

FDO

cf p. 367

TITOS manaque

de un a Huria

la 30/6/2000

Memorias dos

**VIII**

# Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

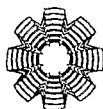
**IV**

# Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería

Huatulco, Oaxaca, México  
del 12 al 17 de septiembre de 1999

Fonds Documentaire IRD  
Cote: B\*21696 Ex 1

à B\*21738



Sociedad Mexicana  
de Biotecnología y  
Bioingeniería A.C.



## DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA DEL POZOL: UN ENFOQUE POLIFASICO

<sup>redesic</sup>  
Farrés, A., Ampé, F.<sup>1</sup>, Escalante, A., Flores, M.T., Guyot, J.P.<sup>1</sup>, Morlon-Guyot, J.<sup>1</sup>, Romero, M.T. y Wachter, C.<sup>1</sup>  
IRD, Montpellier, Francia. Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM.  
Lab. 312. Conj. E. Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, MÉXICO. FAX 56 22 53 29. e-mail:  
wacher@servidor.unam.mx

**Palabras clave:** pozol, diversidad bacteriana, ADN<sub>r</sub> 16S, RAPD, DGGE.

**Introducción.** Los alimentos fermentados tradicionales constituyen microambientes para el desarrollo de una flora microbiana diversa, capaz de efectuar numerosas reacciones metabólicas. El conocimiento de la biodiversidad de los mismos, así como de su aparición temporal y espacial contribuirá al mejor control de los procesos fermentativos así como a la posible explotación de los microorganismos participantes. Las técnicas microbiológicas tradicionales han permitido detectar algunos de los organismos participantes en este proceso. En el caso del pozol, alimento fermentado de maíz consumido en el Sureste Mexicano, los trabajos pioneros de Ulloa y Herrera demostraron la participación de especies fungales en el proceso. Wachter (1995) demostró el papel de las bacterias lácticas durante la fermentación. Sin embargo, las metodologías disponibles impedían tener la certeza de haber detectado todos los microorganismos presentes, así como determinar la diversidad genética y bioquímica de las cepas aisladas de los alimentos provenientes de diferentes zonas. La clasificación de los organismos identificados por métodos bioquímicos resultaba también dudosa e incompleta en algunos casos. En el presente trabajo se ilustran algunos ejemplos del avance en el conocimiento de la comunidad microbiana responsable de la fermentación del pozol empleando diversas metodologías: el análisis de secuencias parciales o totales de ADN<sub>r</sub> 16S amplificados y clonados partir de muestras de ADN total, el análisis de restricción y por RAPD, así como la comparación de resultados con el uso de técnicas bioquímicas tradicionales. La aplicación de la técnica de DGGE y el uso de sondas moleculares especie-específicas ofrecen también información para lograr la descripción completa de la microbiota.

**Metodología.** Los métodos de biología molecular fueron los empleados en trabajos de este tipo y se realizaron los controles correspondientes. Se emplearon muestras de pozol de los estados de Chiapas y Tabasco.

**Resultados y Discusión.** Una primera aproximación para evaluar la biodiversidad consistió en el análisis de una colección de 92 bacterias acidolácticas (LAB) aisladas de diferentes muestras de pozol, tanto mediante el uso de RAPD como por el análisis del perfil de fermentación de carbohidratos por el sistema APII. El enfoque bioquímico permitió la identificación de *Lactococcus lactis* subsp.

*lactis*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. crispatus* and *Lb. acidophilus*. Se realizaron los perfiles de RAPD empleando un oligonucleótido único y el análisis de grupos permitió la discriminación entre especies. Sin embargo, no se observó correlación entre la calidad y la certeza de la identificación bioquímica con el agrupamiento obtenido por el análisis de huellas de RAPD. Este último indicó mayor diversidad genética que la sugerida por métodos bioquímicos. Este resultado coincide con los resultados del análisis de perfiles de restricción con las enzimas *Eco RI*, *Bam HI* y *Hind III* para cepas de *Lactobacillus plantarum*.

El análisis de las secuencias de ADN<sub>r</sub> 16S permitió detectar a las especies *Lb. alimentarius*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei*, *Streptococcus lactis* y por primera vez a *Strep. suis*, así como clonas de identidad incierta, que podrían corresponder a *Clostridium ghoni* o a *Eubacterium tenue*. Los resultados demuestran que las bacterias lácticas son el principal grupo microbiano presente en el pozol. No se detectaron microorganismos de identidad desconocida que sugieran la presencia de microorganismos no cultivables.

Los sistemas de hibridación con sondas específicas para ARN permiten profundizar en la cuantificación de las especies activas en la fermentación del pozol e indican que los lactobacilos y los leuconostocs contribuyen en un 30% cada uno a la actividad fermentativa. Este análisis atribuye un 10% de la misma a especies eucariotes.

Los estudios con la técnica de DGGE permiten detectar diferencias entre los microorganismos presentes en el interior y el exterior de la bola de pozol, así como en los diferentes tiempos de fermentación. La actividad microbiana fue más importante en la periferia, en la que destaca la presencia de *Leuconostoc*, enterobacterias, mohos y levaduras.

Las técnicas moleculares, en particular DGGE y el análisis de rRNA, permitieron caracterizar precisa y rápidamente la estructura microbiana del pozol.

**Agradecimientos.** Apoyo financiero CONACYT 4688N, DGAPA 210194, PADEP 005353, 005357 y 030515.

### Bibliografía.

1. Pace NR (1996) New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *Amer Soc Microbiol News* 62:463-470

Fonds Documentaire IRD

Cote: BX 21710 Ex: 1