

Revista Latinoamericana de Microbiología

Volumen
Volume 45

Número
Number 1-2

Enero-Junio
January-June 2003

Artículo:

Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Asociación Mexicana de Microbiología, AC

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



[Medigraphic.com](http://www.Medigraphic.com)

Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados

Gloria Díaz Ruiz,* Carmen Wachter Rodarte*

RESUMEN. Para entender la presencia y el crecimiento de los microorganismos en los alimentos se reconoce en la actualidad la importancia de su estudio con un enfoque ecológico. La producción de alimentos fermentados en condiciones controladas y su calidad dependen del conocimiento y control de la microbiota presente. Los alimentos fermentados tradicionales se obtienen mediante fermentaciones naturales (en las que no se añaden inóculos) y están constituidos por microbiotas complejas, que son difíciles de describir mediante el uso de métodos convencionales. Existen diferentes alternativas para la determinación de la estructura microbiana de estos alimentos. Una de ellas consiste en aislar microorganismos y tipificarlos mediante técnicas basadas en el DNA, como el RFLP, la ribotipificación, el AFLP, el ARDRA y el RAPD. Para incluir la detección de microorganismos no cultivables o aún no cultivados se utilizan métodos en los que se extraen ácidos nucleicos directamente del alimento y a partir de éstos se determina la diversidad microbiana. La construcción de bibliotecas de clones de rDNA 16S, la obtención de "huellas digitales" mediante DGGE o TGGE son ejemplos de estas técnicas. Se presentan avances recientes de la aplicación de estos métodos para el estudio de alimentos fermentados.

Palabras clave: Alimentos fermentados, comunidades microbianas, diversidad microbiana, ecología microbiana molecular, ecosistemas alimenticios.

ABSTRACT. The importance of ecological concepts to understand the presence and growth of microorganisms in foods is presently recognized. The production of fermented foods under controlled conditions and its safety assurance depend on the knowledge and control of their microbiota. Traditional fermented foods are obtained by natural fermentations (in which no inoculum is added) and contain complex microbiotas, which are difficult to describe through the use of traditional microbiological methods. The microbial structure of these foods can be studied with different approaches. One of them consists on the typification of isolated microorganisms with methods based on DNA as RFLP, ribotyping, AFLP, ARDRA and RAPD. In order to detect non-culturable or not yet cultured microorganisms, nucleic acids are directly extracted from foods and the microbial diversity is determined from them. Examples of these techniques are the construction of 16S rDNA clone libraries and fingerprinting techniques, such as DGGE and TGGE. Recent advances on the application of these techniques on the study of fermented foods are presented.

Key words: Fermented foods, microbial communities, microbial diversity, molecular microbial ecology, food ecosystems.

INTRODUCCIÓN

La microbiología de alimentos ha tendido a dividir en partes la investigación de los microorganismos, enfocándose en el estudio o la detección de ciertos grupos de microorganismos. Por ejemplo, se estudia la sobrevivencia de un cierto microorganismo patógeno o de un determinado grupo de microorganismos de descomposición o la actividad de algún microorganismo fermentador. Recientemente, sin embargo, se ha visto la necesidad de tomar en cuenta el ecosistema completo, ya que el crecimiento, la sobrevivencia y la actividad de cualquier especie, pueden estar determinados por la presencia de otras especies.

Para entender la presencia y el crecimiento de los microorganismos en los alimentos se reconoce en la actualidad la importancia de su estudio con un enfoque ecológico. Los conceptos ecológicos constituyen las bases tanto para el

control de microorganismos indeseables como para el uso racional de microorganismos en la producción de alimentos y bebidas fermentadas y para su uso como probióticos.^{13,14}

Durante el último siglo se ha dependido del aislamiento y cultivo de los microorganismos para su identificación. Éstos han sido caracterizados tradicionalmente por su fenotipo, el conjunto de propiedades celulares observables, como su morfología, propiedades fisiológicas y por la estructura de sus componentes celulares. La necesidad de cultivar los microorganismos para identificarlos ha limitado la comprensión de la diversidad microbiana, ya que ahora se sabe que más del 90% de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando las técnicas tradicionales.² No es posible obtener cultivos puros de ciertos microorganismos porque dependen de las actividades de otros microorganismos o porque no se conocen las condiciones para su cultivo. En otros casos los microorganismos pierden la capacidad de reproducirse, pero retienen su actividad metabólica. No se conocen todavía los mecanismos moleculares relacionados con este fenómeno, se ha propuesto que no es posible cultivar estas células debido a su deterioro y se les podría considerar como moribundas. Otra teoría sugiere que

* Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, 04510 México, D.F.

las células se programan genéticamente para adaptarse a las condiciones adversas (como agotamiento de nutrientes, temperatura baja u otros tipos de estrés) y generar formas de latencia.²⁴ La consecuencia de esto es que se tiene una visión deformada de la diversidad microbiana en el ambiente.

En los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la diversidad microbiana en comunidades complejas debido al uso de métodos moleculares que no requieren el cultivo de microorganismos y al de herramientas usadas en estudios filogenéticos para identificarlos.

Las relaciones evolutivas entre los organismos (que por lo general no es posible obtener mediante el análisis de las características fenotípicas) constituye una base más natural para clasificarlos.^{15,26} Estas relaciones podrían ser establecidas idealmente comparando las secuencias nucleotídicas de sus genomas; sin embargo el análisis a esta escala sería impráctico, pero pueden ser inferidas mediante la comparación de secuencias de genes individuales. Se utilizan entonces ciertas macromoléculas que funcionan como cronómetros evolutivos (indicadores de cambios evolutivos). Se puede medir la distancia evolutiva entre dos organismos por diferencias en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de macromoléculas homólogas aisladas de ellos. Esta molécula debe estar distribuida universalmente en el grupo que se desea estudiar y debe ser funcionalmente homóloga en cada organismo. Para comparar secuencias es necesario alinear las moléculas, por lo que deben contener regiones con similitud significativa además de las que difieren en sus secuencias y éstas deben cambiar a una velocidad proporcional a la de la distancia evolutiva medida. Se han utilizado proteínas como las ATPasas y RecA (proteína requerida para recombinación genética), pero los genes que codifican para el RNA ribosomal son los más utilizados. Esto se debe a que estas moléculas son funcionalmente constantes, se encuentran distribuidas universalmente y sus secuencias son moderadamente conservadas en la mayoría de los organismos. En el caso de los procariotes, el rDNA 16S (que contiene aproximadamente 1,500 nucleótidos) es el más utilizado.²⁰

En los últimos años las técnicas moleculares, incluyendo las basadas en las secuencias mencionadas anteriormente, han cambiado nuestra perspectiva de la diversidad microbiana y permitirán describir, monitorear y controlar comunidades microbianas para que lleven a cabo las actividades requeridas. En el caso específico de los alimentos, es esencial contar con la información que se menciona a continuación,¹³ que es posible obtener mediante el uso de métodos moleculares.

- Datos confiables sobre la diversidad y la identificación taxonómica de los microorganismos que colonizan el alimento en cada etapa de su producción.

- Datos cuantitativos que describan cambios en las poblaciones durante la producción y la cadena de distribución.
- Información sobre la distribución espacial de los microorganismos en el producto.
- Impacto de los factores intrínsecos (propiedades de los alimentos), extrínsecos (factores ambientales), de procesamiento e implícitos (propiedades de los microorganismos) en el crecimiento, sobrevivencia y actividad bioquímica de los microorganismos.
- Correlaciones entre el crecimiento y la actividad de los organismos individuales y la calidad y seguridad del producto.

Los alimentos fermentados contienen generalmente microbiotas complejas, que son difíciles de describir y de estudiar experimentalmente. Los microorganismos aparecieron en la tierra mucho antes que el hombre, de manera que éste ha evolucionado en un ambiente microbiano. Se piensa que cuando el hombre dejó de ser recolector para convertirse en productor de alimentos y que debía almacenarlos, se enfrentó a los problemas de descomposición y de enfermedades causadas por microorganismos. Debe haber sido también la época en la que surgieron los alimentos fermentados y es posible que el hombre antiguo haya aprendido a producirlos por el método de prueba y error: si el sabor y la apariencia eran desagradables o si les causaban enfermedades, no los consumían; sin embargo si después de haberlos almacenado en ciertas condiciones eran apetecibles y no tóxicos, continuaban produciéndolos de esa forma. Los alimentos contenían una microbiota natural y tanto las características de los alimentos como las condiciones de almacenamiento determinaban el predominio de algunos de sus miembros. Para producirlos en condiciones controladas y asegurar su calidad, es importante conocer y controlar los puntos mencionados anteriormente.

Se presentarán avances recientes de la aplicación de algunos de estos métodos para el estudio de alimentos fermentados.

DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE COMUNIDADES MICROBIANAS

Los alimentos fermentados, especialmente los que se producen de forma tradicional, se obtienen mediante fermentaciones naturales, es decir, no se añaden inóculos sino que actúan los microorganismos naturalmente presentes en el alimento. El uso de los métodos convencionales para la identificación de cada uno de sus miembros resulta insuficiente. Una alternativa para la determinación de la estructura microbiana de estos alimentos es aislar microorganismos y tipificarlos; otra es utilizar métodos que no dependen del cultivo, en los que se extraen ácidos nucleicos directamente del alimento (Fig. 1).

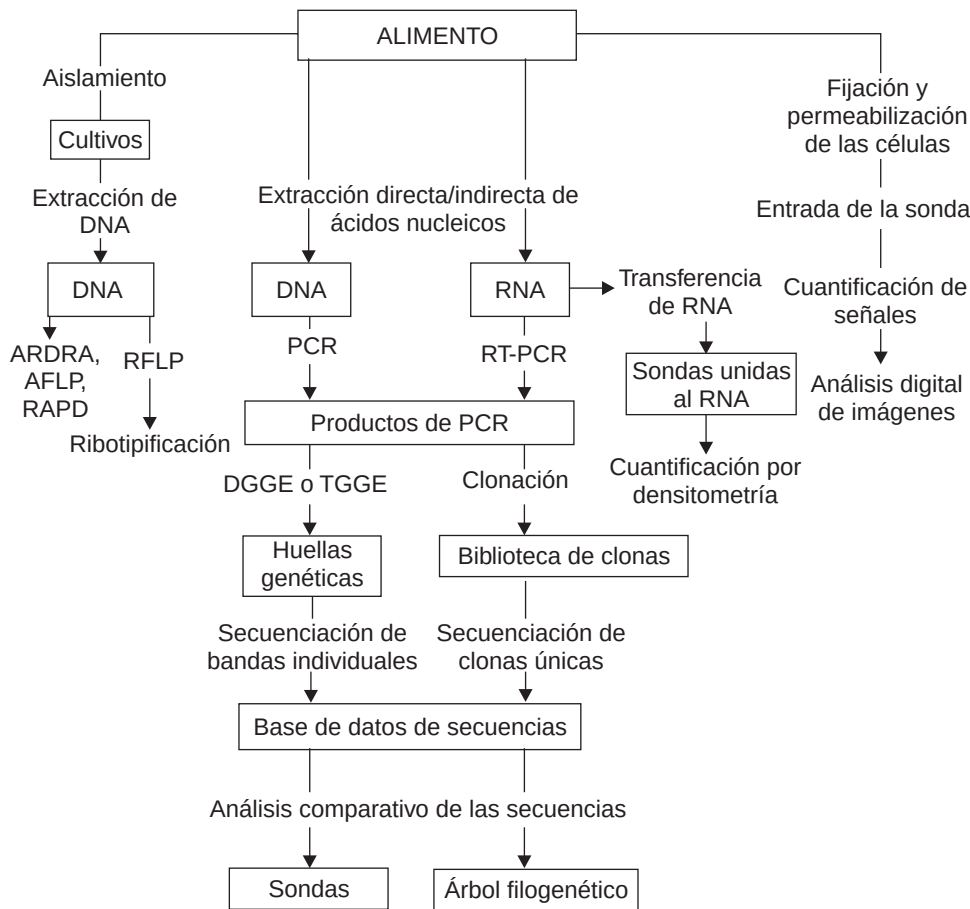


Figura 1. Evaluación de comunidades microbianas en alimentos fermentados.

Tipificación de microorganismos aislados

Existen técnicas de clasificación de microorganismos basadas en el DNA con las que es posible distinguir microorganismos a nivel de especie y de cepa. El **RFLP** (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) fue la primera en ser utilizada. Se extrae el DNA (el genoma completo) de cada cepa, se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos se separan y visualizan por electroforesis en geles de agarosa (Fig. 2). Se obtienen patrones de bandas con buena reproducibilidad pero por lo general son muy complejos. La forma como más se ha utilizado el RFLP es estudiando el polimorfismo de regiones particulares. Para hacer una **ribotipificación** se transfieren los fragmentos a una membrana, se hibridan con una sonda de rRNA marcada y se visualizan únicamente los fragmentos hibridados, que se pueden comparar con cepas de referencia (Fig. 2).

Otras técnicas se basan en el PCR y se caracterizan por su simplicidad y rapidez. El **RAPD** (análisis de DNA polimórfico amplificado al azar), conocido también como **AP-**

PCR (PCR cebado arbitrariamente) consiste en amplificar al azar regiones del DNA extraído de los microorganismos. Los cebadores se escogen al azar, por lo que no es necesario contar con información sobre secuencias específicas del microorganismo a tipificar. Se utilizan temperaturas de alineamiento bajas, de manera que se obtengan productos de PCR que permitan el alineamiento de los cebadores a pesar de que existan una o dos bases que no coincidan. Después de su separación mediante electroforesis en geles de agarosa se obtienen patrones simples de fragmentos de DNA de diferentes tamaños (Fig. 3). El problema de esta técnica es su sensibilidad a las condiciones de reacción, por lo que es difícil en ocasiones obtener una reproducibilidad inter-laboratorios adecuada.

El **AFLP** (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) es una combinación de PCR y el uso de enzimas de restricción. Se basa en la amplificación por PCR de fragmentos de restricción de DNA genómico. Se realiza en tres etapas: a) Restricción del DNA y ligamiento de los adaptadores. Se realiza la restricción con dos enzimas que producen fragmentos de DNA con dos tipos diferentes de

extremos pegajosos. A éstos se ligan adaptadores, que son oligonucleótidos cortos que funcionarán como los sitios de alineamiento de los cebadores. b) Amplificación selectiva de algunos de los fragmentos de restricción. Se usan dos cebadores diferentes conteniendo la misma secuencia que los adaptadores más varias bases contiguas al sitio de restricción. Se utilizan condiciones estrictas, de manera que se amplifiquen únicamente los fragmentos en los que las extensiones del cebador (las bases que se añaden) coinciden exactamente con los nucleótidos adyacentes al sitio de restricción. c) Separación de fragmentos por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (geles de secuenciación). Generalmente se obtienen patrones de 50 a 100 fragmentos, con mucha reproducibilidad, debido a las condiciones estrictas del alineamiento.³⁶ Ésta y otras técnicas basadas en el PCR han sido automatizadas mediante el uso de cebadores marcados con fluorescencia.¹⁴

Otros métodos se basan en la comparación de DNA ribosomal (rDNA). El análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado (**ARDRA**) se basa en la obtención de rDNAs mediante amplificación por PCR usando cebadores

universales, el producto se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos se analizan en geles de agarosa.¹⁸

Con todas estas metodologías se obtienen patrones de bandas o “huellas digitales” de cada microorganismo. Se determinan, utilizando diferentes tipos de software, las diferencias entre éstos (de acuerdo con la presencia o ausencia de bandas) y se construyen dendrogramas. Para identificar los microorganismos clasificados es común incluir en el análisis cepas de referencia¹⁹ o identificar cepas representativas de cada grupo mediante la comparación de secuencias del gen ribosomal 16S.²¹ Generalmente se utilizan enfoques de taxonomía polifásica, incluyendo además de éstos, otros métodos de clasificación y de identificación.

El RAPD es la técnica que más se ha utilizado para el análisis de colecciones microbianas aisladas de alimentos fermentados. Cocconcelli y cols.⁷ analizaron la dinámica de la población de la microbiota natural de un cultivo de suero utilizado para la producción del queso parmigiano reggiano. El análisis de los patrones de RAPD reveló la presencia de 4 biotipos, que fueron identificados mediante el análisis de secuencias de rDNA 16S como *Lactococcus helveticus* y *Lactococ-*

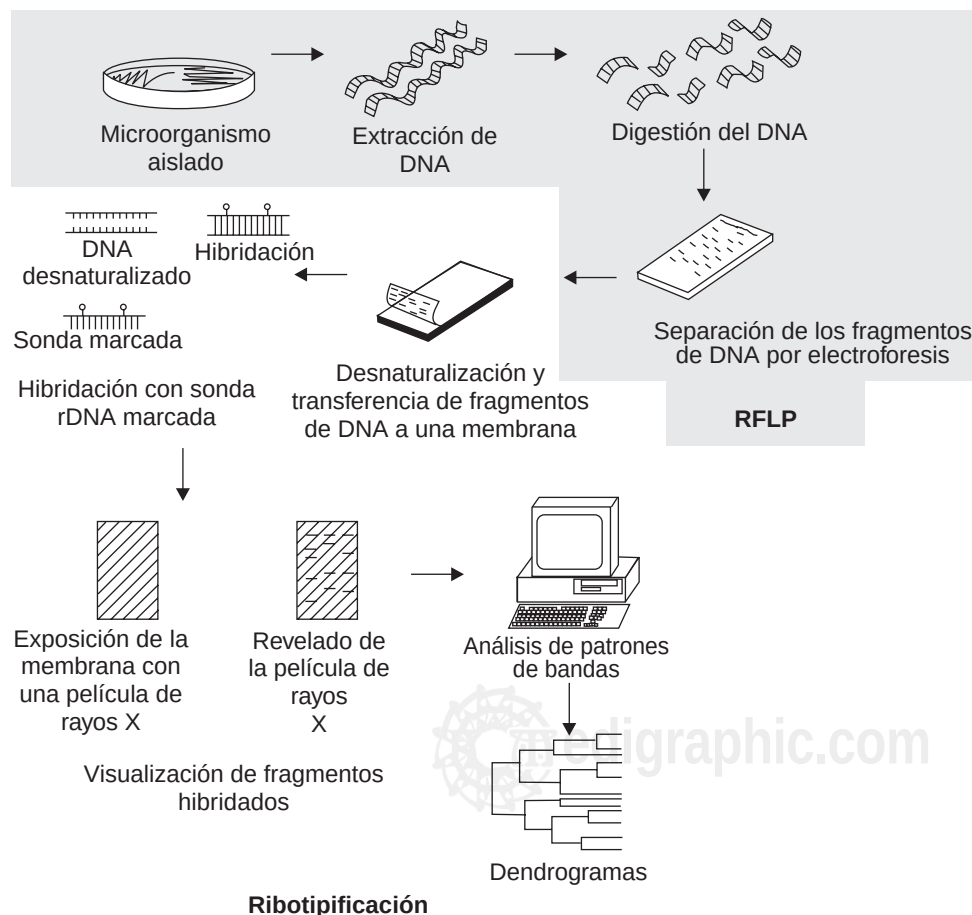


Figura 2. Clasificación de microorganismos aislados de alimentos fermentados mediante el RFLP y la ribotipificación.

cus delbrueckii ssp. *lactis*. El análisis de “huellas digitales” de RAPD de microorganismos aislados durante la fermentación tradicional de queso mozzarella reveló la presencia de 25 biotipos diferentes, incluyendo diversas especies de bacterias lácticas y de bacterias del género *Staphylococcus*.²² Asimismo, se identificaron mediante RAPD y pruebas fisiológicas lactobacilos y estafilococos coagulasa negativos como los grupos responsables de la fermentación de salchichas secas italianas.²⁸ Mediante esta misma técnica fue posible confirmar la relevancia de otorgar la denominación de origen, ya que se demostró que el queso camembert de Normandía contenía cepas de lactococos típicas de los lugares donde se producen.¹⁰

En un estudio sobre la diversidad de bacterias en la superficie de quesos madurados, Brennan y cols.⁵ aislaron 400 cepas de quesos inoculados con *Brevibacterium linens* (que produce un carotenoide rojo) y no inoculados. La mayoría de las cepas eran corynebacterias, pero fue imposible identificarlas mediante pruebas bioquímicas, por lo que utilizaron un enfoque polifásico que incluyó métodos fenotípicos, quimiotaxonomía, RAPD, PFGE (electroforesis de campos pulsados) y comparación de secuencias de rDNA 16S. En ambos tipos de quesos la mayoría de las cepas pertenecieron a las especies

Corynebacterium casei, *Corynebacterium mooreparkense* y *Mycobacterium gubbeenense*, que fueron identificadas como especies nuevas. Contrariamente a lo que se ha pensado, *B. linens* no se detectó en los quesos inoculados con esta bacteria, debido a que fue inhibido por la mayoría de los miembros de la microbiota natural.

Kunene y cols.¹⁷ utilizaron métodos fisiológicos y moleculares para caracterizar la microbiota láctica de un alimento de destete a base de sorgo fermentado. Determinaron el origen de las cepas predominantes mediante el análisis de los resultados de AFLP, encontrando que *Lactobacillus plantarum* provenía del polvo de sorgo usado como ingrediente y como las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* no mostraban un origen común, se presumió que provenían de las casas donde se preparó el alimento.

Estas metodologías son muy convenientes para clasificar e identificar rápidamente colecciones de microorganismos, sin embargo requieren del aislamiento y cultivo de los microorganismos.

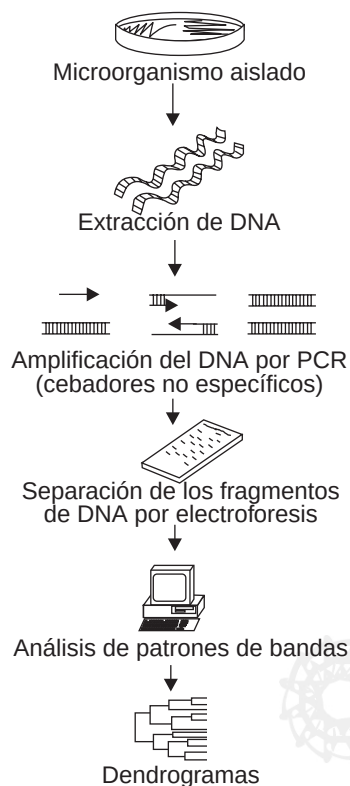


Figura 3. Análisis de colecciones microbianas aisladas de alimentos fermentados mediante el método RAPD.

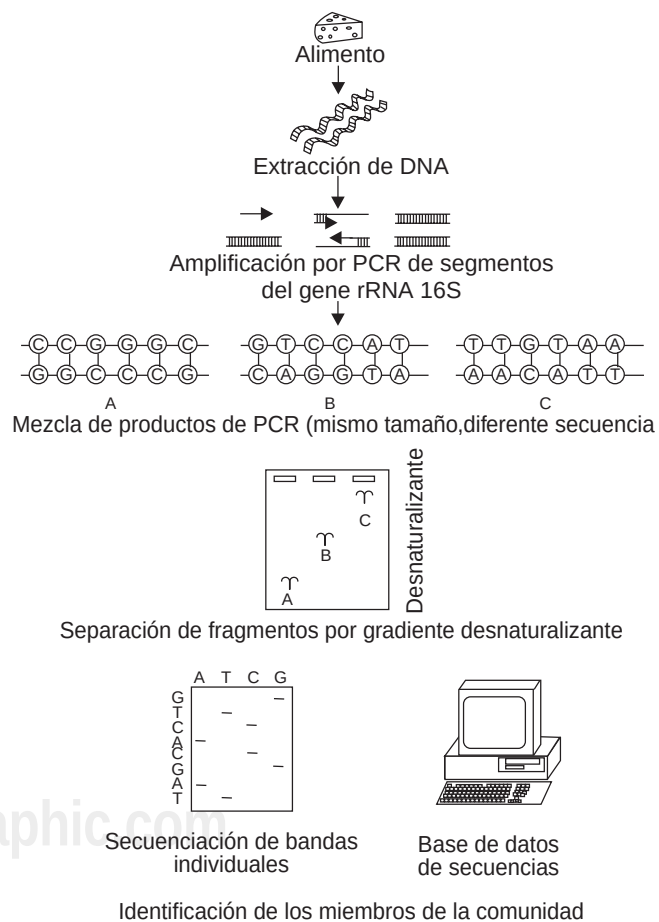


Figura 4. Obtención de “huellas digitales” de comunidades microbianas en alimentos fermentados por el método DGGE.

Análisis de comunidades complejas mediante métodos que no requieren cultivo

Debido a que se recupera un porcentaje bajo de bacterias cultivables mediante las técnicas tradicionales de diferentes ambientes naturales,¹ ha sido necesaria la búsqueda de metodologías que no dependan del cultivo de los microorganismos. Éstas han permitido explorar la diversidad microbiana, analizar la estructura de comunidades microbianas y han revelado que la diversidad microbiana es mucho mayor de lo que se había considerado.

El primer paso es la extracción y purificación del DNA de las muestras. Ésta puede ser directa (extracción del DNA total de la muestra) o indirecta (extracción de microorganismos de la muestra, seguida de la extracción de DNA de éstos). Posteriormente se amplifican, mediante PCR, ciertas regiones del gen ribosomal 16S. Dependiendo del grupo de microorganismos que se desee estudiar, se usan desde cebadores muy generales hasta muy específicos (Fig. 1).

Para la separación de los fragmentos de rDNA 16S amplificados, es necesario construir **bibliotecas de clonas de rDNA 16S**, cuya posterior secuencia y análisis permite determinar la diversidad microbiana. Es posible identificar o determinar cuáles son los microorganismos conocidos más cercanos a los miembros de la comunidad mediante la comparación de las secuencias de los fragmentos de rDNA 16S con las bases de datos, como RDP (Ribosomal Database Project) o Genbank. Escalante y cols.¹² emplearon esta estrategia para determinar la diversidad de bacterias Gram positivas del pozol, un alimento fermentado indígena de maíz. La mayoría de las secuencias se identificaron como bacterias lácticas, que ya se había reportado como el grupo predominante durante la fermentación de este alimento, pero además se detectaron especies que no habían sido aisladas mediante técnicas tradicionales de cultivo.

La obtención de "huellas digitales", que constituyen un patrón o un perfil de la diversidad genética de una comunidad microbiana, son las más utilizadas en la actualidad. En este caso se separan electroforéticamente los fragmentos de rDNA amplificados. La aplicación de electroforesis en geles con gradientes desnaturizantes, como el **DGGE** (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante) y **TGGE** (electroforesis en gel con gradiente de temperatura) permiten separar fragmentos de la misma longitud pero con diferentes secuencias, que son las características de los obtenidos mediante la amplificación de regiones de los genes ribosomales del DNA de una comunidad microbiana. De hecho es posible separar fragmentos que difieren en una sola base. Los agentes desnaturizantes (una mezcla de urea y formamida en el caso del DGGE y la temperatura en el del TGGE) provocan la separación de las cadenas do-

bles de DNA. Éstas contienen dominios con temperaturas de fusión (T_m) característicos, de manera que cuando se alcanza una determinada temperatura o concentración de desnaturizante, la molécula se funde total o parcialmente y disminuye su velocidad de migración en el gel. Las temperaturas de fusión de esos dominios dependen de variaciones en sus secuencias de bases, por lo que los fragmentos correspondientes a microorganismos diferentes tendrán diferentes posiciones en el gel. Para evitar la separación completa de las dos cadenas, se une una secuencia rica en GC (que requiere condiciones más drásticas de desnaturización), llamada grapa-GC, en el extremo 5' de uno de los cebadores, que se coamplifica con el segmento de DNA. Las bandas se visualizan generalmente tiñendo con bromuro de etidio²⁵ (Fig. 4).

Es necesario determinar cuál de las regiones variables de los genes ribosomales permiten separar los microorganismos presentes, así como optimizar el gradiente y la duración de la electroforesis para obtener la mejor separación de las bandas. Se realizan geles con gradientes perpendiculares (el gradiente es perpendicular a la dirección de la electroforesis) para conocer el mejor intervalo de temperaturas o concentraciones de desnaturizante. Se obtiene una curva con forma sigmoidea, en la que a baja temperatura o concentración de desnaturizante los fragmentos migran como cadenas dobles y a concentraciones altas como cadenas sencillas. Las condiciones útiles son las intermedias, en las que las moléculas se funden parcialmente. El tiempo óptimo, que se determina en electroforesis con gradientes paralelos, es el que permite la máxima resolución entre los fragmentos de DNA.²⁵

Ampe y cols.³ investigaron la distribución espacial de la microbiota de una bola de pozol. Utilizaron un enfoque polifásico que incluyó la obtención de huellas digitales por DGGE de fragmentos de DNA obtenidos al amplificar la región V3 de los genes de RNA 16S del DNA extraído de la masa, con cebadores específicos para eubacterias. Demostraron que bacterias del género *Streptococcus*, que no habían sido detectadas utilizando los métodos tradicionales de cultivo, predominan durante la fermentación. *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* constituyeron otro grupo predominante y también se encontraron lactococos y miembros del grupo *Leuconostoc-Weissella*. Demostraron la presencia de gradientes de poblaciones microbianas, siendo mayor la diversidad microbiana en la periferia que en el centro de la bola de masa. En otro estudio, Ben Omar y Ampe⁴ utilizaron el mismo enfoque para estudiar la dinámica de la población microbiana durante la fermentación de este alimento, encontrando que la diversidad microbiana se mantiene durante la fermentación.

Durante la fermentación del vino se desarrolla una evolución compleja de levaduras y bacterias. Se han estudiado

los microorganismos participantes utilizando principalmente métodos clásicos de microbiología; sin embargo éstos son tediosos, largos y limitados, debido a la dificultad o imposibilidad de caracterizar microorganismos difíciles de cultivar. Cocolin y cols.⁸ desarrollaron un método para obtener el perfil de la dinámica de crecimiento de levaduras mediante la separación por DGGE de fragmentos del gen de rDNA 185 amplificados por PCR. Fue posible detectar diferencias sutiles en el desarrollo y la persistencia de levaduras en dos fermentaciones.

Röling y cols.²⁹ estudiaron la ecología microbiana durante el proceso tradicional del curado de la vainilla. La vainilla natural se obtiene de las frutas de la orquídea *Vanilla planifolia*. El sabor a vainilla se obtiene durante su beneficio, que consiste de un escaldado de las vainas, posteriormente se almacenan en una caja durante 24 horas y luego se exponen a ciclos de asoleados y sudados (exposición al sol durante el día y empacado en cajas durante la noche) durante los que se desarrolla la mayor parte del sabor. Finalmente se secan y se empacan en bolsas de plástico para completar el desarrollo del sabor. Se piensa que las actividades microbianas, junto con los procesos térmicos y reacciones enzimáticas de la planta, son importantes en la generación del sabor. Como un primer paso para determinar la contribución de los microorganismos, los autores hicieron uso de la técnica DGGE de rDNA 16S/18S junto con métodos tradicionales de microbiología como parte de un enfoque polifásico para determinar la presencia y cambios de las comunidades microbianas durante el proceso del beneficio. Los mohos y levaduras desaparecieron durante el escaldado de las vainas y se detectaron números considerables de bacterias termófilas y termotolerantes del género *Bacillus* durante el curado posterior, predominando *B. subtilis* y *B. licheniformis*. El análisis de DGGE reveló que no se pudieron detectar mediante los métodos tradicionales una gran parte de los microorganismos que se desarrollaron durante la etapa de asoleado y sudado, por lo que sugirieron que el establecimiento de sus posiciones filogenéticas ayudaría a diseñar medios de aislamiento para estos microorganismos.

Es indeseable la presencia de bacterias lácticas en grandes números al principio de la fermentación de mosto para la obtención de whisky, ya que pueden competir con las levaduras por los nutrientes y reducir el rendimiento de etanol; sin embargo, se piensa que la fermentación láctica tardía tiene efectos benéficos en el sabor final de la bebida. Van Beek y Priest³⁴ determinaron la composición de la comunidad microbiana durante la fermentación de whisky de malta mediante PCR-DGGE. Detectaron 3 fases: la primera se caracteriza por el crecimiento de la levadura y la supresión del crecimiento bacteriano; durante la segunda el crecimiento bacteriano, a expensas de las células muertas

de levaduras, es exponencial y en la tercera ya no crecen las bacterias pero se acumula ácido láctico. Al principio predominaron cocos (*Streptococcus thermophilus* o *Saccharococcus thermophilus*) y al final lactobacilos relacionados con *Lactobacillus acidophilus* o *Lactobacillus crispatus* que no crecen en medios de cultivo convencionales. La producción de ácidos y de otros metabolitos por estas bacterias puede afectar el sabor de la bebida, por lo que proponen que es posible controlarlo mediante la atención cuidadosa del balance entre varias bacterias presentes.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD MICROBIANA

Además de determinar la estructura y diversidad de las comunidades microbianas, es importante saber si éstas son activas. Debido a que los microorganismos metabólicamente activos tienen mayores números de ribosomas que las células muertas, es posible evaluar esto mediante el análisis del RNA extraído de la muestra.

Uso de sondas filogenéticas. La hibridación cuantitativa del RNA extraído con sondas de oligonucleótidos para rRNA 16S permite determinar la actividad de los diferentes grupos microbianos presentes. Éstas, que se conocen como sondas filogenéticas, son fragmentos cortos (15-25 nucleótidos) de DNA de cadena sencilla, sintetizadas químicamente y con alguna marca detectable, como la fluorescencia. Todas las células vivas contienen ribosomas, la mayoría en números grandes, por lo cual la sensibilidad es excelente. Las regiones más conservadas de las moléculas de RNA se conocen como “secuencias firma” y son características para entidades taxonómicas definidas, como especies, géneros, familias, órdenes o hasta para cada uno de los 3 dominios existentes (bacteria, eucaria o arquea). Se realiza una transferencia del RNA usando sondas “anidadas” que se aplican de forma ordenada, desde las específicas para dominio hasta las de género o especie (en algunos casos hasta subespecie). Se cuantifica la cantidad de sonda unida al RNA extraído de la muestra por densitometría y se determina su proporción con respecto a la señal obtenida con una sonda universal.¹ Así, Ampe y cols.³ encontraron que las bacterias lácticas constituían del 90 al 97% de la microbiota activa total de una muestra de pozol después de 5 días de fermentación. Dentro de éstas, *Lactobacillus* y *Weissella* representaban probablemente el 50% de las bacterias lácticas activas y otro género con actividad considerable fue *Streptococcus*. La desventaja de esta técnica es que solamente se evalúan los microorganismos para los cuales existen sondas disponibles y no es posible detectar microorganismos que no han sido descritos.

Obtención de “huellas digitales” de comunidades. De la misma manera como se amplifican por PCR los genes de

rRNA 16S para posteriormente separarlos por DGGE, se amplifican los mismos usando como templado el cDNA (DNA copia) obtenido mediante transcriptasa inversa a partir del RNA extraído. Se detectan los microorganismos activos y las intensidades de las bandas indican sus actividades relativas.

La fermentación de salchichas es otro caso en el que participa una microbiota compleja. Cocolin y cols.⁹ realizaron un estudio para describir la diversidad bacteriana durante la fermentación natural de salchichas italianas mediante PCR-DGGE. Optimizaron el método utilizando cultivos de cepas de bacterias lácticas, *Staphylococcus* y *Kocuria* obtenidos de colecciones internacionales. Obtuvieron perfiles de DGGE a partir de DNA y de RNA de muestras tomadas a diferentes tiempos durante la fermentación. Se demostró la fuerte actividad de las bacterias lácticas durante la fermentación, con mayor diversidad durante las primeras horas y el predominio de *Lactobacillus sake* y *Lactobacillus curvatus*, presentes tanto en los geles obtenidos a partir de DNA como de RNA, a las que se atribuyeron los cambios físicos y sensoriales del sustrato. La principal diferencia entre los geles de DNA y de RNA fue la detección de *L. plantarum* únicamente en los primeros, cuyo producto de PCR se generó posiblemente a partir de células muertas. La técnica resultó muy conveniente, ya que permite monitorear el estado de la fermentación y obtener resultados en un tiempo corto, lo cual hace posible realizar ajustes tecnológicos inmediatos.

El ragusano es un queso artesanal de Sicilia, Italia, registrado con denominación de origen. Esto implica que sus características sensoriales son únicas y son el resultado de las condiciones ambientales locales relacionadas con su producción. Randazzo y cols.²⁷ estudiaron la evolución de los cambios microbianos durante la elaboración y la maduración de este queso utilizando técnicas microbiológicas clásicas y técnicas moleculares independientes del cultivo. Éstos incluyeron: PCR, RT-PCR y DGGE de genes de RNA 16S obtenidos al usar cebadores tanto de bacteria como específicos para el grupo *Lactobacillus* (que incluye también *Leuconostoc* y *Pediococcus*). En la leche utilizada como sustrato detectaron especies de bacterias lácticas mesófilas de *Leuconostoc* y *Lactococcus lactis*, no muy activas metabólicamente, cuyas bandas desaparecieron después de la cocción de la cuajada y también *Macrococcus caseolyticus* metabólicamente activo tanto en la leche como en la cuajada cocida. *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* predominaron durante la maduración y fueron las más activas en esta etapa, por lo que consideraron que están relacionadas con el desarrollo del sabor y el aroma del producto y que deben estar bien adaptadas a las condiciones ambientales durante la maduración de este queso. Obtuvieron perfiles semejantes a partir de

quesos obtenidos en otros dos establecimientos, lo que reafuerza la idea anterior. *L. delbrueckii*, identificada como bacteria importante en los tres quesos estudiados, no fue aislada en medios selectivos. Esto demuestra la importancia de incluir métodos independientes del cultivo para estudiar microbiotas complejas, como la que participa en la fermentación de este queso.

ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES *IN SITU*

Para el estudio de la ecología de comunidades microbianas complejas en alimentos sólidos, como son muchos de los fermentados, se requieren estudios sobre la actividad y la distribución de los microorganismos directamente en muestras intactas. Para realizar el recuento o detección de microorganismos, tanto por las técnicas tradicionales de cultivo como por las más modernas que se mencionaron anteriormente, los alimentos sólidos se maceran u homogenizan. Este procedimiento destruye la integridad estructural de los alimentos y como consecuencia, se pierde la información espacial. El análisis de los alimentos *in situ*, además de proveer esta información, evita los problemas relacionados con la extracción de los microorganismos del sustrato sólido, que no siempre se logra con buena eficiencia.

Los alimentos están constituidos por mezclas heterogéneas de diferentes compuestos y el crecimiento microbiano en cada uno de ellos difiere debido a que sus propiedades varían. Además, el crecimiento de un microorganismo en un determinado punto de un medio sólido dependerá de la difusión de nutrientes hacia él y de metabolitos tóxicos hacia el exterior. Debido a la estructura propia del alimento, existen gradientes de la concentración de nutrientes, de sustancias antimicrobianas, de pH, humedad, actividad acuosa, concentración de oxígeno, etc. Como existen microambientes con diferentes características, es erróneo suponer que las condiciones son uniformes y considerar valores promedio.³¹

La mayoría de los estudios para la identificación *in situ* y localización de microorganismos se basan en el enfoque del RNA ribosomal, debido a la disponibilidad de sondas y al alto contenido celular de ribosomas, lo que facilita la detección a nivel celular.² Para la **hibridación fluorescente *in situ* (FISH)**, se utilizan sondas filogenéticas, como las descritas anteriormente, pero en este caso se detectan directamente en las células. Para esto se fijan con alcoholes o aldehídos y se permeabilizan. Este procedimiento debe permitir la entrada de la sonda a la célula, sin modificar su integridad morfológica. Si se usan sondas marcadas con fluorocromos diferentes, es posible la identificación simultánea de varios microorganismos y su distribución tridimensional. Se debe tomar en cuenta que pueden existir

problemas de accesibilidad a ciertas regiones del RNA, causados por proteínas ribosomales.¹ Se pueden cuantificar las señales emitidas con una cámara sensible a la luz conectada a un analizador de imágenes digital.

Kollöffel y cols.¹⁶ evaluaron el uso de la técnica de hibridación *in situ* para el análisis de comunidades bacterianas en la superficie de quesos Gruyère. La cuenta en agar *Corynebacterium* representó del 10 al 15% de la obtenida cuando las células se tiñeron con DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol, que tiñe el DNA de las células independientemente de su estado fisiológico). Mostraron con esto que una parte pequeña de las células es cultivable. Detectaron la mayor parte de las bacterias con una sonda para eubacterias y utilizando sondas específicas encontraron que la mayor proporción de éstas pertenece a *Actinobacteria*, mientras que las brevibacterias constituyen una proporción pequeña. Entonces si se usa un cultivo iniciador conteniendo únicamente *Brevibacterium linens*, éste constituirá una proporción muy pequeña de la microbiota superficial del queso madurado.

El **crio-seccionamiento** (seccionamiento de una muestra después de su congelamiento en nitrógeno líquido), seguido de una tinción, permite examinar microscópicamente muestras de alimentos sólidos con un mínimo de distorsión. Así, Dodd y Waites¹¹ detectaron microorganismos *in situ* en varios alimentos, como carne fermentada, yogurt, queso y pan usando azul de toluidina, que no permite distinguir entre diferentes microorganismos. Una alternativa a las sondas filogenéticas para la tinción específica de microorganismos es el uso de **anticuerpos marcados**. Además de detectar las células, se pueden obtener anticuerpos para detectar productos microbianos o componentes del alimento. Stringer y cols.³¹ mediante una combinación de crio-seccionamiento, sondas unidas a antibióticos y tinción diferencial, determinaron a nivel microscópico la ineffectividad de una cepa de *Lactococcus lactis* para evitar la germinación de esporas de *Bacillus cereus*, debido a que las concentraciones altas de nisina solamente se encontraban alrededor de las colonias de *L. lactis* y no se extendían hasta donde se encontraban las esporas de *B. cereus*.

LIMITACIONES DE LAS TÉCNICAS

Se debe tomar en cuenta, sin embargo, que estos métodos novedosos tienen limitaciones. Los métodos de extracción de ácidos nucleicos de las muestras no aseguran la lisis de todos los microorganismos presentes y la recuperación de los ácidos nucleicos intactos. Es importante purificar los ácidos nucleicos obtenidos para eliminar sustancias que puedan inhibir la reacción de PCR o la acción de enzimas de restricción.³⁷

La reacción de PCR puede introducir errores, ya que pueden ocurrir amplificaciones preferenciales (debido a la

reasociación del DNA que se usa como templado y que evita la unión de los cebadores y que puede ser reducida añadiendo acetamida, glicerol o dimetilsulfóxido a la reacción de PCR) o a la formación de moléculas quiméricas (moléculas de rDNA híbridas que se forman cuando una molécula de DNA parcialmente elongada sirve como cebador en el siguiente ciclo de PCR), aunque éstas pueden ser detectadas, por ejemplo con el programa CHECK_CHIMERA del RDP. La formación de moléculas heteroduplex (asociación de cadenas sencillas de moléculas diferentes de DNA) durante la amplificación dificulta la interpretación de patrones de DGGE o TGGE. Ésta puede ser reducida utilizando en la reacción de PCR mayor fuerza iónica, concentraciones de cebadores mayores, menores temperaturas de asociación y disminuyendo el número de ciclos de amplificación.²⁵

Sólo pueden separarse por DGGE o TGGE fragmentos pequeños, de hasta 500 pares de bases y esto limita las inferencias filogenéticas. Aunque existen reportes sobre la posibilidad de separar secuencias que difieren en una sola base, también se ha reportado la dificultad de separar fragmentos que difieren en 2 ó 3 bases.³³ Otra limitación de estas técnicas es el número máximo de bandas de DNA que puedan separarse, aunque se ha reportado la detección de poblaciones que constituyen el 1% de la comunidad por PCR-DGGE.²³ Es posible que ocurra la co-migración de fragmentos de DNA, que provocaría la subestimación de la diversidad microbiana y la dificultad para extraer secuencias para su identificación o la sobreestimación de la diversidad debido a la microheterogeneidad en las secuencias de algunos genes, que puede ser detectada por el DGGE o TGGE.²⁵

En cuanto a los métodos *in situ*, puede no detectarse un microorganismo debido a una permeabilización insuficiente o a la falta de acceso de las sondas a las regiones a las que se unen.¹

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Muchos alimentos fermentados se producen con la participación de una microbiota compleja. Para producirlos en condiciones más controladas que aseguren su calidad e inocuidad es importante profundizar en el estudio de su microbiología. Esto permitirá la selección adecuada de cultivos iniciadores, en los casos que se considere conveniente, así como el monitoreo y control de la fermentación. Los avances recientes en los métodos para el análisis de comunidades microbianas hacen posible complementar a los métodos tradicionales para obtener información sobre aspectos importantes de la ecología microbiana de alimentos fermentados: diversidad, estructura y función. Es posible responder las preguntas ¿Qué microorganismos se encuentran en el alimento? ¿Cuáles presentan actividad o mayor

actividad? ¿Cómo cambian las poblaciones microbianas durante la fermentación o al variar factores ambientales? ¿Cómo interactúan los microorganismos entre sí y con el ambiente? ¿Dónde se encuentran los microorganismos? Es particularmente relevante la posibilidad de detectar microorganismos que no se recuperan en medios de cultivo y la de obtener, mediante el uso de técnicas menos laboriosas, resultados en tiempos más cortos que con los métodos clásicos de microbiología.

El siguiente paso para obtener una idea más detallada de la organización y el funcionamiento de comunidades microbianas en alimentos fermentados, será la detección de su actividad. Esto se ha logrado, sobre todo en el área de la microbiología ambiental, mediante el análisis de genes funcionales. Mientras la detección de rRNA mediante FISH o hibridación dot blot o DGGE/TGGE da una idea de la actividad microbiana (debido a que concentraciones grandes de ribosomas indican potencial de síntesis de proteínas), para la detección y/o localización de actividades específicas, sería necesario cuantificar los mRNAs particulares. La tecnología de los microarreglos, que constituye un avance de los métodos de hibridación *in situ* o de dot blot, permitiría comprender la expresión de genes específicos. Se unen arreglos ordenados de oligonucleótidos a una matriz sólida usando métodos automatizados de síntesis y para evaluar la expresión de los genes se realizan hibridaciones competitivas (o métodos más precisos⁶) con diferentes poblaciones de mRNA expresado ante diferentes condiciones de cultivo. Esto se lleva a cabo con equipos automatizados, de forma que se realiza el análisis simultáneo de una gran cantidad de genes. La detección de los genes y de sus niveles de expresión se obtienen mediante el análisis de las señales fluorescentes usando una cámara CCD y un analizador de imágenes.^{30,32} Una de las ventajas del uso de los microarreglos es la rapidez con la que es posible obtener una gran cantidad de datos; sin embargo, se han reportado diferencias significativas en los resultados obtenidos por investigadores diferentes que usan los mismos diseños experimentales. Esto se ha atribuido a diferencias pequeñas en las condiciones experimentales.³⁵

Por otra parte, el uso de microelectrodos² cuyas puntas tienen diámetros menores de 1 µm, permitiría cuantificar gradientes de temperatura, de pH y de compuestos químicos (nutrientes, metabolitos). Esto permitiría un mejor conocimiento del hábitat y de los procesos metabólicos que se llevan a cabo.

Todos estos avances tecnológicos permitirán la caracterización detallada *in situ* de las poblaciones microbianas en los alimentos fermentados, tanto al nivel de la composición poblacional como al de los cambios bioquímicos. El mejor conocimiento sobre la vida microbiana en estos alimentos permitirá no sólo diseñar cultivos iniciadores adecuados, sino monitorear y controlar el desarrollo y la actividad de

las poblaciones microbianas complejas que se requiere actúen en ciertos alimentos fermentados.

AGRADECIMIENTO

Al Ing. Alejandro González M. por su valiosa colaboración en la realización de las figuras.

REFERENCIAS

1. Amann R. I. 1995. Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Mol. Ecol.* 4:543-554.
2. Amann R. & M. Kühn. 1998. *In situ* methods for assessment of microorganisms and their activities. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:352-358.
3. Ampe, F., N. Ben Omar, C. Moizan, C. Wachter & J. P. Guyot. 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(12):5464-5473.
4. Ben Omar, N. & F. Ampe. 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough Pozol. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(9):3664-3673.
5. Brennan N. M., A. C. Ward, T. P. Beresford, P. F. Fox, M. Goodfellow & T. M. Cogan. 2002. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(2): 820-830.
6. Cho J.-C. & M. Tiedje. 2002. Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(3):1425-1430.
7. Cocconcelli P.S., M. G. Parisi, L. Senini & V. Botazzi. 1997. Use of RAPD and 16S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population dynamics in natural whey culture. *Lett. Appl. Microbiol.* 25:8-12.
8. Cocolin L., L. F. Bisson & D. A. Mills. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* 189:81-87.
9. Cocolin L., M. Manzano, C. Cantoni & G. Comi. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA Gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(11):5113-5121.
10. Corroler, D., I. Mangin, N. Desmasures & M. Guegen. 1998. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12):4729-4735.
11. Dodd C. E. R. & W. M. Waites. 1991. The use of toluidine blue for *in situ* detection of micro-organisms in foods. *Lett. Appl. Microbiol.* 13, 220-223.
12. Escalante, A., C. Wachter & A. Farrés. 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 64:21-31.
13. Fleet G. H. 1999. Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 50:101-117.
14. Giraffa G. & E. Neviani. 2001. DNA-based, culture independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 67:19-24.
15. Hugenholtz P., B. M. Goebel & N. R. Pace. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180(18):4765-4774.
16. Köllhoff B., L. & Meil M. Teuber. 1999. Analysis of *brevibacteria* on the surface of Gruyère cheese detected by *in situ* hybridization and by colony hybridization. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:317-322.

17. Kunene N. F., I. Geornaras, A. von Holy & J. W. Hastings. 2000. Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented weaning food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(3):1084-1092.
18. Liu W., T. Marsh, H. Cheng & L. J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(11):4516-4522.
19. Lyhs U., J. Björkroth & H. Korkeala. 1999. Characterization of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout using ribotyping. *Int. J. Food Microbiol.* 52:77-84.
20. Madigan M. T., J. M. Martinko & J. Parker. 2000. *Brock, Biology of Microorganisms*. 9th ed. Prentice Hall International, Inc. USA.
21. Morea M., F. Baruzzi, P. Cappa & P. S. Cocconcelli. 1998. Molecular characterization of the *Lactobacillus* community in traditional processing of Mozzarella cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 43:53-60.
22. Morea M., F. Baruzzi & P. S. Cocconcelli. 1999. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *J. Appl. Microbiol.* 87:574-582.
23. Muyzer G., E. C. de Waal & A. G. Uitterlinder. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
24. Nyström T. 2003. Nonculturable bacteria: programmed survival forms or cells at death's door? *BioEssays* 25:204-211.
25. Muyzer G. & K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek* 73:127-141.
26. Pace N. R. 1996. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *Features* 62(9):463-470.
27. Randazzo C. L., S. Torriani, A. D. L. Akkermans, W. M. de Vos & E. E. Vaughan. 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4):1882-1892.
28. Rebecchi A., S. Crivori, P. G. Sarra & P. S. Cocconcelli. 1998. Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 84:1043-1049.
29. Röling W. F. M., J. Kerler, M. Braster, A. Apriyantono, H. Stam H. W. van Verseveld. 2001. Microorganisms with a taste for vanilla: microbial ecology of traditional indonesian vanilla curing. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(5): 1995-2003.
30. Sinibaldi R., C. O'Connell, C. Seidel & H. Rodríguez. 2001. Gene expression analysis on medium-density oligonucleotide arrays, pp.211-222. In: Rampal J.B. (Ed). *DNA Arrays, methods and protocols. Methods in Molecular Biology* Vol. 170. Humana Press, New Jersey.
31. Stringer S. C., C. E. R. Dodd, M. R. A. Morgan & W. M. Waites. 1995. Detection of microorganisms *in situ* in solid foods. *Trends Food Sci. Technol.* 6:370-374.
32. Southern E.M. 2001. DNA Microarrays, history and overview, pp. 1-15. In: Rampal J.B. (Ed). *DNA Arrays, methods and protocols. Methods in Molecular Biology* Vol. 170. Humana Press, New Jersey.
33. Vallaes T., E. Topp, G. Muyzer, V. Macheret, G. Laguerre & G. Soulas. 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24:279-285.
34. van Beek S., & F. G. Priest. 2002. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(1):297-305.
35. Vasil M. L. 2003. DNA microarrays in analysis of quorum sensing: Strengths and limitations. *J. Bacteriol.* 185(7):2061-2065.
36. Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuipe & M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21):4407-4414.
37. Wilson I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(10):3741-3751.

Correspondence to:

Dra. Carmen Wachter Rodarte
 Departamento de Alimentos y Biotecnología,
 Facultad de Química, UNAM.
 04510 México, D.F.
 México.
 Tel. / Fax: +52 (55) 56 22 53 15.
 E-mail: wacher@servidor.unam.mx