bacilos cortos	-
IL3C3	Circular	Entero	convexa	Brillosa	Crema	Cocobacilos	-
IL5C1	Circular	Entero	convexa	opaca	Rojo	diplococos	-
IL5C3	Circular	Entero	convexa	Brillosa	Naranja	Cocobacilos	-
IL6C1	Circular	Entero	convexa	opaca	Rojo	Cocobacilos	-
IL6C2	Circular	Entero	convexa	opaca	Rojo	Cocobacilos	-
IIL2C1	Circular	Entero	Plana	Brillosa	Rojo	cocobacilos	-
IIL3C2	Circular	Entero	Plana	Brillosa	Uva	diplococos	-
IIL4C2	Circular	Entero	Plana	opaca	Naranja	diplococos	-
IIL5C1	Circular	Entero	Plana	Brillosa	Rojo	diplococos	-
IS0C1	Circular	Entero	Plana	opaca	Rojo	Cocobacilos	-
IS2C1	Puntiforme	Entero	Plana	opaca	Crema	Cocos	-
W3	Circular	Entero	Elevada	opaca	Crema	Bacilos	-
IISOC1	Circular	Entero	Plana	opaca	Rojo	Bacilos	-
IIS6C1	Circular	Entero	Elevada	opaca	Blanca	Cocos	-
IIS6C2	Circular	Entero	Elevada	Brillosa	Crema	Cocos	-

***CLAVES:** Para esta fermentación las claves utilizadas se asignaron de la siguiente manera:

I: Fermentación proveniente del lote 1 / II: Fermentación proveniente del lote 2

W: agua / L: Fermentación líquida/ S: Fermentación sólida

0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 o 12: Tiempo de la fermentación

C: Coliformes

1, 2, 3, 4, 5: Número de colonia proveniente del medio BRVA



La identificación por medio del método rápido Api20E de las 17 cepas descritas previamente se realizó mediante el uso de las tiras API20E de Biomerieux® que corresponde a enterobacterias. Después con ayuda del sistema apiweb® se analizaron los perfiles obtenidos y se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 22.

Tabla 22: Identificación por medio del sistema api20E de las enterobacterias aisladas del atole agrio. Muestreo del 2010.

Clave	Tipo de identificación	Taxón significativo	%ID
IIS6C2	Buena	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>spp pneumoniae</i>	97.6
IIL4C2	Muy buena en el género	<i>Serratia marcescens</i>	87.4%
W3	Perfil inaceptable	<i>Pseudomonas luteola</i>	0
IS0C1	Muy buena en el género	<i>Serratia marcescens</i>	83.6%
IS2C1	Perfil dudoso	<i>Serratia marcescens</i>	74.6%
IIL5C1	Buena identificación	<i>Serratia marcescens</i>	99.9%
IIS0C1	Muy buena identificación	<i>Serratia marcescens</i>	99.8%
IL5C3	Buena en el género	<i>Serratia marcescens</i>	89.1%
IIL2C1	Buena identificación	<i>Serratia marcescens</i>	99.9%
ILIC1	Buena identificación	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>spp pneumoniae</i>	97.7%
IL6C1	Muy buena identificación	<i>Serratia marcescens</i>	99.8%
IL0C2	Perfil dudoso	<i>Raoultella terrigena</i>	52.2%
IL6C2	Muy buena identificación	<i>Serratia marcescens</i>	99.8%
IL3C3	Buena identificación	<i>Serratia marcescens</i>	96%
IL5C1	Buena identificación	<i>Serratia marcescens</i>	99.9%
IIL3C2	Buena identificación	<i>Serratia marcescens</i>	99.9%
IIS6C1	Perfil inaceptable	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>spp pneumoniae</i>	-



Como se observa, en la Tabla 22, de las 17 cepas que se identificaron por este sistema, doce cepas correspondieron a *Serratia marcescens*. El porcentaje de identificación variaba desde el 89% (siendo una buena identificación) hasta 99.9% (muy buena identificación). Se identificaron tres cepas como *Klebsiella pneumoniae* spp *pneumoniae*, aunque el perfil varió de fue bueno para la cepa con la clave ILICI hasta un perfil inaceptable para la cepa IIS6C1. También se observó, una cepa con perfil inaceptable que provenía del agua identificada como *Pseudomonas leuteola*, y una cepa identificada como *Raoultella terrigena* con un perfil dudoso (cepa IL0C2).

Para ambas fermentaciones, *Serratia marcescens* fue la especie que se identificó principalmente. En la fermentación sólida se encontró en un 60%, mientras que en la fermentación líquida su presencia fue del 82%.

También se encontró *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae*. En la fermentación sólida estuvo presente en un 40% del total de especies identificadas, pero en la fermentación líquida tan sólo estuvo presente en un 9%.

A través del tiempo, se ha estudiado la microbiota de algunos alimentos fermentados a partir del maíz. Por ejemplo, entre las enterobacterias encontradas en el *ogi* fueron: *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp. y *Klebsiella* sp.(Sherifah y Daodu, 2011). En el *pozol* se encontraron las siguientes enterobacterias: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter* spp., *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae* y, sin ser enterobacteria, *Pseudomonas* spp. (Sainz, 1998). Por lo tanto, las enterobacterias encontradas en el atole agrio fueron: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* spp. *sibbonii*, *Raoultella terrigena*, *Serratia marcescens* y adicionalmente, las bacterias de la familia Pseudomonadaceae: *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas leuteola*.



7.5 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS POR MÉTODOS GENOTÍPICOS

7.5.1 Extracción de ADN

Las cepas que se eligieron para ser analizadas fueron aquellas que por medio de la identificación fenotípica fueran diferente en género y especie (tanto para las tiras api® como para el sistema vitek2®) estas cepas se encontraban conservadas en glicerol y congeladas a -63°C. Para llevar a cabo la recuperación se tomaron 20µl de cada cultivo conservado y se inocularon en caldo BHI y se incubaron a 37°C, para después inocularlas en TSA para observar la pureza de las cepas.

Como controles en las pruebas moleculares se utilizaron bacterias de identidad conocida, cuyas características y proveniencia se describen en la Tabla 23:

Tabla 23: Características macroscópicas y microscópicas de las cepas de identidad conocida utilizadas como control.

Caracterización macroscópica					Caracterización microscópica		Identificación	Proveniencia
Forma	Borde	Elevación	Textura	Color	Morfología	Gram		
R	W	F	B	Verde	Bacilos	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colección cepario Facultad Química UNAM
R	W	F	B	Naranja	Bacilos	-	<i>Serratia marcescens</i>	
R	W	C	B	Amarillo	Bacilos cortos	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
R	W	F	B	Crema	Bacilos	-	<i>Morganella morganii</i> spp. <i>sibonii</i>	
R	W	F	P	Crema	Bacilos cortos	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	Facultad de Medicina

R: Circular, P: Pegajosa, W: Entero, F: Plana, C: Convexa, B: Butirosa

A partir de este punto, a las cepas de identidad conocida y las obtenidas en este estudio, se les asignaron nuevas claves (Tabla 24), con el fin de facilitar su manejo.



Tabla 24: Asignación de claves a las cepas de identidad conocida y las obtenidas en este estudio para la identificación genotípica.

Clave	Clave previa	Microorganismo
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	L1C1 (api)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3	BE1 (vitek)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
5	S0C1 (api)	<i>Serratia marcescens</i>
6	S8E4 (vitek)	<i>Serratia marcescens</i>
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
8	W3 (api)	<i>Pseudomonas leuteola</i>
9	CE3 (vitek)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
11	L0E2 (vitek)	<i>Enterobacter cloacae</i>
12	<i>Morganella morganii</i>	<i>Morganella morganii</i>
13	S12E4 (vitek)	<i>Morganella morganii</i> spp. <i>sibonii</i>
14	L0C2 (api)	<i>Raoultella terrigena</i>

Por medio de la extracción de ADN por medio del método químico-enzimático, se logró obtener el ADN de las cepas y se cuantificó con el espectrofotómetro UV-Visible marca Agilent modelo 8453E (Tabla 25), se midió a 260 nm ya que a esta longitud absorben las bases púricas y pirimídicas y a 280 nm absorben las proteínas.



Tabla 25: Cuantificación de ADN de las bacterias de identidad conocida y las obtenidas en el presente estudio mediante el espectrofotómetro.

Muestra	260 nm	280 nm	260 nm/280 nm	Concentración (ng/ μ l)
1	1.2275	0.8211	1.4949	306.875
2	0.2651	0.1854	1.4298	66.275
3	0.2742	0.2039	1.3447	68.55
4	0.6023	0.4349	1.3871	150.575
5	0.1431	0.0936	1.5320	35.775
6	0.9144	0.7041	1.2986	228.6
7	0.2270	0.1569	1.446	56.75
8	0.2647	0.2191	1.2081	66.175
9	0.2754	0.1800	1.53	68.85
10	0.6078	0.4067	1.4944	151.95
11	0.4509	0.3401	1.325	114.74
12	0.5671	0.3181	1.4684	116.775
13	0.4475	0.3325	1.346	111.875
14	0.7376	0.5232	1.4097	184.4

La concentración de ADN fue muy variada, ya que se obtuvieron concentraciones desde 56.75 ng/ μ l hasta 306.875 ng/ μ l. La determinación de la concentración en el espectrofotómetro nos ayudó a poder ajustar la concentración del ADN a 40ng/ μ l (que es la necesaria para llevar a cabo el PCR). Sin embargo, cuando analizamos la pureza del ADN mediante el cociente 260 nm/280 nm se encontró que todas las muestras tenían valores menores de 1.8 por lo que o se consideran puras. Para obtener un ADN que pueda ser considerado puro y libre de contaminaciones el cociente 260 nm/280 nm debe de dar un valor de 1.8-2.0, valores por debajo de 1.8, indican contaminación con proteínas, fracciones de membranas o fenol (Molina *et al.*, 2006).



Al mismo tiempo, se llevó a cabo una electroforesis de las muestras del ADN extraído para comprobar la pureza, integridad y concentración del ADN (Figura 34)

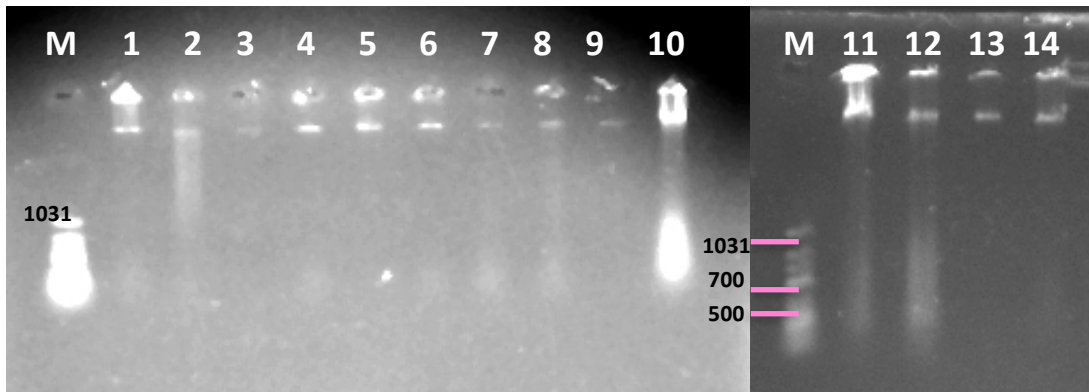


Figura 32: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN extraído de las cepas puras a 90V durante 30 minutos; M= Marcador de peso molecular, Carril 1, 2 y 3= *Klebsiella pneumoniae*, Carril 4, 5 y 6= *Serratia marcescens*, Carril 7 y 9= *Pseudomonas aeruginosa*, carril 8= *Pseudomonas leuteola*, Carril 10 y 11= *Enterobacter cloacae*, Carril 12 y 13= *Morganella morganii*, Carril 14= *Raoultella terrigena*

De acuerdo a la Figura 34, podemos decir, que el ADN se encuentra íntegro, ya que todas las bandas se observan muy nítidas, la intensidad de las bandas es adecuada, lo que nos indica que la concentración de las muestras de ADN es buena. En la figura 19, observamos que las muestras correspondientes a los carriles 7, 8 y 9 su intensidad es baja en comparación con las otras muestras; sin embargo, al observar la Tabla 25, las muestras con la menor concentración de ADN son las 7, 8 y 9.



7.5.2 Identificación de las enterobacterias por medio de la obtención de perfiles ISR

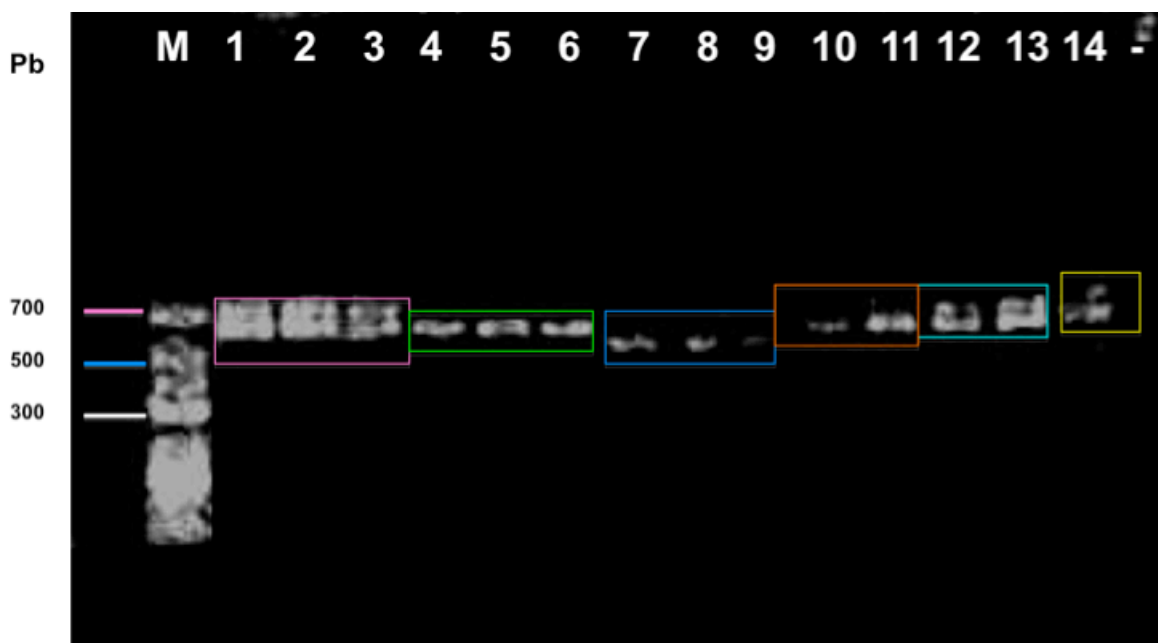


Figura 33: Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de la amplificación del espacio intergénico (ISR) con los primers 1387V y 118R a 70V durante 90 minutos; M= Marcador de peso molecular, Carril 1, 2 y 3= *Klebsiella pneumoniae*, Carril 4, 5 y 6= *Serratia marcescens*, Carril 7 y 9= *Pseudomonas aeruginosa*, carril 8= *Pseudomonas leuteola*, Carril 10 y 11= *Enterobacter cloacae*, Carril 12 y 13= *Morganella morganii*, Carril 14= *Raoultella terrigena*, Carril - = Control negativo

Como se observa en la Figura 35, en la amplificación del espacio intergénico 16S-23S, con los primers 1387V y 118R se obtuvieron, para las cepas identificadas previamente como *Klebsiella pneumoniae* provenientes del atole agrio (2 y 3) así como la cepa de la colección proveniente del cepario (1), unos productos de amplificación de entre 700 y 600pb, se observa la aparición de dos bandas cercanas entre sí, una de aproximadamente 700pb y la otra en el espacio de 600pb (Marcadas en la Figura 35 en color rosa), cuando se compara entre las tres muestras, observamos que las bandas se encuentran del mismo tamaño y forma, lo cual al comparar las muestras 2 y 3 con la 1, se pudo comprobar que se trataba del mismo microorganismo. Pero para optimizar la separación de bandas, es necesario mejorar las condiciones de la electroforesis: aumentar la concentración



de agarosa para realizar el gel, aumentar el tiempo de electroforesis y disminuir la intensidad del potencial eléctrico.

Para la muestra 4 proveniente de la colección del cepario, identificada como *Serratia marcescens* y las muestras 5 y 6, que fueron identificadas previamente por métodos fenotípicos como *Serratia marcescens*, se observó la aparición de solamente una banda, para las tres muestras, con un peso molecular de 600pb (Marcada en la Figura 35 en color verde), del mismo modo se confirmó que las muestras son iguales genéticamente, tanto la proveniente del cepario, como las muestras aisladas del atole agrio.

Para las muestras 7 de la colección del cepario, 8 y 9 las muestras problemas, (*Pseudomonas* spp.) se obtuvo un producto de amplificación de una sola banda de 500pb (Marcadas en la Figura 35 en color azul oscuro).

Para las muestras 10 y 11 se obtuvo una banda de aproximadamente 650pb (Marcadas en la Figura 35 en color naranja), donde la muestra 10, que provenía de la colección de la Facultad de Medicina, tuvo una mayor intensidad, dichas muestras correspondían a las cepas de *Enterobacter cloacae*.

Para las muestras 12 (cepario) y 13 (muestra problema) identificadas como *Morganella morganii* se obtuvieron dos bandas, una de un peso molecular de 700pb y otra de 650pb (Señaladas en la Figura 35 en color azul claro).

Por último, para la muestra 14, que correspondía a la especie de *Raoultella terrigena* no se pudo obtener un control positivo, así que sólo se amplificó el aislado del atole agrio obteniendo un producto de menos de 700pb (En la Figura 35 señalada en color amarillo).

Se sabe que el ISR-PCR puede diferir en la secuencia por lo que puede detectar diferencias interespecies e intraespecies (Martínez-Blanch *et al.*, 2010); de acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que todas las muestras poseen un peso molecular muy cercano entre sí (entre 500 y 600 pb) lo cual hace difícil la



diferenciación interespecie que nos indica un patrón de bandeo muy cercano entre estas especies, y, añadido al hecho de que sólo se apreció la aparición de una banda incrementa el hecho de no poder detectar diferencias intraespecies; para realizar una buena identificación es necesario obtener una amplificación de entre cinco y ocho bandas de diversos pesos moleculares (Chenoll *et al.*, 2003).

Sin embargo, aún con estas dificultades, si fue posible tener perfiles diferentes para cada una de las especies evaluadas, aún cuando se obtuvieron pocas bandas y fuesen de pesos moleculares cercanos entre sí. Las especies que obtuvieron los mejores perfies fueron las especies correspondientes a *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens* ya que en la primera es posible diferenciar entre 2 bandas separadas entre sí, y, en la segunda, la intensidad de la banda es muy clara, y no se observa la banda corrida sino que bastante íntegra cuando se compara con las demás.

Este método se ha utilizado para identificar enterobacterias pero utilizando otros primers, por ejemplo, se utilizó para identificar el origen de distintas cepas de *E. coli* a partir del ISR-PCR, dónde se utilizó el primer G1 (5'-GAAGTCGTAACAAAGG-3'), al que se le añadió GC-cebo (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCC-3') al final del extremo 5' del primer g1; así como el primer en reversa, L1 (5'-CAAGGCATCCACCGT-3'); en este estudio se lograron obtener entre 2 y 6 bandas para cada muestra de *E. coli* con un peso molecular de entre 506 y 618pb (Seurinck *et al.*, 2003). También, para enterobacterias se utilizó esta técnica para encontrar la diversidad en la secuencia del espacio intergénico para diferentes cepas de *Edwarsiella ictaluri* y *Edwarsiella tarda* aisladas del pescado, para lo cual, se utilizaron los oligonucleótidos (5'-TTGTACACCGCCCGTCA- 3'y 5'-GGTACCTTAGATGTTTCAGTTC-3'), dónde se obtuvo como resultado del producto del ISR-PCR patrones indistinguibles de dos bandas en la electroforesis de un peso molecular de aproximadamente 700pb (Panangala *et al.*, 2005). De acuerdo con ambos reportes, podemos encontrar ciertas similitudes con los resultados obtenidos durante este estudio. Por ejemplo, número de bandas y peso



molecular de éstas.

Los primers utilizados en este estudio (1387V y 118R), se utilizaron en un estudio previo de *Bacillus cereus* aislados de origen alimentario, dónde los productos del ISR-PCR dieron un patrón de bandas de entre 2 y 5 bandas de un peso molecular de 435 a 1078pb (Martínez-Blach *et al.*, 2011).

7.5.3 Identificación de las enterobacterias por medio de la obtención de la prueba RAPD

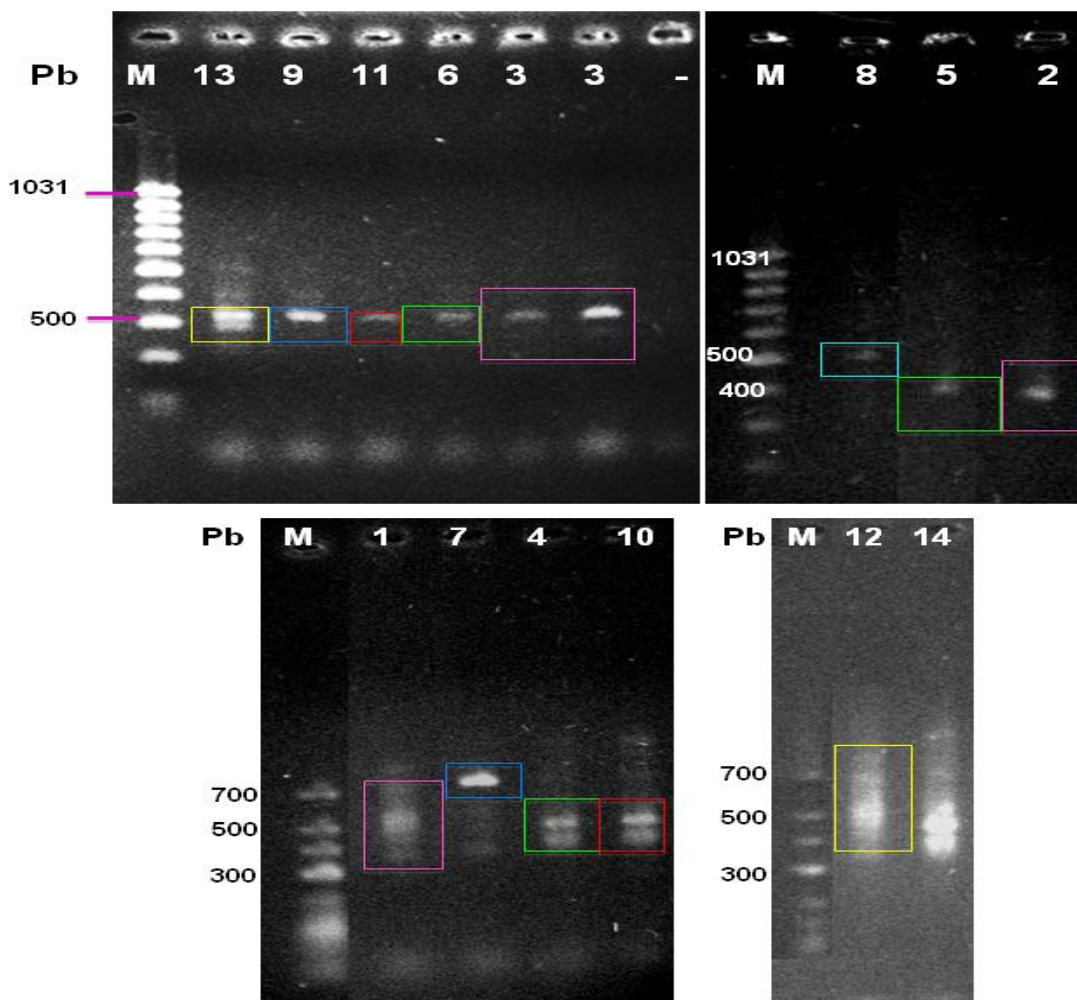


Figura 34: Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de la amplificación polimórfica al azar del ADN (RAPD) con el primer M13 a70V durante 90 minutos; M= Marcador de peso molecular, Carril 1, 2 y 3= *Klebsiella pneumoniae*, Carril 4, 5 y 6= *Serratia marcescens*, Carril 7 y 9= *Pseudomonas aeruginosa*, carril 8= *Pseudomonas leuteola*, Carril 10 y 11= *Enterobacter cloacae*, Carril 12 y 13= *Morganella morganii*, Carril 14= *Raoultella terrigena*, Carril - = Control negativo



La amplificación polimórfica al azar del ADN, realizada con el primer universal M13, para la cepa control: *Klebsiella pneumoniae*(1) se observa un solo producto de amplificación de 500pb, para la cepa aislada a partir del muestreo de 2010 (2), el producto tenía un peso de 400pb; sin embargo para la cepa aislada del muestreo de 2011 (3), la amplificación tuvo una banda de un peso molecular de 500pb (marcadas en la Figura 36 en color rosa), por lo que las similitudes se observaron sólo entre la cepa control y la cepa del muestreo de 2011. El RAPD-PCR analiza diferentes secuencias y detecta diferentes tipos de variaciones en el ADN bacterial; el RAPD-PCR detecta diferencias a lo largo del genoma bacteriano completo.

Para la muestra 4 (*Serratia marcescens*), el producto del RAPD fueron dos bandas de aproximadamente 500pb, para la muestra 5, el producto tuvo un peso molecular de 400pb y sólo se apreció una banda y la muestra 6 el producto fue una banda de 500pb (marcadas en la Figura 36 en color verde), lo que no concuerda con los resultados anteriores, ya que de acuerdo con la identificación fenotípica, todas las cepas trataban de *Serratia marcescens*, y en el ISR de igual manera, las bandas fueron las mismas para las tres muestras, por lo que se pudo haber identificado alguna subespecie de éste microorganismo por medio del RAPD. En un estudio previo se reportó el uso del RAPD-PCR con una combinación de 2 diferentes primers: 1254 (3'-ACGTATCTGC-5') y HLWL 74 (3'-ACGTATCTGC-5') para la caracterización de 175 aislados de *S. marcescens*, algunas diferencias serológicas, patrones de susceptibilidad a fagos y antibióticos para construir una librería de patrones de bandas para este organismo. Como resultados se obtuvieron que, por medio del perfil API20E sólo el 85% de los aislados correspondieron a una “buena identificación”; de los cuales, en la librería formada por el RAPD-PCR, para los 175 aislados de *S. marcescens* se obtuvieron 73 patrones de banda diferentes, o 61 patrones diferenciándose en dos o más bandas de entre 100 y 2072pb (Hejazi *et al.*, 1997).



Para la muestra 7 (*Pseudomonas aeruginosa*) que provenía del cepario, el producto de la amplificación fue una banda con un peso molecular de 700pb; pero para las muestras 8 y 9, (*Pseudomonas* spp.) se obtuvo un producto de amplificación de una sola banda de 500 pb (señaladas en la Figura 36 en color azul). Es importante señalar que la muestra 8 fue identificada como *Pseudomonas leuteola* y la muestra 9, se identificó como *Pseudomonas aeruginosa*. La técnica RAPD-PCR se ha utilizado para estudiar la relación huésped-parásito entre *Pseudomonas aeruginosa* y pacientes con fibrosis cística, en su mayoría para estudiar la relación epidemiológica entre los pacientes de fibrosis, la reacción RAPD-PCR se llevó a cabo con los siguientes primers:

- AN-2162 (5'-TGGTGGCCTCGAGCAAGAGAACGGAG-3') y
- AN-2163 (5'-GGTTGGGTGAGAATTGC-3').

En dicho estudio se obtuvieron como resultados de amplificación, para el primer AN-2162, para las 6 muestras analizadas, se obtuvieron dos diferentes tipos de patrones de bandas: uno incluía 3 bandas y el otro 4 bandas, de peso molecular no definido, que después fueron identificados como *P. aeruginosa* mucoide y *P. aeruginosa* no mucoide, respectivamente; sin embargo, para el primer 163, de las mismas muestras analizadas, 2 tuvieron 5 bandas, 2 muestras fueron de 8 bandas, una de 4 bandas y la última no hubo producto de reacción (Ortiz, 2004). Por lo que en este estudio, aunque no se obtuvo un patrón de bandas tan amplio, fue posible diferenciar los distintos tipos de cepas de *P. aeruginosa* y *P. leuteola*.

La muestra 10 que correspondía a la cepa de *Enterobacter cloacae* proveniente de la colección de la Facultad de Medicina, tuvo como producto de amplificación dos bandas de 400 y 500 pb; pero la muestra 11, es decir la cepa de *Enterobacter cloacae* aislada del atole agrio, sólo se obtuvo una banda de un peso molecular de 500 pb (marcadas en la Figura 36 en color rojo).



Para las muestras 12 y 13 (*Morganella morganii*) se obtuvo una banda, el producto de la amplificación tuvo un peso molecular de 500 pb (Figura 36 en color amarillo), es decir, no hubo diferencia entre el patrón de bandas de las cepas.

Por último, para la muestra 14, *Raoultella terrigena*, al igual que el ISR, no se pudo obtener un control positivo, así que sólo se amplificó el aislado del atole agrio obteniendo un producto de entre 400 y 500 pb.

El PCR-RAPD es una técnica rápida y simple para identificar una gran número de cepas de diferentes especies; por ejemplo ha sido muy exitoso su uso para identificar *B. cereus* aislado a partir de alimentos fermentados tradicionales (Ronimus *et al.*, 2003; Abriouel *et al.*, 2007); sin embargo, cabe recordar que con esta técnica las zonas amplificadas del genoma son aleatorias por lo que es probable que para un mismo ADN, unas veces no ocurra la amplificación (Bardakci, 2001).

El RAPD-PCR tiene como limitaciones las siguientes (Mbwana *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 1990):

- Casi todos los marcadores RAPD son dominantes, es decir, no es posible distinguir si un segmento de ADN se amplificó a partir de un lugar que es heterocigoto (1 ejemplar) y homocigoto (2 copias). Se han detectado sólo en raras ocasiones marcadores RAPD co-dominantes, observados en los segmentos de ADN de diferentes tamaños amplificados a partir del mismo lugar.
- La PCR es una reacción enzimática, por lo tanto, la calidad y la concentración de ADN molde, las concentraciones de los componentes de la PCR, y las condiciones del ciclo de PCR pueden influir considerablemente en el resultado. Por lo tanto la técnica de RAPD es notoriamente dependiente del laboratorio y necesita un cuidadoso desarrollo de los protocolos del laboratorio para ser reproducible.
- Las diferencias entre el primer y el templado puede resultar en la ausencia total de producto de PCR, así como en una cantidad meramente reducida de producto. Así que, los resultados del RAPD pueden ser difíciles de interpretar.



El RAPD-PCR se ha utilizado para diversos estudios; para el primer M13 (5'-GAAACAGCTATGACCATG-3') se aplicó para estudiar la presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos por métodos genotípicos; en este estudio, se realizó también con otros dos primers T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAGG-3') y T7 (5'-AATACGACTCACTATAGG-3'). Dónde se obtuvo como principal resultado la creación de una base de datos del patrón de bandas de 198 cepas de *Listeria monocytogenes*, del total de estas cepas, el 16.95% de ellas fue posible agrupar como similares, con una relación cofenética del 89% (Aznar y Elizaquível, 2008). Sin embargo, en otro estudio realizado con los mismos primers, dónde el objetivo era analizar la diversidad genética de los aislados y cepas de referencia dentro del grupo de *Bacillus cereus* por RAPD-PCR para acercarse a la contribución potencial de los elementos móviles extracromosómicos o modular la plasticidad del genoma y la biodiversidad de los miembros del grupo *B. cereus*. Pero en este estudio, los análisis de los perfiles del RAPD-M13, RAPD-T3 y los perfiles de RAPD-T7 por separado, no hubo éxito en la separación de las especies (Martínez-Blanch *et al.*, 2011).

A pesar de que en la mayoría de las muestras analizadas sólo se observa la aparición de una banda en la identificación, entre especies identificadas previamente como las mismas, se obtuvieron distintas bandas de diversos pesos moleculares, por lo que el PCR-RAPD permitió detectar divergencias en cada una de las cepas.

La reproducibilidad del RAPD está dada usualmente por la aparición de bandas de baja intensidad, la razón de las diferentes intensidades de las bandas aún no es conocida; y, aunque algunos primers no concuerdan perfectamente con la secuencia, la amplificación en algunos ciclos no ocurre. El factor más importante de la reproducibilidad del RAPD se ha encontrado que es el resultado de una inadecuada preparación del templado de ADN, por lo que las diferencias entre las concentraciones de los templados de ADN de dos individuos resulta en la ganancia o pérdida de algunas bandas (Bardakci, 2000) lo que explica también



las diferencias entre los grupos de mismas especies identificadas como iguales previamente ya que como se observó en la tabla 25, el ADN no se encontraba muy puro.

Se realizó un análisis *in silico* con el programa *Basic Local Alignment Tool* (BLAST) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) comprobando la alineación de los primers utilizados en este estudio, tanto para el ISR (1387V y 118R) como para el RAPD (M13), para todas las cepas evaluadas mediante estos métodos. Obteniendo como resultados de porcentaje de alineación los mostrados en la tabla 26.

Tabla 26: Porcentaje de alineación para cada cepa utilizada con los primers utilizados en este estudio *in silico*

	1387V	118R	M13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100%	100%	100%
<i>Serratia marcescens</i>	100%	80%	100%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	100%	100%
<i>Enterobacter cloacae</i>	100%	100%	100%
<i>Morganella morganii</i>	100%	SR*	100%
<i>Raoultella terrigena</i>	100%	100%	SR*

*Sin registros en el BLAST



8. CONCLUSIONES

- El atole agrio se prepara a nivel casero mediante un procedimiento tradicional que podría contaminar el alimento. Siendo los principales puntos de contaminación durante el proceso: el desgranado y la molienda.
- La microbiota del atole agrio es muy compleja ya que están relacionados diversos grupos microbianos tales como bacterias lácticas, bacterias lácticas amilolíticas, enterobacterias, coliformes, hongos y levaduras y su concentración es muy elevada durante la fermentación.
- Las enterobacterias se encuentran presentes en altas concentraciones tanto en la materia prima como en todas las etapas de la fermentación líquida y sólida del atole agrio. El descenso en los valores de pH al terminar las fermentaciones líquida y sólida contribuyeron a la reducción (hasta 3 ciclos logarítmicos) de la concentración de enterobacterias presentes pero no las eliminaron.
- Se aislaron e identificaron tanto en la fermentación sólida, como en la fermentación líquida y en las materias primas del atole agrio las siguientes enterobacterias: *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii spp. sibonii*, *Raoultella terrigena*, así como *Pseudomonas leuteola* y *Pseudomonas aeruginosa*; estas especies son patógenos oportunistas y su presencia generalmente se asocia con el suelo y plantas.
- El PCR-ISR y el RAPD-PCR son técnicas genotípicas que permitieron diferenciar los grupos de enterobacterias antes mencionados. Sin embargo, el patrón de bandas no fue suficiente para lograr una identificación.



9. PERSPECTIVAS

- Como parte del proyecto europeo “Microbiota of Andean Food: Tradition for healthy products”, se debe continuar con la identificación de los diversos grupos microbianos presentes en el atole agrio, para ello es necesario ampliar la colección de bacterias ácido lácticas, levaduras y enterobacterias, e iniciar la identificación mediante métodos tradicionales y moleculares.
- Llevar a cabo la identificación con otras metodologías de aquellas cepas de enterobacterias que tuvieron perfiles dudosos o de baja discriminación con los métodos Vitek y API y realizar las pruebas complementarias sugeridas.
- Optimizar las metodologías moleculares utilizadas en el presente trabajo para la identificación de enterobacterias y aplicar otras diferentes.
- Analizar parámetros fisicoquímicos y sensoriales del atole agrio, relacionar los cambios observados con el avance de la fermentación.



10. BIBLIOGRAFÍA

Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martínez, M., Ortega, E., Gálvez, A., 2007. Differentiation and characterization by molecular techniques of *Bacillus cereus* group isolates from poto poto and dégué, two traditional cereal-based fermented foods of Burkina Faso and Republic of Congo. *Journal of Food Protection*, 70 (5), pp. 1165-1173.

Alonoso, L., Poveda, J., 2008. Estudio comparativo de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm™3M™ para el análisis de los alimentos. Tesis para obtener el grado de microbiólogo industrial. Pontificia Universidad Joveriana, Bogotá.

Andrighetto, C., Zampese, L., Lombardi, A., 2001. RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Letters in Applied Microbiology*, 33(1), pp. 26-33.

Ashelfold, K.E., Fry, J.C., Bailey, M.J., Day, M.J., 2002. Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* spp. quinovora. *International Journal of Systematic Microbiology*, 52, pp. 2281-2289.

Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., 2003. Microbial Quality and Direct PCR Identification of Lactic Acid Bacteria and Nonpathogenic Staphylococci from Artisanal Low-Acid Sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), pp. 4583-4594.

Aznar, R., Alarcón, B., 2002. On the Specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in Food: a Comparison of Published Primers. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(1), pp.109-119.



Aznar, R., Elizaquível, P., 2008. Reliability of *Listeria monocytogenes* Identification by Specific PCR Assessed by Phentypic and Genotypic Techniques. *Food Analysis Methods*, 1, pp. 243-251.

Bardakci, F., 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turkish Journal of Biology*, 25, 185-196.

Ben Belgacem, Dousset, X., Prévost, H., Manai, M., 2009. Polyphasic taxonomic studies of lactic acid bacteria associated with Tunisian fermented meat based on the heterogeneity of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region. *Arch Microbiology*, 191, pp. 711-720.

Biomerieux® Corporation, *Sistema automático de identificación Vitek®*. [En línea] (Actualizado al 30 de enero de 2012). Disponible en:http://www.biomerieux.es/servlet/srt/bio/spain/dynPage?open=SPN_IND_FDA_PRD&doc=SPN_IND_FDA_PRD_G_PRD_NDY_7&pubparams.sform=1&lang=es [Último acceso el 2 de mayo de 2012].

Biomerieux® SA, 2007. *Sistema de identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram-negativos no exigentes*. Lyon: Manual del usuario.

Ben Belgacem, Z., Dousset, X., Prévost, H. y Manai, M., 2009. Polyphasic taxonomic studies of lactic acid bacteria associated with Tunisian fermented meat based on the heterogeneity of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region. *Archives of Microbiology*, 191 (9), pp. 711-720.

Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F., Andolfi, R., Moschetti, G., 2002. 16S-23S rDNA Intergenic Spacer Region Polymorphism of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as Revealed by PCR and Nucleotide Sequence Analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(4), pp. 520-527.



Campbell-Platt, G., 1987, *Fermented foods of the world, a dictionary and guide*, London: Butterworths.

Blandino, A., M.E. Al-Aseeri, S.S. Pandiella, 2003. Cereal-based fermented foods and beverages, *Food Research International*, 36(6), pp. 527-543.

Castro, F., 2006. *Colapsos ambientales, transiciones culturales*. México, D.F.: UNAM Colección postgrado.

Capparelli, E. y Mata, L., 1975. Microflora of maize prepared as tortillas. *Applied Microbiology*, 29, pp. 802-806.

Center of Disease Control, 2012. *Salmonella Home Page*. [en línea] (Actualizado el: 5 de abril de 2012). Disponible en:

<http://www.cdc.gov/salmonella/general/technical.html>

[Último acceso 5 de mayo de 2012]

Chelius, M.K. y Tripplett, E.W., 2000. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), pp. 783-787.

Chenoll, E., Macián, M., Aznar, R., 2003. Identification of *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* by rDNA-based techniques. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 546-556.

Chiu, T., Chen, T., Hwang, W., Tsen, H., 2005. Sequencing of an internal transcribed spacer región of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. *International Journal of Food Microbiology*, 97(3), pp. 259-265.

Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginisberg, H., 1990. *Tratado de microbiología*. 3ª Edición. México: Salvat Editores.



De la Maza, L., Pezzlo, M., Shigei, J., Peterson, E., 2004. *Color Atlas of Medical Bacteriology*. Washington, D.C.: ASM Press.

Díaz, G. y Wachter, C., 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev. Latinoamericana de Microbiología*, 45(1-2), pp. 30-40.

Lampel, K. edit., 2011. *Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*. 2nd Edition. Maryland: FDA.

Fernández, A., García, C., Saéz, J., Valdezate, S., 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Revista de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica*, 37, pp. 215-225.

Fraga, J., Rodríguez, J., Fuentes, O., Castex, M., Fernández, A., 2004. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56(3), pp. 208-213.

Gil, A., 2010. *Tratato de nutrición: Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. 2ª. Edición. Madrid: Editorial médica panamericana.

Gürtler, V. y Stanisich, V. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142, pp. 3-16.

Hayford, A., Petersen, A., Vogensen, F. Y Jakobsen, M., 1999. Use of Conserved Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Fragments and RAPD Pattern for Characterization of *Lactobacillus fermentum* in Ghanaian Fermented Maize Dough. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), pp. 3213-3221.

Haard, N., Odunfa, S., Lee, C., Quintero, R., Lorence, A. y Wachter, C. 1999. *Fermented cereals: a global perspective*. Roma: FAO.



Hejazi, A., Keane, C.T., Falkiner, F.R., 1997. The use of RAPD-PCR as a typing method for *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology*, 46, pp. 913-919.

Hinton, D.M., Bacon, C.W., 1995. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia*, 129(2), pp. 117-125.

Edit. Holt, J., 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9a. edición. Filadelfia: William & Wilkins.

International Organization for Standardization, ISO 7402:1993 "Methods for microbiological examination of food and animal feeding stuffs. Enumeration of Enterobacteriaceae"

Janda, J. y Abbott, S., 2006. *The Enterobacteria*. 2ª Edición. Washington, D.C.: ASM Press.

Janda, J. y Abbott, S., 2006. The Genus *Hafnia*: from Soup to Nuts. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), pp. 12-28.

Jay, J., Loessner, M., Golden, D., 2005. *Microbiología moderna de los alimentos*. 5ª Edición. Zaragoza: Acribia.

Lawson, P., Falsen, A., Ohlén, E. y Collins, M., 2001. *Aerococcus urinaehominis* sp. nov. isolated from human urine. *Journal of Applied Bacteriology*, 51, pp. 683-686.

Levison, M., 1973. Effect of Colon Flora and Short-Chain Fatty Acids on Growth in Vitro of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*. *Infection and Immunity*, 8, pp. 30-35.

Leyva, V., Valdés, E., Cisneros, E., Pérez, O., 1996. Determinación de *Salmonella* y enterobacterias totales en huevos frescos de gallina. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. 10 (2), pp. 1-2.



Lorca, T., Gingerich, T., Pierson, M., Flick, G., Hackney, C., Sumner, S., 2001. Growth and histamine formation of *Morganella morganii* in determining the safety and quality of inoculated and uninoculated bluefish. *Journal Food Protection*, 64(12), pp. 2015-2019.

Lund, B., Baird-Parker, T., 2000. *The microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen: Springer.

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., 2008, *Brock, Biología de los Microorganismos*, 10ª. Edición. Madrid: Pearson.

Manual de usuario pruebas API® 20E de Biomerieux®

Martínez, M. y Siñeriz, F., 2004. PCR Fingerprinting of rRNA Intergenic Spacer Region Characterization of Environmental Bacteria Isolates. *Environmental Microbiology*, 16, pp. 159-166.

Martínez-Blanch, J., Sánchez, G., Garay, E., Aznar, R., 2011. Evaluation of phenotypic and PCR-based approaches for routine analysis of *Bacillus cereus* group foodborne isolates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99, pp. 697-709.

Malorny, B., Tassios, P., Radström P., Cook, N., Wagner, M., Hoorfar, J. 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiol*, 83, pp. 39- 48.

Maslow, J.N., Slutksy, A.M., y Arbeit, R.D., 1993. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology, p. 563-572. **En** Persing D.H., Smith T.H., Tenover F.C. y White T.J. (ed.), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. Maule C.J. 2001 Pulsed-field Gel Electrophoresis. *Enciclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd, Nature publishing Group, pp 1-7.



Mbwana, J., Bölin, L., Lyamuya, E., Mhalu, F., Lagergard, T., 2006. Molecular characterization of *Haemophilus ducreyi* isoaltes from different feographical locations. *Journal of Clinic Microbiology*, 44 (1), pp 132-137.

McCartney, A., 2002. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88(1), pp. 29-37.

McFaddin, JF., 2003, *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*, 3ª. Edición. Baltimore: William and Wilkins.

McGilvery, 1977, *Conceptos de bioquímica*, Barcelona: Reverté.

Mo, A., Know, B., Kamala-Kannan, S., Lee, K., Oh, B., 2010. Isolation and characterization of *Bacillus polyfermenticus* isolated form Meju, Korean soybean fermentation starter. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 26(6), pp. 1099-1105.

Molina, N., Polverino, D., Minvielle, M., Apezteguía, M., Aguilar, M. y Basualdo, J., 2006. Comparación de métodos de lisis y extracción de ADN de trofozoitos de *Giardia lamblia*. *Revista Latinoamericana de Parasitología*, 61, pp. 133-137.

Nilsson, J., Svensson, B., Ekelund, K. Y Christiansson, A., 1998. A RAPD-PCR method for large-scale typing of *Bacillus cerus*. *Letters in Applied Microbiology*, 27, pp. 168-172.

Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización".

Ootsubo, M., Shimzu, T., Tanaka, R., Sawabe, T., Tajima, K. Y Ezura, Y., 2003. Seven hour fluorescence in situ hybridization technology for enumeration of Enterobacteriaceae in food and environmental water sample. *Journal of Applied Microbiology*, 95, pp. 1182-1990.



Ortiz, M., Gallegos, A., Cuevas, F., Pérez, L., Coria, R., 2004. RAPD-PCR Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains obtained from cysticfibrosis patients. *Salud Pública de México*, 46, pp. 1-8.

Ostling, C., Lindgren S., (1993), Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids, *Journal of Applied Bacteriology*, (75), pp 18-24.

Panangala, V., van Santen, V., Shoemaker, C., Klesius, P., 2005. Analysis of 16S-23S intergenic spacer region of the rRNA operons in *Edwardsiella ictaluri* y *Edwardsiella tarda* isolates from fish. *Journal of Applied Microbiology*, 99, pp. 657-669.

Pincus, D., *Microbial Identification Using The Biomérieux Vitek2® System*. Hazelwood: bioMérieux, Inc.

Prischmann, D., Lehman, M., Christie, A., Dashiell, K., 2008. Characterization of bacteria isolated from maize roots: Emphasis on *Serratia* and infestation with corn rootworms (Chrysomelidae: Diabrotica). *Applied Soil Ecology*, 40, pp. 417-431.

Rai, R., Dash, P., Prasanna, B.M., Singh, A., 2007. Endophytic flora in the stem tissue of a tropical maize (*Zea mays* L.) genotype: isolation, identification and enumeration. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 23, pp. 853-858.

Reddy, C.A., editor in Chief (T.J. Beveridge, J.A. Breznak, G.A. Marzluf, T.M. Schmidt, and L.R. Snyder), 2007. *Methods for General and Molecular and Microbiology*. 3rd. Edition. Washington D.C.: ASM press.

Ronimus, R., Rückert, A., Morgan, H., 2003. A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. *International Journal of Food Microbiology*, 96 (3), 263-272.

Sainz, T., 1998. Estudio de la Presencia y Sobrevivencia de enterobacterias patógenasas en el pozol. Tesis para obtener el grado de: Maestra en Ciencias Bioquímicas. UNAM.



Salyers, A. y Whitt, D., 1994. *Bacterial pathogenesis a molecular approach*. Washington, D.C.: ASM Press.

Sambrook, Fritsh, Maniatis, 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Seurnick, S., Verstraete, W., Siciliano, S., 2003. Use of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region PCR and Repetitive Extragenic Palindromic PCR Analysis of *Escherichia coli* isolates to identify non point fecal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), pp. 4942-4950.

Soler, L., Figueras, M., Chacón, M., Guarro, J., Martínez-Murcia, A., 2003. Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates. *Anotoine van Leeuwenhoeck*, 00, pp. 341-349.

Sherifah, W. y Daodu, A., 2011. Physiological Properties of a Microbial Community in Spontaneous Fermentation of Maize (*Zea mays*) for Ogi Production. *International Research Journal of Microbiology*, 2, pp. 109-115.

Stainer, R., Villanueva, J., 2005. *Microbiología*. 2ª. Edición. Barcelona: Reverté.

Steinkraus, K.H. 1996. *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. 2nd. Edition. New York: Marcel Dekker.

Tamang, J., Tamang, B., Schillinger, U., Franz, C., Gores, M., Holzapfel, W., 2005. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), pp. 347-356

Thompson, J. y Gentry-Weeks, C.R., 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. **En**: Bactéries lactiques. Editorail Roissart H. Luquet F.M., Lorica, Francia (1) 239-290.



Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A., 2001. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 79(3-4), pp. 345-352.

Tortora, G., Funke, B. y Case, C. 2007. *Introducción a la microbiología*. 9na. edición. Madrid: editorial Panamericana.

Valderrama, A., En revisión. Diversidad de bacterias lácticas del atole agrio de Villahermosa Tabasco. Tesis de Licenciatura. Licenciatura en Química en alimentos. UNAM.

Van de Zande, L., Bijlsma L., 1995. Limitations of the RAPD technique in phylogeny reconstruction in *Drosophila*. *Journal of Evolution Biology*, 8, pp. 654-656.

Varela, G. y Grotiuz, G. 2008. Fisiología y metabolismo bacteriano. **En:** Oficina del libro FEFMUR, *Temas de bacteriología y virología médica*. Motevideo: Universidad de la República, pp. 43-57.

Wacher, M., Cañas, A., Cook, P., Bárzana, E., Owens, D., 1993. Sources of microorganisms in pozol a traditional mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9, pp. 226-274.

Wacher, C., Cañas, A., Bárzana, E., Lappe, P., Ulloa, M., Owens, D., 2000. Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology*, (17), pp. 251-256.

Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J., Tingey, S., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18 (22), pp. 6531-6535.



11. ANEXOS

ANEXO I: PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA ESTE PROYECTO

- **Agar Bilis Rojo Violeta Difco™**

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 41.5g del polvo en 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esperar a que enfríe y verter en placas estériles.

- **Agar Bilis Rojo Violeta Glucosa Oxoid®**

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 38.5g del polvo en 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esperar a que enfríe y verter en placas estériles.



- **Agar Cuenta en Placa Difco™**

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 23.5g del polvo en 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
5. Esperar a que se enfríe y verter en placas estériles.

- **Agar Man Rogosa y Sharpe Oxoid®**

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 62g de polvo en 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
5. Esperar a que se enfríe y verter en placas estériles.



- **Agar Man Rogosa y Sharpe con almidón**

Fórmula típica (g/L)

Peptona pancreática de caseína	10.000g
Extracto de carne.....	5.000g
Extracto de levadura.....	5.000g
Almidón.....	20.000g
Citrato diamoniacal.....	2.170g
Acetato de sodio.....	5.000g
Fosfato dipotásico.....	2.620g
Agar bacteriológico.....	15.000g
Sulfato de magnesio 5H ₂ O.....	0.207g
Sulfato de Manganeso.....	0.056g

pH= 6.8±0,1

1. Suspender en 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
5. Esperar a que se enfríe y verter en placas estériles.



- **Agar McConkey Bioxon™**

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 50g de polvo en 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
5. Esperar a que se enfríe y verter en placas estériles.

- **Agar Nutritivo Difco™**

Por instrucciones del proveedor:

6. Suspender 23.8g de polvo en 1L de agua destilada.
7. Mezclar bien.
8. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
9. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
10. Esperar a que se enfríe y verter en placas estériles.



- **Agar Papa Dextrosa Difco™**

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 39g de polvo en 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
5. Esperar a que enfríe y verter en placas estériles.

- **Agar Sangre BD Bioxon™**

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 40g de polvo en 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
5. Después de esto enfriar de 45 a 50°C y añadir 5% de sangre desfribinada estéril.
6. Homogenizar esperar a que enfríe y verter en placas estériles.



- **Agar Soya Trypticaseína (TSA) Difco™**

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 40g de polvo en 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
5. Esperar a que enfríe y verter en placas estériles.

- **Caldo Cerebro Corazón Difco™**

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 37g de polvo en 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.



ANEXO II: TINCIÓN DE GRAM

La tinción de Gram se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Colocar sobre un porta-objetos una gota de agua y la colonia que se desea teñir, fijando a calor moderado la preparación. En caso de utilizar un cultivo líquido omitir la gota de agua y colocar directamente sobre el porta-objetos una gota de cultivo líquido.
2. Adicionar una gota de cristal violeta y dejarlo durante un minuto.
3. Lavar con agua y dejar escurrir.
4. Cubrir la preparación con lugol (solución yodo-yoduro), y dejarlo actuar durante un minuto.
5. Lavar con agua y decolorar con una mezcla acetona:etanol (1:1) hasta que deje de salir colorante.
6. Inmediatamente después enjuagar con agua y eliminar exceso.
7. Aplicar safranina, esperar 1 minuto.
8. Enjuagar con agua, escurrir y dejar secar.
9. Realizar la observación microscópica.



ANEXO IIIA: SUBSTRATOS BIOQUÍMICOS VITEK 2® PARA LAS TARJETAS GN

pocillo	Test
2	Ala-Phe-Prol-arilamidasa
3	Adonitol
4	L-Pirrolidonil-Arilamidasa
5	L-Arabitol
7	D-Celobiosa
9	Beta-Galactosidasa
10	Producción de H ₂ S
11	Beta-N-acetil-glucosaminidasa
12	Glutamil arilamidasa pNA
13	D-Glucosa
14	Gamma-Glutamil-transferasa
15	Fermentación glucosa
17	Beta-Glucosidasa
18	D-maltosa
19	D-manitol
20	D-manosa
21	Beta-xilosidasa
22	Beta-Alanina arilamidasa pNA
23	L-Prolina arilamidasa
26	Lipasa
27	Palatinosa
29	Tirosina arilamidasa
31	Ureasa
32	D-sorbitol

pocillo	Test
33	Sacarosa/sucrosa
34	D-Tagatosa
35	D-Trehalosa
36	Citrato de sodio
37	Malonato
39	5-Ceto-D-gluconato
40	L-lactato alcalinización
41	Alfa-Glucosidasa
42	Succinato alcalinización
43	Beta-N-acetil-galactosaminidasa
44	Alfa-Galactosidasa
45	Fosfatasa
46	Glicina arilamidasa
47	Ornitina descarboxilasa
48	Lisina descarboxilasa
52	Descarboxilasa base
53	L-Histidina asimilización
56	Coumarato
57	Beta-Glucoronidasa
58	0/129 Resistencia (Vibrio)
59	Glu-Gly-Arg-arilamidasa
61	L-malato asimilización
62	Ellman
64	L-Lactato asimilización



ANEXO III B: PRUEBAS Y REACCIONES DE LAS TIRAS API20E®

Prueba	Reacción/enzimas
ONPG	Beta-galactosidasa
ADH	Arginina deshidrolasa
LDC	Lisina descarboxilasa
ODC	Ornitina descarboxilasa
CIT	Utilización de citrato
H₂S	Producción de H ₂ S
URE	Ureasa
TDA	Triptófano desaminasa
IND	Producción de indol
VP	Producción de acetoina (Voges-Proskauer)
GEL	Gelatinasa
GLU	Fermentación/oxidación glucosa
MAN	Fermentación/oxidación manitol
INO	Fermentación/oxidación inositol
SOR	Fermentación/oxidación sorbitol
RHA	Fermentación/oxidación ramnosa
SAC	Fermentación/oxidación sacarosa
MEL	Fermentación/oxidación melobiosa
AMY	Fermentación/oxidación amigdalina
ARA	Fermentación/oxidación arabinosa
OX	Citocromo oxidasa



ANEXO IVA: REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

- Lisozima (20 ng/ μ l): Disolver 0.2 g de lisozima en 10ml de agua desionizada, estéril y filtrada.
- Pronasa (20 mg/ml):
 - Tris-HCl 1M: A un matraz aforado de 250 ml adicionar 1.25 ml de NaCl 2M y 0.3025 g de Tris, el pH debe de ser de 7.5.
 - Disolver 0.2 g de Pronasa en 10 ml de Tris-HCl 10 mM, incubar 1 hora a 37°C y almacenar a -20°C.
- RNASA (20 ng/ μ l): Disolver 0.2 g de la enzima en 10 ml de agua desionizada, estéril y filtrada.
- Amortiguador TES (100 ml): Tris 0.605 g, EDTA 0.5 M 1 ml, NaCl 0.2922 g, pH=8. Aforar a 100 ml.
- SDS (10%): Disolver 10 g de SDS en 100 ml de agua desionizada, estéril y filtrada.
- EDTA 0.5 M: Disolver 93.06 g en 500 ml de agua destilada, ajustando a pH=8 con NaOH.

ANEXO IVB: REACTIVOS PARA EL GEL DE AGAROSA

- Agarosa Ultra pura Invitrogen™
- Amortiguador TBE (Tris Borato EDTA) 10X: Tris 34 g, ácido bórico 27.7 g, EDTA 20 ml (0.5 M) disolver en 500 ml y llevar a un pH de 8.
- Amortiguador TBE (Tris Borato EDTA) 1X: Disolver 100 ml de TBE 10X en 900 ml de agua destilada.

Para hacer un gel de agarosa al 1.2%:

-Gel de 11 pocillos: 0.54 g en 45 ml de Buffer TBE 1X

-Gel de 20 pocillos: 0.84 g en 70 ml de Buffer TBE 1X

Calentar 45 segundos o hasta que esté completamente disuelta la agarosa.



Esperar a que enfríe y verter en el acrílico correspondiente. Una vez solidificado, colocar en cámara de electroforesis marca Pharmacia Biotech y colocando 5 μ l de los productos de PCR junto con 1.5 μ l de buffer de carga con colorante en cada uno de los pozos del gel, usando un pozo por muestra y uno extra para colocar 5 μ l de marcador de peso molecular de la marca InvitroGen®.

ANEXO V: GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal.

ARNt: Ácido ribonucleico de transporte.

ISR: Amplificación del espacio intergénico.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RAPD: Amplificación del ADN polimórfico al azar.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

UJAT: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México.