

Identificación de perfiles taxonómicos mediante la secuenciación y análisis del gen 16S rARN en muestras de pulque adquiridas en la Zona Metropolitana de Guadalajara

Caudel Medrano M.D.¹ • Montaña Silva P.A.² • Verdín J.² • Lugo Melchor O.Y.^{1*}

Palabras clave: bebidas fermentadas alcohólicas, meta taxonómica
Key words: alcoholic fermented beverages, metataxonomics

Introducción

El pulque es una bebida tradicional mexicana obtenida a partir de la fermentación del aguamiel (néctar del agave), la cual es reconocida desde tiempos ancestrales por su importancia cultural [1].

Diversos trabajos han estudiado las comunidades bacterianas presentes en el pulque, donde han destacado bacterias con propiedades biotecnológicas, clínicas y funcionales [1-4].

Sin embargo, para poder realizar el aislamiento de dichas bacterias, y evaluar su potencial a nivel expe-

rimental, es necesario conocer qué comunidades bacterianas se encuentran presentes en la muestra con la que se está trabajando, para así poder establecer la estrategia de aislamiento de las bacterias de interés.

Es por ello que el objetivo de este trabajo fue identificar las comunidades bacterianas -mediante un análisis del gen 16S rARN- de muestras de pulque adquiridas en la Zona Metropolitana de Guadalajara (ZMG), que permita detectar la biodisponibilidad de cepas de interés biotecnológico.

1 Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos

2 Biotecnología Industrial. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Av. Normalistas 800, Colinas de La Normal, Guadalajara, Jalisco. C.P. 44270, México. Teléfono (01) (33) 3345-5200 Ext. 1802.

* ylugo@ciatej.mx



Metodología

Se adquirieron 4 muestras de pulque de diferentes puestos ambulantes y establecimientos de la ZMG. Como parte de los criterios de inclusión para la selección de los puntos de muestreo, se estableció que el pulque adquirido debía ser preparado a base de aguamiel de origen jalisciense, contar con diferentes tiempos de maduración (entre las diferentes muestras), y adquirirse en su forma natural (sin saborizantes o extractos de frutas en su preparación). Las muestras fueron transportadas en cadena fría hasta el laboratorio, donde se prepararon para su análisis.

Concentración de la biomasa

Para este procedimiento, utilizamos el método propuesto por Chacón-Vargas et al., 2020.[1] Las muestras analizadas estuvieron compuestas de 4 réplicas obtenidas de la muestra homogenizada, para asegurar representatividad del microbioma disponible y en las diferencias observadas en los distintos análisis

Cada muestra fue sometida -de manera individual- al siguiente proceso: se tomaron 4 alícuotas de 10 mL de la muestra las cuales se centrifugaron a 5,000 rpm a 4°C durante 40 minutos. Se desecharon los sobrenadantes y se agregó un volumen de 10 mL de buffer PBS 1X a cada alícuota para re-suspender y lavar el *pellet* obtenido en cada una de las réplicas. Estas se centrifugaron durante 30 minutos a 4°C y los sobrenadantes fueron desechados. Los lavados con buffer PBS se repitieron 3 veces. Finalmente, el *pellet* obtenido de las 4 alícuotas fue unificado en 10 mL de PBS 1X, y se conservaron a 4°C hasta la extracción de ADN metagenómico y secuenciación.

Extracción de ADN y Secuenciación 16S rARN

Para la extracción de ADN genómico y secuenciación del gen 16S, las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Diagnóstico Molecular, que pertenece al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. La región diana para el análisis fue la V3, para cuya amplificación se utilizaron los oligonucleótidos V3-338f y V3-533R [5], con adaptadores Illumina®. La secuenciación se llevó a cabo en un equipo Mini-seq Illumina®, en condiciones estándar (300 ciclos, 2x150).

Análisis meta-taxonomico

Una vez que se obtuvieron los datos, éstos se analizaron mediante el software CLC Genomics Workbench 22.0.2®. La asignación taxonómica se realizó a través de la comparación con la base de datos SILVA 138.1 al 97%.

Resultados y discusión

Se obtuvieron 4 muestras de pulque con diferentes tiempos de maduración. Las características pueden revisarse en la Tabla 1.

La muestra 3, al tener un tiempo de maduración muy corto (24 h), se dejó en condiciones ambientales por 24 h más y se analizó como una muestra independiente (muestra 3-1), dando un total de 5 muestras independientes analizadas.

Análisis meta-taxonomico

La asignación taxonómica obtenida del análisis del gen ribosomal 16S mostró que, en las 5 muestras analizadas, existe una fuerte presencia de bacterias

Tabla 1. Características de las muestras de pulque analizadas.

Muestra	Tiempo de Fermentación	Origen
1	7 días	Jalisco
2	Pulque maduro, tiempo indefinido	Jalisco
3	1 día	Jalisco
3-1	2 días	Jalisco
4	Pulque maduro, tiempo indefinido	Jalisco

ácido-lácticas, destacando el género “*Lactobacillus*”, donde se observa una abundancia relativa desde un 52% (Muestra 3-1) hasta un 87% (M4) (Figura 1). Algo que destaca en los resultados, es que, que a partir de la reclasificación del género *Lactobacillus* en 2020 [6], podemos observar cómo influye en la asignación taxonómica del presente análisis, donde encontramos la presencia de los géneros *Lentilactobacillus*, *Liquorilactobacillus* (principalmente), y en una proporción más pequeña (<0.78%), *Lacticaseibacillus*, *Secundilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, entre otros. Esta reclasificación nos permite observar que las muestras -a pesar de tener una alta abundancia de bacterias de la familia *Lactobacillaceae*- pueden contener bacterias con características funcionales diferentes entre ellas (a partir de su diferencia fenotípica y genotípica), algo que resulta atractivo durante la búsqueda y caracterización de bacterias con potencial biotecnológico. Dentro de la diversidad de bacterias ácido-lácticas, se observan en menor proporción los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc*, con una abundancia relativa de 2.1-3.1% y 0.4-1.6% respectivamente. Es importante destacar que las bacterias ácido-lácticas han

sido ampliamente reconocidas por sus propiedades funcionales y biotecnológicas, por lo que su presencia enriquece el microbioma -potencialmente funcional- que se encuentra en el pulque [2, 3].

De acuerdo con los datos obtenidos, el género *Zymomonas* se encontró en todas las muestras analizadas; sin embargo, su abundancia relativa es mucho menor en la muestra M3-1 y M4 (1.7 y 1.5% respectivamente) en comparación con el resto de las muestras (M2: 16%; M3: 11%; M1: 7%).

De acuerdo con los datos obtenidos por Chacón Vargas et al., 2020, la presencia del género *Zymomonas* en pulque está asociado a la disponibilidad de etanol, fructosa y lactato, donde la correlación entre ambas es significativamente proporcional: ante una mayor abundancia relativa del género, se podía observar una mayor disponibilidad de los compuestos [1]. Podemos ver que en la M2 (con un tiempo de fermentación indefinido) obtuvimos el mayor porcentaje de abundancia relativa de *Zymomonas* (16%); sin embargo, la muestra M4 que contaba con un tiempo de maduración similar, obtuvo la menor abundancia relativa (1.5%).

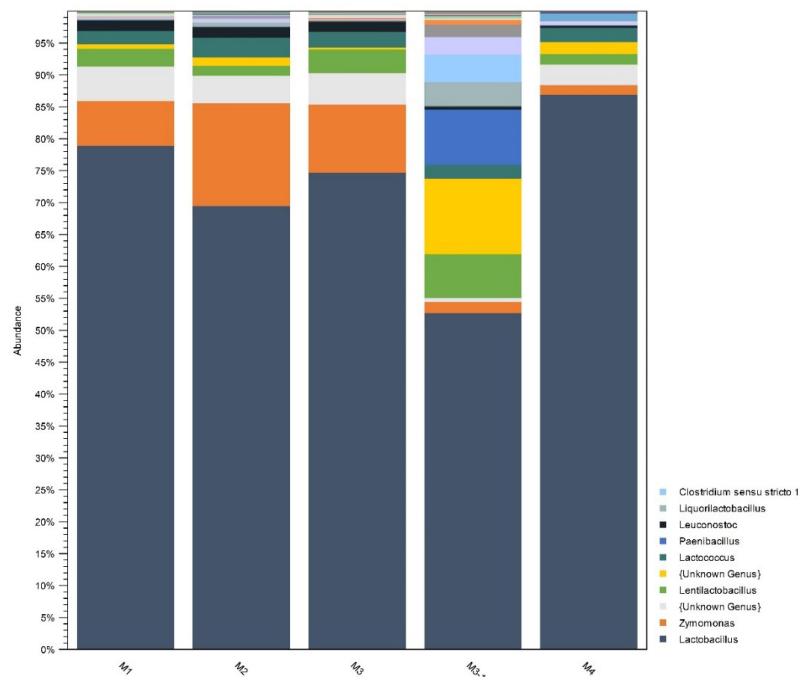


Figura 1. Abundancia relativa de microorganismos en muestras de pulque, a nivel de género. Tiempos de fermentación: M1, 7 días; M2, indefinido; M3, 1 día; M3-1, 2 días; M4, indefinido.

Considerando que en el presente estudio solamente se evaluaron los tiempos de fermentación, podríamos concluir de manera parcial que la diversidad de las comunidades bacterianas no está sujeta únicamente a los tiempos de fermentación, por lo que se recomendaría evaluar más variables (disponibilidad de compuestos, naturaleza del inóculo inicial, composición de la fuente de carbono inicial, entre otros).

Un elemento que destacó fue la presencia del género *Paenibacillus*, al encontrarse presente solo en la Muestra 3-1 en una abundancia relativa aproximada del 8.9%. Este género se ha reportado previamente en estudios donde se le ha identificado como bacteria endófito y con capacidades de promover el crecimiento del agave, característica que puede resultar atractiva en la búsqueda y caracterización de la funcionalidad de especies para aplicaciones industriales [4, 7].

En cuanto al análisis estadístico para evaluar la profundidad del análisis, así como la comparación de la diversidad y abundancia en las muestras, se llevó a cabo un análisis de diversidad alfa y beta.

La diversidad alfa se refiere a la riqueza de especies presentes en un ambiente local; mientras más alto sea el índice, la diversidad de especies es mayor [1]. Los resultados obtenidos para la diversidad alfa se pueden revisar a continuación (Tabla 2).

La muestra que presentó un índice alfa mayor fue la M3-1, mientras que la muestra 4 obtuvo los valores más bajos (incluso, podemos observar que la curva de rarefacción no sostiene un comportamiento asintótico (Figura 2)); se estima que esto puede suceder cuando el rendimiento de la extracción de ADN o la preparación de los amplicones meta-taxonómicos no alcanzaron los rendimientos deseados. Basado en el índice de diversidad filogenética, se observó que hay una diferencia importante en la muestra M3-1, lo que se podría interpretar como que -las especies en esta muestra- están filogenéticamente más alejadas a las de las otras muestras.

Por otro lado, el análisis de la diversidad beta se refiere a la comparación de la diversidad biológica de las muestras con diferente tiempo de fermentación.

Tabla 2. Diversidad alfa.

Muestra	M1	M2	M3	M3-1	M4
Entropía de Shannon	7.34	7.74	7.39	8.07	6.91
Índice de Simpson	0.96	0.98	0.96	0.98	0.95
Diversidad filogenética	0.95	0.91	0.93	1.19	0.91

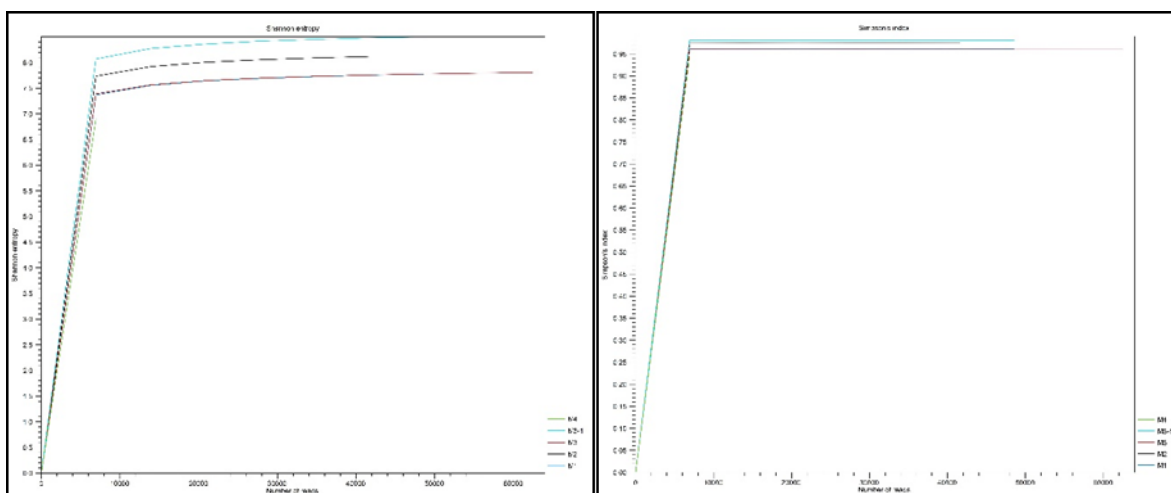


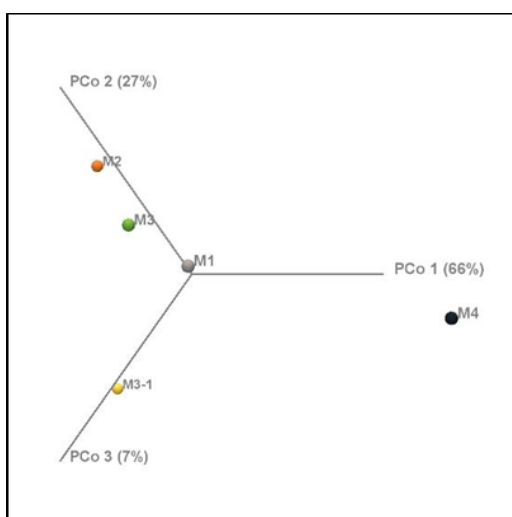
Figura 2. Curvas de rarefacción de la entropía de Shannon (izquierda), y el índice de Simpson (derecha).

Como se comentó anteriormente, las muestras se adquirieron en diversos puntos de la ZMG; sin embargo, algunas de ellas compartían un tiempo de fermentación similar, lo que nos llevó a preguntarnos si el tiempo de fermentación jugaba un papel determinante en la abundancia y diversidad de las muestras y, finalmente, en la biodisponibilidad de cepas potencialmente funcionales. Para esto, se realizó un análisis de componentes principales (*Weighted-UniFrac*) donde se hizo la comparación de la diversidad de todas las muestras, considerando la diversidad y la abundancia presente en cada una de ellas (Figura 3).

Uno de los resultados más esperados eran los de las muestras M3 y M3-1, ya que al ser la misma muestra -en diferente estado de fermentación-, permitiría dar seguimiento a la modificación del microbioma respecto al tiempo de fermentación, permitiendo concluir de manera directa si este era una determinante en la diversidad de las muestras. De acuerdo con los resultados, existe una diferencia importante entre ambas muestras, ya que se posicionaron en cuadrantes diferentes (algo que se refleja en la matriz de distancias); sin embargo, estas diferencias se deben a especies poco abundantes entre ellas. Diversos autores han estudiado los cambios en la diversidad microbiana de acuerdo con la etapa de fermentación del pulque.

Chacón-Vargas, et al., 2020 [1], observaron que conforme los periodos de fermentación se iban extendiendo, la diversidad iba modificándose, lo cual se asoció a la disminución de azúcares y al aumento de etanol y ácido láctico.

Sin embargo, algo similar ocurre entre la muestra M2 y M4 (ambas comparten tiempos de fermentación iguales), donde observamos que las muestras obtuvieron una diferencia importante en términos de diversidad entre ellas, relacionadas a especies poco abundantes. Este comportamiento no era esperado ya que se estimaba que la biodisponibilidad de compuestos (como azúcares, etanol, etc.) así como el microbioma de ambas matrices fuera similar. Escalante et al., 2008, reportó una modificación en las diferentes etapas de fermentación (similar a Chacón Vargas, et al., 2020), e incluso, observaron la pérdida de algunas bacterias a lo largo de la fermentación, lo cual se asoció a las características ambientales de la muestra, tales como la disponibilidad de compuestos (etanol), acidificación de la matriz y la posible actividad antimicrobiana de algunas bacterias disponibles en el pulque [8] por lo que es posible que aunque la muestra M2 y M4 compartan tiempos de fermentación similares, las bacterias disponibles en la matriz estén influenciadas no solo por los compuestos presentes, sino también por la funcionalidad de cepas presentes en la muestra.



	1	2	3	4	5
1	0.00	0.33	0.12	0.46	0.33
2	0.33	0.00	0.24	0.34	0.56
3	0.12	0.24	0.00	0.42	0.42
4	0.46	0.34	0.42	0.00	0.59
5	0.33	0.56	0.42	0.59	0.00

Figura 3. Análisis de componentes principales de las muestras de pulque y su matriz de distancias. Tiempos de fermentación: M1, 7 días; M2, indefinido; M3, 1 día; M3-1, 2 días; M4, indefinido.

Esta información también concuerda con los resultados obtenidos en el análisis taxonómico de la Muestra 3 y 3-1 (Figura 1), donde hubo una reducción en los géneros de *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Zymomonas* en la muestra 3-1 (48 h de fermentación) en relación con la Muestra 3 (con 24 h de fermentación), pero se observó un aumento en la presencia de los géneros *Lentilactobacillus* y *Paenibacillus*, así como un género no reconocido -pero asociado- a la familia *Lactobacillaceae*.

Conclusión

El análisis meta-taxonómico del gen ribosomal 16S en muestras de pulque nos permitió conocer la diver-

sidad de las comunidades bacterianas conformadas mayoritariamente por bacterias ácido-lácticas: *Lactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Lactococcus*, y *Leuconostoc*; así como también bacterias del género *Zymomonas* -principalmente-, confirmando que existe una gran abundancia de bacterias ácido-lácticas de interés clínico y biotecnológico en pulque.

Esto permitirá generar una estrategia experimental para el aislamiento de las bacterias de interés, al conocer las comunidades que se encuentran específicamente en las muestras y que potencialmente podríamos aislar a través de medios específicos y adecuados para las mismas.

Referencias

1. Chacón-Vargas K, Torres J, Giles-Gómez M, Escalante A, Gibbons JG. Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-13. doi:10.1038/s41598-020-71864-4
2. Cervantes-Elizarrarás A, Cruz-Cansino N, Ramírez-Moreno E, et al. *In Vitro* Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Aguamiel and Pulque and Antibacterial Activity Against Pathogens. *Applied Sciences.* 2019;9(3):601. doi:10.3390/app9030601
3. Escalante A, López Soto DR, Velázquez Gutiérrez JE, Giles-Gómez M, Bolívar F, López-Munguía A. Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: Historical, microbiological, and technical aspects. *Front Microbiol.* 2016;7(JUN). doi:10.3389/fmicb.2016.01026
4. Ávila Torres DÁ. Aislamiento y Caracterización de Microorganismos de La de Agave Pulquero, Con Potencial Efecto Promotor Del Vegetal". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2018.
5. Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Welch DM, Relman DA, Sogin ML. Exploring Microbial Diversity and Taxonomy Using SSU rRNA Hypervariable Tag Sequencing. *PLoS Genet.* 2008;4(11):1-10.
6. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinckii* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020;70(4):2782-2858. doi:10.1099/ijsem.0.004107
7. de Jesus Santos AF, Martins CYS, Santos PO, et al. Diazotrophic bacteria associated with sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm): potential for plant growth promotion. *Plant Soil.* 2014;385(1-2):37-48. doi:10.1007/s11104-014-2202-x
8. Escalante A, Giles-Gómez M, Hernández G, et al. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int J Food Microbiol.* 2008;124(2):126-134. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003