

## Diversidad bacteriana durante la fermentación de la tuba

SALGADO-DELGADO, Jesus Alberto, FRANCISCO-MORALES José Yonatan, MARTÍNEZ-AYALA Itzel Guadalupe, NAVEZ-GONZALEZ Daysi, HUERTA-BERISTAIN, Gerardo.

hbgerardo@gmail.com

Recibido Julio 20, 2015; Aceptado Enero 27, 2016

### Resumen

En México existe una gran cantidad de bebidas fermentadas algunas de ellas datan desde la época prehispánica, hoy en día muchas de ellas siguen consumiéndose. La tuba es una bebida que se obtiene por medio de la fermentación de la savia de distintas palmas, en México principalmente *Cocos nuciferas*. Existen bebidas similares a la tuba y son conocidas como Palm Wine. Estudios sobre el palm wine en África revelan la presencia de levaduras del género *Saccharomyces*, bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* y ácido acéticas de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Existe amplia diversidad bacteriana en la naturaleza y tan solo un porcentaje relativamente bajo de esta diversidad ha sido estudiada, de lo poco que se ha podido estudiar se han obtenido gran cantidad de productos con aplicaciones en tecnología y salud. En este estudio se realizó una caracterización microbiológica, en lo cual, en el aislamiento primario se obtuvieron un total de 40 cepas bacterianas, en las primeras 0 horas de fermentación se aislaron 15 cepas, a las 12 horas fueron 13 cepas y a las 24 horas fueron 12 cepas bacterianas. Lo cual predominan las bacterias Gram positivas, siguiendo las Gram negativas y por último las levaduras. Por las características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas se diferenció hasta un posible género de los cuales son *Bacillus sp.*, *Zymomonas sp.* y *Saccharomyces sp.*

### Tuba, Fermentacion, Palm Wine, Diversidad Bacteriana.

### Abstract

In Mexico there is a lot of drinks fermented some of them dating from pre-Hispanic times, today many of them are still languishing. The tuba is a drink that is obtained through the fermentation of the sap from various palms, *Cocos nuciferas* mainly in Mexico. There are similar to the tuba beverages and are known as Wine Palm. Studies palm wine in Africa reveal the presence of *Saccharomyces* yeasts, lactic acid bacteria as *Lactobacillus* and acetic acid bacteria as *Acetobacter* and *Gluconobacter*. There is ample bacterial diversity in nature and only a relatively small percentage of this diversity has been studied, how little has been studying have been obtained lots of products with applications in technology and health. In this study microbiological characterization was carried out, in which, in the primary insulation a total of 40 bacterial strains were obtained in the first 0 hours of fermentation 15 strains were isolated at 12 hours were 13 strains and 24 hours were 12 bacterial strains. Which is dominated by Gram positive bacteria, Gram negative following and finally the yeast. By macroscopic, microscopic and biochemical characteristics were differentiated until possible genera which are *Bacillus sp.*, *Zymomonas sp.* and *Saccharomyces sp.*

**Keywords:** Fermentation, Palm Wine, bacterial diversity.

**Citación:** †SALGADO-DELGADO, Jesus Alberto, FRANCISCO-MORALES José Yonatan, MARTÍNEZ-AYALA Itzel Guadalupe, NAVEZ-GONZALEZ Daysi, HUERTA-BERISTAIN, Gerardo. Diversidad bacteriana durante la fermentación de la tuba. Foro de Estudios sobre Guerrero. Noviembre 2015. Mayo 2015 – Abril 2016, 2-3:65-68

\*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: motero\_sanchez@yahoo.com.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

## Introducción

En México existe una gran cantidad de bebidas fermentadas como la tuba, el pulque, el pozol, el tepache, etc., algunas de ellas datan desde la época prehispánica donde tenían un gran papel cultural, si embargo hoy en día muchas de ellas se siguen conumiendo. Los primeros estudios fueron realizados basándose en su historia e importancia cultural, con el paso del tiempo los trabajos eran encaminados al estudio de la fermentación, los productos que se elebaoraban y los microorganismos que participan en la fermentación (Wacher, 2004).

La tuba es una bebida que se obtiene por medio de la fermentación de la savia de distintas palmas, en México principalmente *Cocos nuciferas*. Existen en diferentes partes del mundo bebidas similares a la tuba y son conocidas como Palm Wine. Estudios sobre el palm wine en África revelan la presencia de levaduras del género *Saccharomyces*, bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* y ácido acéticas de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Almoa-Awua *et al.*, 2006; Stringini *et al.*, 2009). El estudio de la diversidad bacteriana en las bebidas fermentadas requiere del uso de métodos no dependientes de cultivo, esto para tener mayor certeza de la diversidad presente en estos medios, debido ha que el 0.1 a 10% de las bacterias del medio son cultivables (Rondon *et al.*, 1999). Diversas técnicas moleculares como las que son basadas en el ADN que codifican para el ARNr 16s ayuda establecer relaciones filogenéticas que tienen los microorganismos, esto para crear bases de datos que simplifiquen su identificación.

Existe amplia diversidad bacterian en la naturaleza y tan solo un porcentaje relativamente bajo de esta diversidad ha sido estudiada, de lo poco que se ha podido estudiar se han obtenido gran cantidad de productos provenientes de las bacterias con aplicaciones

en tecnología y salud. En este estudio se realizó una caracterización microbiológica de la diversidad bacteriana presente en la tuba evaluando la dinámica de crecimiento de la población durante diferentes etapas de fermentación, posteriormente se pretende realizar la caracterización molecular de esta población amplificando del gen ADN 16s.

## Materiales y Métodos

Toma de muestra y aislamiento de microorganismos.

La muestra de tuba fue proporcionada por un productor local de Las Pozas, mucipio de Acapulco Guerrero. Colocando en envases de plásticos esteriles y transportándola en baño de hielo a 4°C al laboratorio. En el laboratorio se colocó 100 mL en matraces esteriles y se incubaron a 30°C durante 24 h. Se tomaron muestras a 0, 12 y 24 horas y se realizaron diluciones seriadas de cada muestra en solución salina (NaCl 0.85% p/v) desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$ . Se sembraron por estría masiva por duplicado las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  en tres diferentes medios LM, MEGI y MRS para aislar la diversidad bacteriana.

Caracterización microscópica y bioquímica.

Para determinar las características de los microorganismos aislados, se realizaron distintas pruebas bioquímicas (Oxidasa, catalasa, O/F carbohidratos, Medio Mio, Hierro de Kligger, Medio Lia, Citrato de Simmons, Agar Fenilalanina, Caldo Nitrato, Gelatina nutritivas y Caldo rojo fenol) y microscópicas para determinar el grupo microbiano. A las colonias aisladas se le realizó tinción de Gram y se observaron analizaron a 100x.

Microscopia electrónica

El análisis por microscopia electrónica se realizó con 1 ml de diferentes muestras de tuba a las 0, 12 y 24 horas de fermentación, dichas

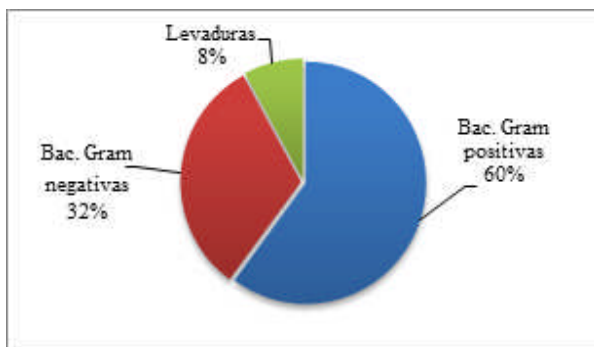
**Artículo****ALIMENTOS**

muestras fueron fijadas con un volumen de 3% v/v glutaraldehído por 1 h. Posteriormente se realizaron lavados con buffer de fosfatos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M) y se vuelve a fijar con  $\text{OsO}_4$  (0.01% p/p) por 1h. Transcurrido este tiempo, las muestras se deshidrataron con etanol de 30% a 100% y secadas a punto crítico con  $\text{CO}_2$  mediante un secador Samdri-780 (Tousimis) y recubiertas con oro con un Ion Sputter JFC-1100 (JEOL). Las muestras fueron observadas con un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-5410LV (JEOL).

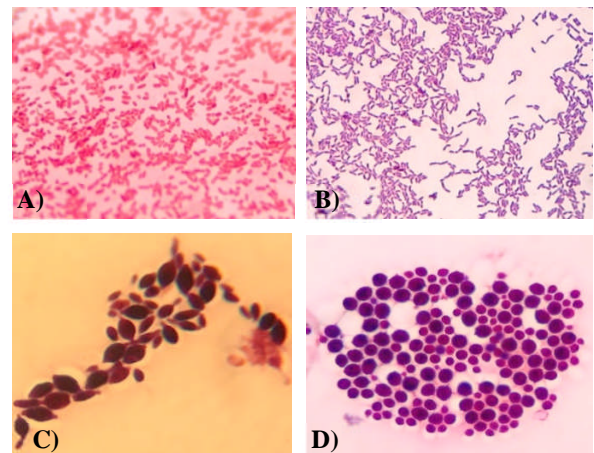
**Resultados****Aislamiento de microorganismos**

De los aislamientos primarios se obtuvieron un total 40 cepas bacterianas Gram negativas y positivas, así como levaduras. En las primeras 0h de fermentación se aislaron 15 cepas, a las 12h fueron 13 cepas y a las 24h fueron 12 cepas bacterianas. De acuerdo al recuento de poblaciones en la tinción de Gram, se observó que existe un consorcio entre levaduras y bacterias, Figura 1. Estos grupos estuvieron presentes en todas las etapas de proceso de fermentación.

En la figura 2, se observan las características microscópicas obtenidas por medio de la coloración de Gram lo cual permitió visualizar la morfología de cocobacilos Gram negativos, bacilos Gram positivos y células levaduriformes.



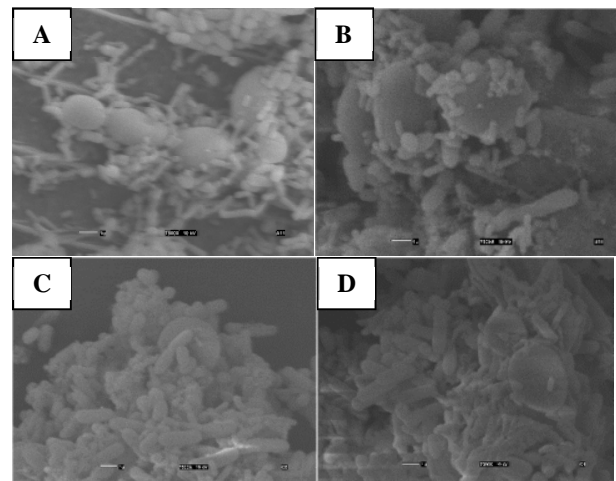
**Figura 1.** Porcentaje de bacterias y levaduras en base a tinción de Gram presentes en la fermentación de la tuba.



**Figura 2.** Características microscópicas con coloración de Gram. A) Cocobacilos Gram negativos. B) Bacilos Gram positivos. C y D) Células levaduriformes. Aumente a 100x.

De las características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas realizadas se han podido identificar al menos hasta un posible género de los cuales son *Bacillus* sp., *Zymomonas* sp. y *Saccharomyces* sp.

En la figura 3 se observa la imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido podemos observar bacterias cuya morfología son principalmente bacilos de diferentes tamaños y algunos cocos de menor cantidad.



**Figura 3.** Microscopía electrónica de barrido. A) 0 horas de fermentación. B) 12 horas de fermentación. C y D) 24 horas de fermentación. Observadas entre 7500x y 10000x.

**Dicusión**

SALGADO-DELGADO, Jesus Alberto, FRANCISCO-MORALES José Yonatan, MARTÍNEZ-AYALA Itzel Guadalupe, NAVEZ-GONZALEZ Daysi, HUERTA-BERISTAIN, Gerardo. Diversidad bacteriana durante la fermentación de la tuba.

**Artículo****Foro de Estudios sobre Guerrero****ALIMENTOS**

Mayo 2015 – Abril 2016 Vol.2 No.3 65-68

La diversidad bacteriana en la tuba durante su proceso de fermentación fue estudiada, en este sentido se detectó que a las 0 horas de fermentación los microorganismos presentes son propios de la savia de la *Coccoloba nucifera*, al tiempo de 12 horas se observa la proliferación de levaduras similar a lo que observan en el trabajo realizado por Escalante et al. 2008 lo mismo a las 24 horas se observó una proliferación de microorganismos homofermentativos, del género *Lactobacillus* y otros microorganismos, resultados similares se observan en muestras de pulque en el trabajo realizado por Escalante et al., 2008, los *Lactobacillus* tienen capacidad de metabolizar glucosa, fructosa y sacarosa y producir D,L-lactato (Carr et al., 2002). *Z. mobilis*, previamente ha sido reportada en pulque y ha sido considerada en asociación con levaduras responsables de la producción de etanol, lo que hace suponer que entre la diversidad microbiana en la Tuba estén presentes cepas como *Z. mobilis* y *S. cereviceae*. Así mismo en algunos trabajos se ha reportado que muchos microorganismos desaparecen después de las primeras horas de fermentación debido a la disminución del pH por aumento de la producción de ácidos y etanol. Además en el análisis de la diversidad del pulque se han obtenido por primera vez microorganismos que producen un exopolisacárido de fructosa (del tipo de levadura o inulina) *L. citreum* y *L. mesenteroides* ha sido reportado que son los responsables de la producción de estos exopolisacáridos. Para tener una caracterización filogenética de la tuba esta en progreso el análisis molecular para estudiar el análisis de diversidad mediante ensayos ARDRA y la caracterización fisicoquímica de la Tuba.

**Conclusiones**

La diversidad bacteriana presente en la tuba y durante su fermentación fue estudiada por primera vez para determinar los cambios en las comunidades microbianas involucradas en el

proceso de fermentación de la tuba, entre lo que se observó presencia de bacterias 60% gram positivas, 32% gram negativas y 8% levaduras.

**Agradecimiento**

El presente trabajo fue financiado parcialmente por la Dirección de investigación y posgrado a través de los proyectos UAGro.

**Referencias**

- Amoa-Awua W., Sampson E., Tano-Debrah K. (2006). Growth of yeast, lactic and acetic bacteria in palm wine during tapping and fermentation from felled oil palm (*Elaeis guineensis*) in Ghana. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 102 599-606.
- Carr, F.J., Chill, D., Maldas, N., (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology* 28, 281–370.
- Escalante A., Giles-Gómez M., Hernández G., Soledad M., 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. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 124 126-134.
- Rondon M., Goodman R., Handelsman J. (1999). The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends Biotechnol.* Vol. 17 403-409.
- Stringini M., Comitini F., Taccari M., Ciani M. (2009). Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. *Food Microbiology*. Vol. 26 415-420.
- Wacher C. (2004). Alimentos y bebidas fermentados tradicionales. En *Biotecnología Alimentaria*. pp. 312-349. Limusa. México D.F.