



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

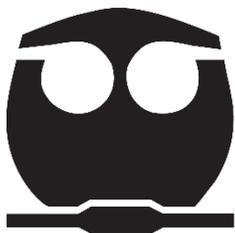
**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE BACTERIAS ENDÓFITAS DEL
MAGUEY PULQUERO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

DIEGO GUERRERO CORONA



Ciudad Universitaria, CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Q.F.B. ALEJANDRO CAMACHO CRUZ
VOCAL: Dr. JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA
SECRETARIO: Dr. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
1er. SUPLENTE: Dra. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
2° SUPLENTE: M. en B. MARTHA GILES GÓMEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

CEPARIO, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.
LABORATORIO 4, DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCÁTÁLISIS, INSTITUTO
DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en B. MARTHA GILES GÓMEZ

SUSTENTANTE (S):

DIEGO GUERRERO CORONA

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM <IN207914>

<Análisis de la diversidad de bacterias lácticas del pulque enfocado al estudio de su genómica y su metabolismo>

Agradezco a la DGAPA- UNAM la beca otorgada

La línea de investigación en la que se ubica este proyecto forma parte de la Red Temática Mexicana de Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves, AGARED – CONACYT.

ÍNDICE

.....	2
1. ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
2. ÍNDICE DE TABLAS.....	9
3. RESUMEN.....	10
4. INTRODUCCIÓN.....	12
5. GENERALIDADES.....	14
5.1 Pulque.....	14
5.2 Género <i>Agave</i>	14
5.2.1 Etimología.....	14
5.2.2 Distribución.....	15
5.2.3 Requerimientos climáticos.....	15
5.2.4 Descripción.....	15
5.3 Maguey pulquero.....	16
5.4 Producción tradicional del pulque.....	17
5.5 Microbiología del pulque.....	21
5.6 Relevancia de la Diversidad Microbiana.....	25
5.7 Métodos para describir la diversidad microbiana.....	25
5.7.1 Métodos Fenotípicos.....	26
5.7.2 Métodos Genotípicos.....	26
5.7.2.1 ADNr 16S.....	26
5.7.2.2 Análisis de Restricción de ADNr 16S Amplificado (ARDRA).....	28
5.7.2.3. Método de secuenciación Sanger.....	28
5.8 Bacterias endófitas.....	31
5.8.1 Colonización de plantas por bacterias endófitas.....	33
5.8.2 Entrada bacteriana.....	33
5.8.3 Bacterias endófitas en agaves.....	35
5.8.4 Importancia de las bacterias endófitas.....	35
6. JUSTIFICACIÓN.....	38
7. HIPÓTESIS.....	38
8. OBJETIVOS.....	38
8.1 Objetivo general.....	38

8.2 Objetivos particulares	38
9. METODOLOGÍA	39
9.1 Muestreo	40
9.2 Aislamiento de bacterias endófitas del maguey	40
9.3 Cuantificación de bacterias ácido lácticas y mesófilas aerobias	41
9.4 Análisis microscópico	41
9.5 Purificación.....	41
9.6 Conservación de cepas.....	41
9.6.1 Conservación a mediano plazo.....	41
9.6.2 Conservación a largo plazo.....	42
9.7 Identificación molecular por análisis de secuencias de ADNr 16S.....	42
9.7.1 Extracción de ADN total y electroforesis en gel de agarosa	42
9.7.2 Amplificación del ADNr 16S por PCR.....	42
9.7.3 Análisis de Restricción de ADNr 16S Amplificado (ARDRA).....	43
9.7.4 Purificación y Secuenciación del ADNr 16S.....	44
9.7.5 Análisis Bioinformático.....	44
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
10.1 Estandarización de la metodología	45
10.1.1 Cuantificación de bacterias ácido lácticas y mesófilas aerobias.....	45
10.1.2 Extracción de ADN total	46
10.2 Aislamiento de bacterias endófitas aisladas de la piña del maguey.....	46
10.2.1 Cuantificación de bacterias ácido lácticas y mesófilas aerobias.....	46
10.2.2 Análisis microscópico	47
10.2.3 Identificación molecular por análisis de secuencias de ADNr 16S de endófitos de la piña de agave	49
10.2.3.1 Extracción de ADN total y electroforesis en gel de agarosa	49
10.2.3.2 Amplificación del ADNr 16S por PCR.....	49
10.2.3.3 Análisis de Restricción de ADNr 16S Amplificado (ARDRA).....	50
10.2.3.4 Purificación del producto de PCR para el gen ADNr 16S.....	52
10.2.3.5 Análisis de secuencias de ADNr 16S.....	52
11 CONCLUSIONES	59
12 PERSPECTIVAS	60
13 REFERENCIAS	61
14 ANEXOS.....	64

1. ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Proceso de elaboración tradicional del pulque.....	18
Figura 2. Modelo de la estructura secundaria del ADNr 16S.....	27
Figura 3. Esquema de la secuenciación por el método enzimático de terminación de cadena o Sanger.....	29
Figura 4. Esquema de la secuenciación por el método automático de electroforesis capilar.....	30
Figura 5. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S.....	30
Figura 6. Localización de bacterias endófitas por hibridación fluorescente in situ.....	33
Figura 7. Principales rutas de establecimiento en la planta por bacterias endófitas...34	
Figura 8. Interacciones planta-bacterias endófitas y sus aplicaciones.....	36
Figura 9. Metodología de la penca y piña del maguey pulquero.....	39
Figura 10. Tinción de Gram de algunas colonias seleccionadas a partir de las placas MRS, APT y TSA.....	48
Figura 11. Electroforesis de ADN total extraído de las cepas aisladas.....	49
Figura 12. Amplificación del gen ADNr 16S de las cepas aisladas.....	50
Figura 13. Representación esquemática de la digestión enzimática con BsuRI del gen ADNr 16S de las cepas aisladas de la piña de maguey.....	51
Figura 14. Árbol filogenético de aislados únicos detectados en la piña del maguey..56	
Figura 15. Árbol filogenético del aislado AM02 detectado en la piña del maguey.....	57
Figura 16. Digestión enzimática con BsuRI del gen ADNr 16S de las cepas aisladas en MRS y APT.....	74
Figura 17. Digestión enzimática con BsuRI del gen ADNr 16S de las cepas aisladas en APT.....	75
Figura 18. Digestión enzimática con BsuRI del gen ADNr 16S de las cepas aisladas en APT.....	76
Figura 19. Digestión enzimática con BsuRI del gen ADNr 16S de las cepas aisladas en TSA.....	77
Figura 20. Digestión enzimática con BsuRI del gen ADNr 16S de las cepas aisladas en TSA.....	78

2. ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Especies de Agave usadas para la extracción de aguamiel y producción de pulque.....	16
Tabla 2. Diversidad microbiana detectada en aguamiel y durante la fermentación del pulque.....	24
Tabla 3. Bacterias endófitas secuenciadas y mecanismo de acción beneficiosa.....	32
Tabla 4. Productos naturales que han sido derivados o producidos de diversas bacterias endófitas.....	37
Tabla 5. Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación del ADN _r 16S.....	43
Tabla 6. Mezcla de reacción para análisis ARDRA.....	44
Tabla 7. Cuenta en placa de bacterias ácido lácticas y mesófilas aerobias en la penca.....	45
Tabla 8. Cuenta en placa de bacterias ácido lácticas y mesófilas aerobias en la piña del maguey.....	47
Tabla 9. Tipos únicos ARDRA.....	51
Tabla 10. Identificación Molecular de endófitos de la piña del maguey.....	53
Tabla 11. Características morfológicas y tinción de Gram de las cepas aisladas.....	69

3. RESUMEN

Estudios previos han determinado la diversidad microbiana presente en el aguamiel, savia del maguey empleada para la producción de pulque, compuesta principalmente por bacterias ácido lácticas (BAL), incluyendo *L. mesenteroides*, *L. kimchi*, *L. citreum* y en menor proporción por *Lactococcus lactis*. Las γ -Proteobacteria *Erwinia rapontici*, *Enterobacter* sp. y *Acinetobacter radioresistens* fueron el segundo grupo bacteriano más abundante detectado en la savia de agave. Dado que las γ -Proteobacterias identificadas son microorganismos distribuidos de forma natural en diversos entornos tales como el agua dulce, el suelo y las superficies vegetales, es posible suponer que estas bacterias son un contaminante incorporado a la savia durante su acumulación en el cajete o durante la extracción y procedimientos de manejo (Escalante *et al.*, 2008). Aunque Escalante *et al.* (2008) no informaron la detección de lactobacilos en aguamiel, el aislamiento de *Lactobacillus brevis* y *L. collinoides* de las muestras de savia de agave recolectadas en Huitzilac, estado de Morelos, se describió en una publicación reciente (Escalante A *et al.*, 2016).

Las bacterias endófitas se pueden definir como aquellos organismos que residen en tejidos de las plantas, principalmente espacios intercelulares, raramente en espacios intracelulares y dentro de tejidos vasculares sin causar síntomas de enfermedad en la planta (Pérez *et al.*, 2010).

El objetivo del presente trabajo fue aislar la diversidad de bacterias endófitas cultivables asociadas a la planta de maguey pulquero de la población de Huitzilac, en el Estado de Morelos, a partir del siguiente planteamiento: ¿Es posible que las bacterias endófitas del maguey sean las mismas que se han detectado en el aguamiel? El trabajo realizado consistió en dos partes: La estandarización de la metodología para la extracción y cultivo de bacterias endófitas y la extracción de ADN total a partir de la biomasa de la penca de maguey.

En la estandarización de la metodología, se realizó el aislamiento de las bacterias endófitas en medio selectivo Man Rogosa Sharpe (MRS), APT y Agar Soya Tripiticaseína

(TSA), obteniendo una mayor cantidad de colonias en el origen de la penca y siendo más eficiente la técnica de expresión que la maceración al visualizar el ADN total en un gel de electroforesis.

La segunda parte consistió en aplicar estas metodologías para la extracción de la fracción bacteriana endófitas presente en una muestra de piña de un maguey. Esta estandarización se lleva a cabo debido a que no es fácil obtener la muestra de la piña ya que se tiene que esperar a la maduración del maguey para que se realice el proceso de castración.

En la muestra de la piña del maguey se logró el aislamiento de 98 cepas endófitas, así como la extracción de ADN total y la amplificación del ADNr 16S de cada cepa. Su tipificación mediante el análisis de restricción de ADNr 16S amplificado (ARDRA) permitió detectar 13 grupos genéticos. Las bacterias endófitas fueron identificadas a través del análisis de secuencia del ADNr 16S como: *Pantoea agglomerans*, *Raoultella terrigena*, *Acinetobacter genomus* sp., *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Erwinia billingiae*, *Leuconostoc rapi*, *Pseudomonas rhizosphaerae*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas* sp. y *Pseudomonas fluorescens*.

Estos resultados pudieron determinar el origen de estos microorganismos presentes en el aguamiel y que posteriormente participan en la fermentación del pulque, específicamente *Leuconostoc mesenteroides* y *L. citreum*, es decir, se encuentran en la piña del maguey y no tienen ningún otro origen.

4. INTRODUCCIÓN

Las bacterias endófitas se pueden definir como aquellos organismos que residen en tejidos de las plantas, principalmente espacios intercelulares, raramente en espacios intracelulares y dentro de tejidos vasculares sin causar síntomas de enfermedad en la planta (Pérez *et al.*, 2010). Hay un número de maneras por las cuáles las bacterias endófitas pueden obtener acceso al interior de la planta.

La colonización en el interior de las plantas generalmente empieza con el establecimiento de bacterias en la rizosfera. Después de la colonización de la rizosfera, las bacterias se adhieren a la superficie de la raíz. Malfanova N *et al* describen que la unión de células bacterianas a la raíz es un paso crucial para el posterior establecimiento de endófitos, donde varios componentes de la superficie bacteriana pueden estar involucrados en este proceso (Malfanova N *et al.*, 2013).

El pulque es una bebida alcohólica tradicional mexicana producida a partir de la fermentación de la savia fresca, conocido como aguamiel; el cual es extraído de varias especies de *Agave* que crecen en la meseta central de México incluyendo principalmente los estados actuales de Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Morelos, Michoacán, Estado de México y Querétaro. El producto fermentado es una bebida blanca lechosa, viscosa y ligeramente ácida con un contenido alcohólico entre 4 y 7° GL (Escalante A *et al.*, 2016).

Desde el punto de vista microbiológico el proceso de fermentación del pulque representa un ambiente naturalmente enriquecido en el que se desarrollan tres tipos de fermentación que definen sus características sensoriales distintivas finales: una fermentación ácida en la que se produce principalmente ácido láctico y ácido acético como resultados del metabolismo de bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas; un metabolismo alcohólico, resultado de la producción de etanol por levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*; y la producción de diferentes tipos de polisacáridos extracelulares (EPS) tales como la

dextrana y levanas, producidas principalmente por la BAL *Leuconostoc mesenteroides* y por *Z. mobilis* (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Escalante *et al.*, 2012).

En el grupo de trabajo del Dr. Escalante y la M. en B. Martha Giles (Instituto de Biotecnología-UNAM y Facultad de Química-UNAM) se han enfocado al estudio de la diversidad bacteriana presente en el pulque determinando la presencia de una diversidad bacteriana conformada por diversos microorganismos previamente considerados como esenciales para la fermentación como son *L. mesenteroides*, *Z. mobilis*, *S. cerevisiae* (Sánchez-Marroquín and Hope, 1953; Sánchez-Marroquín *et al.*, 1957, García-Garibay y López-Munguía, 1993), pero de forma interesante se han detectado también una gran diversidad de LAB y Proteobacterias, entre los que destacan las BAL *Leuconostoc citreum*, *L. kimchii*, *Lactobacillus acidophilus*, en muestras de pulque procedentes de diferente origen geográfico y durante el desarrollo de una fermentación en laboratorio, lo que nos han permitido cuestionar el papel esencial tradicionalmente asociados a la producción de esta bebida (Escalante *et al.*, 2004; 2008).

Así mismo se han realizado estudios para caracterizar la diversidad microbiana de muestras de aguamiel. La diversidad microbiana identificada en aguamiel está compuesta principalmente por BAL, incluyendo a *Leuconostoc mesenteroides*, *L. citreum* y *L. kimchi*; las γ -Proteobacteria *Erwinia rapontici*, *Enterobacter* sp. y *Acitenobacter radioresistens* fueron las segundas más abundantes detectadas en muestras de aguamiel (Escalante A *et al.*, 2016).

Con base a la experiencia de este grupo de trabajo, se tiene como finalidad continuar trabajando sobre la caracterización de la diversidad microbiana y genética bacteriana. Por ello, el objetivo de este trabajo consistió en identificar la comunidad de bacterias endófitas cultivables asociadas a la planta de maguey pulquero; principalmente la piña del maguey, la cual es un objeto de estudio de interés porque a partir de esta estructura se forma el cajete, cavidad en la que se acumula el aguamiel, la savia que se emplea como sustrato para la elaboración del pulque.

5. GENERALIDADES

5.1 Pulque

El pulque es una bebida alcohólica tradicional mexicana producida a partir de la fermentación de la savia fresca, conocido como aguamiel; el cual es extraído de varias especies de *Agave* que crecen en la meseta central de México, incluyendo principalmente los estados actuales de Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Morelos, Michoacán, Estado de México y Querétaro. El producto fermentado es una bebida blanca lechosa, viscosa y ligeramente ácida con un contenido alcohólico entre 4 y 7° GL (Escalante A *et al.*, 2016).

5.2 Género *Agave*

5.2.1 Etimología

El nombre genérico *Agave* proviene del griego *Agavos*, y fue propuesto por el naturalista sueco Carlos Linneo en 1753 para reconocer aquellas plantas americanas con hojas suculentas, arregladas en espiral alrededor de un tallo corto, en cuyos bordes se encuentran espinas marginales y una terminal en el ápice. La palabra alude a algo admirable o noble y fue tomada de la mitología griega, pues Ágave era una ménade, hija de Cadmo, rey de Tebas, quien al frente de una muchedumbre de bacantes, asesinó a su hijo Penteo, sucesor de Cadmo en el trono de Tebas. El nombre agave es muy adecuado para describir plantas cuyas bebidas pueden inducir a la embriaguez. *Agave* es un término científico de uso mundial a partir de 1753. En México, estas plantas se conocían con diferentes nombres tales como *metl* (náhuatl), *uadá* (otomí), *doba* (zapoteco) y *akamba* (purépecha). Fueron los españoles quienes trajeron la voz caribeña “*maguey*” para nombrarlas y ahora es el nombre común más difundido (García-Mendoza A.J., 2012).

5.2.2 Distribución

El género *Agave* es endémico de América. Es el género más grande de la familia Agavaceae. De un total de 210 especies, México tiene 159, es decir el 75 por ciento, con 119 especies endémicas. La distribución del género abarca del sur de los Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela, incluyendo todas las islas del caribe (Nava B.O., 2014).

En México, el género *Agave* es muy diverso en las zonas áridas y semiáridas del centro y norte, pero su número disminuye drásticamente hacia las provincias húmedas y cálidas del sur, está ausente en Tabasco, Quintana Roo y Campeche (Nava B.O., 2014).

5.2.3 Requerimientos climáticos

Las especies de *Agave* crecen en un gran número de ambientes de México, desde los valles y planicies hasta los cerros y laderas pedregosas, incluyendo lugares montañosos de gran latitud (García Herrera E.J., *et al.*, 2010); crece entre los 2000 y 2400 metros sobre el nivel del mar, en las zonas semiáridas del altiplano central y regiones aledañas, con temperaturas templadas o frías, suelos resacos y duros de composición arcillosa (Matus V., 2011).

5.2.4 Descripción

Son plantas perennes, la mayoría de ellas arbustos sin tallo, aunque hay algunas que si lo desarrollan. Tienen forma de piña, de la cual salen sus hojas o pencas, a veces rectas y otras dobladas, de color verde intenso o amarillo, crecen formando rosetas de hojas carnosas, rígidas en los sitios de baja precipitación pluvial, flexibles en los sitios con precipitación abundante, sus flores están dispuestas en espigas o en racimos (Nava B.O., 2014).

5.3 Maguey pulquero

Los magueyes productores del pulque son *Agave salmiana*, *A. mapisaga*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. hookeri*, *A. americana* (García-Garibay y López-Munguía, 1993; Escalante *et al.*, 2016) (Tabla 1). Las zonas productoras de pulque son principalmente Hidalgo, Tlaxcala, Estado de México y Puebla, aunque también se le encuentra marginalmente en San Luis Potosí, Michoacán, Querétaro, Morelos, Guanajuato, Veracruz y Oaxaca (Flores *et al.*, 2008). El maguey cultivado en lugares húmedos con climas templados suele producir un aguamiel de baja calidad, ya que tiene poca concentración de azúcares, los magueyes con una producción de aguamiel más rica en azúcares son aquellos cultivados en suelos secos con climas cálidos (Loyola E., 1956).

Tabla 1. Especies de *Agave* usadas para la extracción de aguamiel y producción de pulque (Escalante A *et al.*, 2016).

Nombre	Comentarios
<i>A. atrovirens</i> Kraw ex-Salm Dyck	Cultivado principalmente en los estados de México, Tlaxcala, Hidalgo y Puebla
<i>A. atrovirens</i> var. <i>salmiana</i> (Otto ex-Salm Dyck) Maire and Weiller	Cultivado principalmente en los estados de México, Tlaxcala, Hidalgo y Puebla
<i>A. americana</i> L	Cultivado principalmente en los estados de México, Tlaxcala, Hidalgo y Puebla
<i>A. mapisaga</i> Trel	Incluye 13 variantes. Cultivado principalmente en los estados de México, Tlaxcala, Hidalgo y Puebla
<i>A. salmiana</i> var. <i>angustifolia</i> A. Berger	Cultivado principalmente en los estados de México, Tlaxcala, Hidalgo y Puebla
<i>A. salmiana</i> var. <i>ferox</i> (K. Koch) Gentry	Incluye tres variantes
<i>A. salmiana</i> var. <i>salmiana</i>	El grupo más diverso, incluyendo 31 variantes

5.4 Producción tradicional del pulque

La extracción de aguamiel y elaboración del pulque son realizadas tradicionalmente por el tlachiquero, que tiene un profundo conocimiento de la biología y el cuidado de las especies de maguey utilizadas para la producción. El proceso comienza con la selección de plantas maduras de 6 a 15 años y comprende cuatro etapas comunes con ligeras variaciones entre las zonas productoras: Castración, raspado y extracción de aguamiel, preparación de semilla y fermentación (Fig. 1) (Escalante A *et al.*, 2016).

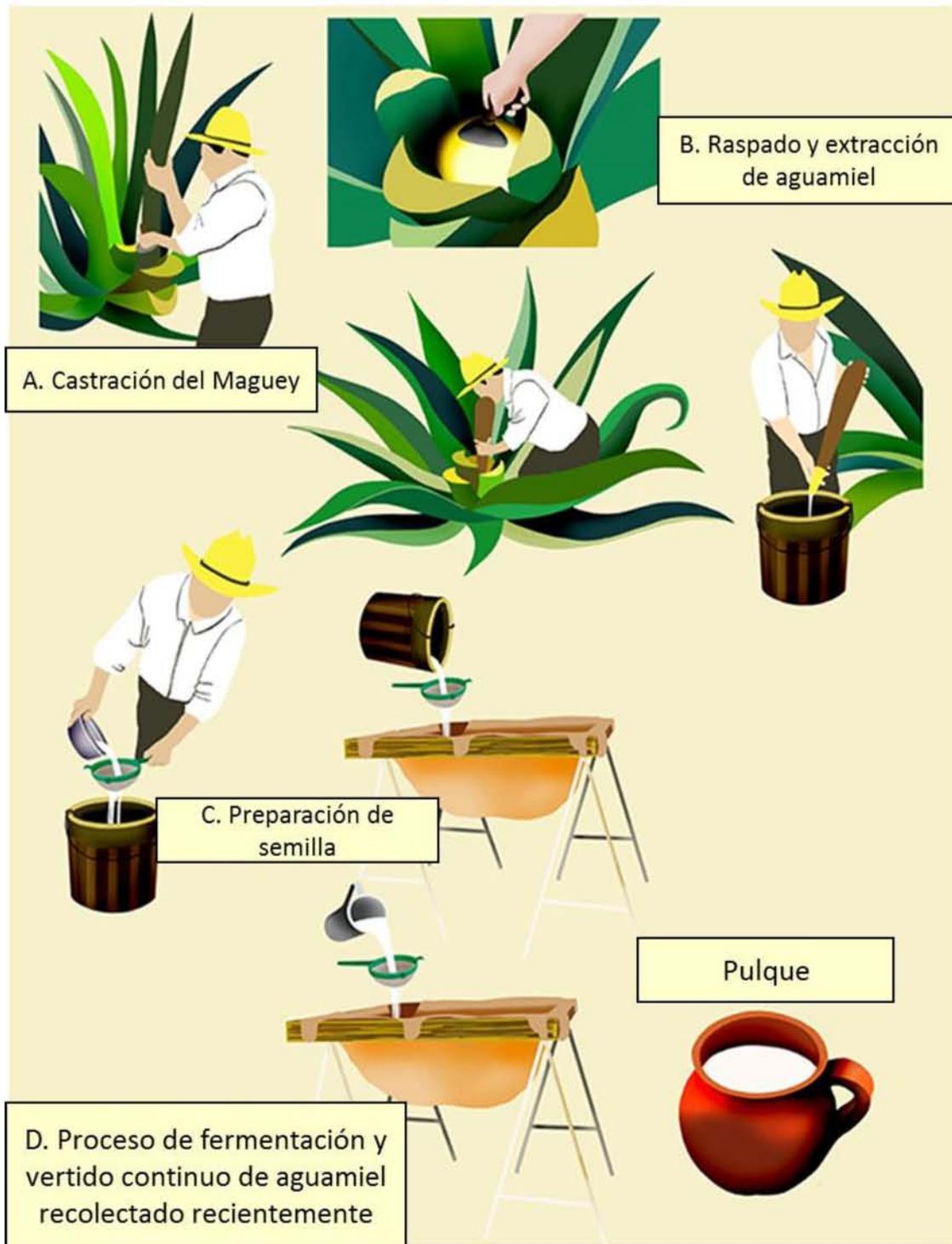


Figura 1. Proceso de elaboración tradicional del pulque. El proceso tradicional comprende cuatro etapas: A. Castración del maguey, B. Raspado y extracción del aguamiel, C. Preparación de semilla y D. Fermentación. Modificado de Escalante A *et al.*, 2016.

Castración del Maguey

Para esta operación, las plantas maduras seleccionadas son castradas destruyendo el pedúnculo floral embrionario que rodea al brote floral (quiote). Durante esta operación, las hojas centrales de la planta (meloyote o corazón), de las cuales se eleva la flor se eliminan usando un instrumento afilado y puntiagudo, dejando una cavidad (conocida como cajete) en el centro de la planta. La cavidad está cubierta con una gran piedra o con hojas de la misma planta para protegerla de los animales y las condiciones ambientales. Un período de maduración sigue a la castración y varía de 3 meses a 1 año (Escalante A *et al.*, 2016).

El proceso de castración varía entre las regiones productoras: en la región productora de Huitzilac (estado de Morelos) se excava la cavidad sin eliminar las hojas centrales y se corta el capullo floral después del proceso de maduración. El momento preciso para la castración es la responsabilidad del tlachiquero para evitar la floración de la planta. Si la inflorescencia crece, la planta nunca producirá aguamiel. Además, la castración temprana resultará en un volumen reducido de producción de aguamiel de mala calidad. Tradicionalmente, algunas sugerencias utilizadas por el tlachiquero para seleccionar plantas maduras son la abundancia de hojas, la delgadez del meloyote y las hojas circundantes, que también son sin punta y adoptan un tono verde más claro (Escalante A *et al.*, 2016).

Raspado y extracción de aguamiel

El aguamiel fresco es ligeramente turbio, espeso, muy dulce, un sabor fresco y neutro a ligeramente ácido. Raspando la pared del cajete se induce el flujo de la savia, por lo que aguamiel fluye y se acumula en la cavidad. Esta operación es realizada por el tlachiquero utilizando una herramienta de raspado. La savia acumulada se extrae dos veces al día (generalmente al amanecer y al atardecer) por succión oral utilizando una calabaza seca (*Lagenaria siceraria*) conocida como acocote. Después de cada colección de aguamiel, las paredes de la cavidad son

raspadas de nuevo para mantener la inducción del flujo de la savia. El aguamiel recién recogido se almacena en recipientes de plástico y se transporta a cubas específicas donde tiene lugar la fermentación principal. Una planta de agave madura puede producir aguamiel de 3 a 6 meses hasta que la planta muere, dependiendo de la frecuencia del proceso de raspado. Diariamente, la planta produce 4-6 L de aguamiel con una producción promedio máxima de alrededor de 1000 L en su vida útil de producción (Escalante A *et al.*, 2016).

Preparación de semilla

Esta operación se refiere a la producción de material de partida (inóculo) para la fermentación de la savia recién recogida en un nuevo recipiente. Para este propósito, alrededor de 2 L de pulque fermentado se colocan en una cuba de ~20 L de barro, vidrio, madera, plástico o fibra de vidrio, se vierte aguamiel fresco de alta calidad. Una fermentación espontánea comienza a temperatura ambiente hasta que se desarrolla un sabor característico alcohólico y acético o hasta que se forma una capa blanca llamada zurrón en la superficie, proceso que suele tardar de 1 a 4 semanas dependiendo de la estación. Por último, el tlachiquero transfiere el producto fermentado (semilla) a una o más cubas limpias donde se produce la fermentación pulque una vez que se añade el aguamiel recolectado (Escalante A *et al.*, 2016).

Fermentación

La fermentación se lleva a cabo en cubas habitualmente hechas de barriles de cuero de vaca, fibra de vidrio, plástico o madera situados en espacios cerrados conocidos como tinacal o en espacios abiertos específicos. El aguamiel recién recogido se filtra para separar los insectos o cualquier objeto grande y se vierte en la cuba, donde la semilla fue transferida previamente. El tiempo de fermentación varía fuertemente dependiendo de la calidad aguamiel, la madurez de la semilla, la estación y la región productora, entre otros factores. Por lo general dura de 3 a 6 h, pero durante la

noche o incluso períodos prolongados de tiempo (por ejemplo, 3-12 días) no son fuera de lo común (Escalante A *et al.*, 2016).

5.5 Microbiología del pulque

La fermentación por pulque es un proceso que se puede considerar como de lote alimentado, no agitado, realizado en condiciones no asépticas. Los microorganismos involucrados en la fermentación son aquellos que ocurren naturalmente durante la acumulación de la savia en la cavidad de cajete en el maguey y los incorporados durante la recolección, transporte, preparación y manipulación de las semillas

Desde el punto de vista microbiológico el proceso de fermentación del pulque representa un ambiente naturalmente enriquecido en el que se desarrollan tres tipos de fermentación que definen sus características sensoriales distintivas finales: una fermentación ácida en la que se produce principalmente ácido láctico y ácido acético como resultados del metabolismo de bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas; un metabolismo alcohólico, resultado de la producción de etanol por levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*; y la producción de diferentes tipos de polisacáridos extracelulares (EPS) tales como la dextrana y levanas, producidas principalmente por la BAL *Leuconostoc mesenteroides* y por *Z. mobilis* (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Escalante *et al.*, 2012).

La diversidad microbiana identificada en una muestra de aguamiel proveniente de la localidad de Huitzilac, Morelos estuvo compuesta principalmente por BAL, incluyendo *L. mesenteroides*, *L. kimchi*, *L. citreum* y en menor proporción por *Lactococcus lactis*. Las γ -Proteobacteria *Erwinia rapontici*, *Enterobacter* sp. y *Acinetobacter radioresistens* fueron el segundo grupo bacteriano más abundante detectado en la savia de agave. Dado que las γ -Proteobacterias identificadas son microorganismos distribuidos de forma natural en diversos entornos tales como el

agua dulce, el suelo y las superficies vegetales, es posible suponer que estas bacterias son un contaminante incorporado a la savia durante su acumulación en la cajeta o durante la extracción y procedimientos de manejo (Escalante et al., 2008). Aunque Escalante et al. (2008) no informaron la detección de lactobacilos en aguamiel, el aislamiento de *Lactobacillus brevis* y *L. collinoides* de las muestras de savia de agave recolectadas también en la localidad de Huitzilac, se describió en una publicación reciente (Escalante A et al., 2016).

La adición de aguamiel recién recogido a pulque previamente fermentado resulta en un aumento considerable en el recuento de levaduras (~ 155% sobre UFC/ml total respecto a aguamiel). *Leuconostoc kimchi* y *A. radioresistens* disminuyeron, y *L. mesenteroides* se mantuvo relativamente constante respecto a aguamiel (Escalante et al., 2008). Curiosamente, después de mezclar aguamiel con pulque (T₀), el microorganismo más abundante detectado fue el LAB identificado como *Lactobacillus acidophilus*. También se detectaron las γ -Proteobacteria *Enterobacter agglomerans* y la α -Proteobacteria *Z. mobilis* y *Acetobacter malorum*, pero en proporciones bajas en T₀. Se observaron importantes cambios fisicoquímicos en T₀. Después de mezclar aguamiel fresco y pulque fermentado, el pH disminuyó de 6.0 a 4.5 en la mezcla (Escalante A et al., 2016).

La diversidad microbiana presente en T₀ incluye los microorganismos en aguamiel y los de pulque fermentado resultando en una diversidad microbiana compuesta por BAL homo y heterofermentativo, BAL que produce EPS, bacterias ácido acéticas, bacterias mesófilas aerobias, *Z. mobilis* productor de etanol y levaduras (Escalante A et al., 2016).

Después de 3 h de fermentación se observan cambios importantes en la diversidad bacteriana. *Lactobacillus* sp, *L. mesenteroides* y *Enterococcus agglomerans* se convierten en las especies dominantes. Otras bacterias como *Zymomonas mobilis*, *Acetobacter malorum* y *Acitenobacter radioresistens* se encontraron relativamente

constante desde la inoculación; *L. citreum* fue detectado en menor proporción y algunos otros desaparecieron. (Escalante A *et al.*, 2008).

Al final del proceso de fermentación (6h), la diversidad bacteriana observada se compone principalmente de *Lactobacillus acidophilus*, así como de las BAL heterofermentativas *L. mesenteroides* (50%), *L. lactis* subsp. *lactis* (12.5%), *Lactobacillus* sp. homofermentativos (14.8%) y la α -Proteobacteria *A. malorum* (13.6%) (Escalante A *et al.*, 2008).

L. acidophilus fermenta la glucosa, fructosa, sacarosa y produce ácido láctico. *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* y especies de *Citrobacter* contribuyeron a la producción de ácido láctico, CO₂, etanol y pequeñas cantidades de ácido acético que son importantes para las características sensoriales del pulque fermentado (Escalante A *et al.*, 2008).

Se ha reportado que algunas especies de BAL son capaces de crecer en ambientes con concentraciones de etanol de hasta el 20%, por lo tanto, la capacidad de las BAL para resistir altas concentraciones de etanol y su capacidad de crecer en ambientes ácidos (pH= 4.5) podría explicar su abundancia relativa durante el proceso de fermentación. Es posible que las especies bacterianas que aparentemente desaparecieron durante la fermentación no fueron capaces de resistir a la acidificación del medio ambiente, el aumento de la concentración de etanol, el posible efecto antimicrobiano de las BAL, tales como la producción de H₂O₂, u otras actividades antimicrobianas (Escalante A *et al.*, 2008). En la Tabla 2 se muestra la diversidad microbiana detectada en aguamiel y durante la fermentación del pulque.

Tabla 2. Diversidad microbiana detectada en aguamiel y durante la fermentación del pulque (Escalante A *et al.*, 2016).

Bacteria	Levadura/Hongo	Características metabólicas que definen las propiedades sensoriales del aguamiel o pulque
<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>L. dextranicum</i> <i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Microorganismos esenciales responsables de ácido (ácido láctico), alcohol y producción de EPS.
	Levaduras aisladas del aguamiel: <i>Candida lusitaneae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus var bulagricus</i> (+), <i>S. cerevisiae</i> . Levaduras aisladas del pulque: <i>C. valida</i> (+), <i>S. cerevisiae</i> (chevalieri), <i>S. cerevisiae</i> (capensis), <i>K. marxianus var lactis</i> (+)	Varios aislados de <i>C. valida</i> , <i>S. cerevisiae</i> (chevalier) aislados del pulque fueron capaces de resistir a >10% de alcohol. Relevancia del potencial en la producción de etanol durante la fermentación y resistencia a toxinas asesinas.
<i>Acetobacter aceti</i> , <i>A. aceti</i> subsp. <i>xylinus</i> , <i>Bacillus simplex</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Cellulomonas</i> sp., <i>Escherichia</i> sp., <i>Kokuria rosea</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. vermiforme</i> , <i>Leuconostoc</i> sp., <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> , <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> , <i>Macrococcus caseolyticus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Sarcina</i> sp., <i>Z. mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i>	<i>Cryptococcus</i> sp., <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Debaryomyces</i> <i>carsonii</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>L. marxianus</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Pichia</i> sp., <i>P.</i> <i>guilliermondii</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>Rhodotorula</i> sp., <i>R. mucilaginosa</i> , <i>Saccharomyces bayanus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S.</i> <i>pastorianus</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i>	Microorganismos esenciales responsables de la fermentación láctica y acética (BAL y bacterias ácido acéticas), fermentación alcohólica (<i>Z. mobilis</i> y <i>S. cerevisiae</i>), producción de EPS (<i>Leuconostoc</i> sp.) y bacterias de putrefacción.
Análisis de bibliotecas de clones de ADNr 16S permitió identificar: <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. kéfir</i> , <i>L. acetotolerans</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> , <i>L. pseudomesenteroides</i> , <i>Acetobacter pomorum</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> , <i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Flavobacterium jhonsoanae</i> , <i>Hafnia alvei</i> .		<i>L. acidophilus</i> homofermentativo fue identificado como el microorganismo más abundante en las tres muestras analizadas de diferente origen geográfico, sugiriendo un posible papel esencial en la fermentación láctica. <i>L. mesenteroides</i> estaba presente en baja proporción respecto a lactobacilli. <i>Z. mobilis</i> y AAB fueron detectados en bajos porcentajes o ausentes. Presencia de posible putrefacción o bacterias contaminantes
Un cultivo combinado dependiente y bibliotecas de ADNr 16S permitieron identificar aquellos microorganismos presentes en aguamiel recién extraído y durante 6 h de fermentación. α-Proteobacteria: <i>Acetobacter malorum</i> ^a , <i>A. orientalis</i> ^b , <i>Z. mobilis</i> subsp. <i>pomaceae</i> ^b , γ-Proteobacteria: <i>Citrobacter</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp. ^a , <i>E. agglomerans</i> ^a , <i>Erwinia rhapontici</i> ^a , <i>Kuyvera acorbata</i> ^c , <i>K. cochleae</i> ^a , <i>Providencia</i> sp. ^a , <i>Serratia grimensii</i> ^a , <i>Acitenobacter radioresistens</i> ^b , <i>Sterotrophomonas</i> sp. ^a , <i>Chryseobacterium</i> sp. <i>Firmicutes</i> : <i>Bacillus</i> sp. ^a , <i>B. licheniformis</i> ^a , <i>Lactobacillus</i> sp. ^c , <i>L. acidophilus</i> ^b , <i>L. hilgardii</i> ^b , <i>L. paracollinoides</i> ^b , <i>L. sanfranciscensis</i> ^b , <i>Lactococcus</i> sp. ^a , <i>L. lactis</i> ^a , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ^a , <i>Leuconostoc kimchi</i> ^c , <i>L. citreum</i> ^c , <i>L. gasocomitatum</i> ^b , <i>L. mesenteroides</i> ^c , <i>L. pseudomesenteroides</i> ^c , <i>Pediococcus urinaequi</i> ^a , <i>Streptococcus deviese</i> ^a	<i>S. cerevisiae</i> ^b	Las especies <i>Leuconostoc citreum</i> y <i>L. kimchi</i> fueron identificadas como las BAL más abundantes en aguamiel. Después de mezclar aguamiel fresco con pulque fermentado previamente, <i>L. acidophilus</i> , <i>L. mesenteroides</i> fueron las BAL más abundantes durante 6 h de fermentación. <i>E. agglomerans</i> fue la no-BAL más abundante durante las primeras 3 h de fermentación. <i>Z. mobilis</i> y AAB estuvieron ausentes en aguamiel pero detectadas en proporciones bajas durante el proceso de fermentación. El conteo total bacteriano de BAL (UFC/mL) y bacterias mesófilas aerobias totales fue constante durante 6 h de fermentación. El conteo total de levaduras (UFC/mL) detectó en aguamiel un incremento después de mezclar aguamiel con pulque fermentado, incrementando hasta 3 h y manteniéndose constante hasta el final de la fermentación.

(+) Indica actividad asesina detectada

^aIdentificados a partir de un aislado de cultivo

^bIdentificados a partir de biblioteca de clones de ADNr 16S

^cIdentificados por métodos dependientes y no dependientes de cultivo.

5.6 Relevancia de la Diversidad Microbiana

El mundo microbiano es la mayor reserva inexplorada de la biodiversidad en la tierra. Es una frontera importante en la biología bajo intensas investigaciones. La exploración de la diversidad microbiana se ha visto estimulada por el hecho de que los microorganismos son esenciales para la vida ya que realizan numerosas funciones esenciales para la biosfera que incluyen el reciclaje de nutrientes y desintoxicación del medio ambiente (Vibha B. y Neelman G, 2012).

Nuestro conocimiento acerca de las bacterias en ambientes naturales es limitado, y el estudio de la diversidad microbiana en la naturaleza no es una tarea fácil. En los ecosistemas naturales, existen microorganismos en grandes cantidades a pesar del hecho de que hay varios miles de especies microbianas que aún no han sido descritos. Un gramo de suelo o sedimento puede contener 10^{10} bacterias contadas por microscopía de fluorescencia después de la tinción con un colorante fluorescente. En el agua de mar pura, el número de bacterias es de aproximadamente 10^6 por mililitro (Frakuddin M y Mannan K S B, 2013).

Dentro de las poblaciones microbianas naturales, una gran cantidad de información genética está "esperando" a ser descubierta. Se ha registrado que las bacterias cultivables representan una fracción menor de la población bacteriana total presente (Giovannoni S J *et al.*, 1990). Sin embargo, es importante continuar el trabajo tanto en las cultivables, así como las bacterias no cultivables de diferentes entornos.

5.7 Métodos para describir la diversidad microbiana

La identificación de una bacteria es su asignación a un taxón según una clasificación dada. Consiste en la determinación de las características fenotípicas y/o genotípicas y la comparación de estas características con los diferentes taxones de la clasificación considerada. Las características a determinar y su número depende principalmente del tipo de bacteria y del fin que se persigue en la identificación (Oleňka A, 2010).

5.7.1 Métodos Fenotípicos

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos, entre otros (Bou G *et al.*, 2011).

5.7.2 Métodos Genotípicos

Los métodos genotípicos tienen una tipificación más precisa puesto que todos los organismos contienen ácidos nucleicos y con estos métodos se estudia su genoma. Los métodos genotípicos son generalmente rápidos, económicos y sencillos una vez que se han implementado, pero requieren una inversión económica inicial, tiempo y habilidades técnicas para evaluar, interpretar y estandarizar. Una de las ventajas de estos métodos es que son independientes de las variaciones en las condiciones de crecimiento de los microorganismos.

Entre los métodos de identificación genotípica se encuentran la secuenciación de regiones del gen que codifica los ARNr 16S o 23S, ensayos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y diversas técnicas de tipificación del ADN basándose en ya sea patrones de fragmentos de ADN amplificados por PCR o análisis de restricción de ADN total (Oleñka A, 2010).

5.7.2.1 ADNr 16S

El ADNr 16S es el gen que codifica al ARNr 16S, tiene un tamaño aproximado de 1500 nucleótidos y se compone de regiones variables y conservadas, a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Las regiones conservadas en 5'- y 3'- son usadas para diseñar oligonucleótidos y amplificar todo el gen.

Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla (Fig. 2).

Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al ADNr 16S, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarle. Esta macromolécula presenta una serie de características, por las cuales fue considerada como cronómetro molecular definitivo:

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Existe una base de datos amplia en continuo crecimiento con la cual se puede comparar los resultados. (Rocío y Mendoza, 2004)

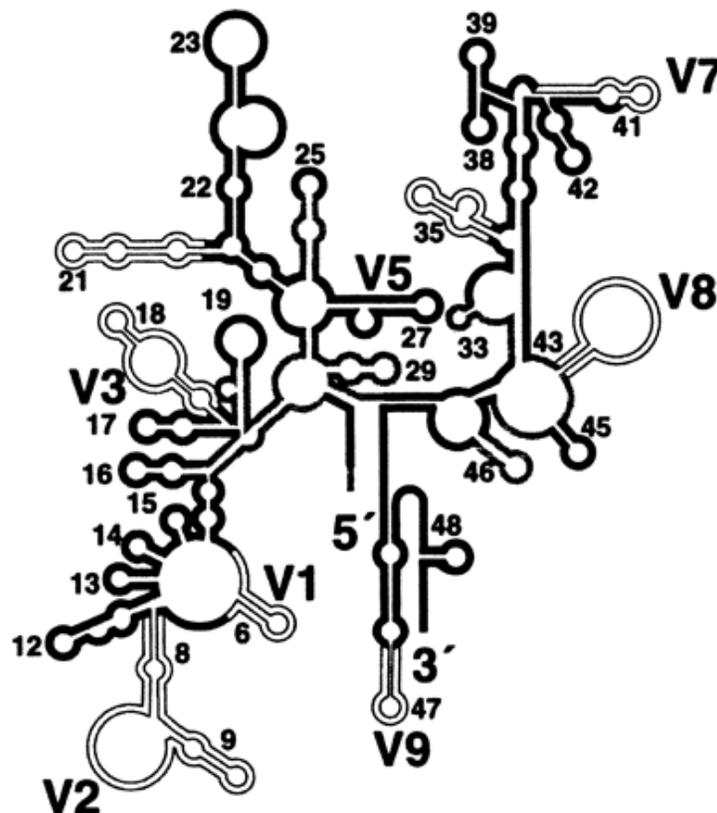


Figura 2. Modelo de la estructura secundaria del ARNr 16S (líneas dobles indican regiones variables o hipervariables; líneas negras indican regiones altamente conservadas; V1 a V9 indican las principales regiones variables) (Tortoli E., 2003)

5.7.2.2 Análisis de Restricción de ADNr 16S Amplificado (ARDRA)

El análisis ARDRA, por sus siglas en inglés “Amplified rDNA Restriction Analysis”, consiste en la digestión del ADNr 16S amplificado con enzimas de restricción, mediante las cuales se obtendrán fragmentos de ADN de acuerdo al número de sitios de restricción para cada enzima utilizada.

Aunque la técnica de ARDRA proporciona poca o ninguna información acerca del tipo de microorganismos presentes en la muestra. El método sigue siendo útil para el monitoreo rápido de las comunidades microbianas a lo largo del tiempo, o para comparar la diversidad microbiana en respuesta a los cambios ambientales. Una de las mayores limitaciones de ARDRA es que los perfiles de restricción generados de comunidades microbianas complejas son algunas veces muy difíciles de resolver por electroforesis en gel de agarosa. (Ahmad I *et al.*, 2011).

5.7.2.3. Método de secuenciación Sanger

El método se basa en generar por replicación *in vitro* de un ADN molde, copia de segmentos con el mismo origen pero distinta longitud. Se llevan a cabo 4 reacciones independientes en las que la hebra de ADN complementaria era sintetizada, a cada reacción se le agregaban los elementos necesarios para la síntesis de la hebra incluyendo los nucleótidos. Una variante importante en cada reacción era la adición de los dideoxynucleótidos (ddNTPs), estos nucleótidos carecen de un grupo hidroxilo en su extremo 3', lo que finalizaba la síntesis de la hebra complementaria, además estos ddNTPs eran marcados radiactivamente; a cada una de las reacciones de síntesis se agregaba un solo tipo de ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP o ddTTP) en bajas concentraciones junto con los nucleótidos normales. Finalmente las 4 reacciones eran corridas en una electroforesis (carriles separados), lo que permitía observar fragmentos de distintos tamaños en las distintas reacciones, esto permitía deducir el nucleótido en el que finalizaba cada banda dependiendo del tipo de ddNTP adicionado, con lo que era posible determinar la secuencia de la cadena molde.

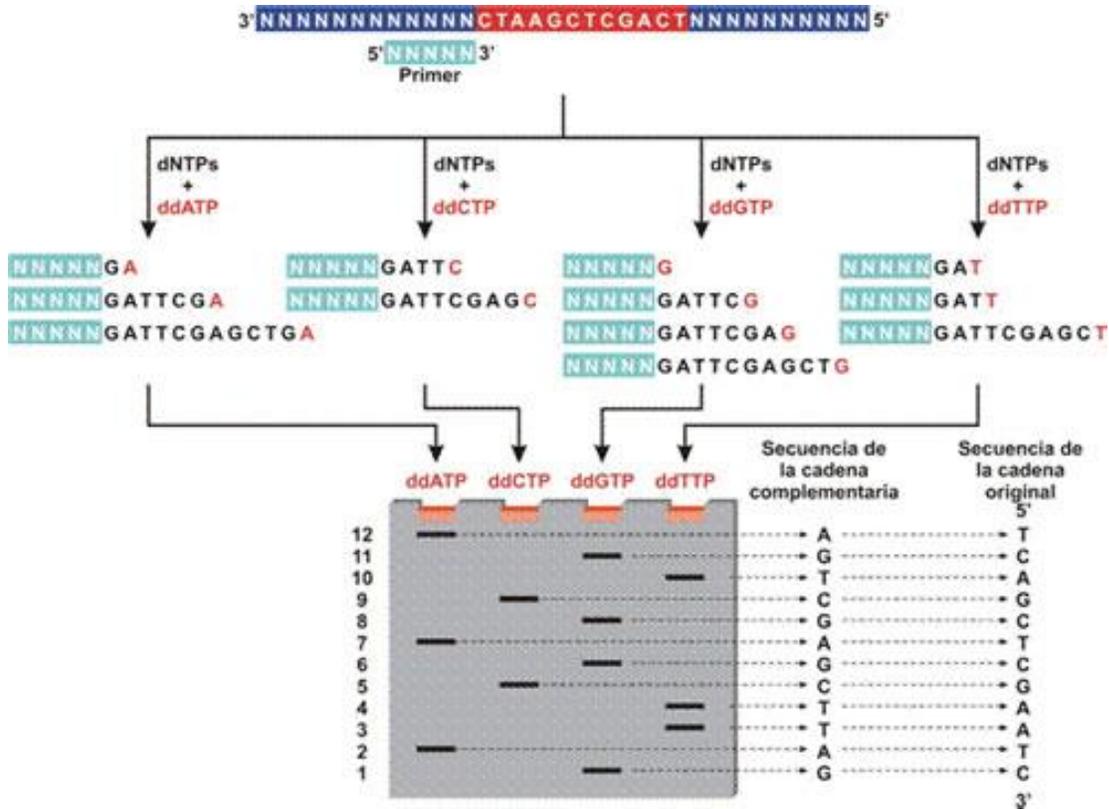


Figura 3. Esquema de la secuenciación por el método enzimático de terminación de cadena o Sanger (Cultek).

En un principio la secuenciación de Sanger usaba ddNTPs marcados radiactivamente, lo que lo volvía un método riesgoso para los investigadores. Posteriormente con el desarrollo tecnológico, los marcadores radiactivos fueron sustituidos por fluoróforos que contribuyeron de forma relevante a la seguridad del método, y a que las 4 reacciones pudieran hacerse en un solo tubo aprovechando las diferentes longitudes de onda de emisión de cada uno (Cervantes A. J., 2016).

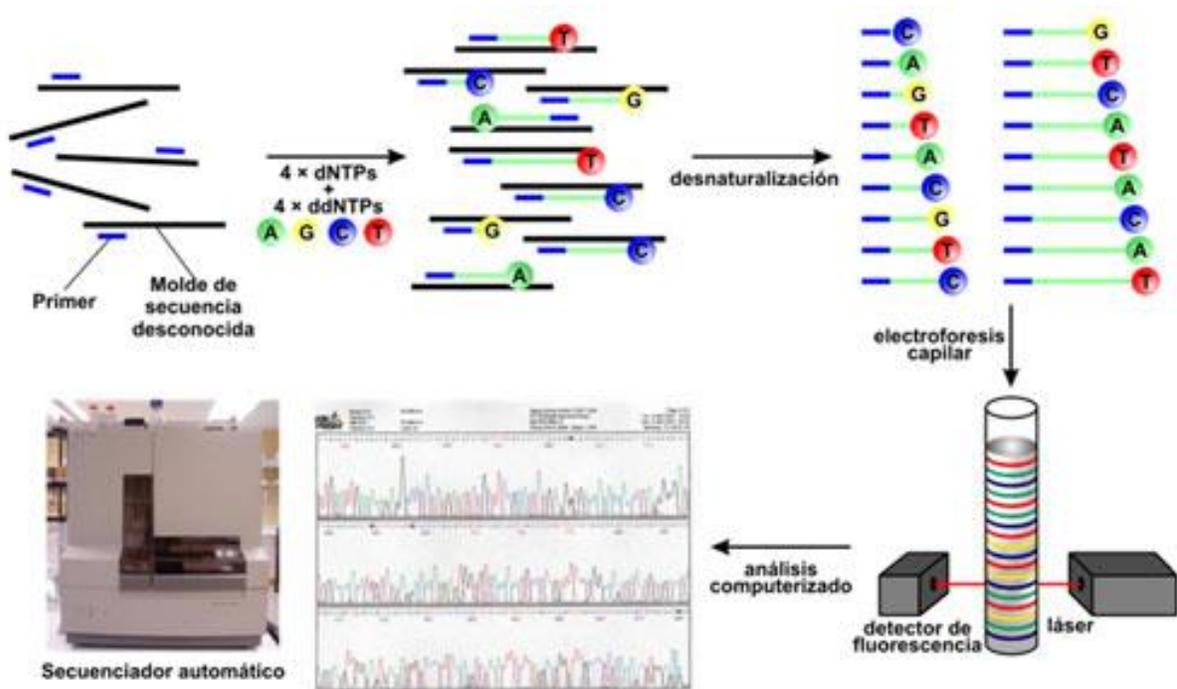


Figura 4. Esquema de la secuenciación por el método automático de electroforesis capilar (Cultek). Una vez que se tiene la secuencia, la última etapa es la comparación de la secuencia del ADNr 16S con las depositadas en las bases de datos. Finalmente, se puede construir un árbol filogenético, que refleja, de forma esquemática, el grado de parentesco entre las bacterias comparadas (Fig. 5) (Rodicio MR *et al.*, 2004).

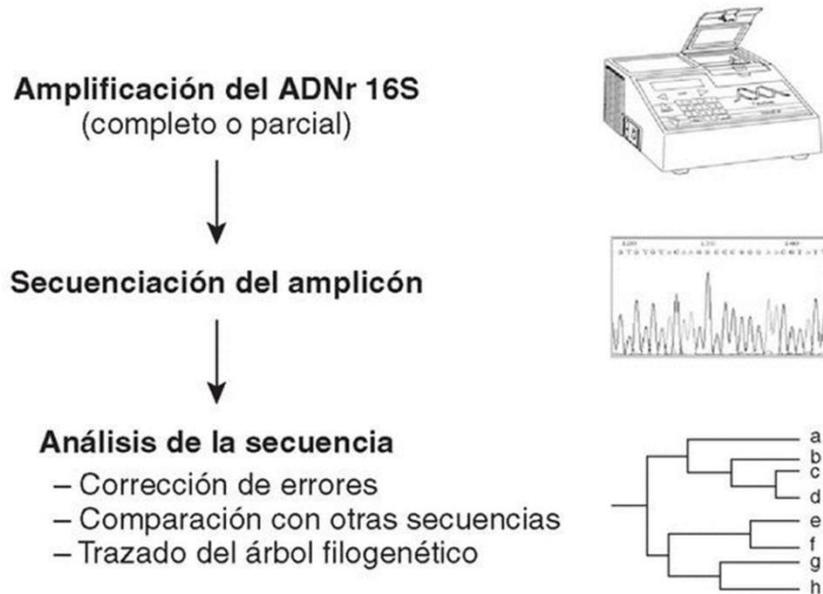


Figura 5. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S. Modificado de Rodicio MR *et al.*, 2004.

5.8 Bacterias endófitas

Se pueden definir como aquellos organismos que residen en tejidos de las plantas, principalmente espacios intercelulares, raramente en espacios intracelulares y dentro de tejidos vasculares sin causar síntomas de enfermedad en la planta (Pérez *et al.*, 2010).

Desde los primeros informes confiables sobre el aislamiento de bacterias endófitas de la superficie esterilizada de plantas (Samish y Dimant, 1959; Mundt y Hinkle, 1976), han sido reportados más de 200 géneros bacterianos de 16 Fila como endófitos. Éstos incluyen tanto bacterias cultivables como no cultivables pertenecientes a *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* y *Verrumicrobiae*. Sin embargo, los endófitos más predominantes y estudiados pertenecen a tres grandes Fila: *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Firmicutes* y miembros incluidos de *Azoarcus*, *Acetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* y *Streptomyces* (Malfanova *et al.*, 2013).

Tabla 3. Bacterias endófitas secuenciadas y mecanismo de acción beneficiosa. Modificado de Malfanova *et al.*, 2013.

Endófito	Fila	Planta de Origen	Mecanismo de acción beneficiosa
<i>Azoarcus</i> sp. BH72	β -Proteobacteria	Pasto Kallar	BNF y competencia por hierro
<i>Azospirillum</i> sp. B510	α -Proteobacteria	Arroz	Metabolismo ACC, BNF, ISR, producción de IAA y sideróforos
<i>Bacillus subtilis</i> BSn5	Firmicuta	Konjac	Antibiosis in vitro, producción de lipopéptidos y policétidos
<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN	β -Proteobacteria	Cebolla	Metabolismo ACC, producción de IAA y sideróforos.
<i>Enterobacter</i> sp. 638	γ -Proteobacteria	Álamo	Competencia por hierro, producción de antimicrobianos, IAA y sideróforos
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pa15	α -Proteobacteria	Caña de azúcar	Antibiosis, BNF, solubilización de fosfato y zinc, producción de GB e IAA
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	β -Proteobacteria	Sorgo	Metabolismo ACC, BNF, competencia por hierro, producción de IAA
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	γ -Proteobacteria	Maíz	BNF
<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	α -Proteobacteria	Álamo	Desconocido
<i>Pseudomonas putida</i> W619	γ -Proteobacteria	Álamo	Producción de IAA
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	γ -Proteobacteria	Arroz	BNF
<i>Serratia proteamaculans</i> 568	γ -Proteobacteria	Álamo	Producción de volátiles
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	γ -Proteobacteria	Álamo	Producción de antibióticos
<i>Variovorax paradoxus</i> S110	β -Proteobacteria	Álamo	Metabolismo ACC y competencia por hierro

ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxilato, BNF: Fijación de nitrógeno biológica, GB: Giberelina, IAA: ácido indolacético, ISR: Resistencia sistémica inducida.

Los endófitos pueden ser visualizados por hibridación fluorescente *in situ* en combinación con microscopía confocal de barrido por láser usando sondas específicas (Fig. 5)

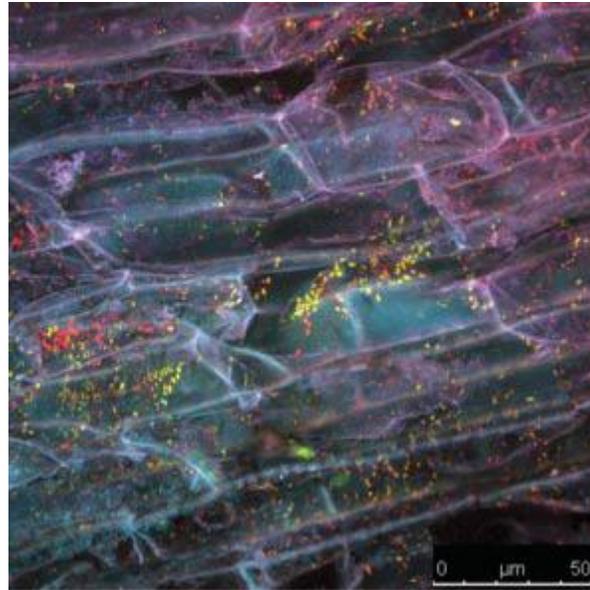


Figura 6. Localización de bacterias endófitas por hibridación fluorescente *in situ* en combinación con microscopía confocal de barrido por láser en células de la raíz de *L. perenne* por bacterias (rojo), α -Proteobacteria (rosado) y γ -Proteobacteria (amarillo) (Malfanova *et al.*, 2013).

5.8.1 Colonización de plantas por bacterias endófitas

Se han descrito diversas maneras por las cuáles las bacterias endófitas pueden obtener acceso al interior de la planta.

La colonización en el interior de las plantas generalmente empieza con el establecimiento de bacterias en la rizosfera. Después de la colonización de la rizosfera, las bacterias se adhieren a la superficie de la raíz. De acuerdo a Malfanova *et al.*, 2013 la unión de células bacterianas a la raíz es un paso crucial para el posterior establecimiento de endófitos, donde varios componentes de la superficie bacteriana pueden estar involucrados en este proceso.

5.8.2 Entrada bacteriana

Los sitios preferidos de la unión bacteriana y la posterior entrada son: La zona de la raíz apical con la capa de pared delgada de la superficie de la raíz, tales como la

zona de elongación celular y la zona de raíz de cabello (zona de penetración activa) y la zona de raíz basal con pequeñas grietas causadas por la aparición de raíces laterales (zona de penetración pasiva) (Fig. 6). En estos sitios, las bacterias son a menudo dispuestas en microcolonias que comprenden varios cientos de células. Para la penetración activa, las bacterias endófitas tienen que estar bien equipados con enzimas celulíticas que hidrolizan la pared de las células de la exodermis de las plantas (Malfanova *et al.*, 2013). Otros sitios de penetración pueden ocurrir por estomas o heridas en las plantas (Perez *et al.*, 2010).

Al entrar en una planta, a través de las grietas naturales (en la región donde aparecen las raíces laterales), las bacterias permanecen invisibles al sistema inmune de la planta (Malfanova *et al.*, 2013).

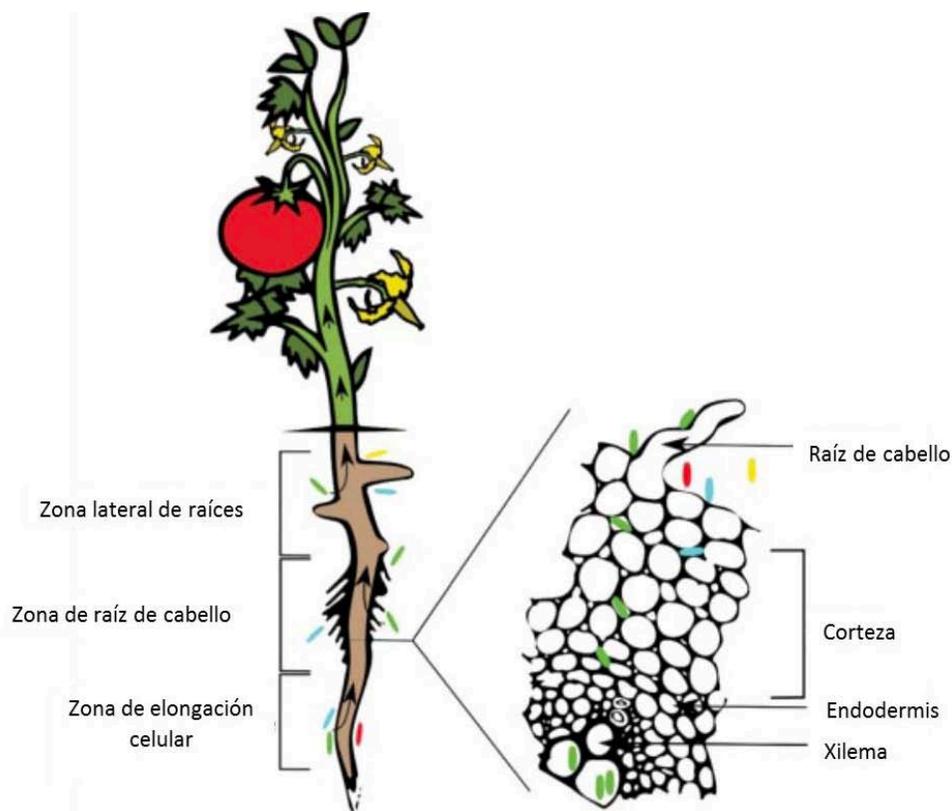


Figura 7. Principales rutas de establecimiento en la planta por bacterias endófitas. Las bacterias pueden entrar por varias zonas de la raíz como se indica. Los endófitos pueden o bien permanecer en sitio de entrada (indicados en azul) o moverse más profundo y ocupar el espacio intercelular de la corteza y vasos del xilema (indicados en verde). Rojo y amarillo las bacterias rizosféricas que no son capaces de colonizar los tejidos internos de la planta. Modificado de Malfanova *et al.*, 2013.

5.8.3 Bacterias endófitas en agaves

Recientemente en un estudio (Martínez-Rodríguez J C *et al.*, 2014) se extrajeron bacterias endófitas cultivables a partir de bases de las hojas de *Agave tequilana*. A través del análisis de secuencias de ADNr 16S, se confirmaron 11 bacterias endófitas: *Acinetobacter baumannii*, *A. bereziniae*, *Acinetobacter* sp., *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus* sp., *Enterobacter hormaechei*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas* sp., *Enterococcus casseliflavus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Gluconobacter oxydans*.

Los aislamientos fueron confirmados para ser bacterias promotoras del crecimiento vegetal por sus capacidades de fijación de nitrógeno, producción de auxinas, solubilización de fosfatos o antagonismo contra *Fusarium oxysporum* AC132.

Es importante destacar que este estudio es el único reporte de bacterias endófitas de agaves.

5.8.4 Importancia de las bacterias endófitas

Las bacterias endófitas pueden promover el crecimiento de las plantas, el rendimiento y pueden actuar como agentes de control biológico. Los endófitos también favorecen a su huésped mediante la producción de diversos productos naturales que podrían ser aprovechadas para su posible uso en la medicina, agricultura o la industria. Además, se ha demostrado que tienen el potencial para eliminar los contaminantes del suelo aumentando la fitorremediación y pueden desempeñar un papel en la fertilidad del suelo mediante la solubilización de fosfatos y la fijación de nitrógeno (Modificado de Ryan R P *et al.*, 2008).

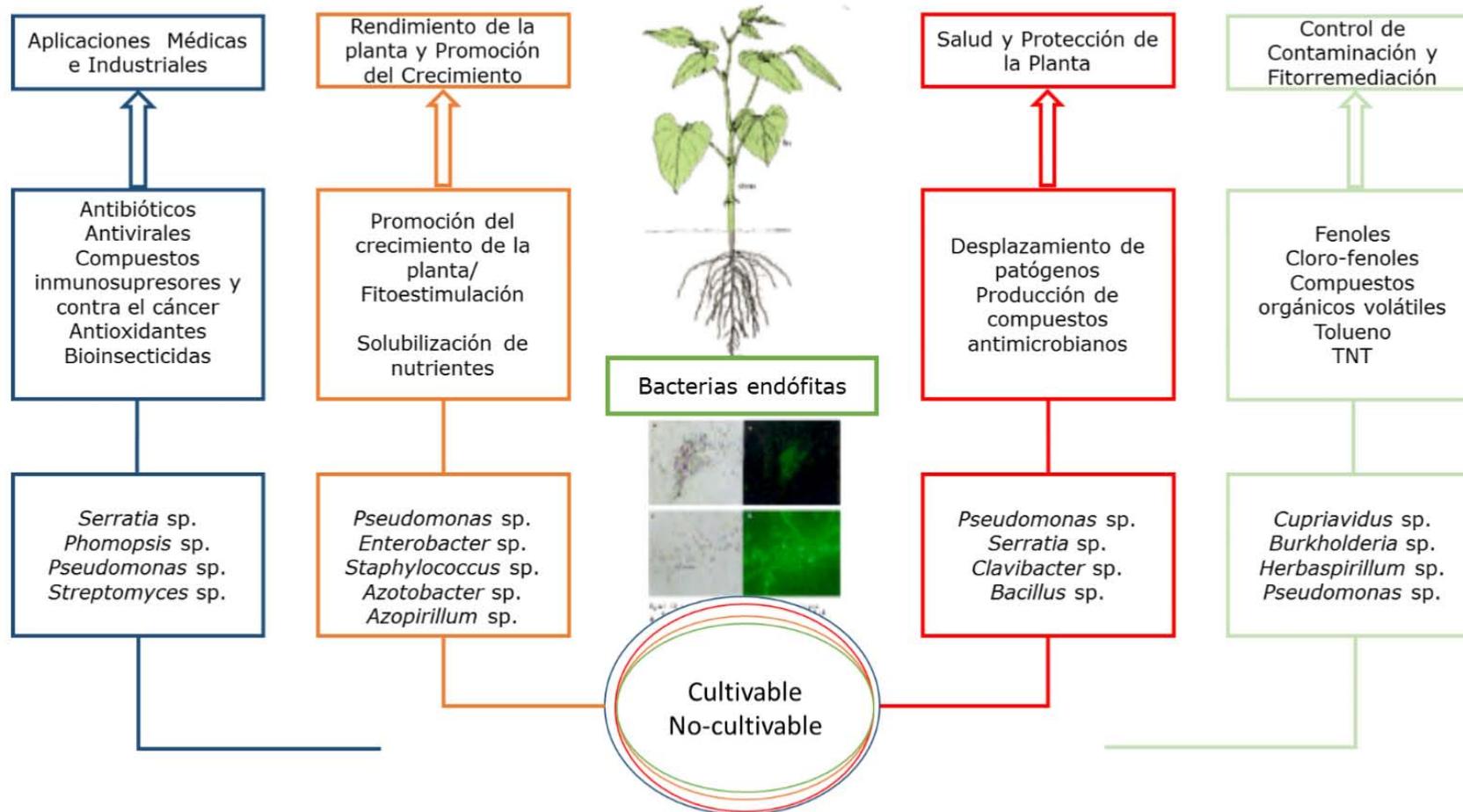


Figura 8. Diagrama de las diferentes interacciones planta-bacterias endófitas que han sido estudiadas y sus aplicaciones (Modificado de Ryan R P *et al.*, 2008).

Tabla 4. Productos naturales que han sido derivados o producidos de diversas bacterias endófitas (Modificado de Ryan R P *et al.*, 2008).

Organismo	Asociación de plantas	Agente activo	Actividad
<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	Taxol	Contra el cáncer
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Pasto	Ecomicinas B y C	Antimicrobiano
<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Kandelia candel</i>	Ácidos p-aminoacetofenónicos	Antimicrobiano
<i>Streptomyces</i> NRRL 30562	<i>Kennedia nigriscans</i>	Munumbicinas Munumbicinas D	Antibiótico Antimalárico
<i>Streptomyces</i> NRRL 30566	<i>Grevillea pteridifolia</i>	Kakadumicinas	Antibiótico
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Rhyncholacis penicillata</i>	Oocidina A	Antifúngico
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Trigo Pino Ejotes <i>Arabidopsis thaliana</i>	Fusaricidina A-D	Antifúngico
<i>Cytonaema</i> sp.	<i>Quercus</i> sp. 103	Ácidos citoconicos A y D	Antiviral
<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Monstera</i> sp.	Coronamicina	Antimalárico, antifúngico

6. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios han sido desarrollados para caracterizar la diversidad microbiana de muestras de aguamiel y pulque en nuestro grupo de investigación (Instituto de Biotecnología y Facultad de Química, UNAM); lo cual ha permitido proponer el papel de estos microorganismos durante el proceso de fermentación.

Desde esta perspectiva, el presente estudio tiene el siguiente planteamiento: ¿Es posible que las bacterias endófitas del maguey sean las mismas que se han detectado en el aguamiel? Y por lo tanto, que participen en el proceso de fermentación del pulque

7. HIPÓTESIS

Es posible que las bacterias endófitas del maguey sean las mismas que se han detectado en el aguamiel.

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo general

Realizar el estudio de la diversidad microbiana y genética de bacterias endófitas asociadas a una planta de maguey pulquero.

8.2 Objetivos particulares

Elaboración de la metodología para el cultivo de endófitos asociados naturalmente a la planta de maguey.

Extracción de ADN total de bacterias endófitas asociadas a la planta de maguey pulquero

Identificación de las bacterias endófitas por análisis de secuencias del ADNr16S

Conservación de las cepas a largo plazo para futuras investigaciones

9. METODOLOGÍA

En la figura 9 se muestra el diagrama de la metodología empleada para el aislamiento de microorganismos endófitos de la penca y la piña del maguey pulquero.

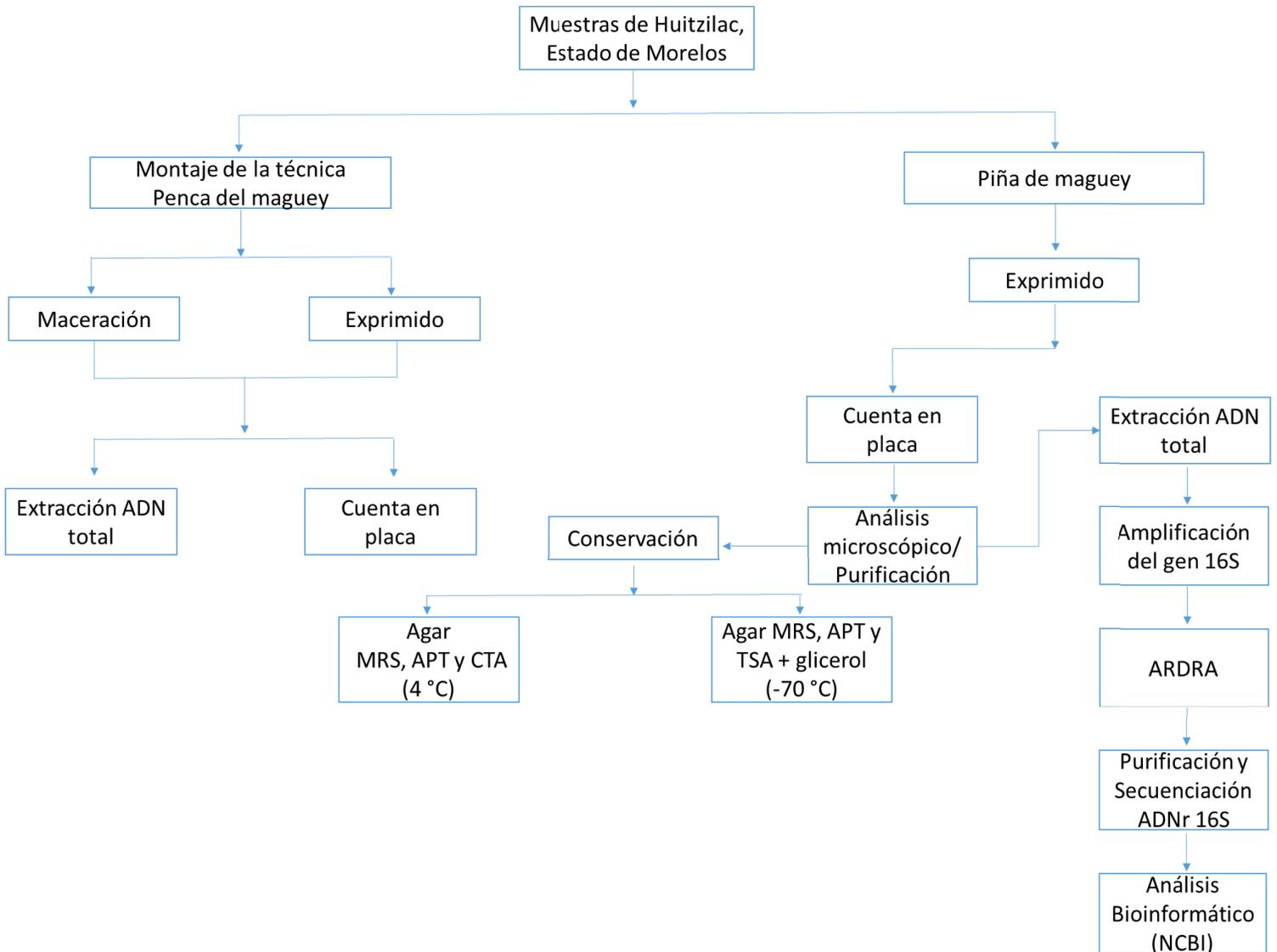


Figura 9. Metodología de la penca y piña del maguey pulquero.

9.1 Muestreo

Las pencas y la piña del maguey utilizadas para este estudio se obtuvieron de la población de Huitzilac en el Estado de Morelos. De la piña del maguey *Agave salmiana*, el productor realizó un raspado obteniendo la parte externa de dicha piña y la pulpa; las muestras fueron colocadas en bolsas estériles para su transporte al laboratorio. La edad aproximada del maguey era de 5 años.

9.2 Aislamiento de bacterias endófitas del maguey

Se probaron dos técnicas de extracción de microorganismos del tejido vegetal, una por maceración y otra por exprimido. Maceración: La superficie de las pencas utilizadas se limpió con solución salina estéril (SSI), aproximadamente 200 g de la penca se homogeneizaron con mortero y pistilo. Exprimido: Una muestra de 200 g se limpió con SSI y se utilizó un exprimidor de metal en condiciones estériles. A partir del jugo obtenido se depositó en tubos Falcon estériles de 50 mL, se centrifugó a 1000 rpm por 5 min y el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo estéril. Se centrifugó nuevamente a 5000 rpm por 2 min y se eliminó el sobrenadante. La biomasa obtenida se utilizó para realizar la extracción de ADN total y diluciones seriadas para determinar la cantidad de células (UFC/g) por cuenta en placa en medio medio selectivo Man Rogosa Sharpe (MRS), APT y Agar Soya Tripiticaseína (TSA).

La metodología de extracción de células con la penca se estandarizó para tenerla lista antes de realizar el muestreo durante el capado del maguey; esta estandarización se lleva a cabo debido a que no es fácil obtener la muestra de la piña ya que se tiene que esperar a la maduración del maguey para que se realice el proceso de castración.

9.3 Cuantificación de bacterias ácido lácticas y mesófilas aerobias

Se realizó por duplicado diluciones seriadas en SSI al 0.9 % (p/v) hasta 10^{-3} en el caso de las pencas y utilizando la piña del maguey (parte externa y pulpa) hasta 10^{-4} . Se inoculó 0.1 mL por extensión superficial en placa de agar, utilizando el medio selectivo Man Rogosa Sharpe (MRS), APT y Tripteína Soya Agar (TSA) con cicloheximida (0.5 µg/mL). Las placas fueron incubadas a una temperatura de 28°C por 24 h; al cabo de este tiempo se contaron las unidades formadoras de colonias.

9.4 Análisis microscópico

De las colonias resultantes en las distintas diluciones de la piña del maguey (parte externa y pulpa) en los respectivos medios (MRS, APT y TSA), se transfirieron por picadura las colonias en placas nuevas y se incubaron a 28°C por 24 h. Se consideró elegir aquellas colonias que no presentaran características típicas de levaduras: Coloración blanca a cremosa, brillantes. Pasado el tiempo de incubación mediante una tinción de Gram se realizó el análisis morfológico.

9.5 Purificación

La purificación de cepas se llevó a cabo en sus respectivas placas de MRS, APT y TSA con cicloheximida incubando a 28°C por 24 h; utilizando la técnica de estriado por agotamiento y se corroboró la pureza de la cepa observando el crecimiento en el medio y a través de la tinción de Gram.

9.6 Conservación de cepas

9.6.1 Conservación a mediano plazo

Las cepas microscópicamente observadas fueron conservadas por subcultivo en medio semisólido MRS y APT con 0.5 % de agar bacteriológico y trazas de carbonato de calcio (aproximadamente 0.1 g por tubo) para neutralizar el medio por la generación de acidez durante el almacenamiento. Las cepas aisladas de TSA

fueron conservadas en medio semisólido Cistina Tripteína Agar (CTA). Después de 24 h de incubación a 28°C, se almacenaron a 4°C para su conservación a mediano plazo.

9.6.2 Conservación a largo plazo

A partir de las cepas aisladas, se realizó un cultivo en 3 mL de sus respectivos medios (APT, MRS y TSA), durante 24 h de incubación a 28°C. Al cabo de éste tiempo, se colocaron en crioviales 500 µL del cultivo y 500 µL de solución de glicerol al 50 % m/v, se homogenizó y se congelaron a -70°C.

9.7 Identificación molecular por análisis de secuencias de ADNr 16S

9.7.1 Extracción de ADN total y electroforesis en gel de agarosa

Utilizando el sistema comercial UltraClean™ Microbial Isolation Kit (Mobio) y siguiendo las recomendaciones del proveedor se prosiguió a la extracción de ADN total de los microorganismos aislados (metodología detallada en el Anexo 1). La integridad del ADN se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, 100 V, en solución buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) y se utilizó el marcador de peso molecular O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder de la marca Fermentas®.

9.7.2 Amplificación del ADNr 16S por PCR

El ADN extraído para cada cepa fue utilizado como templado para la amplificación por PCR de sus respectivos ADNr 16S. Para la amplificación del ADNr 16S se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa recombinante (Fermentas) y los primers universales para eubacterias denominados como fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y rD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'). La mezcla de reacción se presenta en la tabla 5. Estos primers fueron utilizados por Weisburg *et al.*, 1991, para la

amplificación de genes ribosomales completos (1.5 kb) a partir de muestras de ADN de diferentes especies de bacterias.

Tabla 5. Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación del ADNr 16S

Mezcla de reacción		Condiciones de reacción		
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. Ciclos / etapa
Taq Buffer (10X)	5 µL	95	5	1/desnaturalización inicial
dNTP Mix (2mM)	1 µL	95	1	30 / amplificación
Primer fD1 (1µM)	0.6 µL	49	1	
Primer rD1 (1µM)	0.6 µL	72	1.5	
MgCl ₂ (2.5 mM)	5 µL	72	5	1/extensión final
Templado (ADN total)	1 µL			
Enzima Taq polimerasa (0.25 U/µL)	0.25 µL			
Agua	c.b.p. 50 µL			

Cantidad bastante para (c.b.p.)

Al término de la reacción, se analizaron 5 µL de cada reacción de amplificación por electroforesis como se describió anteriormente.

9.7.3 Análisis de Restricción de ADNr 16S Amplificado (ARDRA)

Esta técnica se utilizó para identificar aquellas colonias aisladas con un perfil de restricción único para ser secuenciada y obtener su identidad por comparación en la base de datos no redundante del National Center for Biotechnological Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

A partir del ADNr 16S amplificado se tomó como templado para en análisis por ARDRA. Para el análisis ARDRA se utilizó la enzima BsuRI (Thermo Scientific). La mezcla de reacción se presenta en la tabla 6. Una vez preparada la mezcla de reacción, se incubó durante 2 horas a 37°C y la digestión se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% como se describió previamente y se usó el marcador de peso molecular O'GeneRuler 100 pb DNA Ladder de la marca Fermentas®.

Tabla 6. Mezcla de reacción para análisis ARDRA

Producto de PCR (ADNr 16S)	5 μ L
Enzima Bsu RI	0.5 μ L
Buffer R (10X)	2 μ L
H ₂ O	12.5 μ L
Total	20 μ L

9.7.4 Purificación y Secuenciación del ADNr 16S

El producto de PCR fue purificado por medio del sistema comercial Pure Link™ PCR Purification Kit de Invitrogen (metodología detallada en el Anexo 3).

El ADNr 16S purificado se secuenció en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM mediante la técnica de Sanger. La mezcla de reacción a secuenciar consistió en: 14 o 15 μ L del producto de PCR (10 ng de templado por cada 100 pb de producto de PCR), 1 μ L de primer fD1 o rD1 (10 pmol) y 1 μ L de agua grado biología molecular para aforar a 16 μ L.

9.7.5 Análisis Bioinformático

Una vez obtenidas las secuencias fueron visualizadas en el programa FinchTV para llevar a cabo la depuración de zonas de baja calidad de las muestras y resolución de ambigüedades. Para obtener la identidad de cada secuencia, éstas se analizaron en la base de datos no redundante GenBank de NCBI (National Center of Biotechnological Information, sitio web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando la aplicación Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). La identidad de la secuencia se determinó de acuerdo al porcentaje de identidad y el valor de expectancia (E value). Con la finalidad de complementar los resultados de identidad obtenidos, se realizó un árbol filogenético (visualizado en el programa MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis, sitio web: <http://www.megasoftware.net/>) con el algoritmo Neighbor-joining, el modelo Jukes-Cantor y un análisis bootstrap de 1000 réplicas, en el que se incluyeron como referencia varias secuencias de ADNr 16S de microorganismos previamente depositados en la base de datos NCBI y la

secuencia completa del ADNr 16S de los aislados (alineadas en el programa Clustal W).

Para la identificación de cada secuencia, se basó en los porcentajes mencionados anteriormente cuyo significado es:

El valor E es un número dado por el alineamiento de manera al azar, por lo tanto, permite definir que alineamientos se quieren obtener de acuerdo a su significado estadístico. Un valor bajo o cercano a cero de E implica una mayor similitud estadística entre una secuencia y otra, mientras que un valor más grande de E indica menos probabilidad de homología o identidad entre una secuencia y otra. El valor de cobertura (Query Cover, QC) indica que porcentaje de la secuencia de consulta está alineado.

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Estandarización de la metodología

10.1.1 Cuantificación de bacterias ácido lácticas y mesófilas aerobias

Como se mencionó en la metodología, se realizó la cuantificación de bacterias ácido lácticas y mesófilas aerobias en la penca y piña de maguey, utilizando los medios MRS, APT y TSA.

En la cuantificación microbiana de la penca de maguey, se observa en la tabla 7 mayor UFC/g tejido de bacterias endófitas cultivables en el origen de la penca en comparación con el corte lejano al origen de la penca; esto sugiere que, al ir avanzando a lo largo de la penca se obtendrán una menor cantidad de microorganismos endófitos.

Medio	UFC/g tejido (Origen de la penca)	UFC/g tejido (Superior al origen de la penca)
MRS	31×10^3	42×10^2
APT	45×10^3	36×10^2
TSA	27×10^3	32×10^2

De acuerdo al resultado anterior se decidió trabajar con la parte de la penca de maguey cercana al origen para la extracción de ADN total.

10.1.2 Extracción de ADN total

A partir de la técnica de maceración y expresión de la penca de maguey como lo indica la metodología, se procedió a la extracción de ADN total bacteriano (Fig 9), donde se observó una banda íntegra, indicativo de que el ADN no se encuentra degradado y por encima del peso más alto del marcador (10 Kb); a pesar que las bandas se ven muy tenues o apenas visibles en algunos casos, resultó más eficiente la técnica de exprimido con el kit PowerFood™ Microbial Isolation que la maceración (resultados no mostrados).

Con base en estos resultados se logró el montaje de la técnica para su aplicación en la piña del maguey, utilizando la técnica por exprimido y el kit PowerFood™ Microbial Isolation.

En la extracción de ADN total bacteriano de la piña de maguey, se observaron las bandas obtenidas por encima de 10 Kb después de la electroforesis en gel de agarosa al 1%, indicando la correcta extracción de ADN (resultados no mostrados).

10.2 Aislamiento de bacterias endófitas aisladas de la piña del maguey

10.2.1 Cuantificación de bacterias ácido lácticas y mesófilas aerobias

Respecto a las UFC/g tejido de bacterias endófitas cultivables en la piña del maguey se reportó como valor estimado (v.e.) debido a que se excedió del rango que podría considerarse estadísticamente representativo para el conteo (25-250 mesófilos aerobios y 30-300 bacterias lácticas). A partir de los resultados del conteo, se observó que el número de bacterias en la pulpa es mayor comparando con la parte externa de la piña (Tabla 8); estos resultados sugieren que la pulpa al ser el sitio donde se producirá el aguamiel va a presentar una mayor cantidad de microorganismos endófitos.

Tabla 8. Cuenta en placa de bacterias ácido lácticas y mesófilas aerobias en la piña de maguey		
Medio	UFC/g tejido (Pulpa)	UFC/g tejido (Parte externa)
MRS	91 x 10 ⁵ (v.e.)	41 x 10 ³
APT	22 x 10 ⁶ (v.e.)	29 x 10 ³
TSA	20 x 10 ⁵ (v.e.)	80 x 10 ⁴

10.2.2 Análisis microscópico

Para la evaluación de la morfología por microscopía de los microorganismos obtenidos a partir de las colonias seleccionadas de la piña del maguey en las placas MRS, APT y TSA se realizó una tinción de Gram. Se analizaron en promedio 133 colonias, observándose un gran número de levaduras, cocos, cocos agrupados en diplococos, cocobacilos, bacilos cortos y largos (Fig. 10). La mayoría de las colonias no estaban totalmente puras por lo que se procedió al estriado por agotamiento para verificar la pureza y al análisis microscópico nuevamente. De estas colonias se obtuvo un número final de 98 colonias con las que se continuó trabajando.

En el anexo 4 se muestran de forma agrupada los resultados obtenidos de las 98 cepas, así como las características distintivas desarrolladas en sus respectivos medios (MRS, APT y TSA).

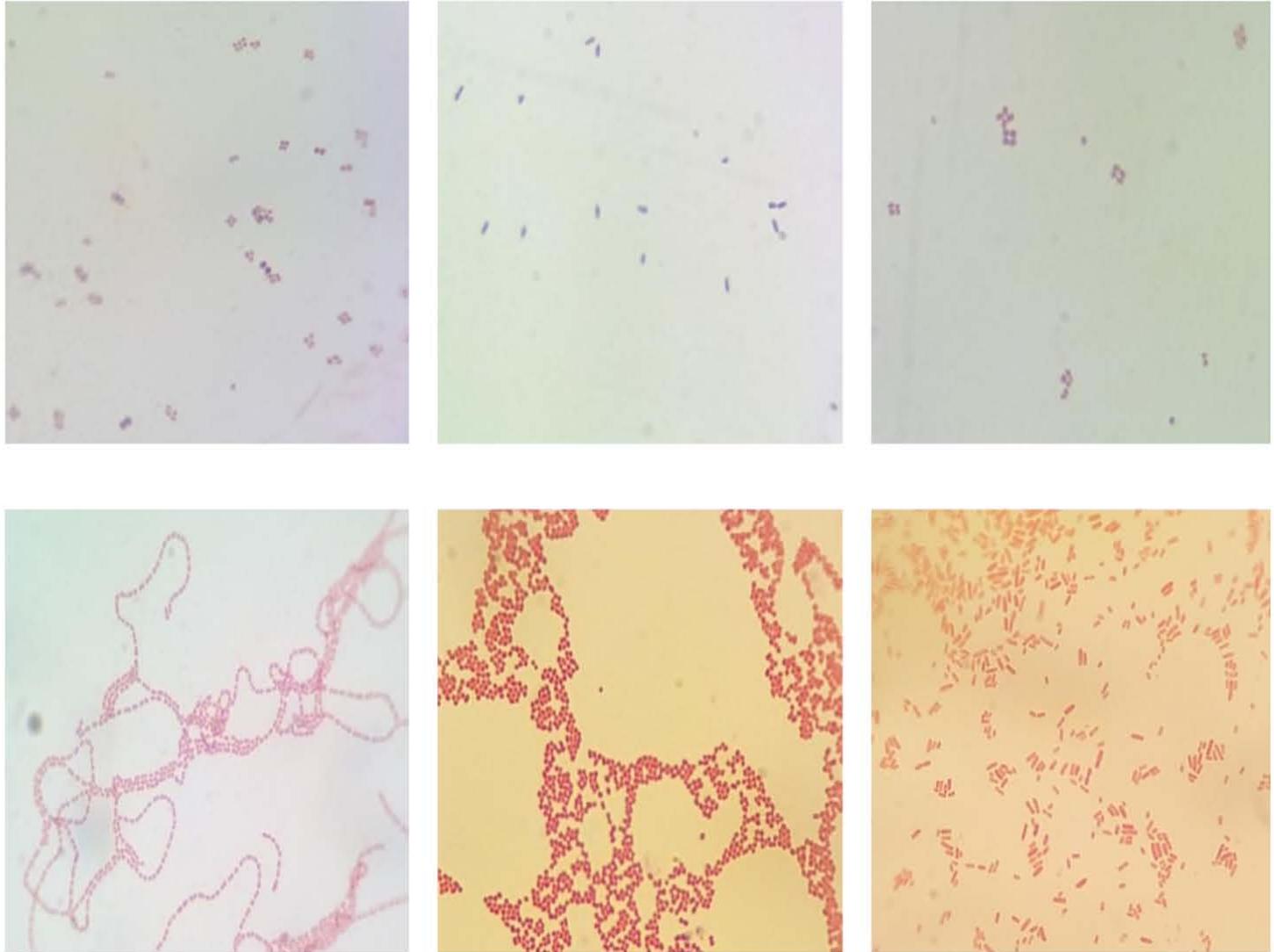


Figura 10. Tinción de Gram de algunas colonias seleccionadas a partir de las placas MRS, APT y TSA, incubadas a 28°C por 24 h. Aumento total: 1000 X

10.2.3 Identificación molecular por análisis de secuencias de ADNr 16S de endófitos de la piña de agave

10.2.3.1 Extracción de ADN total y electroforesis en gel de agarosa

En la extracción de ADN total bacteriano de la piña de maguey, se observaron las bandas obtenidas por encima de 10 Kb después de la electroforesis en gel de agarosa al 1%, indicando la correcta extracción de ADN (resultados no mostrados).

A partir de las cepas aisladas, se verificó la extracción de ADN total y evaluó la integridad del mismo con la electroforesis en gel de agarosa, obteniéndose bandas por encima de 10 Kb (Fig. 11).



Figura 11. Electroforesis de ADN total extraído de las cepas aisladas. Gel de agarosa 1% con bromuro de etidio 0.04%, 100 V. (M) Marcador de peso molecular (O'GeneRuler 1 Kb DNA Ladder, Fermentas®), (1) P5, (2) P6, (3) P7, (4) P9, (5) P11, (6) P13 y (7) P17 (Cepas aisladas del medio TSA). Sólo se muestra la extracción del ADN de algunas cepas con fines ilustrativos.

10.2.3.2 Amplificación del ADNr 16S por PCR

Para el análisis de la amplificación del gen ADNr 16S, se realizó al igual que la extracción de ADN total una electroforesis en gel de agarosa (Fig. 12).



Figura 12. Amplificación del gen ADNr 16S de las cepas aisladas. Gel de agarosa 1% con bromuro de etidio 0.04%, 100 V. (M) Marcador de peso molecular (O'GeneRuler 1 Kb DNA Ladder, Fermentas®), (1) P5, (2) P7, (3) P11, (4) P12, (5) P13, (6) P16, (7) P21, (8) P23, (9) P24, (10) P25, (11) P28 y (12) P29 (Cepas aisladas del medio APT). Sólo se muestra la amplificación del gen ADNr 16S de algunas cepas con fines ilustrativos.

Se observó que la cantidad de ADN total obtenida fue suficiente para llevar a cabo la amplificación del gen ADNr 16S. En el gel, se observaron fragmentos de 1.5 Kb, lo que demuestra la correcta amplificación del producto de PCR con los primers fD1 y rD1 (Weisburg *et al.*, 1991).

10.2.3.3 Análisis de Restricción de ADNr 16S Amplificado (ARDRA)

La caracterización por ARDRA del ADNr 16S fue desarrollada en todas las cepas aisladas de la piña de maguey. Se obtuvieron 17 patrones de restricción diferentes después de la digestión enzimática con BsuRI del gen ADNr 16S (Fig. 13). En la Fig. 12 sólo se muestran 13 patrones de restricción debido a que no se pudo obtener la secuencia de 4 aislados.

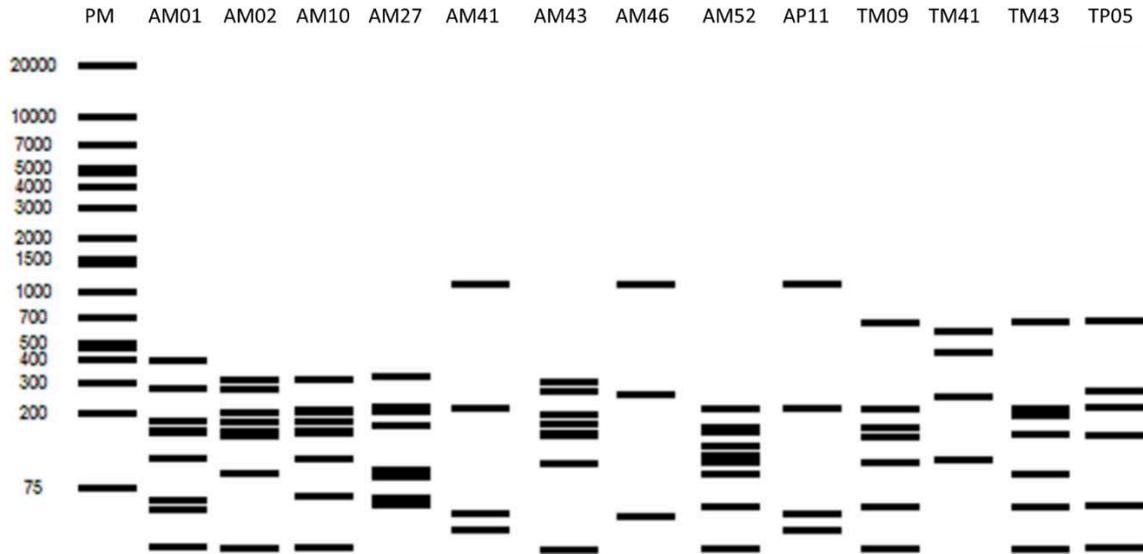


Figura 13. Representación esquemática de la digestión enzimática con BsuRI del gen ADNr 16S de las cepas aisladas de la piña de maguey.

Corte virtual realizado en el programa Serial Cloner empleando la secuencia del ADNr 16S obtenida para cada aislado.

(PM) Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 kb Plus, Fermentas®). En la parte superior de cada carril se indica el nombre de la cepa correspondiente.

Así mismo, se incluye en la tabla 9 una recopilación de los perfiles ARDRA únicos con aquellos aislados que poseen el mismo perfil ARDRA.

Tabla 9. Tipos únicos ARDRA

Tipo único ARDRA	Cepas con el mismo perfil ARDRA
AM01	AM01 _C , AM08, AM21 _B , AM38, AM38 _B , TP01
AM02	AM11, AM14, AM21, AM26, AM26 _B , AM28, AM29, AM36, AM36 _B , AM37, AM39, AM40
AM10	AM20, AM20 _B , AM20 _C , AP05, TP11
AM27	AP07, AP13, AP2, AP23, TM20 _B , TM33 _B
AM41	MM12, MM16, MM17, MM17 _B , MM18, MP02, MP22, MP26, MP28, MP30, AM01 _B , AM44, AP01, AP06, AP08
AM43 _B	AM07, AM43, AP12, AP16, AP24, AP28, AP29, TM01, TM06, TM15, TM20, TM24 _B , TM25 _B , TM47 _B , TM48 _B , TM52 _B , TP03, TP17, TP23
AM46	MM03, MM15, MM42, MM45, TM56 _B , TP07, TP18
AM52	Perfil único
AP11	AP25
TM09	TM05, TM34, TM07 _B , TM21 _B , TM34 _B , TM49 _B , TM51 _B , TP06, TP09, TP13
TM41	Perfil único
TM43	Perfil único
TP05	Perfil único

10.2.3.4 Purificación del producto de PCR para el gen ADNr 16S

A partir de los 13 patrones de restricción distintos, se utilizó el producto de PCR de las 13 cepas aisladas; lo cual tiene como objetivo eliminar las impurezas que se encuentran después de la reacción por PCR, como son restos de MgCl₂, dNTP's, Taq polimerasa, primers, los cuales pudieran interferir en la reacción de secuenciación.

La purificación se verificó con una electroforesis en gel de agarosa al 1%, observándose una banda nítida en el peso molecular esperado de 1.5 kb y la ausencia de otras bandas, que indican presencia de productos inespecíficos (resultados no mostrados).

10.2.3.5 Análisis de secuencias de ADNr 16S

Como se indicó en la metodología, se realizó una comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos del GeneBank, haciendo uso del programa BLAST para determinar la identidad de cada una.

La identidad seleccionada para cada cepa aislada se determinó en base al mayor porcentaje de identidad mostrado en la base de datos del GeneBank, este porcentaje indica que todas las bases analizadas corresponden a la identidad del microorganismo depositado en la base de datos (Tabla 10).

Tabla 10. Identificación Molecular de endófitos de la piña del maguey. ^aBasado en los perfiles ARDRA de los 13 tipos ARDRA únicos.

Clave aislado	Frecuencia ^a (%)	Identidad	Identidad (%)	Valor E	QC (%)	No. acceso
AM01	7.1	<i>Pantoea agglomerans</i> cepa NSF	96	0.0	99	KT075171.1
AM02	13.3	Sin identidad asignada				
AM10	6.1	<i>Raoultella terrigena</i> cepa NBRC 14941	99	0.0	99	KJ719057.1
AM27	7.1	<i>Acinetobacter genomosp. 28</i> cepa ANC 4149	99	0.0	100	KX014586.1
AM41	16.3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa CTBRBL226	99	0.0	100	JX426116.1
AM43 _B	20.4	Sin identidad asignada				
AM46	8.2	<i>Leuconostoc citreum</i> cepa JCM 9698	99	0.0	100	LC096222.1
AM52	1.0	<i>Erwinia billingiae</i> cepa LMG 2613	98	0.0	97	NR_118431.1
AP11	2.0	<i>Leuconostoc rapi</i> cepa LMG 27676	98	0.0	100	NR_136799.1
TM09	11.2	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> cepa R2SsM1P1C15	99	0.0	99	KF147111.1
TM41	1.0	<i>Bacillus pumilus</i> cepa IHBB 9209	99	0.0	99	KR085783.1
TM43	1.0	<i>Pseudomonas sp.</i> BCRC 80328	92	0.0	93	JQ361087.1
TP05	1.0	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain PC33	96	0.0	98	DQ178231.1

La identidad de los aislados fue corroborada de acuerdo a la posición de las secuencias en el árbol filogenético (Fig. 14). La agrupación observada en el árbol de las secuencias de aislados y de las referencias utilizadas, permitió confirmar los resultados arrojados en el programa BLAST; la posición de las secuencias de referencia, así como el grupo externo y los valores de bootstrap generaron robustez al análisis.

Para el aislado AM02 no se le pudo asignar una identidad a partir de los resultados del análisis de la secuencia del ADNr 16S, ya que si bien el resultado de identidad más cercana por BLAST correspondió a secuencias de ADNr 16S de diversas especies de *Hafnia*, el análisis en la Base de Datos Ribosomales (Aplicación Sequence Match, <https://rdp.cme.msu.edu>), arrojó una identidad cercana a secuencias de ADNr del género *Erwinia*. Con la finalidad de corroborar este resultado se construyó un árbol filogenético incluyendo secuencias de ADNr 16S de

referencia tanto de *Hafnia* como de *Erwinia* (Fig. 15) observándose que el aislado AM02 se ubica como un grupo aparte de los formados por las secuencias de referencia.

Para el aislado AM43_B no se pudo resolver tampoco su identidad ya que si bien los resultados del análisis en la aplicación BLAST mostraron que la identidad de esta secuencia (99 %) correspondió tanto a *Rahnella* sp. y *Serratia* sp. En este caso la construcción de un árbol filogenético con secuencias de referencias de estos microorganismos no permitió confirmar la identidad del aislado (Fig. 14, recuadro azul fuerte).

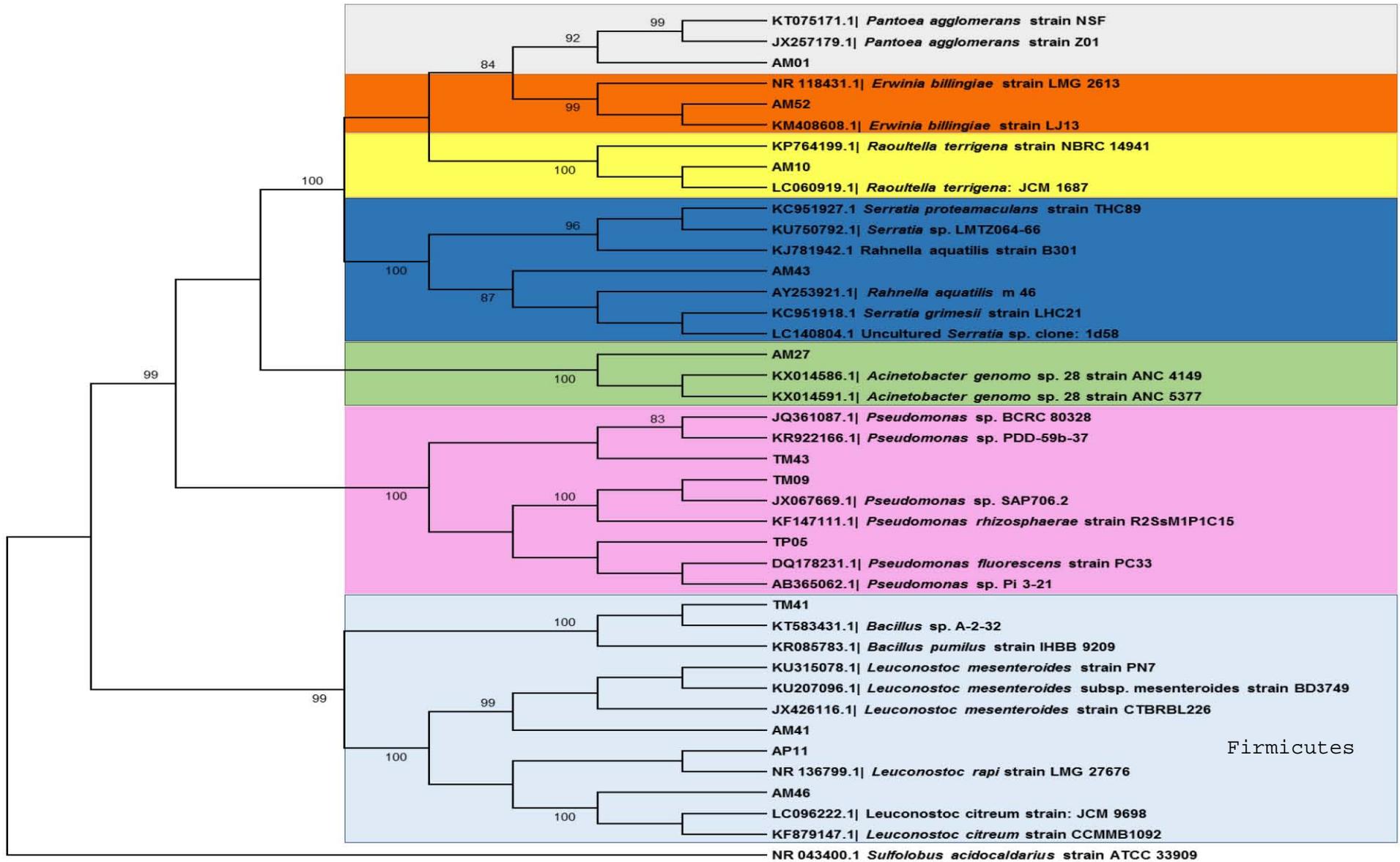


Figura 14. Árbol filogenético elaborado por Neighbor-Joining de los aislados únicos detectados en la piña del maguey y bacterias de referencia obtenidas en la base de datos del NCBI y *Sulfolobus acidocaldarius* utilizada como grupo externo. En las ramas se muestran los valores del análisis bootstrap mayores a 80.

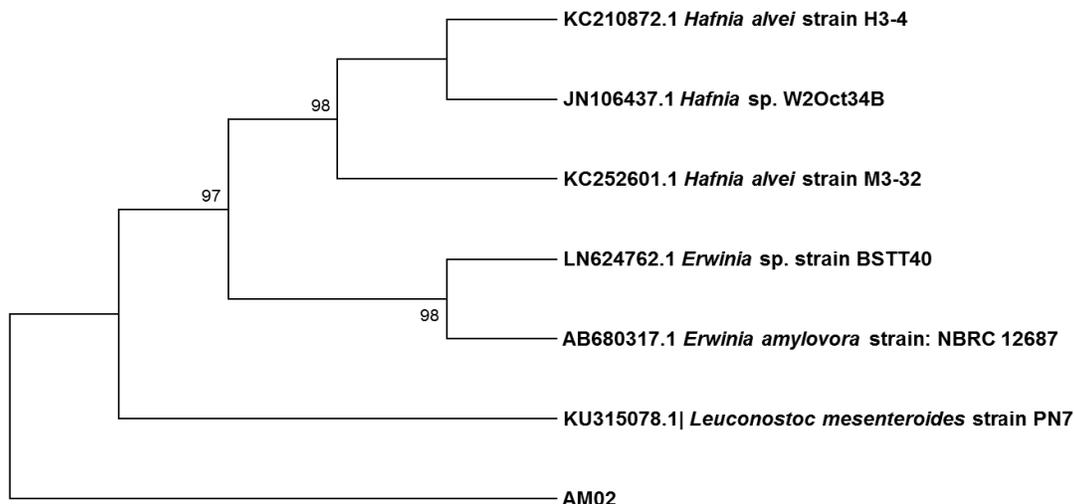


Figura 15. Árbol filogenético elaborado por Neighbor-Joining del aislado AM02 detectado en la piña del maguey y bacterias de referencia obtenidas en la base de datos del NCBI y *Leuconostoc mesenteroides* utilizada como grupo externo. En las ramas se muestran los valores del análisis bootstrap mayores a 80.

En el grupo del Dr. Escalante se han realizado diversos estudios para caracterizar la diversidad microbiana de muestras de aguamiel y pulque. La diversidad microbiana identificada en aguamiel fue compuesta principalmente por BAL, incluyendo a *Leuconostoc mesenteroides*, *L. citreum* y *L. kimchi*; las γ -Proteobacteria *Erwinia rapontici*, *Enterobacter* sp. y *Acitenobacter radioresistens* fueron las segundas más abundantes detectadas en muestras de aguamiel (Escalante A *et al.*, 2016). Así como *Hafnia alvei* ya había sido detectado anteriormente en muestras de pulque (Escalante A *et al.*, 2004).

De acuerdo a estos estudios realizados en aguamiel y los realizados en este trabajo, se puede determinar el origen de estos microorganismos (*Leuconostoc mesenteroides* y *L. citreum*), es decir, se encuentran en la piña del maguey y no provienen de otro origen. *L. rafi* ha sido reportado como un aislado de la solución de salmuera utilizada en la producción de productos sunki, una salmuera japonesa tradicional.

También como lo menciona Escalante A *et al.*, 2008, las γ -Proteobacterias aisladas en la piña del maguey (*Raoultella terrigena*, *Acinetobacter genomosporum* sp., *Erwinia billingiae*, *Pseudomonas* sp. y *Pantoea agglomerans*) son microorganismos de

distribución natural en ambientes diversos tales como agua dulce, suelo y superficies vegetales, algunas de ellas también se consideran patógenos humanos oportunistas; es posible suponer que estas bacterias contaminantes de área se incorporan a la piña, durante la acumulación de la savia, o contaminantes durante el procedimiento de raspado para tomar muestras de la piña.

Bacillus pumilus reside en suelos y algunos colonizan en el área de raíz de algunas plantas donde *B. pumilus* tiene actividad antibacteriana y antifúngica.

En conjunto, estos resultados sugieren que la diversidad microbiana del aguamiel, principalmente BAL, corresponden a las identificadas en la piña del maguey pulquero (*Agave salmiana*).

11 CONCLUSIONES

- Se estandarizó una técnica que permitió de forma exitosa el aislamiento de bacterias endófitas de la piña de un maguey pulquero (*Agave salmiana*), durante el proceso de capado.
- Se logró la tipificación por la técnica de ARDRA de una colección de 98 bacterias endófitas aisladas de una planta de maguey pulquero (*Agave salmiana*), identificadas como: *Pantoea agglomerans*, *Raoultella terrigena*, *Acinetobacter genomus* sp., *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Erwinia billingiae*, *Leuconostoc rapi*, *Pseudomonas rhizosphaerae*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas* sp. y *Pseudomonas fluorescens*.
- Se logró determinar el origen de los microorganismos: *Leuconostoc mesenteroides* y *L. citreum* presentes en el aguamiel y durante la fermentación del pulque, al igual que las γ -Proteobacterias aisladas en el presente trabajo.
- El presente estudio es el primer reporte de aislamiento de bacterias endófitas del maguey pulquero (*Agave salmiana*) de la localidad de Huitzilac, Morelos.

12 PERSPECTIVAS

- A partir del ADN total bacteriano total que se obtuvo de la piña del maguey, realizar la identificación de la comunidad de bacterias endófitas no cultivables.
- Realizar la identificación de bacterias endófitas con distintos magueyes pulqueros (diferentes regiones geográficas).
- Identificar los 4 aislados que no se pudo obtener su secuencia de ADNr 16S por una técnica alternativa como MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer).
- Amplificar una región del operón 16S más amplia para los aislados que no se pudo asignar una identidad (AM02 y AM43B) o bien, utilizar la técnica alternativa de MALDI-TOF MS.

13 REFERENCIAS

- Ahmad I, Ahmad F y Pichtel J. 2011. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*. Springer, pp 37.
- Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto J A y Valdezate S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Bioanálisis*, pp 22-34.
- Cervantes A J. 2016. Caracterización de los segmentos únicos de Citomegalovirus Humano (HCMV) y Herpesvirus Humano 6 (HHV6) en personas con VIH por secuenciación de siguiente generación. [Tesis de Maestría]. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en Tesiunam: www.dgbiblio.unam.mx/index.php/catalogos.
- Clarridge J E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology* 17: 840-862.
- Cultek. [En línea]. Disponible en <http://www.cultek.com/index.asp> [Último acceso: 2017 Enero 08].
- Escalante A, Giles-Gómez M, Hernández G, Córdova-Aguilar MS, López-Munguía A, Gosset G, Bolívar F. 2008. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 124:126–34
- Escalante A, López D, Velázquez J, Giles-Gómez M, Bolívar F, López-Munguía A. 2016. Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. *Front. Microbiol.* 7:1026.
- Escalante A, Rodríguez ME, Martínez A, López-Munguía A, Bolívar F, Gosset G. 2004. Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 235:273–9.
- Flores A, Escovedo R, Aguilar L. 2008. Evaluación fisicoquímica del aguamiel de tres variedades de maguey pulquero. *Revista Salud Pública y Nutrición*.
- Frakuddin M y Mannan K S B. 2013. Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. *Journal of Science* 42: 19-33.
- Giovannoni S J, Britschgi T B, Moyer C L y Field K G. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345, 60-63.

García-Garibay M y López Munguía A. 1993. Bebidas alcohólicas no destiladas. En: García-Garibay M, Quintero-Ramírez R y López Munguía, A. (Eds). Biotecnología Alimentaria. Limusa. México D.F. pp 263-311.

García J A. 2012. México país de magueyes. La Jornada del campo: 53. Jardín Botánico, Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.

García P, Allende F, Legarraga P, Huilcaman M y Solari S. 2012. Bacterial identification based on protein mass spectrometry: A new insight at the microbiology of the 21st century. Rev Chilena Infectol 29: 263-272.

Lappe-Oliveras P, Moreno-Terrazas R, Arrizon-Gaviño J, Herrera-Suárez T, García-Mendoza A, Gschaedler-Mathis A. 2008. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic non distilled and distilled Agave beverages. FEMS Yeast Res. 8:1037-52

Loyola M. 1956. Cultivo y explotación del maguey. En: La industria del pulque, Banco de México, S.A. Departamento de Investigaciones Industriales. México D.F. pp 10-20

Martínez-Rodríguez J, Mora-Atumio M, Plascencia-Correa L, Audelo-Regalado E, Guardado RF, Hernández SE, Peña RY, Escalante A, Beltran GM, Ogura T. 2014. Cultivable endophytic bacteria from leaf bases of *Agave tequilana* and their role as plant growth promoters. Brazilian Journal of Microbiology. 45:1333-1339.

Matus V. 2011. Caracterización de la capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas del pulque. [Tesis de Licenciatura]. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en Tesiunam: www.dgbiblio.unam.mx/index.php/catalogos.

Melfanova N, Lugtenberg B y Berg G. 2013. Bacterial Endophytes: Who and Where, and What Are They Doing There? Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere, Volume 1, First Edition: 393-403.

Metzker M. 2010. Sequencing technologies the next generation. Nature: 31-46.

Nava B O. 2014. Diversidad genética de maguey pulquero (*Agave salmiana* y *A. mapisada Trel.*) y uso de tecnologías agroecológicas. [Tesis de Maestría]. Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Navrátilová L, Procházková P, Bardoň J, Novotný R, Zápalka M, Jakubec P, Zatloukal J, Kolek V, Kopřiva F, Flodrová P, Raclavský V. 2016. Performance of pyrosequencing versus MALDI-TOF MS in bacteria identification in chronic lung disease. J Biol Methods 3:e52

Oleñka A, 2010. Identificación de cepas de bacterias lácticas por criterios fenotípicos y análisis de secuencias del gen ADN ribosomal 16S. [Tesis de Licenciatura].

México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en [Tesiunam: www.dgbiblio.unam.mx/index.php/catalogos](http://www.dgbiblio.unam.mx/index.php/catalogos).

Pérez A, Rojas J, Fuentes J. 2010. Endophytes diversity of bacteria associated with roots of Colosuana (*Bothriochloa pertusa*) Pasture in Three Locations of Sucre Department, Colombia. *Acta biol. Colomb.*, Vol. 15:219 – 228.

Ryan R P, Germaine K, Franks A, Ryan D J y Dowling D N. 2008. Bacterial endophytes: Recent developments and applications. *FEMS Microbiol Lett* 278 1-9

Rocio M, Mendoza M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22: 238-245.

Rodicio MR y Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22:238-45

Salazar O C. 2004. Memoria gráfica de la historia del pulque en México. [Tesis de Licenciatura]. Departamento de diseño gráfico, Universidad de las Américas de Puebla Cholula, Puebla.

Sánchez-Marroquín A, Hope PH. 1953. Agave juice. Fermentation and chemical composition of some species. *Agric Food Chem*1:246–9.

Sánchez-Marroquín A, Terán J, Piso J. 1957. Estudios sobre la microbiología del pulque. XVIII. *Rev Soc Quim Mex*1:167–74.

Tortoli E. (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* 16: 319–354.

Vibha B, Neelman G. 2012. Importance of Exploration of Microbial Biodiversity. *ISCA Journal of Biological Sciences* 1: 78-83.

14 ANEXOS

Anexo 1

Obtención de ADN total por el método de kit comercial Ultra Clean®

Se realizó la extracción de ADN total de cada una de las cepas, utilizando el kit comercial Ultra Clean® Microbial DNA Isolation, MoBio Lab Inc. A continuación se describe la metodología proporcionada por el proveedor. Todos los materiales y reactivos están incluidos en el kit.

1. En un microtubo de colecta de 2 mL poner 1.8 mL del cultivo en estudio y centrifugar a 10 000 x g por 30 segundos, a temperatura ambiente y remover el sobrenadante con una punta de micropipeta.
2. Resuspender el pellet celular en 300 µL de la solución “Microbead solution” y mezclar mediante vórtex ligero. Transferir las células resuspendidas a un tubo “Microbead tube”. *(La solución contiene un buffer y sales para estabilizar y dispersar homogéneamente la célula microbiana antes de la lisis).*
3. Adicionar 50 µL de la solución “MD1” al tubo Microbead. Esta solución contiene SDS y otras sustancias para lisis. Asegurar los tubos en una base de vórtex adecuada y mezclar a máxima velocidad por 10 min. *(Se crearon las condiciones químico-mecánicas para llevar a cabo la lisis celular y liberar los ácidos nucleicos).*
4. Centrifugar los tubos a 10 000 x g por 1 min a temperatura ambiente y transferir el sobrenadante, donde permaneció el ADN, a un tubo de colecta de 2 mL.
5. Adicionar 100 µL de la solución “MD2” al sobrenadante y dar vórtex por 5 segundos. *(La solución MD2 precipita los contaminantes del ADN, incluyendo restos celulares y proteínas).* Centrifugar los tubos a 10 000 x g por 1 min a temperatura ambiente.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo de colecta limpio, cuidando de no contaminar con el pellet. Agregar 900 µL de solución “MD3” al sobrenadante y mezclar en vórtex por 5 segundos. *(La solución MD3 permite la unión de ADN genómico a la membrana del filtro).*
7. Cargar aproximadamente 700 µL en el filtro “Spin Filter” y centrifugar a 10 000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente; descartar el líquido que atravesó el filtro. Repetir la operación 2 ó 3 veces para cada muestra, descartando el sobrenadante.

8. Adicionar 300 μL de la solución "MD4" y centrifugar a 10 000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente, eliminar el líquido remanente. (*La solución MD4 es etanol que lava las impurezas y elimina la sal de la membrana del filtro*).
9. Centrifugar nuevamente a 10 000 x g por 1 min a temperatura ambiente para eliminar restos de la solución anterior.
10. Colocar el filtro en un tubo nuevo de colecta. Agregar 50 μL de la solución "MD5" al centro de la membrana del filtro y centrifugar a 10 000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente. (*El ADN se eluye en Buffer Tris 10 mM pH 8.0*)
11. Desechar el filtro y almacenar el ADN a -20°C .

Anexo 2

Obtención de ADN total por el método de kit comercial Ultra Clean®

Se realizó la extracción de ADN total de cada una de las cepas, utilizando el kit comercial Ultra Clean® Microbial DNA Isolation, MoBio Lab Inc. A continuación se describe la metodología proporcionada por el proveedor. Todos los materiales y reactivos están incluidos en el kit.

1. En un microtubo de colecta de 2 mL poner 1.8 mL del cultivo en estudio y centrifugar a 10 000 x g por 30 segundos, a temperatura ambiente y remover el sobrenadante con una punta de micropipeta.
2. Resuspender el pellet celular en 450 µL de la solución "PF1" y mezclar mediante vórtex ligero. Transferir las células resuspendidas a un tubo "Microbead tube". *(PF1 es un reactivo fuerte de lisis que incluye un detergente para romper la pared celular y eliminar contaminates. Mantener esta solución caliente).*
3. Asegurar los tubos en una base de vórtex adecuada y mezclar a máxima velocidad por 10 min. (Se crearon las condiciones químico-mecánicas para llevar a cabo la lisis celular y liberar los ácidos nucleicos).
4. Centrifugar los tubos a 10 000 x g por 1 min a temperatura ambiente y transferir el sobrenadante, donde permaneció el ADN, a un tubo de colecta de 2 mL.
5. Adicionar 100 µL de la solución "PF2" al sobrenadante y dar vórtex por 5 segundos. Incubar a 4°C por 5 min. *(La solución PF2 precipita los contaminantes del ADN, incluyendo restos celulares y proteínas).* Centrifugar los tubos a 10 000 x g por 1 min a temperatura ambiente.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo de colecta limpio, cuidando de no contaminar con el pellet. Agregar 900 µL de solución "PF3" al sobrenadante y mezclar en vórtex por 5 segundos. *(La solución MD3 permite la unión de ADN genómico a la membrana del filtro).*
12. Cargar aproximadamente 650 µL en el filtro "Spin Filter" y centrifugar a 13 000 x g por 1 min a temperatura ambiente; descartar el líquido que atravesó el filtro. Repetir la operación 2 ó 3 veces para cada muestra, descartando el sobrenadante. Colocar el filtro en un tubo nuevo de colecta.
7. Adicionar 650 µL de la solución "PF4" y centrifugar a 13 000 x g por 1 min a temperatura ambiente, eliminar el líquido remanente. *(La solución PF4 es un alcohol que lava las impurezas y elimina la sal de la membrana del filtro).*

8. Adicionar 650 μL de la solución "PF5" y centrifugar a 13 000 x g por 1 min a temperatura ambiente, eliminar el líquido remanente. (*La solución PF5 garantiza la eliminación completa de la solución PF4, que resultará en una mayor pureza y rendimiento de ADN*).
9. Centrifugar nuevamente a 13 000 x g por 2 min a temperatura ambiente para eliminar restos de la solución anterior.
10. Colocar el filtro en un tubo nuevo de colecta. Agregar 100 μL de la solución "PF6" al centro de la membrana del filtro y centrifugar a 13 000 x g por 1 min a temperatura ambiente. (*El ADN se eluye en Buffer Tris 10 mM pH 8.0*)
11. Desechar el filtro y almacenar el ADN a -20°C .

Anexo 3

Purificación del producto de PCR

Para eliminar residuos de la reacción de amplificación se empleó el kit de purificación PureLink™ PCR Purification Kit, Invitrogen®. A continuación se describe la metodología proporcionada por el proveedor. Todos los materiales y reactivos están incluidos en el kit.

1. Al producto de PCR adicionar 4 volúmenes de la solución “PureLink™ Binding Buffer” con isopropanol. Mezclar bien.
2. Adicionar la mezcla anterior a un tubo de colecta con la columna “PureLink™ Spin Column”.
3. Centrifugar a 10 000 x g por 1 min. El ADN permanece unido a la columna. Descartar el líquido que atravesó la columna.
4. Lavar la columna con 650 µL de solución “Wash Buffer” con etanol
5. Centrifugar a 10 000 x g por 1 min. Descartar el líquido que atravesó la columna.
6. Centrifugar a máxima velocidad durante 2-3 minutos para remover cualquier residuo del buffer de lavado.
7. Colocar la columna en un tubo nuevo de colecta de 1.7 mL “PureLink™ Elution Tube” y añadir 50 µL del buffer de elución (Tris-HCL 10 mM, pH 8.5) para liberar el ADN.
8. Incubar la columna a temperatura ambiente por 1 min.
9. Centrifugar a máxima velocidad por 2 min. El tubo de colecta contiene el producto de PCR purificado. Eliminar la columna.
10. Almacenar el producto purificado a -20°C

Anexo 4

Tabla 11. Características morfológicas y tinción de Gram de las cepas aisladas

Colonias maguey pulquero MRS			
Cepa	Clave	Tinción de Gram	Descripción colonial
M ₁ 3	MM03	Cocos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 12	MM12	Cocos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 15	MM15	Cocos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 16	MM16	Cocos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 17A	MM17	Cocos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 17B	MM17 _B	Cocos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 18	MM18	Cocos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
P 2	MP02	Cocos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
P 22	MP22	Cocos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
P 26	MP26	Cocos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
P 28	MP28	Cocos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
P 30	MP30	Cocos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.

Colonias maguey pulquero APT			
Cepa	Clave	Tinción de Gram	Descripción colonial
M ₁ 1A	AM01	Bacilos cortos gram negativos	Colonias pequeñas blanquecinas/amarillentas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 1B	AM01 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias blanquecinas/amarillentas, amiboides, elevadas y con bordes ondulados.
M ₁ 1C	AM01 _C	Bacilos cortos gram negativos	Colonias blanquecinas/amarillentas, amiboides, elevadas y con bordes ondulados.
M ₁ 2	AM02	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 7	AM07	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, amiboides, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 8	AM08	Bacilos cortos gram negativos	Colonias amarillentas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 10	AM10	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.

M ₁ 11	AM11	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 14	AM14	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 20A	AM20	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 20B	AM20 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 20C	AM20 _C	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 21A	AM21	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 21B	AM21 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 26A	AM26 _A	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 26B	AM26 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 27	AM27	Cocobacilos gram negativos	Colonias pequeñas translúcidas a blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 28	AM28	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 29	AM29	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 36A	AM36	Bacilos cortos gram negativos	Colonias translúcidas, amiboides, elevadas y con bordes ondulados.
M ₁ 36B	AM36 _A	Bacilos cortos gram negativos	Colonias translúcidas, amiboides, elevadas y con bordes ondulados.
M ₁ 37	AM37	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 38A	AM38	Bacilos cortos gram negativos	Colonias blanquecinas/amarillentas, amiboides, elevadas y con bordes ondulados.
M ₁ 38B	AM38 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias blanquecinas/amarillentas, amiboides, elevadas y con bordes ondulados.
M ₁ 39	AM39	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 40	AM40	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 41	AM41	Cocobacilos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 42	AM42	Cocos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 43A	AM43	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 43B	AM43 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.

M ₁ 44	AM44	Cocos gram negativos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 45	AM45	Cocos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 46	AM46	Cocobacilos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
M ₁ 52	AM52	Bacilos cortos gram negativos	Colonias translúcidas a blanquecinas, amiboides, elevadas y con bordes ondulados.
P 1	AP01	Cocos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
P 5	AP05	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
P 6	AP06	Diplococos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
P 7	AP07	Diplococos gram positivos	Colonias pequeñas translúcidas a blanquecinas, circulares, umbilicada y con bordes enteros.
P 8	AP08	Cocobacilos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, circulares, convexa y con bordes enteros.
P 11	AP11	Cocobacilos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexa y con bordes enteros.
P 12	AP12	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
P 13	AP13	Cocobacilos gram positivos	Colonias pequeñas translúcidas a blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
P 16	AP16	Cocobacilos gram negativos	Colonias blanquecinas, amiboides, elevadas y con bordes ondulados.
P 21	AP21	Diplococos gram positivos	Colonias pequeñas translúcidas a blanquecinas, circulares, umbilicada y con bordes enteros.
P23	AP23	Diplococos gram positivos	Colonias pequeñas translúcidas a blanquecinas, circulares, convexa y con bordes enteros.
P 24	AP24	Cocobacilos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
P 25	AP25	Diplococos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
P 28	AP28	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
P 29	AP29	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.

Colonias maguey pulquero TSA			
Cepa	Clave	Tinción de Gram	Descripción colonial
M _{1A} 1	TM01	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas translúcidas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M _{1A} 5	TM05	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas translúcidas, circulares, convexas y con bordes enteros.

M _{1A} 6	TM06	Bacilos cortos gram negativos	Colonias pequeñas translúcidas, circulares, planas y con bordes enteros.
M _{1A} 9	TM09	Bacilos cortos gram negativos	Colonias pequeñas translúcidas/amarillentas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M _{1A} 14	TM14	Bacilos cortos gram negativos	Colonias pequeñas amarillentas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M _{1A} 15	TM15	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M _{1A} 18	TM18	Diplococos gram positivos	Colonias pequeñas translúcidas a blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M _{1A} 20	TM20	Bacilos cortos gram negativos	Colonias pequeñas translúcidas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M _{1A} 34	TM34	Bacilos cortos gram positivos	Colonias pequeñas translúcidas a blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M _{1A} 35	TM35	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas translúcidas/amarillentas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M _{1A} 41	TM41	Bacilos largos gram positivos	Colonias medianas translúcidas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M _{1A} 43	TM43	Bacilos cortos gram negativos	Colonias pequeñas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M _{1B} 7	TM07 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas translúcidas/amarillentas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M _{1B} 16	TM16 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias amarillentas, amiboides, elevadas y con bordes ondulados.
M _{1B} 20	TM20 _B	Cocos gram negativos	Colonias pequeñas translúcidas, circulares, planas y con bordes enteros.
M _{1B} 21	TM21 _B	Bacilos cortos gram positivos	Colonias pequeñas translúcidas a blanquecinas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
M _{1B} 24	TM24 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias pequeñas translúcidas, circulares, planas y con bordes enteros.
M _{1B} 25	TM25 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas translúcidas, circulares, planas y con bordes enteros.
M _{1B} 33	TM33 _B	Diplococos gram positivos	Colonias pequeñas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M _{1B} 34	TM34 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias pequeñas translúcidas/amarillentas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M _{1B} 36	TM36 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas translúcidas a blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M _{1B} 47	TM47 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias pequeñas translúcidas/amarillentas, circulares, convexas y con bordes enteros.
M _{1B} 48	TM48 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias pequeñas translúcidas, circulares, planas y con bordes enteros.
M _{1B} 49	TM49 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias pequeñas translúcidas, circulares, planas y con bordes enteros.
M _{1B} 51	TM51 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas translúcidas a blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.

M _{1B} 52	TM52 _B	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas translúcidas, circulares, planas y con bordes enteros.
M _{1B} 56	TM56 _B	Cocos gram positivos (tétradas)	Colonias pequeñas blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
P 1	TP01	Bacilos cortos gram negativos	Colonias translúcidas/amarillentas, amiboides, elevadas y con bordes ondulados.
P 3	TP03	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas translúcidas a blanquecinas, circulares, convexas y con bordes enteros.
P 5	TP05	Bacilos cortos gram negativos	Colonias pequeñas translúcidas, circulares, convexas y con bordes enteros.
P 6	TP06	Bacilos cortos gram negativos	Colonias blanquecinas, amiboides, elevadas y con bordes ondulados.
P 7	TP07	Bacilos cortos gram negativos	Colonias pequeñas amarillentas, circulares, convexas y con bordes enteros.
P 9	TP09	Bacilos cortos gram negativos	Colonias blanquecinas, amiboides, elevadas y con bordes ondulados.
P 11	TP11	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas translúcidas, circulares, convexas y con bordes enteros.
P 13	TP13	Cocobacilos gram positivos	Colonias pequeñas translúcidas/amarillentas, circulares, convexas y con bordes enteros.
P17	TP17	Bacilos cortos gram negativos	Colonias pequeñas translúcidas, circulares, convexas y con bordes enteros.
P 18	TP18	Bacilos cortos gram positivos	Colonias pequeñas amarillentas, puntiformes, convexas y con bordes enteros.
P 23	TP23	Bacilos cortos gram negativos	Colonias medianas translúcidas, circulares, convexas y con bordes enteros.

Anexo 4

Gel de agarosa de la digestión enzimática con BsuRI del gen ADNr 16S de las cepas aisladas.

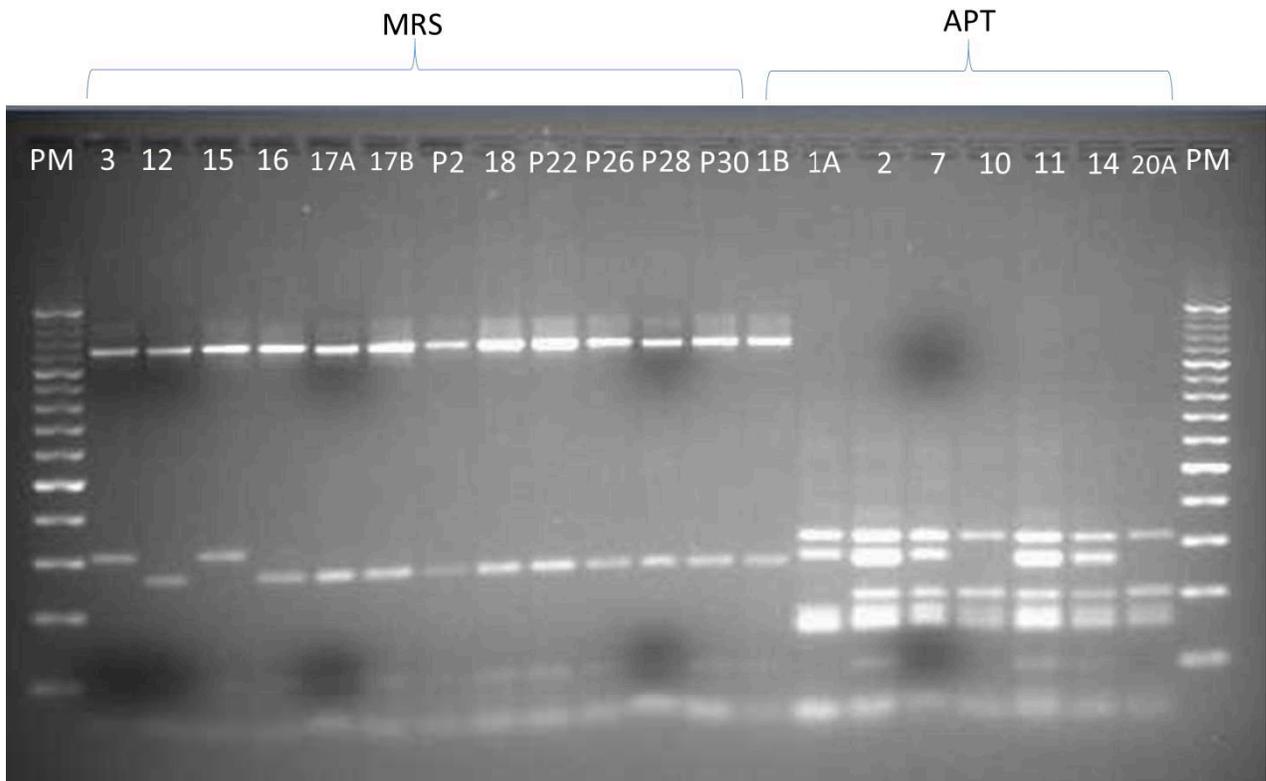


Figura 16. Digestión enzimática con BsuRI del gen ADNr 16S de las cepas aisladas. Gel de agarosa 2% con bromuro de etidio 0.04%, 100 V. (PM) Marcador de peso molecular (O'RangeRuler 100 pb DNA Ladder, Fermentas). En la parte superior de cada carril se indica el nombre de la cepa correspondiente.

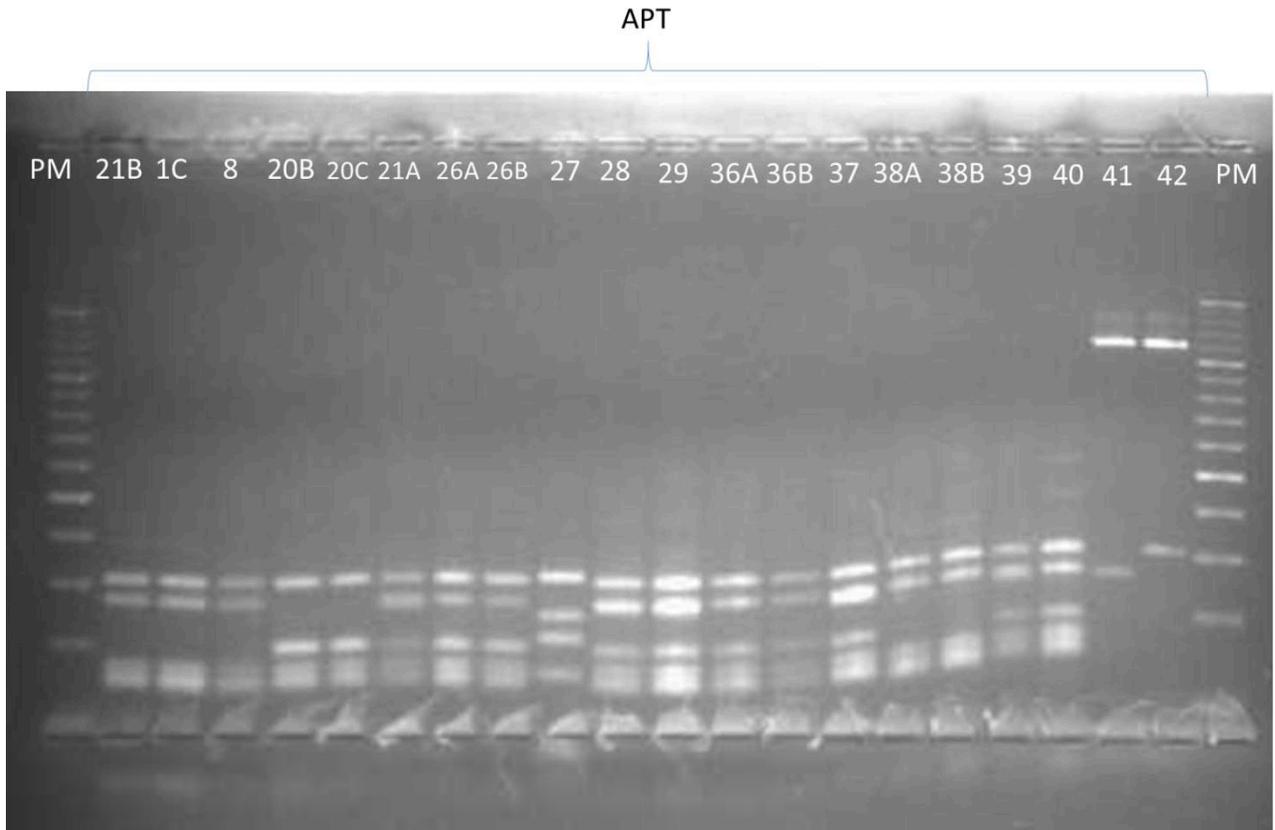


Figura 17. Digestión enzimática con BsuRI del gen ADNr 16S de las cepas aisladas. Gel de agarosa 2% con bromuro de etidio 0.04%, 100 V. (PM) Marcador de peso molecular (O'RangeRuler 100 pb DNA Ladder, Fermentas). En la parte superior de cada carril se indica el nombre de la cepa correspondiente.

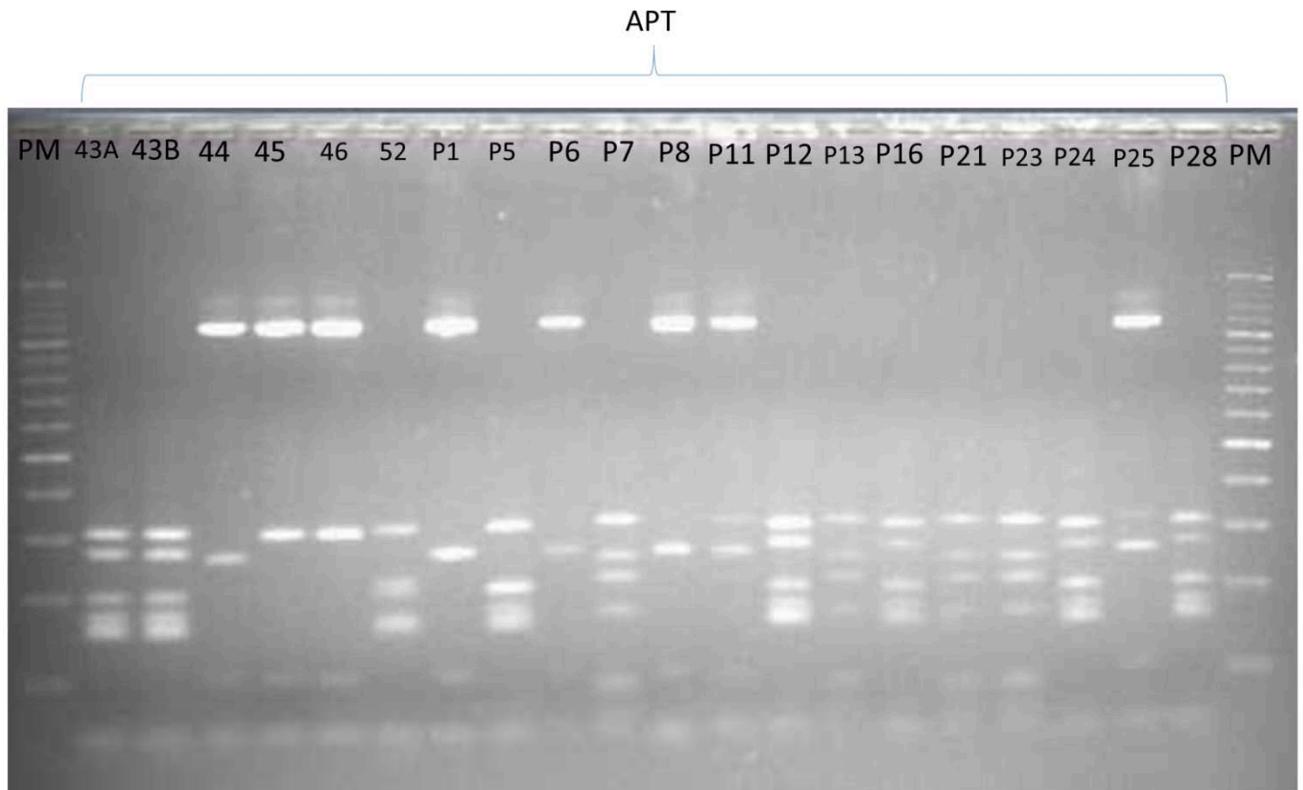


Figura 18. Digestión enzimática con BsuRI del gen ADNr 16S de las cepas aisladas. Gel de agarosa 2% con bromuro de etidio 0.04%, 100 V. (PM) Marcador de peso molecular (O'RangeRuler 100 pb DNA Ladder, Fermentas). En la parte superior de cada carril se indica el nombre de la cepa correspondiente.

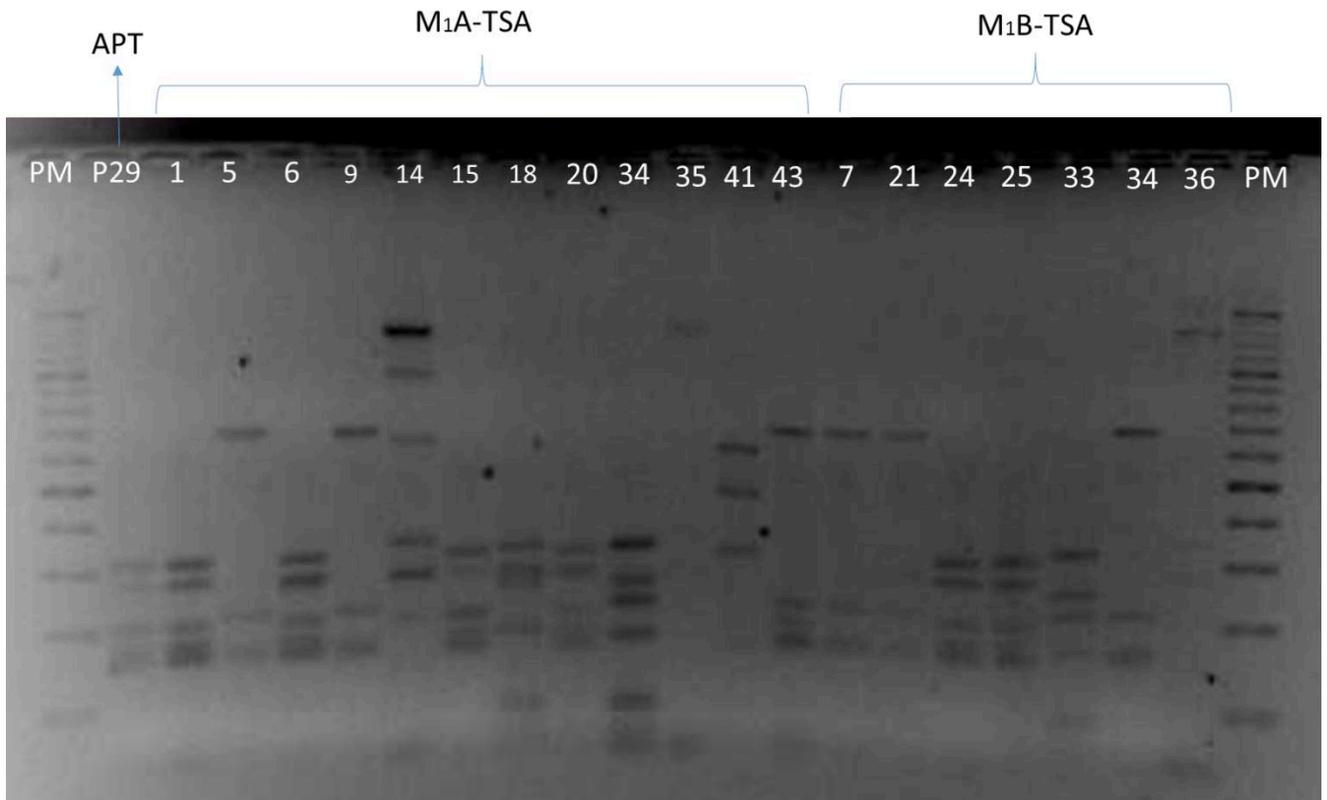


Figura 19. Digestión enzimática con BsuRI del gen ADNr 16S de las cepas aisladas. Gel de agarosa 2% con bromuro de etidio 0.04%, 100 V. (PM) Marcador de peso molecular (O'RangeRuler 100 pb DNA Ladder, Fermentas). En la parte superior de cada carril se indica el nombre de la cepa correspondiente.

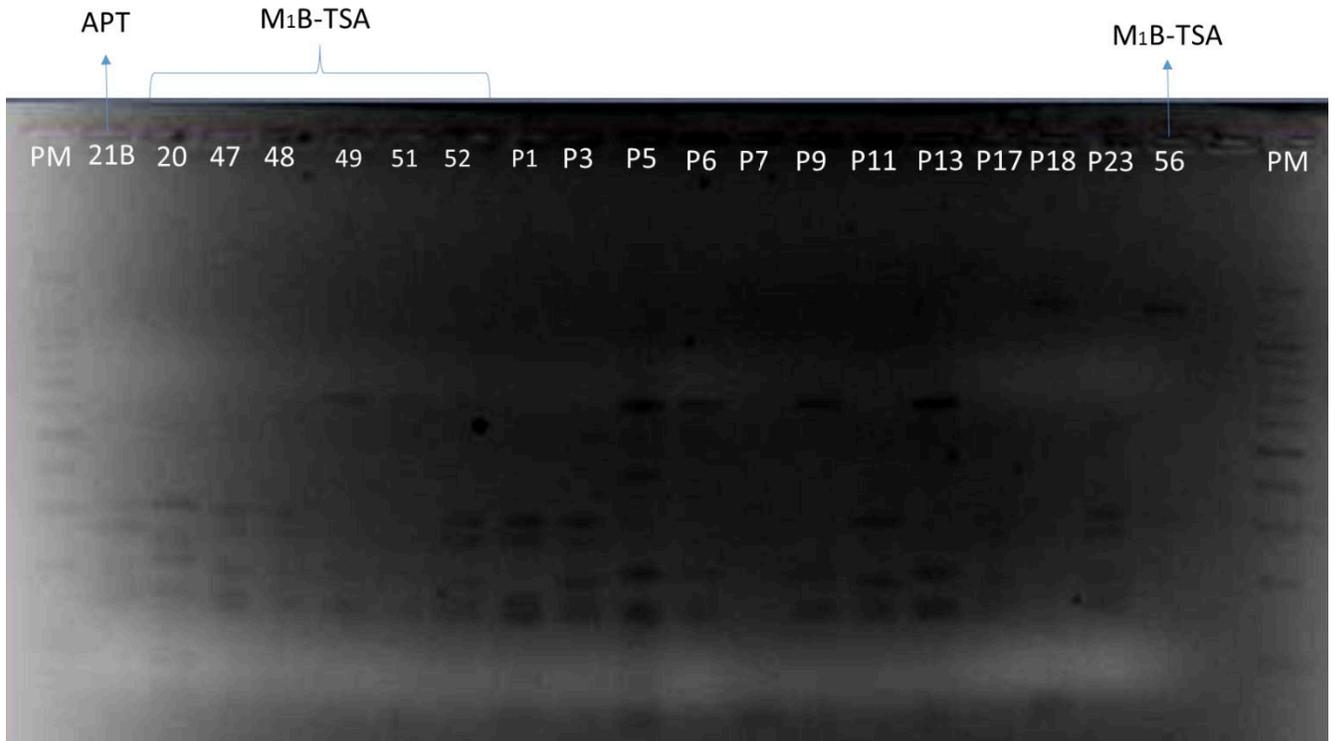


Figura 20. Digestión enzimática con BsuRI del gen ADNr 16S de las cepas aisladas. Gel de agarosa 2% con bromuro de etidio 0.04%, 100 V. (PM) Marcador de peso molecular (O'RangeRuler 100 pb DNA Ladder, Fermentas). En la parte superior de cada carril se indica el nombre de la cepa correspondiente.