



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.**

**Facultad de Ciencias Químicas.**

**Departamento de Microbiología.**

**Identificación Fenotípica y Genotípica de Bacterias Ácido Lácticas aisladas de Aguamiel y Pulque con Actividad Antimicrobiana frente a Bacterias asociadas a Enfermedades Transmitidas por Alimentos.**

Tesis presentada como requisito para obtener el Título de Licenciatura en  
Químico Farmacobiólogo



**Presenta:** Ricardo Carrasco Torres.

**Directora:** M.C Laura Martínez Pérez.

**Asesor:** D.C. Juan Carlos Benítez Serrano.

Noviembre/2019.



## **Dedicatoria**

**A los que más amo, la familia en cuál empecé a existir y la que me dio una razón por la cuál existir...**



### Agradecimientos:

Principalmente, le agradezco a la mujer que me dio la vida y con ello permitir conocerla, que ha sido mi motivación para superarme día con día, que supo educarme con amor, comprensión, valores y sobre todo con un especial sentido humano, gran ejemplo de ser, mi madre.

A mis hermanos y a su familia, personas que representan mucho en mi vida, a los que amo y agradezco su existencia.

A todos mis amigos y su familia, a quienes amo y si enunciase la lista sería larga, les vivo infinitamente agradecido por su amistad, enseñanzas y, sobre todo, el apoyo que me han brindado en cada una de mis etapas de la vida, personas que se convirtieron en conocidos, amigos que se volvieron hermanos y su familia que se volvió mi familia, les guardo siempre en la mente y eternamente agradecido, faltan palabras para poder expresarlo. Sólo espero siempre poder regresar la ayuda que me han brindado.

A mi directora y asesor de tesis, que de ser profesores se convirtieron en amigos, les agradezco su enseñanza, amistad, paciencia, el conocimiento compartido y todos los momentos que se han compartido.

A mis amigos, compañeros, socios, hermano y tío putativo de MTM México, a quienes amo, gracias por todo el apoyo hasta ahora.

A las mujeres que me han enseñado el arte de la amistad, el querer y el amor, gracias por regalarme momentos y aprendizaje.

A la familia Serrano Hernández, de verdad gracias por todo.

A los profesores de la Facultad que tuvieron la paciencia para soportarme y enseñarme.

A la BUAP, por regalarme los mejores amigos desde la preparatoria hasta la universidad.



**Universidad Autónoma de Puebla**  
**Facultad de Ciencias Químicas**



**No hay razones más fuertes por la cuál vivir que el amor representado en cada fragmento que compone la vida.**



Trabajo presentado sobre el desarrollo de la investigación:



*Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.*

FUNDADA EN 1957

AVE. CIPRESSES S/N COL. SAN ANDRÉS TOTOLTEPEC  
C.P. 14400 MÉXICO, D.F.  
APARTADO POSTAL 70-006, CIUDAD UNIVERSITARIA  
TEL. Y FAX: (55)5622-5742  
http://www.smbc.org.mx  
Correo Electrónico: smbca@fco.unam.mx

MESA DIRECTIVA 2015 - 2017

PRESIDENTE  
DR. MIGUEL LARA FLORES

VICE-PRESIDENTE  
DRA. IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO

SECRETARÍA TESORERA  
DRA. ELDA GUADALUPE ESPIN OCAMPO

SUB-SECRETARÍA TESORERA  
DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Barberín Arreguín Lozano  
Dr. Edmundo Calva Cuadrilla  
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval (†)  
Dr. Joaquín Cravioto (†)  
Dr. Carlos del Río Estrada (†)  
Dr. Silvestre Frenk Freund  
Dr. Mario García Hernández (†)  
Dr. Jesús Guzmán García (†)  
Dr. Jesús Kumate Rodríguez  
Dr. José Laguna García (†)  
Dr. Guillermo Massieu Helguera (†)  
Dr. Raúl Oncarza Vidaurreta  
Dr. Efraín G. Pardo Codina  
Dr. Guillermo Soberón Acevedo

Otorga la presente

**CONSTANCIA** a:

**Ricardo Carrasco Torres**

Quien asistió y presentó el trabajo:

**Antagonistic activity of a Lactobacillus sp strain isolated from environment against bacteria associated with foodborne diseases**

Por:

**Ricardo Carrasco Torres, Juan Carlos Benítez Serrano, Azarel Ruíz Román, Patricia Aguilar Alonso, Gloria León Tello, Laura Martínez Pérez**

En la modalidad de cartel durante el XXXI Congreso Nacional de Bioquímica del 6 al 11 de noviembre de 2016 en Aguascalientes, Ags.

Atentamente  
Por el Comité Organizador

**Dr. Miguel Lara Flores**  
Presidente



## Índice

<b>1.0</b>	<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2.0</b>	<b>Marco Teórico</b> .....	<b>2</b>
2.1	Definición del grupo de BAL .....	2
2.1.1	Orden <i>Lactobacillales</i> .....	3
2.1.2	Géneros representativos del grupo de las BAL .....	4
2.1.3	Clasificación de BAL de acuerdo con su metabolismo de carbohidratos. ....	5
2.1.4	Potencial antimicrobiano de las BAL .....	6
2.2	Aguamiel y Pulque .....	7
2.2.1	Diversidad microbiana y bioquímica del proceso de fermentación .....	7
2.2.2	Bioquímica de la fermentación .....	8
2.3	ETA .....	11
2.3.1	Bacterias causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos de mayor importancia en México. ....	11
2.3.2	Características generales de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	12
2.3.3	Características generales de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> , serovar typhi ( <i>S. enterica</i> serovar typhi) .....	13
2.3.4	Características generales de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica serotipo O157:H7 (EHEC O157:H7) .....	14
2.3.5	Características generales de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	15
<b>3.0</b>	<b>Marco de Referencia</b> .....	<b>17</b>
<b>4.0</b>	<b>Planteamiento del Problema</b> .....	<b>18</b>
<b>5.0</b>	<b>Justificación</b> .....	<b>19</b>
<b>6.0</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>20</b>
<b>7.0</b>	<b>Hipótesis</b> .....	<b>21</b>
<b>8.0</b>	<b>Diseño del Estudio</b> .....	<b>22</b>
<b>9.0</b>	<b>Material y Metodología</b> .....	<b>24</b>
9.1	Identificación fenotípica .....	24
9.2	Evaluación de antagonismo .....	24



9.3	Identificación Genotípica .....	26
9.3.1	PCR de colonia. ....	26
9.3.2	Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1%.....	27
9.3.3	Purificación del gel.....	27
9.3.4	Secuenciación de ADN.....	27
<b>10.0</b>	<b>Esquema General de Trabajo.....</b>	<b>28</b>
<b>11.0</b>	<b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>32</b>
11.1	Resultados obtenidos en la identificación fenotípica de las BAL .....	32
11.2	Resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antimicrobiana de las BAL.....	34
11.2.1	EHEC O157:H7 ATCC 70092 y <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	34
11.3	Descripción fenotípica de las cepas aisladas de aguamiel con actividad antimicrobiana ( Ag1.13A, Ag1.18M, Ag1.23M y Ag1.27M).....	40
11.4	Resultados obtenidos en la identificación genotípica de las BAL .....	42
11.4.1	PCR y electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1% .....	42
11.4.2	Secuenciación de los amplicones obtenidos en la PCR.....	43
<b>12.0</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>47</b>
<b>13.0</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>48</b>
<b>14.0</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>54</b>



## Índice de Tablas y Figuras

### Tablas:

<b>Tabla 1.-</b> Taxonomía de las BAL de mayor importancia biotecnológica.....	3
<b>Tabla 2.-</b> Tabla de la diversidad microbiológica aislada e identificada del pulque y aguamiel. 9	
<b>Tabla 3.-</b> Características macroscópicas de las colonias aisladas de pulque y aguamiel .....	32
<b>Tabla 4.-</b> Cantidad de colonias aisladas de las muestras de pulque y aguamiel con las características correspondientes al grupo de las BAL.....	32
<b>Tabla 5.-</b> Caracterización bioquímica y morfológica de las 30 colonias aisladas de aguamiel y pulque .....	33
<b>Tabla 6.-</b> Resultados obtenidos en el ensayo de difusión en agar frente a EHEC O157:H7 ATCC 70092 .....	35
<b>Tabla 7.-</b> Resultados obtenidos en el ensayo de difusión en agar frente a <i>S. aureus</i> ATCC 25923. ....	36
<b>Tabla 8.-</b> Resultado de los ensayos de antagonismo realizados por duplicado de las colonias obtenidas de aguamiel frente a <i>S. enterica</i> serovar typhimurium ATCC 14028, <i>B. cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , EHEC O157:H7 ATCC 70092 y <i>S. aureus</i> ATCC 25923 .....	38
<b>Tabla 9.-</b> Descripción macroscópica a 48 h de incubación, por 37°C, en agar MRS de las colonias aisladas de aguamiel.....	40
<b>Tabla 10.-</b> Descripción del crecimiento en un medio líquido (caldo MRS) a 37°C, 24h, 150 rpm de las colonias aisladas de aguamiel. ....	41
<b>Tabla 11.-</b> Tamaño de los amplicones obtenidos de las colonias aisladas de aguamiel usando los cebadores E9F y E939R.....	44
<b>Tabla 12.-</b> Análisis de las secuencias del gen 16s rRNA en la base de datos EMBL de las cepas caracterizadas.....	45



**Figuras:**

**Figura 1.-** Cultivo de cepas de desafío a 24 h en agar Mueller Hinton. A) EHEC O157:H7 ATCC 70092 y B) *S. aureus* ATCC 25923.....34

**Figura 2.-** Ensayo de difusión en agar de las cepas aisladas de aguamiel frente a: a) EHEC O157:H7 ATCC 70092 y b) *S. aureus* ATCC 25923. Control (+): *Lactobacillus paracasei* KSI y control (-): Caldo MRS.....37

**Figura 3.-** Fotos de los ensayos de antagonismo sin inhibición de las cepas aisladas de pulque y aguamiel frente a: A) EHEC O157:H7 ATCC 70092 y B) *S. aureus* ATCC 25923. ....37

**Figura 4.-** Cultivo de cepas de desafío a 24 h, en agar Mueller Hinton A) *Salmonella enterica* serovar typhimurium ATCC 14028 B) *B. cereus* y C) *L. monocytogenes*. ....38

**Figura 5.-** Ensayo de difusión en agar de las cepas aisladas de aguamiel frente a: a) *S. enterica* serovar typhimurium ATCC 14028 y b) *B. cereus*. Control (+): *Lactobacillus paracasei* KSI, control (-): Caldo MRS.....38

**Figura 6.-** Ensayo de difusión en agar de las cepas aisladas de aguamiel frente a *L. monocytogenes*. Control (+): *Lactobacillus paracasei* KSI, control (-): Caldo MRS. a) Foto de frente sin distinción de inhibición, b) foto frente a luz, distinción de halos de inhibición.....39

**Figura 7.-** Cultivo de 48 h de las cepas aisladas de aguamiel donde: A) agar MRS; B) caldo MRS y C) Tinción de Gram de Ag1.13 A, Ag1.18M, Ag1.23M Ag1.27M y *L. paracasei* KSI .....41

**Figura 8.-** Electroforesis de la PCR de colonia en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, Carril 2: Ag1.18M, Carril 3: Ag 1.23M, Carril 4: Control (+), Carril 5: Ag1.27M, Carril 6: Ag1.13A y Carril 7: Control (-). ....43

**Figura 9.-** Electroforesis de la purificación de los productos obtenidos en la PCR de colonia, con el Kit de purificación Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZYMO RESEARCH). Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, Carril 2: Ag1.18M, Carril 3: Ag 1.23M, Carril 4: Control (+), Carril 5: Ag1.27M, Carril 6: Ag1.13 A. ....44

**Figura 10.-** Electroferograma de la secuencia de la cepa Ag1.13 A, analizado con el software Finch TV.....54



<b>Figura 11.-</b> Electroferograma de la secuencia de la cepa Ag1.18M, analizada con el software Finch TV.....	55
<b>Figura 12.-</b> Electroferograma de la secuencia de la cepa Ag1.23 M, analizada con el software Finch TV.....	56
<b>Figura 13.-</b> Electroferograma de la secuencia de la cepa Ag1.27 M, analizada con el software Finch TV.....	57



### Lista de abreviaturas

°C	Grados Celsius
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico ribosómico
AMH	Agar Mueller Hinton
ARNr	Ácido Ribonucleico
AST	Agar Soya Trypticasa
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosín Trifosfato
BAA	Bacterias Ácido Acéticas
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
ECEAg	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
ECEH	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ECEI	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ECEP	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ECET	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de Toxina Shiga
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ETA	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
G/L	Grados Gay Lussac
IAE	Intoxicación Alimentaria Estafilocócica
mL	Mililitro
MRS	Man Rogosa y Sharpe
OMS	Organización Mundial de Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrogeno
rpm	Revoluciones por minuto
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
SEP	Síntesis de Extra Polisacáridos
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
TAE	Tris Acetato EDTA
Stx	Toxina Shiga
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
µL	Microlitro



## Resumen

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias de morfología bacilar, cocoide o bacilar corta, Gram positivas, con metabolismo homo y heterofermentativo, responsables de la fermentación de un gran número de alimentos, estas tienen la capacidad de coexistir con plantas y animales enriqueciendo el medio donde se desarrollan, a través del producto de su metabolismo y muchos de estos con actividad inhibitoria. Por ello, el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar BAL con capacidad de inhibir bacterias asociadas a Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) de dos muestras de aguamiel y dos muestras de pulque, donde aislaron 30 colonias con características macroscópicas pertenecientes al grupo de las BAL las cuales fueron evaluadas mediante ensayos de difusión en agar en primer lugar, frente a *Escherichia coli* O157:H7 American Type Culture Collection (ATCC) 70092 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, obteniendo halos de inhibición de 14 mm y 12.75 mm respectivamente y conservando únicamente las cepas que presentaron inhibición total, posteriormente contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* donde se exhibió una de inhibición total de 13 mm, 14.5 mm y 12 mm respectivamente. Finalmente se realizó la identificación molecular de las cuatro cepas que presentaron mejor actividad antimicrobiana, las cuales fueron identificadas como BAL perteneciente al género y especie de *Lactobacillus paracasei*.



## 1.0 Introducción

Las BAL son bacterias con morfología celular en forma de coco, bacilos, y cocobacilos Gram positivas, sin actividad de las enzimas catalasa y oxidasa, y que metabolizan los carbohidratos, por ello, forman parte de un gran número de procesos fermentativos, además, algunas cepas poseen actividad antimicrobiana frente a algunas bacterias patógenas, por estas cualidades se integran en distintos ecosistemas aportando beneficios a su alrededor, por ejemplo, algunas cepas pertenecientes al grupo de las BAL, como *Leuconostoc* sp. y *Lactobacillus* sp. forman parte del consorcio microbiológico encargado de la fermentación de la savia fresca del “maguey” pulquero conocida como aguamiel para generar la bebida tradicionalmente mexicana conocida como “pulque”. Dentro del estudio de estas bacterias se ha registrado su capacidad antimicrobiana frente a cepas causantes de ETA como *E. coli*, *S. enterica* y *L. monocytogenes*. Tomando en cuenta que en el año 2015 la Organización Mundial de Salud (OMS) estimó que existen aproximadamente 600 millones de casos de ETA anualmente, provocando 420 000 muertes, de las cuales 230 000 son a causa de agentes etiológicos asociados a enfermedades entéricas como: *Escherichia coli*, y *S. enterica*, es importante el estudio del entorno para coadyuvar al desarrollo de soluciones que aporten a la prevención de ETA, y el uso racional de BAL con capacidad antimicrobiana puede representar una alternativa al problema que enfrenta el mundo globalizado.



## 2.0 Marco Teórico

Las bacterias son organismos vivos sin núcleo, también llamados procariontes (*pro*, antes; *carios*, núcleo) presentes en todos los rincones de la tierra, viviendo como células únicas o en comunidades que tienen la capacidad de crecer, reproducirse y modificar profundamente su entorno. Poseen una amplia capacidad de adaptabilidad y por esa razón se encuentran poblando casi todos los nichos biológicos de la naturaleza: en las ventilas termales de los abismos oceánicos, en los estómagos e intestinos de los organismos complejos, en las raíces de algunas plantas y en las salinas, por dar algunos ejemplos. También, son responsables de mantener la homeóstasis, como los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno, azufre y hierro, indispensables para la continuidad de la vida<sup>1</sup>.

### 2.1 Definición del grupo de BAL

El uso microorganismos para la obtención de alimentos fermentados y como métodos de conservación de estos como data de hace miles de años, pero no fue sino hasta la aparición del microscopio que se observó su existencia por primera vez, en 1668 por A. Leeuwenhoek<sup>2</sup>. En 1857 que Louis Pasteur describe su interacción con los alimentos, fue ahí donde se inicia la investigación de microorganismos en alimentos<sup>3</sup>.

Las BAL forman parte del grupo de microorganismos presentes en alimentos estudiados a través del tiempo, actualmente, se analiza a manera de detalle la funcionalidad de estas bacterias en una amplia variedad de alimentos, plantas y animales, el papel que desempeñan en el medio en el que se desarrollan, por ejemplo, como fermentadores principales, conservadores naturales, brindadores de características organolépticas y funcionalidad en alimentos. En plantas y animales forman parte del microbiota, brindando nutrimentos esenciales para su desarrollo o protección frente a patógenos, y en humanos específicamente la importancia de su actividad antiinflamatoria, anticolesterolémica y antimicrobiana. Para ello se tuvo que observar, aislar, purificar, identificar, clasificar, organizar y definir el grupo de bacterias que compartían características morfológicas, metabólicas y fisiológicas similares, en el cual se incluía el orden de las *Lactobacillales* y las *Bifidobacteriales*, gracias al nacimiento de la filogenia molecular y el aporte de Carl R. Woese sobre la comparación de secuencias de ARN ribosómico. En los años 60, se pudo establecer un sistema evolutivo, con el análisis de



las secuencias de ADN de ambas bacterias, y con ello la separación en ordenes distintos, por un lado, el orden de las *Lactobacillales* perteneciente a la clase *Bacilli* y por otro, las *Bifidobacteriales* en la clase *Actinobacteria*<sup>4</sup>.

En el manual de Bergey's de 1986 se define al grupo de las "BAL" como **grupo** heterogéneo de microorganismos **Gram positivos** cuya característica principal es la **producción de ácido láctico** a partir de **la fermentación de carbohidratos**<sup>5</sup>, teniendo un significado ambiguo, pudiendo referirse tanto a bacterias del orden *Lactobacillales* exclusivamente, o al conjunto de bacterias del **orden *Lactobacillales* y *Bifidobacteriales***<sup>4</sup>.

### 2.1.1 Orden *Lactobacillales*

Las BAL propiamente dichas, pertenecen al filo *Firmicutes*, formando un grupo bastante heterogéneo de bajo contenido en G+C, dentro de la clase *Bacilli* y el orden *Lactobacillales*, conteniendo 7 familias (*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae* y *Acetoanaerobium*) y distribuyéndose en más de 19 géneros (*Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, entre otros). Las características que comparten la mayoría de estas bacterias son: la morfología **cocoide, bacilar o cocobacilar**, **Gram positivos**, **no esporulados**, **aerotolerantes**, **microaerófilicos o anaerobios facultativos**, **mesófilos**, **no poseen citocromos**, **catalasa negativos** (en algunos casos pueden presentar actividad de pseudocatalasa), **acidófilos o acidotolerantes**, **de metabolismo quimiorganótrofo** y **estrictamente fermentativo**, produciendo **ácido láctico** como **principal producto** de la fermentación<sup>6,7</sup>. Dentro de este grupo se encuentran géneros de mayor importancia en la aplicación biotecnológica tanto en el desarrollo de alimentos funcionales, como en la caracterización de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.

<b>Reino</b>	Bacteria
<b>Filo</b>	<i>Firmicutes</i>
<b>Clase</b>	<i>Bacilli</i>
<b>Orden</b>	<i>Lactobacillales</i>
<b>Familias</b>	<i>Aerococcaceae</i> , <i>Carnobacteriaceae</i> , <i>Enterococcaceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Leuconostocaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> , <i>Acetoanaerobium</i>
<b>Géneros</b>	<i>Carnobacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> , <i>Weissella</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Vagococcus</i> , <i>Tetragenococcus</i> , entre otros).

**Tabla 1.-** Taxonomía de las BAL de mayor importancia biotecnológica.



### 2.1.2 Géneros representativos del grupo de las BAL

**Lactococcus** actualmente contiene 12 especies (*L. fujiensis*, *L. garvieae*, *L. lactis*, *L. piscicum*, entre otras)<sup>7</sup> y es representado por la especie tipo *Lactococcus lactis*, con dos subespecies *lactis* y *cremoris*. Las bacterias de este género son **cocos dispuestos individualmente**, en **pares** o **cadena cortas**, con carácter homofermentativo y especies capaces de crecer a 7°C o menos<sup>8</sup>.

**Leuconostoc** actualmente contiene 18 especies (*L. mesenteroides*, *L. pseudomesenteroides*, *L. citreum*, *L. kimchii*, entre otras.)<sup>7</sup>. Generalmente son **cocos ovoides** que en mayoría de los casos están **dispuestos en cadenas**, intrínsecamente **resistente a la vancomicina**. Todo el género tiene **carácter heterofermentativo** y pueden producir **dextranos a partir de sacarosa**<sup>9</sup>.

**Pediococcus** actualmente contiene 9 especies (*P. acidilactici*, *P. cellicola*, *P. claussenii*, *P. damnosus*, entre otras.)<sup>7</sup>. Estas bacterias **suelen disponerse en pares o tétradas**, y se dividen a lo largo de dos planos de simetría, como *Tetragenococcus* y *Aerococcus* y **son estrictamente homofermentativos**<sup>10</sup>.

**Streptococcus** actualmente contiene más de 50 especies<sup>7</sup>. La división celular en este género se produce a lo largo de un eje único en estas bacterias, por lo que **se disponen en cadenas o pares**. **Existen especies patógenas para el ser humano**, siendo las más importantes los ***Streptococcus* alfa-hemolíticos** (*S. pneumoniae* y *S. viridans*) y **beta-hemolíticos** de los grupos A y B de acuerdo con la **clasificación de Lancefield**. Algunos *Streptococcus* de uso alimenticio pertenecen al grupo viridans, pseudotaxonomía empleada para referirse a especies que no poseen antígenos de Lancefield y son **alfa-hemolíticas** como *S. thermophilus*, y no hemolíticas<sup>11</sup>.

**Lactobacillus** actualmente contiene más de 180 especies (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, entre otros.) Este género posee una **morfología de bastón**, una alta **tolerancia al peróxido de hidrógeno**, muchos *Lactobacillus* poseen **metabolismo homofermentativo**, y algunas especies, **heterofermentativo**. Son **aerotolerantes a pesar de la ausencia completa de la cadena respiratoria**<sup>12</sup>.



Los resultados de la taxonomía molecular, la determinación del tipo de peptidoglucano, las propiedades de ciertas enzimas (como lactato deshidrogenasa), la determinación del isómero del ácido láctico y la hibridación ADN-ADN, han permitido dividir a los *Lactobacillus* en tres grupos que cubre, bajo nuevas definiciones, los **grupos de Orla- Jensen**<sup>6</sup>.

### 2.1.3 Clasificación de BAL de acuerdo con su metabolismo de carbohidratos.

En 1993, Axelsson, estableció la clasificación de bacterias lácticas con **respecto al metabolismo de carbohidratos**, agrupándolas en tres categorías: **Homofermentativas obligadas, heterofermentativas obligadas y heterofermentativas facultativas**<sup>6</sup>:

- I. **Homofermentativas obligadas:** estas bacterias (*Lactobacillus* del grupo I) oxidan la glucosa y otras hexosas hasta ácido láctico a través de la vía fermentativa Embden-Meyerhof- Parnas, mediante la participación de la enzima llamada fructosa 1,6-difosfato aldosa. Estas bacterias carecen de las enzimas glucosa 6- fosfato deshidrogenada y 6- fosfogluconato deshidrogenasa, debido a ello no son capaces de fermentar las pentosas ni el gluconato<sup>6</sup>.
- II. **Heterofermentativas obligadas:** estas bacterias (*Leuconostoc* y *Lactobacillus* de grupo III) degradan la glucosa y otras hexosas hasta ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético o etanol y las pentosas hasta ácido láctico y ácido acético, a través de la ruta metabólica de las pentosas fosfato, con la participación de la enzima fosfocetolasa y carecen de la enzima 1,6-difosfato aldosa<sup>6</sup>.
- III. **Heterofermentativas facultativas:** el resto de las bacterias lácticas (*Lactobacillus* del grupo II, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* y *Tetragenococcus*) fermentan las hexosas casi exclusivamente hasta ácido láctico por la vía Embden- Meyerhof- Parnas, pero algunos microorganismos a pesar de no presentar la enzima fosfocetolasa, en condiciones limitantes de carbohidratos y anaerobiosis, producen además ácido fórmico, ácido acético y etanol. Con lo que respecta a la utilización de las pentosas, la mayoría de estos microorganismos son capaces de fermentarlas por acción de fosfocetolasa inducible, produciendo cantidades equivalentes de ácido láctico y ácido acético<sup>6</sup>.



Por otra parte, las **bacterias lácticas** también pueden **metabolizar disacáridos** como la **lactosa y sacarosa**, mediante un **sistema de permeasa dependiente de Adenosín Trifosfato (ATP)** o del **sistema fosfotransferasa dependiente del fosfoenolpiruvato** (Sistema PEP-PTS) y son desdoblados hasta sus monosacáridos correspondientes, los cuales son utilizados en el proceso fermentativo, para producir ácido láctico y otros metabolitos<sup>6</sup>.

#### 2.1.4 Potencial antimicrobiano de las BAL

Con frecuencia el medio ambiente es incapaz de permitir la vida de un gran número de organismos. Aún un medio rico tiene límites con respecto al número de organismos que puede alimentar y constantemente son diferentes tipos de ellos los que buscan disfrutarlo y desarrollarse en él. Cuando esto sucede con frecuencia no hay otro camino que la guerra entre organismos de una u otra especie que no permiten invadir a otros su territorio, como lo hacen las plantas que liberan al suelo sustancias tóxicas para otras plantas. Las bacterias no son la excepción a la regla y disponen de distintos mecanismos para evitar la coexistencia con otros organismos de distinta especie. Éstas son sustancias que segregan al medio paralizándolo o causando la muerte a los microorganismos, plantas y animales, en conjunto reciben el nombre de antibióticos y toxinas<sup>13</sup>.

Las bacterias lácticas y sus **productos antimicrobianos** son los reactivos bio-conservadores de grado alimenticio más famosos, con varias aplicaciones en industrias alimenticias y farmacéuticas, estos consisten principalmente en **ácido orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, isómeros de aminoácidos y bacteriocinas con actividad antibacteriana, antifúngica y antiparasitaria**<sup>14</sup>, diferenciándose de acuerdo al tipo de mecanismo que exhiben como **inespecíficos** (ácidos orgánicos, diacetilo, acetaldehído, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno) o **específicos** (reuterina, BLS, isómeros de aminoácidos y bacteriocinas).



## 2.2 Aguamiel y Pulque

El **aguamiel** es un líquido translúcido, de color ámbar claro, dulce, de fluencia fresca y ligeramente ácido, con olor y sabor sui géneris. El **pulque** es una bebida tradicional mexicana producida y consumida en distintos estados del país, su elaboración data de la época prehispánica siendo un símbolo de misticismo entre las distintas culturas. Esta bebida es el producto de la **fermentación** de la **savia** de distintas especies de maguey (*A. americana*, *A. atrovirens*, *A. feroz*, *A. mapisaga*, *A. salmiana*) conocida como aguamiel, obteniendo un líquido blanco, viscoso, con olor fuerte, ligeramente ácido y con un contenido alcohólico de 4-7° grados Gay Lussac, dicho proceso de fermentación es llevado a cabo por un **consorcio microbiológico** que le confiere particularidades **organolépticas** y **funcionales**<sup>15,16</sup>.

### 2.2.1 Diversidad microbiana y bioquímica del proceso de fermentación

La **fermentación** del pulque es un proceso discontinuo que no requiere agitación y se realiza en condiciones **no asépticas**. La **fermentación** es llevada a cabo por un consorcio de microorganismos presentes en el microbiota **de la savia**, en la **acumulación en el cajete** y los que se incorporan en la **recolección, transporte, preparación y manipulación de semillas**<sup>16,17</sup>.

En los primeros estudios microbiológicos realizados al pulque, se identificó la presencia de **BAL** homo y heterofermentativas (*Lactobacillus* sp. *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc dextranicum*), la **levadura** (*Saccharomyces cerevisiae*) como *S. Carbajali* y la  **$\alpha$ -proteobacteria** (*Zymomonas mobilis*) como *Pseudomonas lindneri*<sup>18</sup>. Los productos metabólicos que generan estos microorganismos durante la fermentación sirvieron de referencia para determinar la **microbiota esencial** y el proceso para la obtención de pulque, a partir de esto, el grupo de investigación de Sánchez Marroquín obtuvo una bebida fermentada con las mismas características organolépticas y fisicoquímicas (aroma, sabor, contenido alcohólico, acidez y viscosidad), con un **inóculo mixto de los microorganismos** (mencionados con anterioridad) y una **fermentación controlada de aguamiel**<sup>19</sup>.



Por otra parte, a través de estudios minuciosos de la diversidad microbiana del pulque, se sugiere una clasificación de acuerdo con las principales características organolépticas presentes durante la fermentación de la savia del maguey y los aspectos metabólicos de los microorganismos involucrados en esta:

- I) **Bacterias productoras de ácido** (principalmente BAL y Acido Acéticas (BAA))
- II) **Microorganismos productores de alcohol** (principalmente *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*)
- III) **Bacterias productoras de dextranos y fructanos** (*L. mesenteroides* y *Z. mobilis*)
- IV) **Microorganismos putrefactivos** (géneros de  $\alpha$ - proteobacterias)

Los microorganismos involucrados en el proceso de fermentación del pulque **se han aislado sistemáticamente en la meseta central de México**<sup>16,17</sup>. En la actualidad el papel específico de diversos microorganismos, particularmente los dominantes en la fermentación de aguamiel y pulque, y los que participan en la producción de aminoácido esenciales, vitaminas y una variedad de compuestos volátiles, siguen siendo objeto de estudio<sup>16</sup>.

### 2.2.2 Bioquímica de la fermentación

Los estudios de aguamiel y pulque han revelado una compleja diversidad de microorganismos, que **varía** de acuerdo a su **origen geográfico** y a la **especie de maguey**, por mencionar algunos factores, lo que ha llevado a proponer una clasificación de la fermentación del pulque en función sus las propiedades sensoriales, los principales productos metabólicos obtenidos durante el proceso (ácidos orgánicos, etanol, fructanos, dextranos, y ácido acético) y los microorganismos identificados con mayor abundancia en el pulque (BAL, levaduras, BAA).

- I. **Fermentación ácida:** desempeñada principalmente por BAL homo y heterofermentativas, como especies de *Lactobacillus* sp. y *Leuconostoc* sp.<sup>16,17,18,19</sup>. Dada por el metabolismo de carbohidratos a través de la ruta catabólica de glucosa disponible para piruvato, la ruta Embden-Meyerhof, y su posterior conversión a ácido láctico y otros como ácido acético, CO<sub>2</sub> y etanol<sup>16,20</sup>.



- II. Fermentación alcohólica:** llevado a cabo por *S. cerevisiae* y en menor grado la  $\alpha$ -proteobacteria *Z. mobilis*, a partir del metabolismo de carbohidratos como la sacarosa, glucosa y fructuosa en aguamiel. La bacteria *Z. mobilis* convierte azúcares fermentables eficazmente en etanol y CO<sub>2</sub>, por la vía Entner-Doudoroff<sup>16,21</sup>.
- III. Síntesis de Extra Polisacáridos (SEP):** realizada por especies de *Leuconostoc*, incluyendo *L. mesenteroides* y *L. kimchii*, y resultado de la producción exopolisacáridos de dextranos y fructanos a partir del metabolismo de la sacarosa y a través de enzimas como glucosil- y fructosiltransferasas, respectivamente<sup>22,23</sup>.
- IV. Fermentación ácido acética:** proceso desempeñado probablemente BAA, como las especies de *Acetobacter* y *Gluconobacter*<sup>16</sup>. Las BAA producen ácido acético como producto principal de la oxidación de azúcares, alcohol de azúcares y etanol, llevadas a cabo por la actividad enzimática de las enzimas alcohol- y aldehído- deshidrogenasas ubicadas en la membrana externa de *G. oxydans* que cataboliza preferentemente azúcares, y *Acetobacter* sp. en menor medida, también, estas bacterias son capaces de producir ácido glucurónico y oxidan varios ácidos orgánicos, incluyendo el ácido láctico a CO<sub>2</sub> y agua<sup>24</sup>.

En la **Tabla 2** se muestran los microorganismos actualmente caracterizados en aguamiel y pulque.

**Tabla 2.-** Tabla de la diversidad microbiológica aislada e identificada del pulque y aguamiel.

Bacteria	Levaduras/ Fungi	Principales rasgos metabólicos que definen las propiedades sensoriales de aguamiel y pulque
<i>Lactobacillus</i> sp. <i>mesenteroides</i> , <i>Zymomonas mobili</i>	<i>Leuconostoc</i> <i>L. dextranicum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Microorganismos esenciales responsables de la producción del ácido (ácido láctico), alcohol y SEP.



Levaduras aisladas de aguamiel: *Candida lusitanae*, *Klyuveromyces marxianus* var *bulagricus* (+), *S. cerevisiae*  
Levaduras aisladas de pulque: *C. valida* (+), *S. cerevisiae* (*chevalieri*), *S. cerevisiae* (*capensis*), *K. marxianus* var *lactis* (+).

Varios aislamientos de *C. valida*, *S. cerevisiae* (*chevalier*) aislados de pulque pudieron resistir a > 10% de alcohol. Potencial relevancia en la producción de etanol durante la fermentación y resistencia a toxinas asesinas.

*Acetobacter aceti*, *A. aceti* subsp. *xylinus*, *Bacillus simplex*, *B. subtilis*, *Cellulomonas* sp., *Escherichia* sp., *Kokuria rosea*, *Lactobacillus* sp., *L. delbrueckii*, *L. vermiforme*, *Leuconostoc* sp., *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Macrococcus caseolyticus*, *Micrococcus luteus*, *Sarcina* sp., *Z. mobilis* subsp. *mobilis*.

*Cryptococcus* sp., *Candida parapsilosis*, *Clavispora lusitanae*, *Debaryomyces carsonii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Klyuveromyces lactis*, *K. marxianus*, *Geotrichum candidum*, *Pichia* sp., *P. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *Rhodotorula* sp., *R. mucilaginosa*, *Saccharomyces bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *Torulaspora delbrueckii*

Microorganismos esenciales responsables de la fermentación láctica y acética (BAL y BAA), la fermentación alcohólica (*Z. mobilis* y *S. cerevisiae*), la producción de SEP (*Leuconostoc* sp.) y bacterias putrefactivas.

El análisis de las bibliotecas de clones del 16S ADNr permitió identificar a *Lactobacillus acidophilus*, *L. kefir*, *L. acetotolerans*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*, *L. pseudomesenteroides*, *Acetobacter pomorum*, *Gluconobacter oxydans*, *Zymomonas mobilis*, *Flavobacterium jhonsonae*, *Hafnia alvei*.

La bacteria homofermentativa *L. acidophilus* fue identificada como el microorganismo más abundante en tres muestras analizadas de diferentes orígenes geográficos, lo que sugiere un posible papel esencial en la fermentación del ácido láctico. *L. mesenteroides* estuvo presente en baja proporción respecto a los *Lactobacillus*, *Z. mobilis* y BAA fueron detectadas en bajo porcentaje o ausentes. Posible presencia de bacterias putrefactivas o contaminantes.

La combinación de un cultivo y bibliotecas de 16s ADNr permitió identificar aquellos microorganismos presentes en aguamiel recién recolectado y durante 6 h de fermentación  
 $\alpha$ -proteobacteria: *Acetobacter malorum*<sup>a</sup>, *A. orientalis*<sup>b</sup>, *Z. mobilis* subsp. *Pomaceae*<sup>b</sup>,  $\gamma$ -Proteobacteria: *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp.<sup>a</sup>, *E. agglomerans*<sup>a</sup>, *Erwinia rhapontici*<sup>d</sup>, *Kuyvera acorbata*<sup>c</sup>, *K. cochleae*<sup>a</sup>, *Providencia* sp.<sup>a</sup>, *Serratia grimensii*<sup>a</sup>, *Acinetobacter radiosistens*<sup>b</sup>, *Estereofotoponia* sp.<sup>a</sup>. Firmicutes: *Bacillus* sp.<sup>a</sup>, *B. licheniformis*<sup>a</sup>, *Lactobacillus* sp.<sup>c</sup>, *L. acidophilus*<sup>b</sup>, *L. hilgardii*<sup>b</sup>, *L. paracollinoides*<sup>b</sup>, *L.*

*S. cerevisiae*<sup>b</sup>

*Leuconostoc citreum* y *L. kimchi* especies de BAL fueron identificadas de manera abundante aguamiel y pulque previamente fermentado, *L. acidophilus* y *L. mesenteroides* fueron las BAL más abundantes durante 6 h de fermentación. *E. agglomerans* no perteneciente a las BAL, fue la más abundante durante las primeras 3 h de fermentación. *Z. mobilis* y las BAA estuvieron ausentes en aguamiel, pero se detectaron en bajas proporciones durante el proceso de fermentación. La cuenta total de BAL y bacterias mesofílicas aerobias (UFC/mL), fueron constantes durante 6 h de fermentación. La cuenta total de levaduras (UFC/mL) detectada en aguamiel aumento después de mezclar



*sanfranciscensis*<sup>b</sup>, *Lactococcus* sp.<sup>a</sup>, *L. lactis*<sup>a</sup>, *L. lactis* susp. *lactis*<sup>a</sup>, *Leuconostoc kimchi*<sup>c</sup>, *L. citreum*<sup>c</sup>, *L. gasocomitatum*<sup>b</sup>, *L. mesenteroides*<sup>c</sup>, *L. pseudomesenteroides*<sup>c</sup>, *Pediococcus urinaeequi*<sup>a</sup>, *Streptococcus deviesei*<sup>a</sup>.

aguamiel con pulque fermentado, incrementando hasta las 3 h y se mantuvo hasta el final de la fermentación.

## 2.3 ETA

Son **enfermedades** originadas por la **ingesta** de **alimentos** o **agua** que contengan **agentes etiológicos** en **cantidades suficientes** para afectar la salud del consumidor en nivel individual o en grupos de población. Los principales síntomas son caracterizados por: diarrea, vómitos, náuseas, dolores abdominales, dolores musculares, dolores de cabeza y fiebre<sup>25</sup>.

### 2.3.1 Bacterias causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos de mayor importancia en México.

La falta de inocuidad alimentaria en México representa un severo problema que hasta ahora sigue pasando desapercibido. Las normas mexicanas con las que se cuenta para la detección de microorganismos patógenos, indicadores y/o deterioradores presentes en alimentos son escasas, centrándose en bacterias como los **patotipos de *E. coli*, *S. enterica*, *L. monocytogenes*, *Vibrio cholerae* y *Staphylococcus aureus***. La falta de inversión en investigaciones de ETA propias del país genera bajo desarrollo económico, pérdidas humanas, materias primas y costos elevados en el control de brotes y se presenta como un problema de carácter mundial.

Las bacterias causantes de ETA de mayor importancia en México, descritas hasta ahora, de acuerdo con la Foodborne Disease Burden, pertenecen al grupo de enfermedades entéricas como: *Aeromonas* sp., ***E. coli* Enterohemorragica (ECEH)**, *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigenica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEAg), *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* serovares O1/O139, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, ***Salmonella enterica* subsp. *enterica*, serovar Typhi/ Paratyphi**, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* spp. no tifoidea, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*,



*Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, y *S. aureus* <sup>26</sup>.

El grupo de las bacterias causantes de ETA es muy diverso, de distinto Gram y mecanismo de acción; relacionándose de acuerdo con el tipo de patogenia que originan como causantes de infecciones superficiales, invasivas, toxiinfecciones e intoxicaciones.

Las infecciones superficiales son producidas por bacterias con factores de virulencia asociados a membranas, como antígenos somáticos (O), flagelar (H) o capsular (K), por otra parte, las infecciones de tipo invasivas son causadas por bacterias que poseen la capacidad de introducirse en una célula específica del sistema digestivo para proliferar y diseminarse, como *L. monocytogenes* y *S. enterica serovar Typhi*. Las toxiinfecciones son originadas por bacterias que poseen factores de adherencia, y una vez adheridas a las células gastrointestinales estas sintetizan exotoxinas capaces de hacer un cambio fisiológico a estas como la toxina colérica o las toxinas Shiga (TxS) producida por *E. coli O157:H7* y por último se encuentran las bacterias responsables de intoxicaciones alimentarias, donde la patogenia está directamente ligada con la ingesta únicamente de toxinas generadas por las bacterias al proliferar en el alimento, por ejemplo, las toxina emética sintetizada por *B. cereus* y la toxina estafilocócica sintetizada por *S. aureus* <sup>27,28</sup>.

### 2.3.2 Características generales de *Listeria monocytogenes*

Es una bacteria bacilar **Gram positiva**, descrita por Joseph Lister (1827-1912), **no forma esporas**, **anaeróbica facultativa**, puede crecer a **temperaturas bajas** (0°C), posee **motilidad vía flagelos** a 30°C, pero no a 37°C, catalasa y oxidasa negativa, expresa beta- hemolisina y **crece en un rango de pH 4-9.6**.

Existen 13 patotipos de *L. monocytogenes* de los cuales más del 90% de los aislados en humanos pertenece a solo tres: 1/2a, 1/ 2b y 4b, este último serotipo es responsable del 33% de casos humanos esporádicos en todo el mundo, así mismo, este microorganismo es capaz de causar enfermedades de distinta índole dependiendo de su estadía, conociéndose como **listeriosis** cuando es de **carácter invasivo** o **gastroenteritis febril** cuando esto no sucede,



siendo un microorganismo intracelular facultativo. Las manifestaciones clínicas de listeriosis incluyen **septicemia**, **meningitis** (o meningoencefalitis), **neumonía**, e **infecciones intrauterinas** o **cervicales en mujeres embarazadas**, que pueden provocar **aborto espontáneo** (del segundo al tercer trimestre de embarazo) o **muerte fetal**. Los síntomas gastrointestinales, como náuseas, vómitos y diarrea, pueden preceder en las formas más graves de listeriosis o pueden ser los únicos síntomas expresados.

Los alimentos que se asocian con casos de listeriosis son: leche cruda o mal pasteurizada, queso suave (poco tiempo de maduración), con un pH > 5, helados, verduras crudas como ensalada de col, alfalfa, carne de res, aves, y pescado (crudos, cocinados, ahumados y fermentados). La dosis infectiva varía de acuerdo con el serotipo de la cepa y con la susceptibilidad del consumidor, en grupos de riesgo como inmunocomprometidos o inmunosuprimidos es de **10<sup>2</sup> células viables** y en caso de población sana aumenta a **10<sup>4</sup>**, teniendo una tasa de mortalidad del **20-30%** <sup>29,30</sup>.

### 2.3.3 Características generales de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, serovar typhi (*S. enterica* serovar typhi)

Es una bacteria **Gram negativa**, con **forma de bastón** e **intracelular**, **anaerobio facultativo**, el género fue descrito por Theobald Smith (1859-1934) - Daniel Elmer Salmon (1850-1914). No forma esporas, con **movilidad** a través de **flagelos peritricos**, quimiótrofos, crece en un rango de **pH 3.8-9.5**, obtienen su energía de reacciones de oxidación y reducción usando fuentes orgánicas, y cuyo reservorio natural es el ser humano.

Este microorganismo origina la enfermedad conocida como **fiebre tifoidea** o simplemente **tifoidea**, esta es una infección que puede presentarse de seis a treinta días después de la exposición con el agente etiológico. Las manifestaciones clínicas que se presentan con mayor frecuencia son: la aparición **gradual de fiebre alta durante varios días**, **dolor abdominal**, **debilidad**, **estreñimiento** y **dolor de cabeza**, los vómitos no suelen ser graves y la diarrea es poco común y en los casos severos se puede presentar confusión<sup>31</sup>.

Los alimentos que se asocian con casos de tifoidea son: leche cruda o mal pasteurizada, alimentos congelados, huevo, carne de hamburguesa, pollo, agua, helado de crema, queso



cheddar, chocolate y agua. Con una dosis infectiva  $10^4$ - $10^9$  células viable /g en pacientes sanos, y de acuerdo con las estimaciones realizadas por la OMS, cada año se enferman entre 11 y 20 millones de personas, de las cuales fallecen entre 128,000 y 161,000<sup>31</sup>.

### 2.3.4 Características generales de *Escherichia coli* enterohemorrágica serotipo O157:H7 (EHEC O157:H7)

Es una bacteria **Gram negativa**, anaerobia facultativa con **forma de bastón**, **no forma esporas**, **crece** en un rango de **pH 4.4-6.7**, el género fue descrito por primera vez por Theodor Escherich (1857-1911). La mayoría de las cepas de *E. coli* **son inofensivas**, colonizan el tracto **gastrointestinal de humanos y animales como biota normal**, sin embargo, existen cepas que han evolucionado al adquirir factores de virulencia a través de plásmidos, transposones, bacteriófagos y/o islas de patogenicidad y clasificándose en función de estos: ECEH, ECEP, ECET, ECEI y en ECEAg y en ECEH que se define como un patotipo sintetizador de toxinas Shiga causante de la **colitis hemorrágica** y el **síndrome urémico hemolítico en humanos**. La característica distintiva de la colitis hemorrágica producida por ECEH es el desarrollo de **diarrea sanguinolenta varios días después del inicio de la diarrea no hemorrágica y dolor abdominal**, no hay presencia de fiebre o se presenta en baja intensidad. La **patogenia** de la enfermedad **está relacionada** con al menos **dos factores de virulencia bacteriana: moléculas de adhesión** y la **producción citotoxinas**. El síndrome urémico hemolítico (SUH) típico, es una enfermedad causada por cepas virulentas productoras de toxinas Shiga de *E. coli* (ECTS), donde el cuadro clínico incluye **anemia hemolítica microangiopática**, **trombocitopenia** y **síndrome de disfunción multiorgánica** y afecta principalmente el riñón, sistema digestivo, nervioso y en ocasiones corazón y páncreas. ECEH al colonizar el intestino y dañar la barrera epitelial, libera las toxinas al torrente sanguíneo provocando daño en las células diana de los distintos órganos, como la insuficiencia renal, la cual, actualmente no existe un tratamiento efectivo para la enfermedad<sup>32,33</sup>.



Los alimentos asociados a infecciones causadas por EHEC, son carnes cruda y mal procesada, germinados, verduras, jugos no pasteurizados, leche cruda, algunos productos lácteos y cárnicos fermentados, teniendo una **dosis infectiva  $10^6$ - $10^{10}$  células viable /g** en pacientes sanos. El **10%** de los pacientes con infección por ECTS, pueden desarrollar la **SUH**, con una **tasa de letalidad de 3-5% de manera global**, de los cuales el 50% de los sobrevivientes, suelen tener complicaciones post-infección como insuficiencia renal crónica, hipertensión y padecimientos neuronales<sup>34</sup>.

### 2.3.5 Características generales de *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria **Gram positiva**, dispuesta en **pares o racimos**, **anaerobio facultativo**, **catalasa positiva**, **no forma esporas**, **crece** en un rango **pH 4-9.6**, descrita por primera vez por Sir Alexander Ogston (1844-1929) y nombrada por Friedrich Julius Rosenbach (1842-1923). Existen cepas de *S. aureus* que a menudo promueven infecciones cutáneas, respiratorias, intoxicación alimentaria y debido a la aparición de cepas resistentes a la meticilina (SARM) se ha convertido en un **problema en salud clínica, alimentaria y hospitalaria a nivel mundial**. La intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE), se origina cuando se consumen alimentos contaminados con las **enterotoxinas estafilocócicas**, que forman parte del grupo conocido como: **superantígenos toxina pirogénicos (PTSAgs)**, que causan **gastroenteritis**, estimulan el **peristaltismo intestinal** y el **sistema nervioso central**, esto se manifiesta a través de vómitos, que acompañan a la enfermedad gastrointestinal<sup>35</sup>.

Los alimentos involucrados con intoxicaciones estafilococias son: jamón, carnes curadas, rellenos de pastel, queso fresco, leche cruda, yema de huevo, puré de papa y pollo cocido; aún no se han reportado estimaciones de la **dosis específica**, sin embargo, en 2003 Asao et al., reportaron una dosis de **20 a 100 nanogramos** en un brote de IAE **por persona en Japón**. La tasa de letalidad es baja y sólo se han descrito casos en Estados Unidos de América y la región de países bajos<sup>26,36</sup>.

### 2.3.6 Características generales de *Bacillus cereus*



Es una bacteria **Gram positiva** en forma de **bastón alargado**, aerobia o anaerobia facultativa, móvil, **beta- hemolítica** y **forma endoesporas** en posición central o paracentral, crece en un rango de **pH 2-11**. Es un **microorganismo saprófito presente en animales y plantas**, descrito como causante de intoxicaciones por Steinar Hauge (1914-1976) y **produce** al menos **7 tipos de toxinas**: la cereulida (toxina emética), tres enterotoxinas (hemolisina BL o HBL, no- hemolítica o NHE y enterotoxina T o EntT), y tres fosfolipasas, las cuales son causantes del **síndrome emético** y **diarreico**. Actualmente se investiga su comportamiento como patógeno oportunista por su alta resistencia a métodos de desinfección, esterilización y conservación de alimentos<sup>37</sup>.

El **síndrome emético** se caracteriza por **náuseas** y **vómitos**, estos síntomas se desarrollan entre **1 a 5 h** del consumo del alimento contaminado con la toxina preformada, ésta estimula el nervio vago aferente a través de la unión con el receptor de serotonina. La toxina es un depsipéptido llamado **cereulida**, su producción ocurre en la **fase estacionaria del crecimiento del microorganismo**, y se acumula en el alimento a medida que transcurre el tiempo<sup>38</sup>.

Los alimentos relacionados con la intoxicación son: carne, leche cruda, en polvo, fermentada o pasteurizada, frutas, verduras budines, jamones enlatados, alimentos desecados, margarinas, comida china y helados de crema. En 2005, se obtuvo una concentración **1.6 microgramos de toxina/g** de alimento, de la toxina emética en un brote de intoxicación alimentaria por **B. cereus**, en Finlandia, pero no se han reportado muertes por síndrome emético causado por este microorganismo<sup>26</sup>.



### 3.0 Marco de Referencia

Escalante et al., 2004 realizaron la primera identificación de la diversidad microbiana detrás de la fermentación del pulque mediante el análisis secuencial de biblioteca de clones de ADNr 16s de tres muestras distintas de pulque provenientes de diferente demografía, de la cual como resultado de la identificación de la diversidad bacteriana obtuvo un dominio del 80.97%, de especies de *Lactobacillus*, como *L. cepa ASF360*, *L. kefir*, *L. acetotolerans*, *L. hilgardii*, *L. plantarum* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*<sup>42</sup>.

En el 2004 Forney et al., describen una secuencia de oligonucleótidos de amplio espectro para la amplificación del gen ARNr 16s empleado en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) conocidos como primers universales (E9F y E939R) y utilizados en la identificación genotípica de bacterias<sup>41</sup>.

Balouri et al., en el 2016, describen distintas metodologías para la de evaluación in vitro de la susceptibilidad antimicrobiana, como la técnica de difusión en agar en pozo en el cual se deposita en un volumen del agente antimicrobiano en una placa preformada con la cepa desafiante se incuba en condiciones óptimas y se evalúa a través de la presencia de halos de inhibición después de un periodo de tiempo establecido<sup>40</sup>.

Giles- Gómez et al., en el 2016 llevaron a cabo la evaluación probiótica de una cepa aislada de pulque identificada como *Leuconostoc mesenteroides* P45, donde se determinó su actividad antimicrobiana frente a bacterias asociadas a enfermedades gastrointestinales como *E. coli* enteropatógena (EPEC), *L. monocytogenes* y *S. enterica* serovar typhi y typhimurium vía *in vitro* y a través de ensayos de difusión en agar en donde obtuvieron halos de inhibición de 6.5 a 8.5 mm de los extractos fermentados libres de células<sup>43</sup>.



#### 4.0 Planteamiento del Problema

En la estimación de la OMS sobre la carga mundial de ETA realizada en el 2015, se señala que existen aproximadamente 600 millones de casos de ETA anualmente, provocando 420 000 muertes y de las cuales los agentes causantes de enfermedades diarreicas son responsables de aproximadamente 230, 000 muertes. En América 77 millones de personas padecen de ETA al año y 9, 000 perecen. Desafortunadamente en México no se cuenta con la información suficiente para calcular problema de salud pública que genera el consumo de alimentos insalubres, así como la disminución de la calidad de vida, gastos gubernamentales e industriales para el tratamiento, control y/o prevención de las enfermedades y brotes. De los distintos factores que pueden originar ETA, las bacterias son los microorganismos responsables de un gran número de patologías como las enfermedades diarreicas y sus complicaciones (fiebre tifoidea, SHU, listeriosis, etc.). Actualmente en México se han identificado como agentes etiológicos causantes de enfermedades por consumo de alimentos a patotipos y especies de los géneros: *Escherichia*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Brucella*, *Clostridium* y *Staphylococcus*, presentes en una gran diversidad de alimentos y ecosistemas.

Partiendo de la diversidad microbiológica de bacterias lácticas presente en el aguamiel y pulque y los estudios reportados acerca su actividad antimicrobiana frente a cepas asociadas a enfermedades gastrointestinales se planteó aislar, evaluar e identificar bacterias lácticas con actividad antimicrobiana frente a bacterias asociadas a ETA (*S. enterica* serovar typhimurium ATCC 14028, *E. coli* O157:H7 ATCC 70092, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* y *L. monocytogenes*). Sugiriendo el planteamiento de la siguiente pregunta científica:

**¿Existe actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas aisladas de aguamiel y pulque frente a bacterias asociadas a ETA?**



## 5.0 Justificación

Las ETA representan un problema de salud mundial, existen 600 millones de casos al año que generan baja calidad de vida, enfermedades crónicas, gastos, y muertes cada año, por ello es necesario contribuir con investigaciones como la identificación de BAL con actividad antimicrobiana en aguamiel o pulque, que forman parte de nuestros alimentos en México, para ofrecer alternativas de prevención, contribuyendo a la mejora de la calidad de vida, la reducción de gastos, y sobre todo de enfermedades crónicas y muertes. Estas alternativas pueden darse a través de la creación de métodos de conservación de alimentos, estudios *in vivo* e *in vitro* del efecto probiótico de las BAL, desarrollo de alimentos funcionales, caracterización de los metabolitos con actividad antimicrobianas, suplementos alimenticios, entre otras cosas, de fácil acceso y seguras.



## 6.0 Objetivos

### General:

1. Identificar BAL aisladas a partir de aguamiel y pulque con actividad antimicrobiana frente a bacterias asociadas a ETA.

### Específicos

1. Identificar fenotípicamente colonias con características pertenecientes al grupo de bacterias lácticas a través de la descripción macroscópica y microscópica de colonias aisladas, con el uso de un medio selectivo (BD Difco™ MRS), la técnica de tinción de Gram y pruebas de oxidasa y catalasa.
2. Evaluar actividad antimicrobiana, a través ensayos de difusión en agar del extracto libre de células de colonias aisladas y pre caracterizadas, frente a cepas asociadas a ETA como *S. enterica* serovar typhimurium ATCC 14028, *E. coli* O157:H7 ATCC 70092, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* y *L. monocytogenes*, previamente caracterizadas por el departamento de microbiología.
3. Identificar genotípicamente cepas de mayor espectro de inhibición, a través de la amplificación del gen 16s rRNA, con el empleo de la técnica PCR, corrimiento electroforético y secuenciación de los productos, recuperados de la electroforesis a través del Kit de purificación Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZYMO RESEARCH).



## 7.0 Hipótesis

**H0:** No existe actividad antimicrobiana de las BAL aisladas de aguamiel y pulque frente a cepas bacterianas asociada a ETA.

**H1:** Existe actividad antimicrobiana de las BAL aisladas de aguamiel y pulque frente a cepas bacterianas asociada a ETA.



## 8.0 Diseño del Estudio

### a) Tipo de estudio

El tipo de estudio se orienta según el análisis de los resultados y su alcance, como un estudio prospectivo, transversal, descriptivo y observacional.

### b) Universo del estudio

BAL aisladas de 2 muestras de aguamiel y 2 muestra de pulque.

### c) Tamaño de muestra

- 15 cepas presuntivas BAL aisladas de aguamiel.
- 15 cepas presuntivas BAL aisladas de pulque.
- 5 cepas asociadas a ETA (*S. enterica* serovar typhimurium ATCC 14028, *E. coli* O157:H7 ATCC 70092, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* y *L. monocytogenes*).

### d) Sede y lugar del estudio

Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Químicas, BUAP.

### e) Criterios de selección

#### Inclusión:

1. Colonias que presenten las siguientes características en agar MRS en condiciones de aerofilia y microaerofilia; forma: puntiforme, irregular o circular de 2-5mm; borde: entero o lobulado; elevación: convexa y elevada; textura: lisa o rugosa.
2. Bacterias con morfología bacilar corta, cocoide o cocobacilar Gram positivas, sin formación de esporas, no móviles, catalasa y oxidasa negativas.
3. Aislados que presenten halos visibles de inhibición en los ensayos de antagonismo frente a las bacterias asociadas a ETA: *E. coli* O157:H7 ATCC 70092 y *S. aureus* ATCC 25923, *S. enterica* serovar typhimurium ATCC 14028, *B. cereus* y *L. monocytogenes*.



**Exclusión:**

- Cepas que no cumplan con los criterios de inclusión

**f) Recursos humanos**

Directora: M.C Laura Martínez Pérez.

Asesor: D.C Juan Carlos Benítez Serrano.

Tesista: pQFB. Ricardo Carrasco Torres.

**g) Recursos financieros**

Aportados por la directora y el asesor de tesis.

**h) Diseño estadístico**

Estadística descriptiva: Tablas de datos.



## 9.0 Material y Metodología

### 9.1 Identificación fenotípica

Un total de 4 muestras fueron analizadas, 2 muestras de aguamiel y 2 de pulque, las cuales se inocularon por duplicado en alícuotas de 1mL en tubos con caldos MRS, que es un medio selectivo, y se incubaron a 37°C por 48h. Posteriormente se sembraron asadas por estría cruzada en agar MRS dejándose incubar en condiciones de aerobiosis y microaerofilia a 37°C hasta la aparición de unidades formadoras de colonias (UFC). La selección de colonias se realizó bajo los siguientes criterios de la descripción macroscópica: forma, borde, elevación, textura y características secundarias: pigmentación, olor consistencia y comportamiento óptico<sup>44</sup>, y las características coloniales descritas para bacterias lácticas: forma: puntiforme, irregular o circular de 2-5mm, bordes enteros o lobulados, con distinto tipo de elevación predominando la convexa y elevada, textura lisa<sup>39</sup>, a las cuales se les realizó tinción de Gram, catalasa y oxidasa, conservando las colonias puras en agar MRS/48h/37°C.

Se utilizaron como controles de tinción la cepa *S. aureus* ATCC 25923 como Gram positivo y *P. aeruginosa* ATCC 27853 como Gram negativo, para las pruebas de catalasa y oxidasa se emplearon como controles la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 como control positivo y *L. rhamnosus* ATCC 9595 como control negativo.

### 9.2 Evaluación de antagonismo

La existencia de actividad antimicrobiana de las colonias previamente aisladas se realizó por la metodología reportada por Balouri y colaboradores en el 2016<sup>40</sup>, descrito en el **Esquema 3** y con los siguientes materiales:

#### Materiales Biológicos

- 15 cepas de aguamiel y 15 pulque.
- *S. aureus* ATCC 25923.
- *E. coli* O157:H7 ATCC 70092.
- *S. enterica* serovar typhimurium ATCC 14028.
- *L. monocytogenes*.
- *B. cereus*.
- Control positivo de inhibición: *Lactobacillus paracasei* KSI.
- Control negativo: Caldo MRS estéril.



## Metodología

Las presuntas cepas ácido lácticas se inocularon en tubos con caldo MRS a 37°C por 48 h a 150 rpm, posteriormente se centrifugó el caldo crecido a 4,500 rpm/4°C por 30 min, y se filtró por membrana (0.22  $\mu$ m), para obtener el extracto libre de células, en tubos de Eppendorf de 2mL. Por otra parte, se sembraron las cepas desafiantes asociadas a ETA (*S. enterica* serovar typhimurium ATCC 14028, *E. coli* O157:H7 ATCC 70092, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* y *L. monocytogenes*) en placas de agar soya y tripticaseína (BD Difco™ AST) a 37°C/ 24 h para la obtención de colonias frescas y puras. Se generó una base previa con 13mL de agar Mueller Hinton (BD Difco™ AMH), en el cual se montaron los tubos de vidrio, en seguida se vertió una segunda base de AMH el cual contenía 1mL de la suspensión bacteriana ajustada al 0.5 del estándar de Mac Farland preparada con SSI de la correspondiente cepa desafiante en un tubo Falcon previamente atemperado con AMH, al retirar los tubos de vidrio con pinzas estériles, se depositaron 150  $\mu$ L de extracto libre de células en cada pozo, dejándose incubar a 37°C/24 h, para finalmente registrar la presencia de halos de inhibición.

Las cepas aisladas que presentaron halos visibles de inhibición frente a las bacterias desafiantes se mantuvieron en agar MRS y se conservaron mediante el método de baja congelación, para su resguardo. Recuperando cepas lácticas conservadas hasta 24 meses en congelación, bajo el siguiente protocolo:

1. Inocular una asada de las cepas en tubos con 3 mL de caldo MRS e incubar 37°C por 24h.
2. Dispensar 1.5 mL de caldo crecido en tubos Eppendorf de 2 mL.
3. Centrifugar a 11,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 3 min.
4. Recuperar el paquete celular.
5. Agregar 1.5 mL de caldo MRS al 20% de glicerol.
6. Congelar y conservar a -70°C.

El método de conservación por baja congelación consiste en la obtención de una suspensión celular adicionada con glicerol, para su resguardo en ultra congelación (-70°C). El daño celular por la formación de cristales durante la congelación es disminuido con uso de sustancias no electrolíticas y de bajo pase molecular como el glicerol, que tiene un efecto crio protector penetrador, a través de su incorporación al citoplasma generando un ambiente hipertónico, la célula libera moléculas de agua con el fin de equilibrar su gradiente osmótico, posteriormente, incorpora agua de acuerdo con la concentración de glicerol en el citoplasma, disminuyendo la incorporación de glicerol con relación al decremento de la temperatura.



### 9.3 Identificación Genotípica

La identificación molecular se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el propósito de amplificar el gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S, molécula propuesta por Carl R. Woese (1928-2012) para la construcción de árboles filogenéticos, gracias a que se presenta como una familia de multigenes conservada que actúa como marcador eficiente de evolución. Para la realización de esta técnica se hizo uso de los oligonucleótidos de amplio espectro reportados por Forney y colaboradores en el 2004<sup>41</sup>, para la amplificación y secuenciación del ARNr 16s, (E9F: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y E939R: 5'-CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC-3), primers previamente diseñados y bajo el diaGramma de trabajo de la **Esquema 4**.

#### 9.3.1 PCR de colonia.

La identificación molecular se realizó bajo el método PCR de colonia y a través del siguiente protocolo y condiciones de reacción:

Protocolo:

1. En un tubo Eppendorf, agregar 25  $\mu$ L del MIX de reacción (PCR Máster Mix 2X Thermo scientific).
2. Agregar 1  $\mu$ L de los cebadores E9F [25pm/ $\mu$ l] y E939R [25pm/ $\mu$ l], respectivamente.
3. Resuspender en el tubo una UFC de fresca y pura, como molde.
4. Completar un volumen final de 50  $\mu$ L con agua libre de nucleasas.
5. Incubar en termociclador, bajo las siguientes condiciones de reacción.

Condiciones de reacción:

1. Desnaturalización inicial: 94°C/2 min
2. 35 ciclos de amplificación con desnaturalización: 94°C/30 s
3. Alineamiento: 55°C/30 s.
4. Extensión: 72°C /1.30 min.
5. Extensión final: 72°C /10 min.



### 9.3.2 Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1%.

La amplificación del gen se evaluó mediante el uso de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1%, solución buffer Tris-Ácido acético- EDTA a 1x (TAE 1X) y con el marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, este se reveló con bromuro de etidio y luz ultravioleta. Utilizando a la cepa *L. paracasei* KSI como control positivo y agua libre de nucleasas como control negativo.

### 9.3.3 Purificación del gel.

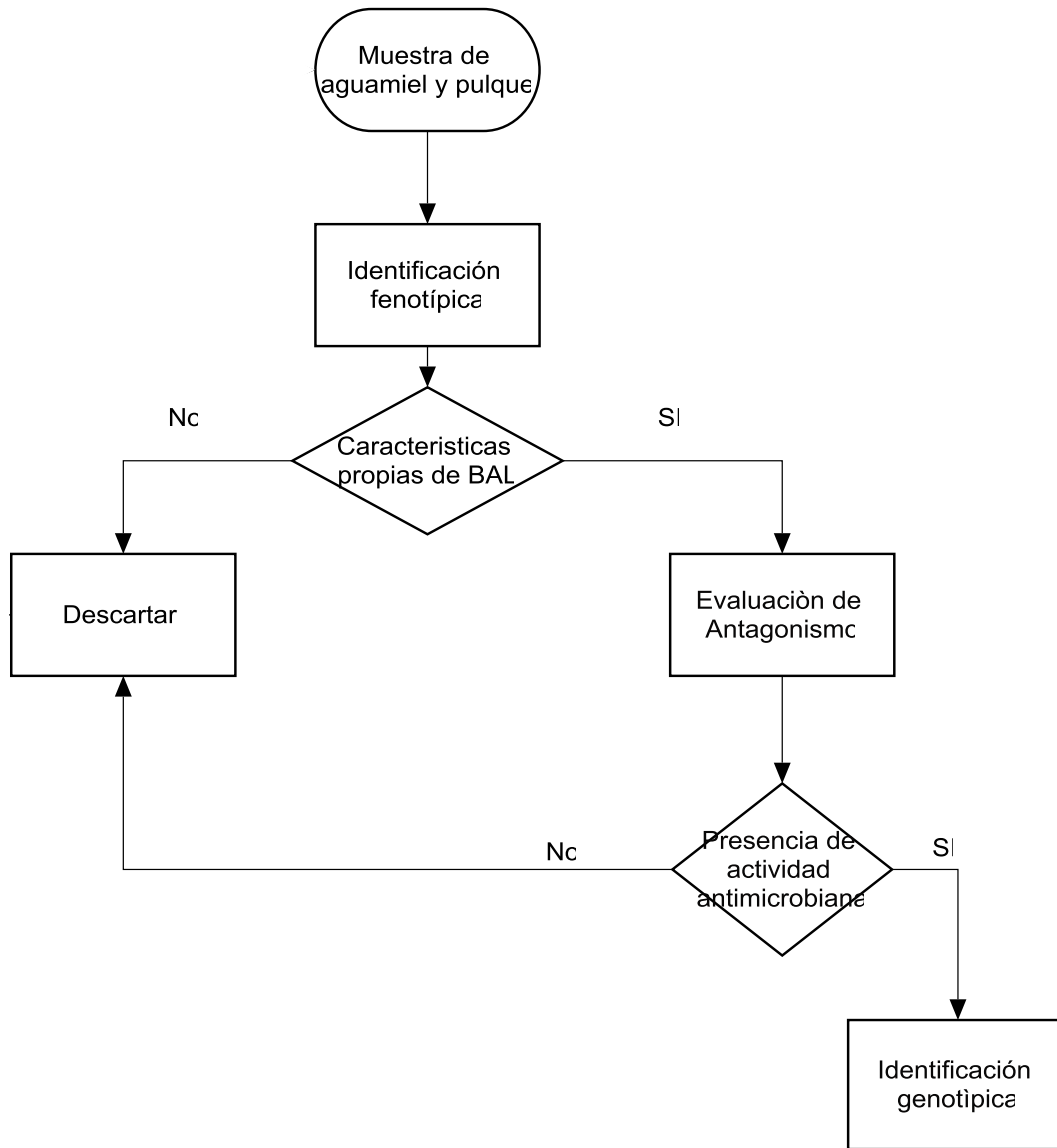
Los productos de PCR se purificaron a partir del gel de agarosa utilizando el Kit de purificación Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZYMO RESEARCH) y siguiendo las especificaciones de fabricante.

### 9.3.4 Secuenciación de ADN.

Los productos de la electroforesis de la PCR de colonia de las cuatro colonias (Ag1.13A, Ag1.18M, Ag1.23M y Ag1.27M) que presentaron actividad antimicrobiana asiladas de aguamiel, se enviaron a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y posteriormente se realizó el análisis de los electroferogramas obtenidos mediante la base de datos de European Molecular Biology Laboratory.

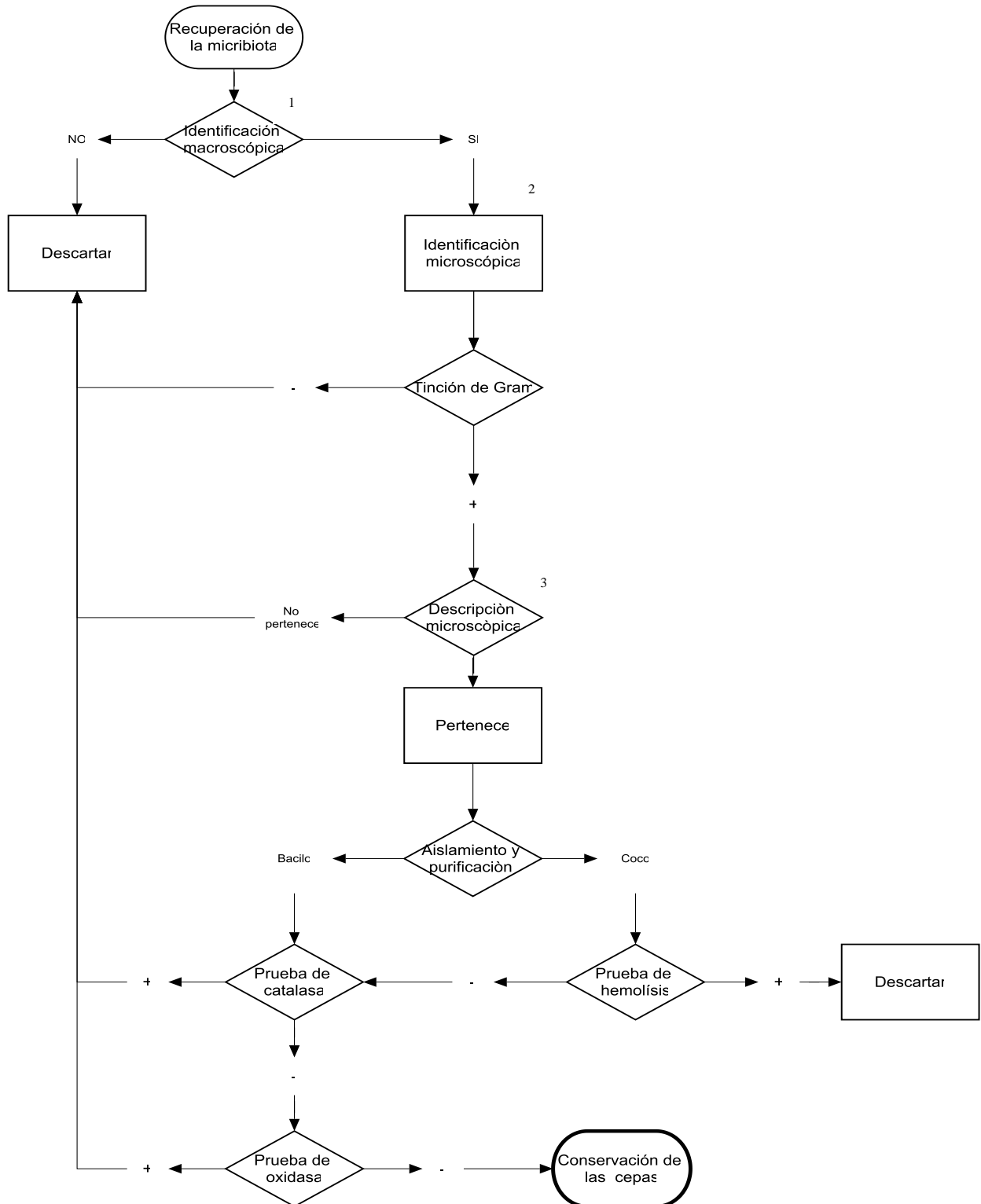


### 10.0 Esquema General de Trabajo



Fuente: Diseño del estudio

Esquema 2.- Esquema para la identificación fenotípica.



Fuente<sup>1</sup>: "Bacterias ácido lácticas" EcuRed., 2018.

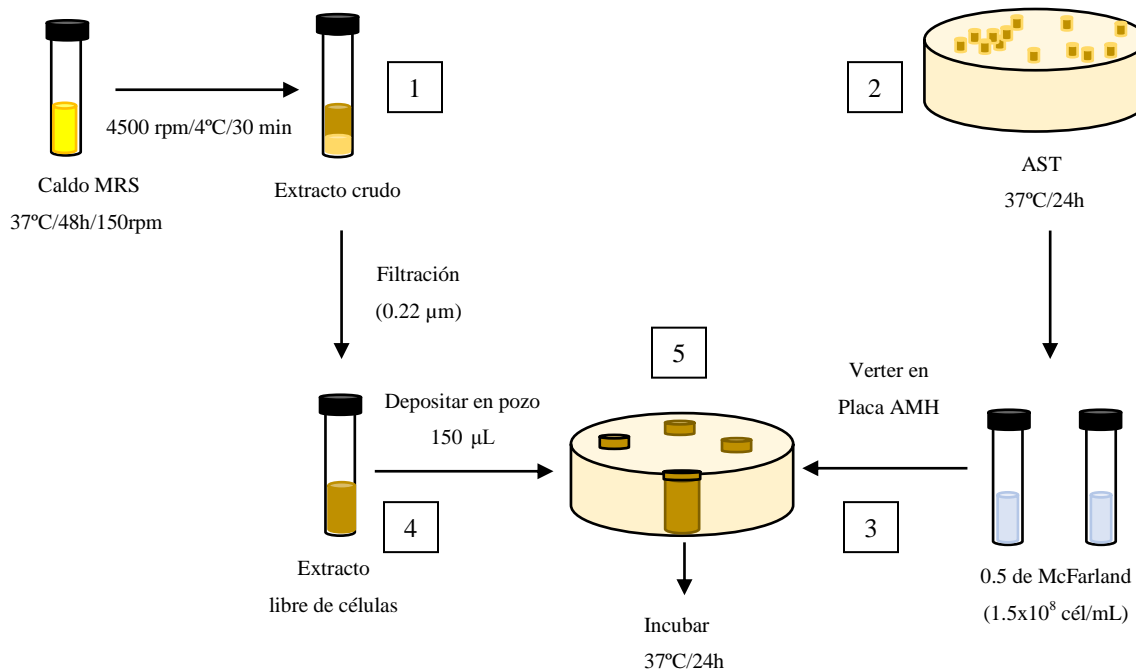
Fuente<sup>2</sup>: Sáenz, T. A., & Gorbeña, J. C. R. .2008<sup>6</sup>; Taxonomy Browser, 2018<sup>7</sup>.

Fuente<sup>3</sup>: Vargas, F. T., & Kuno V. A., 2014.

**Esquema 3.-** Esquema de trabajo del ensayo de antagonismo por difusión en agar.

**Obtención de extracto libre de células**

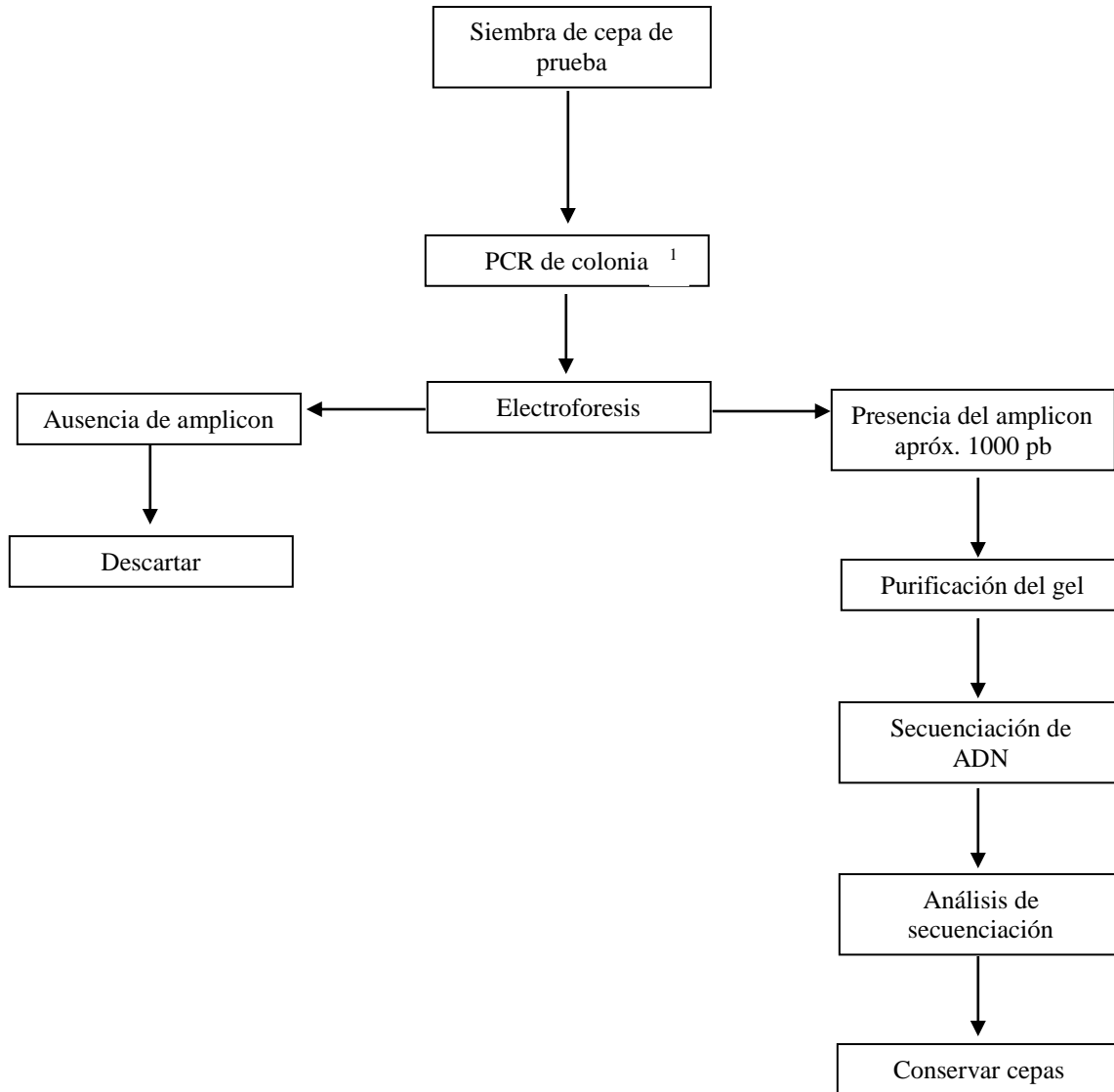
Siembra de cepas de aguamiel y pulque



**Fuente:** Balouiri, et al.,2016<sup>40</sup>.



**Esquema 4.**- Esquema de trabajo para la identificación genotípica de las cepas aisladas a partir de las muestras de pulque y aguamiel.



Fuente: Forney, et al., 2004<sup>41</sup>.



## 11.0 Resultados y Discusión

### 11.1 Resultados obtenidos en la identificación fenotípica de las BAL

Bajo la metodología de investigación se obtuvieron un total de 48 aislados a partir de las cuatro muestras (2 muestras de pulque y 2 de aguamiel), estas compartían características macroscópicas similares entre ellas, como se especifica en la **Tabla 3**, al realizar la tinción de Gram, pruebas de oxidasa y catalasa se pudieron descartar 18 muestras por presentar morfología reportada para levaduras, bacilar alargada, actividad de la enzima catalasa u oxidasa, obteniendo un total de 30 colonias (como se muestra en la Tabla 4), con morfología bacilar corta dispuesta en pares, cadenas o racimos, predominando la disposición en pares, Gram positivas, oxidasa y catalasa negativas, sin aparente movilidad y sin formación de endospora, con capacidad de crecer a 37°C en ambiente de aerobiosis y microaerofilia, en la **Tabla 5** se muestran los resultados de la caracterización bioquímica y morfológicas de las 30 cepas.

**Tabla 3.-** Características macroscópicas de las colonias aisladas de pulque y aguamiel

Características Primarias	Características Secundarias
<b>Forma:</b> circular o puntiforme <b>Bordes:</b> entero o lobulado <b>Elevación:</b> convexa <b>Textura:</b> lisa o con curvas	<b>Pigmentación:</b> blanca <b>Olor:</b> frutal o ácido <b>Consistencia:</b> lisa o rugosa <b>Comportamiento óptico:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>frente a la luz transmitida:</b> opaca o translúcida</li> <li>• <b>frente a la luz reflejada:</b> brillantes u opacas</li> </ul>

Tomado de Vargas y Kuno, 2014<sup>44</sup>

**Tabla 4.-** Cantidad de colonias aisladas de las muestras de pulque y aguamiel con las características correspondientes al grupo de las BAL

Muestra	Cantidad de colonias aisladas
Muestra de aguamiel 1 (Ag1)	4
Muestra de Pulque 1 (P11)	5
Muestra de aguamiel 2 (Ag2)	11
Muestra de Pulque 2 (P12)	10

**Tabla 5.-** Caracterización bioquímica y morfológica de las 30 colonias aisladas de aguamiel y pulque

Muestra	Colonia	Gram	Morfología	Catalasa	Oxidasa
Ag1	13A	+	Bacilos cortos	-	-
	18M	+	Bacilos cortos	-	-
	23M	+	Bacilos cortos	-	-
	27M	+	Bacilos cortos	-	-
PI1	1A	+	Bacilos cortos	-	-
	5A	+	Bacilos cortos	-	-
	3M	+	Bacilos cortos	-	-
	8M	+	Bacilos cortos	-	-
	13M	+	Bacilos cortos	-	-
Ag2	1A	+	Bacilos cortos	-	-
	4A	+	Bacilos cortos	-	-
	5A	+	Bacilos cortos	-	-
	6A	+	Bacilos cortos	-	-
	7A	+	Bacilos cortos	-	-
	1M	+	Bacilos cortos	-	-
	2M	+	Bacilos cortos	-	-
	3M	+	Bacilos cortos	-	-
	4M	+	Bacilos cortos	-	-
	5M	+	Bacilos cortos	-	-
	6M	+	Bacilos cortos	-	-
PI2	1A	+	Bacilos cortos	-	-
	3A	+	Bacilos cortos	-	-
	6A	+	Bacilos cortos	-	-
	7A	+	Bacilos cortos	-	-
	1M	+	Bacilos cortos	-	-
	2M	+	Bacilos cortos	-	-
	3M	+	Bacilos cortos	-	-

4M	+	Bacilos cortos	-	-
5M	+	Bacilos cortos	-	-
8M	+	Bacilos cortos	-	-

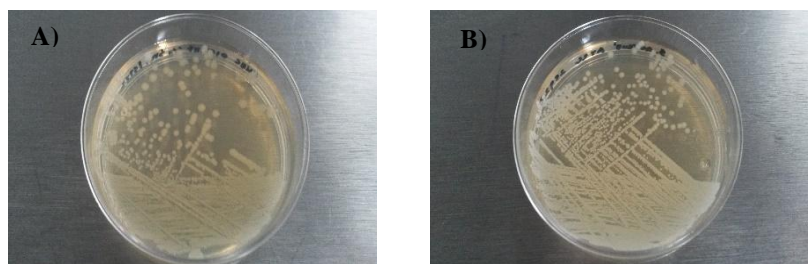
**Nota:** Las pruebas se realizaron a partir de AST con 48 h de incubación a 37°C. Donde A: condición de aislamiento en aerobiosis y M: condición de aislamiento en microaerofilia.

Las colonias caracterizadas bioquímicamente y morfológicamente, aisladas bajo los criterios coloniales reportados para el grupo de las BAL<sup>39</sup>, cumplieron con las características macroscópicas y microscópicas reportadas para el orden *Lactobacillales*; bacilos cortos Gram positivos dispuestos en pares, cadena o racimos, microaerófilos y aerotolerantes, mesófilos, sin movilidad, ni aparente formación de endosporas, sin actividad de la enzima catalasa y oxidasa<sup>6</sup>, orden descrito dentro de la clase *Bacilli* del Filo *Firmicutes*<sup>9</sup>.

## 11.2 Resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antimicrobiana de las BAL

### 11.2.1 EHEC O157:H7 ATCC 70092 y *S. aureus* ATCC 25923

Después de las 24 h de cultivo de las cepas desafiante en AHM (**Figura 1**). En otras placas de agar MH fueron cultivadas las cepas de reto previamente estandarizadas y en estas placas se generaron pozos donde se colocaron 150 µL de extracto libre de células obtenidos de cada una de las colonias aisladas de aguamiel y pulque frente a las cepas desafiante EHEC O157:H7 ATCC 70092 y *S. aureus* ATCC 25923 tratadas de acuerdo con lo descrito anteriormente en la metodología referente al ensayo de antagonismo en difusión en agar. Los resultados obtenidos se muestran en las **Tablas 6 y 7**, como control positivo se utilizó la cepa *Lactobacillus paracasei* KSI y como control negativo caldo MRS estéril tratado bajo las mismas condiciones de las colonias aisladas de pulque y aguamiel.



**Figura 1.-** Cultivo de cepas de desafío a 24 h en agar Mueller Hinton. A) EHEC O157:H7 ATCC 70092 y B) *S. aureus* ATCC 25923.



Tabla 6.- Resultados obtenidos en el ensayo de difusión en agar frente a EHEC O157:H7 ATCC 70092

Muestra	Colonia	Diámetro del halo de inhibición 1 (mm)	Diámetro del halo de inhibición 2 (mm)
Ag1	13A	14	14
	18M	14	13
	23M	14	15
	27M	15	14
Ag2	4A	12	11
	6A	11	10
	7A	12	10
	1M	10	10
Pl2	1A	10	9
	3A	9	8
	6A	9	9
	7A	10	8
	1M	10	9
	2M	10	10
	3M	10	8
	4M	10	8
Control +	5M	9	12
	8M	9	11
Control +	-	15	14
Control -	-	-	-

Nota:

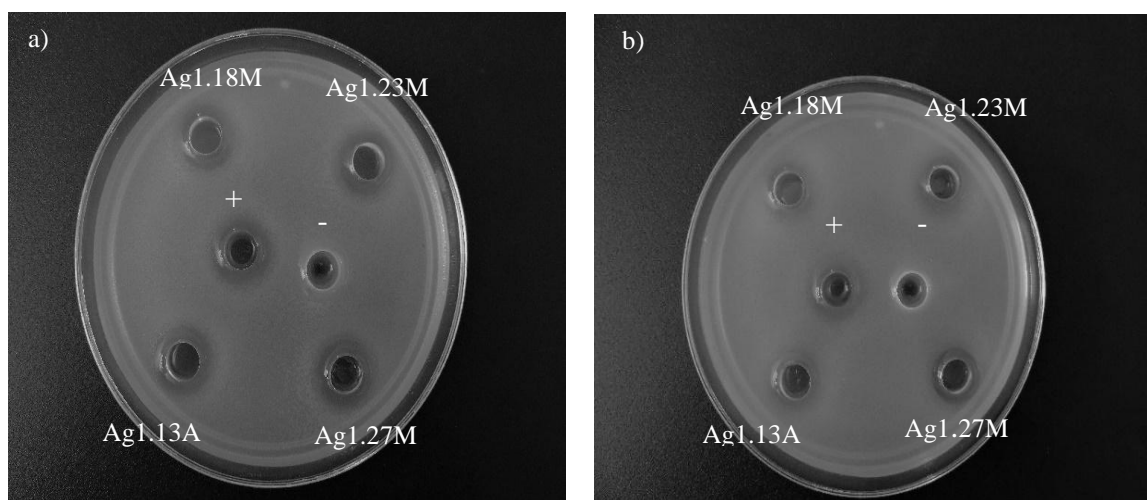
Control (+): *Lactobacillus paracasei* KSI y Control (-): Caldo MRS.

**Tabla 7.-** Resultados obtenidos en el ensayo de difusión en agar frente a *S. aureus* ATCC 25923.

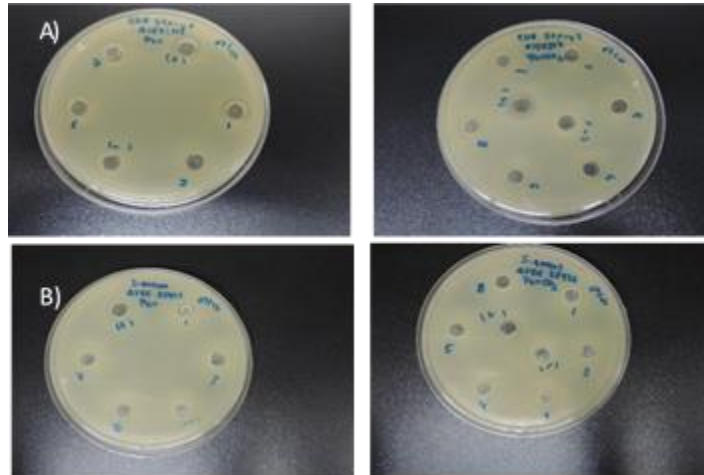
Muestra	Colonia	Diámetro del halo de inhibición 1 (mm)	Diámetro del halo de inhibición 2 (mm)
<b>Ag1</b>	13A	13	12
	18M	13	12
	23M	14	12
	27M	13	13
<b>Control +</b>	-	14	13
<b>Control -</b>	-	-	-

**Nota:** Control (+): *Lactobacillus paracasei* KSI, Control (-): Caldo MRS.

Al obtener los resultados anteriores enlistados en las **Tablas 6 y 7**, se eligieron únicamente las colonias que presentaron los mejores halos de inhibición frente a las cepas desafiantes (Ag1.13A, Ag1.18M, Ag1.23M, Ag1.27M), **Figura 2** por lo que fueron seleccionadas para los siguientes ensayos de antagonismo (*S. enterica* serovar typhimurium ATCC 14028, *B. cereus* y *L. monocytogenes*), las cepas que no presentaron inhibición frente a EHEC O157:H7 ATCC 70092. y/o *S. aureus* ATCC 25923 fueron descartadas. Como se muestra en la **Figura 3**.



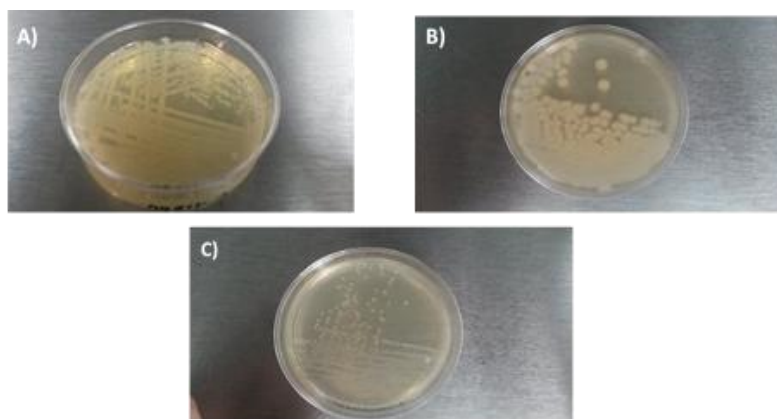
**Figura 2.-** Ensayo de difusión en agar de las cepas aisladas de aguamiel frente a: a) EHEC O157:H7 ATCC 70092 y b) *S. aureus* ATCC 25923. Control (+): *Lactobacillus paracasei* KSI y control (-): Caldo MRS.



**Figura 3.-** Fotos de los ensayos de antagonismo sin inhibición de las cepas aisladas de pulque y aguamiel frente a: A) EHEC O157:H7 ATCC 70092 y B) *S. aureus* ATCC 25923.

### 11.2.2 Ensayos de antagonismo de las colonias Ag1.13A, Ag1.18M, Ag1.23M y Ag1.27M frente a *S. enterica* serovar typhimurium ATCC 14028, *B. cereus* y *L. monocytogenes*

Después de las 24 h de cultivo de las cepas desafiantes *S. enterica* serovar typhimurium ATCC 14028, *B. cereus* y *L. monocytogenes* en AMH (**Figura 4**). En otras placas de agar MH fueron cultivadas las cepas de reto previamente estandarizadas y en estas placas se generaron pozos donde se colocaron 150  $\mu$ L de extracto libre de células obtenidos de las colonias Ag1.13A, Ag1.18M, Ag1.23M y Ag1.27M y tratadas de acuerdo con lo descrito anteriormente en la metodología referente al ensayo de antagonismo en difusión en agar, los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 8** y las **Figuras 5** y **6**.

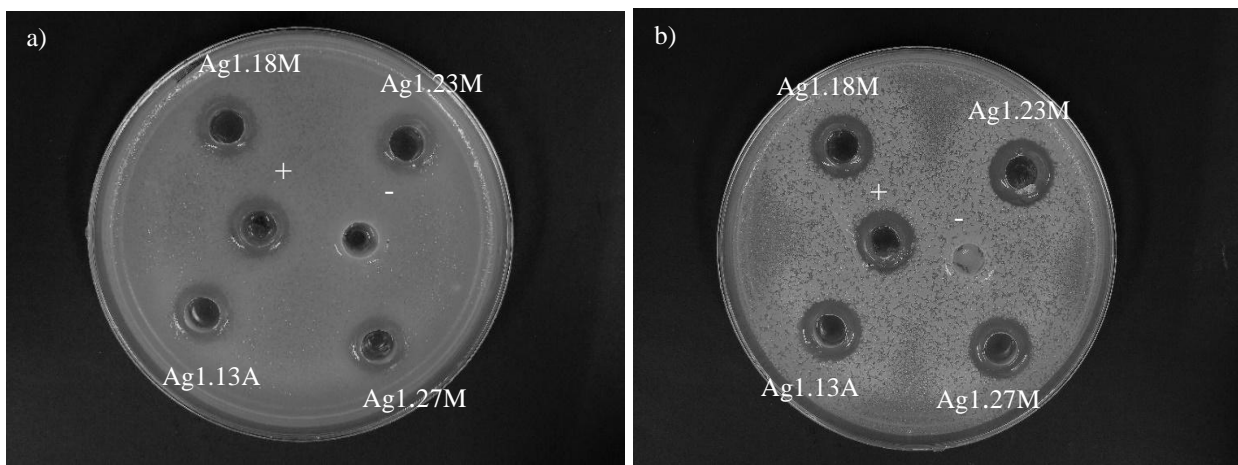


**Figura 4.-** Cultivo de cepas de desafío a 24 h, en agar Mueller Hinton A) *Salmonella enterica* serovar typhimurium ATCC 14028 B) *B. cereus* y C) *L. monocytogenes*.

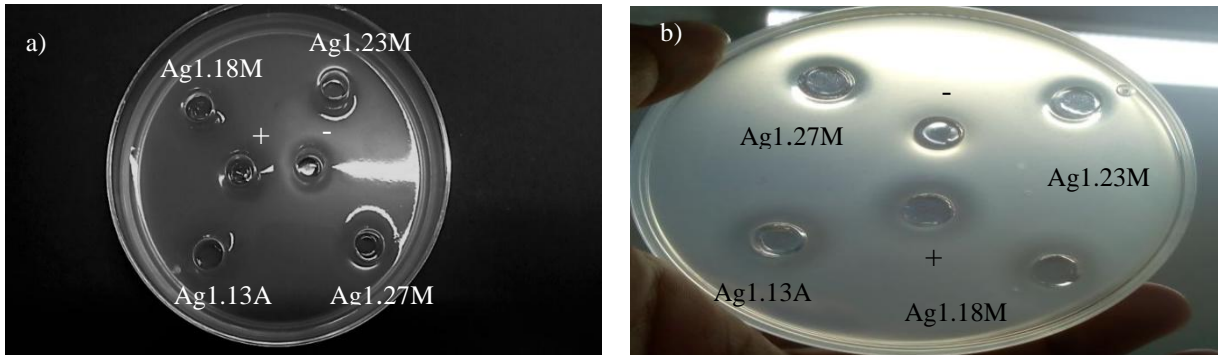
**Tabla 8.-**Resultado de los ensayos de antagonismo realizados por duplicado de las colonias obtenidas de aguamiel frente a *S. enterica* serovar typhimurium ATCC 14028, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, EHEC O157:H7 ATCC 70092 y *S. aureus* ATCC 25923

Colonia	Halos de inhibición presentados por:				
	<i>S. enterica</i> serovar typhimurium ATCC 14028	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	EHEC O157:H7 ATCC 70092	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Ag1.13A	13.0mm	14.5mm	13.0mm	14.0mm	12.5mm
Ag1.18M	13.5mm	14.0mm	13.5mm	13.5mm	12.5mm
Ag1.23M	12.5mm	15.0mm	13.5mm	14.5mm	13.0mm
Ag1.27M	12.5mm	15.0mm	11.5mm	14.5mm	13.0mm
<i>Lactobacillus paracasei</i> KSI	13.5mm	15.0mm	13.0mm	14.5mm	13.5mm
Caldo MRS estéril	-	-	-	-	-

Nota: se muestra el promedio de los halos de inhibición en milímetros de los resultados.



**Figura 5.-** Ensayo de difusión en agar de las cepas aisladas de aguamiel frente a: a) *S. enterica* serovar typhimurium ATCC 14028 y b) *B. cereus*. Control (+): *Lactobacillus paracasei* KSI, control (-): Caldo MRS.



**Figura 6.-** Ensayo de difusión en agar de las cepas aisladas de aguamiel frente a *L. monocytogenes*. Control (+): *Lactobacillus paracasei* KSI, control (-): Caldo MRS. a) Foto de frente sin distinción de inhibición, b) foto frente a luz, distinción de halos de inhibición.

En la Tabla 8, se observan los diámetros de las colonias aisladas de aguamiel, presentando los mayores halos de inhibición en *B. cereus* y EHEC O157:H7 ATCC 70092 (13.5 -15.0mm), siguiéndoles *S. enterica* serovar typhimurium ATCC 14028 y *L. monocytogenes* (11.5-13.5mm), por último *S. aureus* ATCC 25923 (12.5-13.0 mm). De acuerdo con estudios realizados *B. cereus* demostró un 63.6% de inhibición *in vitro* frente a 14 cepas de BAL aisladas y caracterizadas a partir de leche<sup>49</sup>. Giles et al., en el 2016, obtuvieron halos de inhibición de 6.5 A 8.5 mm de diámetro en ensayos de difusión en agar frente a EPEC, *Salmonella entérica* serovar Typhi y Typhimurium, *L. monocytogenes*, con un extracto libre de células concentrado a 2x de *Leuconostoc mesenteroides* P45, bacteria aislada a partir de pulque, actualmente estudian su potencial antimicrobiano y su aplicación biotecnológica<sup>43</sup>. En otros estudios utilizando el mismo método, se reportaron halos de inhibición menores (6.0-9.4mm) de una cepa de *L. brevis* frente a *S. aureus* a las obtenidos durante el trabajo de investigación, cepa que fue aislada y caracterizada a partir de quesos artesanales<sup>48</sup>.

Tomando en cuenta que existen 600 millones de casos de ETA anualmente, causando 420 000 muertes al año y donde sólo 230, 000 de estas son ocasionadas por agentes causantes de enfermedades gastrointestinales (patotipos de *E. coli*, *S. enterica* serovar typhimurium ATCC



14028 y *L. monocytogenes*)<sup>26</sup> y el grave problema en crecimiento de la resistencia a los antibióticos por patotipos de *E. coli* y *S. aureus*<sup>45,47</sup>, los resultados obtenidos durante las pruebas de antagonismo sugieren un amplio potencial para el desarrollo de investigaciones en la aplicación de estas BAL aisladas de aguamiel en pro de la prevención de ETA, como lo puede ser en la generación de bioconservadores, alimentos funcionales o la identificación y caracterización de el o los metabolitos que generan la inhibición, a través de métodos de mayor sensibilidad<sup>46</sup>. Con ello se puede buscar reducir las incidencias de muertes ocasionadas por ETA, aumentando la calidad de vida de las personas y disminuyendo costes que genera el control de estas, ya sea de forma individual o de manera global.

### 11.3 Descripción fenotípica de las cepas aisladas de aguamiel con actividad antimicrobiana (Ag1.13A, Ag1.18M, Ag1.23M y Ag1.27M)

Antes de realizar la identificación genotípica se describieron las características macroscópicas de las colonias en agar MRS a 48h de incubación, y de acuerdo con los criterios reportados<sup>44</sup> y las características de crecimiento en caldo MRS a 24 h, como se muestra en las **Tablas 9** y **10** y en la **Figura 7**.

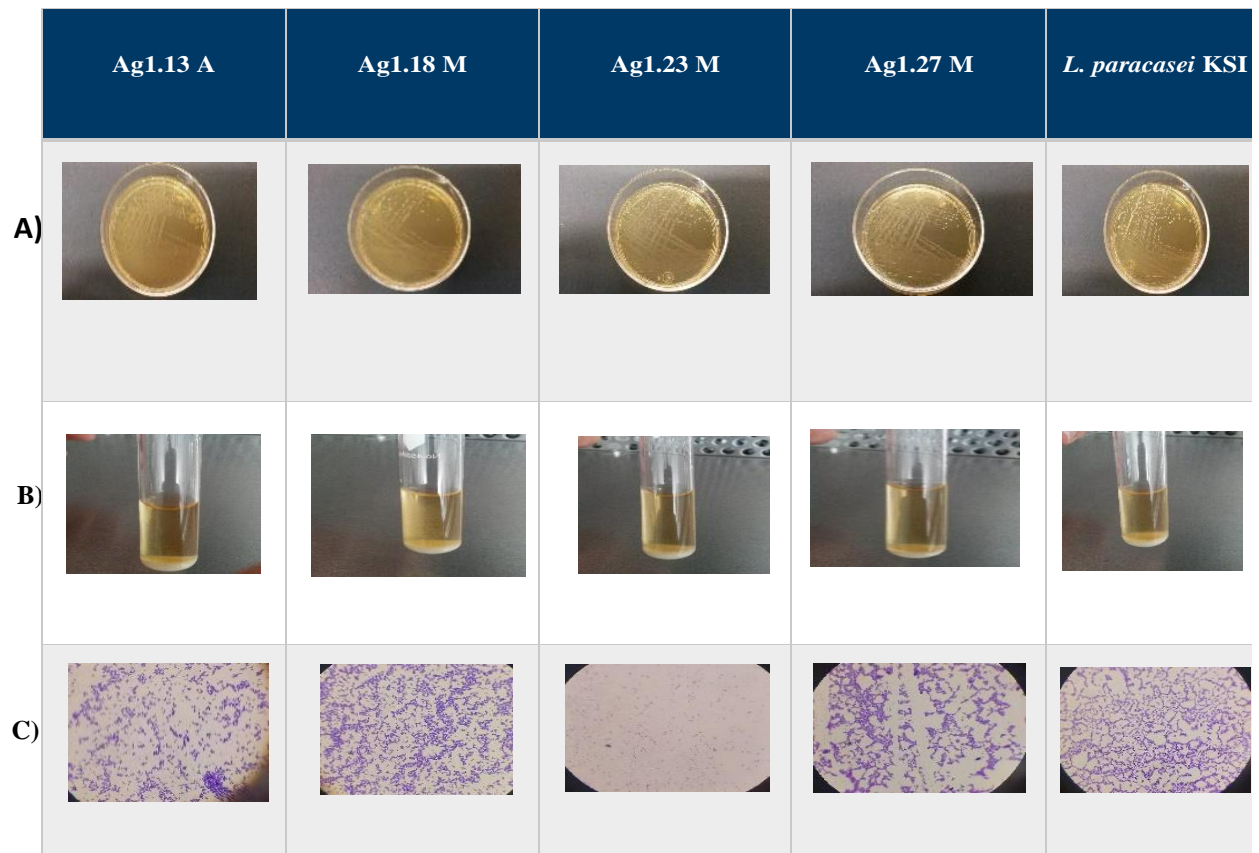
**Tabla 9.-** Descripción macroscópica a 48 h de incubación, por 37°C, en agar MRS de las colonias aisladas de aguamiel.

Característica	Ag1.13 A	Ag1.18 M	Ag1.23 M	Ag1.27 M	<i>Lactobacillus paracasei</i> KSI
<b>Forma</b>	P	P	P	P	P
<b>Borde</b>	I	I	I	E	E
<b>Elevación</b>	El	El	El	El	El
<b>Textura</b>	C	Ls	C	Ls	Ls
<b>Pigmentación</b>	B	B	B	B	B
<b>Olor</b>	F	F	F	F	F
<b>Consistencia</b>	R	Ls	R	Ls	Ls
<b>Comportamiento óptico</b>	T/O	O/Br	T/O	O/Br	O/Br

NOTA: P: Puntiforme; I: Irregular, E: Entero; El: Elevada; C: Con curvas, Ls: Lisa; B: Blanca; F: Frutal; R: Rugosa, T: Translúcida, O: Opaca y Br: Brillante.

**Tabla 10.-** Descripción del crecimiento en un medio líquido (caldo MRS) a 37°C, 24h, 150 rpm de las colonias aisladas de aguamiel.

Característica	Ag1.13 A	Ag1.18 M	Ag1.23 M	Ag1.27 M	<i>Lactobacillus paracasei</i> KSI
Turbidez uniforme	-	-	-	-	-
Floculante	x	x	x	x	x
Película	-	-	-	-	-
Sedimento	x	x	x	x	x
Adherencia en paredes	-	x	-	-	x



**Figura 7.-** Cultivo de 48 h de las cepas aisladas de aguamiel donde: A) agar MRS; B) caldo MRS y C) Tinción de Gram de Ag1.13 A, Ag1.18M, Ag1.23M Ag1.27M y *L. paracasei* KSI



En las **Tablas 9 y 10**, se puede observar, a grandes rasgos, la existencia de al menos dos cepas distintas en cuanto a la descripción colonial se refiere, teniendo una igualdad de características en las cepas Ag1.13A y Ag 1.23 M, tanto en la descripción del medio sólido como en el líquido. Las cepas Ag1.27M y *L. paracasei* KSI comparten las mismas características macroscópicas en el medio sólido, sin embargo, se puede observar una diferencia en el medio líquido, ya que Ag 1.22M no mostró aparente adherencia en las paredes del tubo de vidrio. La cepa Ag1.18M muestra una variabilidad morfológica en medio líquido y sólido, compartiendo similitudes coloniales en el medio sólido con las cepas Ag1.13A y Ag 1.23M, pero con un comportamiento óptico distinto, frente a luz transmitida se muestra opaca, a diferencia de las translúcida de las cepas Ag1.13A y Ag 1.23M, y frente a luz reflejada se muestra brillante, contrario a las cepas anteriores que presentaron opacidad. En el medio líquido Ag1.18M muestra un comportamiento similar a *L. paracasei* KSI, con la formación de flóculos, sedimento y aparente adherencia en las paredes de vidrio.

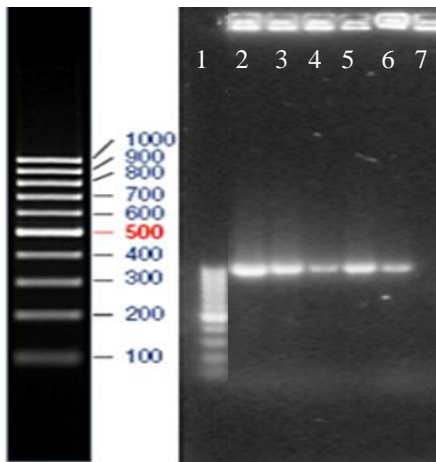
En cuanto a las características microscópicas, todas las cepas presentan morfología bacilar corta, Gram positiva, con ausencia de actividad de las enzimas oxidasa y catalasa, con capacidad de crecimiento en condiciones aerobias y de microaerofilia, sin formación de esporas y mesofílicas, características pertenecientes al grupo de las BAL<sup>6</sup>.

#### **11.4 Resultados obtenidos en la identificación genotípica de las BAL**

##### **11.4.1 PCR y electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1%.**

Las cepas se conservaron por el método de ultra congelación, para posteriormente hacer su análisis genotípico con la utilización de la técnica de PCR y los primers E9F: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y E939R: 5' CTTGTGCGGGCCCCGTCAATTC-3, reportados por Forney et al., 2004. Los resultados se muestran en la **Figura 8**, un amplicon del gen 16s rRNA para todas las muestras. La amplificación del gen se evaluó mediante el uso de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1%, solución buffer Tris-Ácido acético- EDTA a 1x (TAE 1X) y con el marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, este se reveló con bromuro de etidio y luz ultravioleta. Utilizando a la cepa *L. paracasei* KSI como control positivo y agua libre de nucleasas como control negativo.

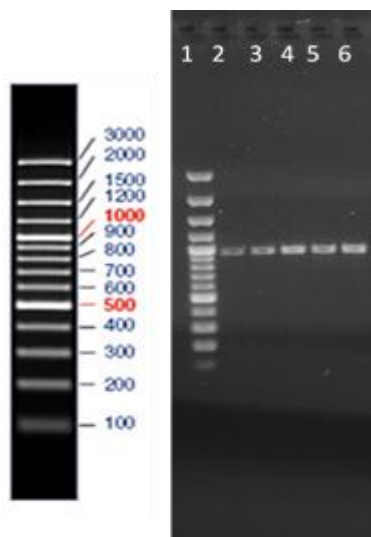
Al revelar el corrimiento electroforético de la amplificación del gen 16s rRNA, mediante luz ultravioleta, **Figura 8**, se pudieron observar bandas, carril 2,3,5,6 a la altura del marcador de peso GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, carril 1, correspondiente a una cadena aproximadamente de 1000 pb, de acuerdo con el fabricante.



**Figura 8.-** Electroforesis de la PCR de colonia en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, Carril 2: Ag1.18M, Carril 3: Ag 1.23M, Carril 4: Control (+), Carril 5: Ag1.27M, Carril 6: Ag1.13A y Carril 7: Control (-).

#### 11.4.2 Purificación y secuenciación de los amplicones obtenidos en la PCR

Los amplicones de las cepas (Ag1.18M, Ag1.23M, Ag1.27M y Ag1.13A) obtenidos a partir de la electroforesis de la PCR de colonia, en gel de agarosa al 1%, se purificaron a través del Kit de purificación Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZYMO RESEARCH), mediante el protocolo marcado por el fabricante, el producto de purificación se corrió en otro gel de agarosa al 1% con el marcador de peso GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, (100-3000 pb), **carril 1**, donde se observaron bandas alineadas al marcador correspondiente a un fragmento de ADN con tamaño aproximado de 1000 pb, **carriles: 2,3,5 y 6 (Figura 9)**. Los productos purificados se enviaron a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.



**Figura 9.-** Electroforesis de la purificación de los productos obtenidos en la PCR de colonia, con el Kit de purificación Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZYMO RESEARCH). Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, Carril 2: Ag1.18M, Carril 3: Ag 1.23M, Carril 4: Control (+), Carril 5: Ag1.27M, Carril 6: Ag1.13 A.

Para el análisis bidireccional de los productos de secuenciación del gen 16s rRNA de las distintas colonias aisladas de aguamiel (Ag1.13A, Ag1.18M, Ag1.23M y Ag1.27M) se analizaron mediante el programa Finch Tv, con el objetivo de obtener una cadena de ADN mayor tamaño, se concatenaron las secuencias de cada una de estas colonias, obteniendo así, una cadena con mayor cantidad de pares de bases para su posterior identificación genotípica en la base de datos EMBL (**Tabla 11**), los resultados del análisis se muestran en los **Anexos**.

**Tabla 11.-** Tamaño de los amplicones obtenidos de las colonias aisladas de aguamiel usando los cebadores E9F y E939R.

Cepa	Pares de bases (pb)
Ag1.13 A	909
Ag1.18 M	868
Ag1.23 M	869
Ag1.27 M	872
<i>L. paracasei</i> KSI	876



### 11.4.3 Análisis de la secuenciación concatenada en la base de datos EMBL

El resultado del análisis de los fragmentos obtenidos a través del software Finch TV, se analizaron en las bases de datos del EMBL para realizar la identificación de las bacterias aisladas de aguamiel con actividad antimicrobiana, **Tabla 12**.

**Tabla 12.-** Análisis de las secuencias del gen 16s rRNA en la base de datos EMBL de las cepas caracterizadas.

Cepa	Resultado de EMBL	Porcentaje de identidad
<b>Ag1.13A</b>	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa ZFM54	99.9
	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa Lpc10	99.9
	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa KL1	99.9
<b>Ag1.18M</b>	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa ZFM54	99.9
	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa Lpc10	99.9
	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa KL1	99.9
<b>Ag1.23M</b>	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa HBUAS54287	99.9
	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa HBUAS53355	99.9
	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa HBUAS53354	99.9
<b>Ag1.27M</b>	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa HBUAS54287	99.9
	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa HBUAS53355	99.9
	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa HBUAS53354	99.9

De acuerdo con los resultados de la **Tabla 12**, los fragmentos de la secuenciación de las bacterias obtenidas de aguamiel muestran la identificación de las cepas Ag1.13A y Ag1.18M como *Lactobacillus paracasei* cepa ZFM54, *Lactobacillus paracasei* cepa Lpc10, *Lactobacillus paracasei* cepa KL1 y a Ag1.23 y Ag1.27 como *Lactobacillus paracasei* cepa HBUAS54287, *Lactobacillus paracasei* cepa HBUAS53355, *Lactobacillus paracasei* cepa HBUAS53354 con un porcentaje de identidad del 99.9%, sin embargo, el gen 16s rRNA como marcador de especie posee un tasa de variabilidad mayor (17-35%), y con respecto al género (<10%) en pruebas comerciales para identificación de aislamientos clínicos, por ello se asume una variabilidad mayor en el quehacer de la investigación. El creciente desarrollo de la



informática, como la generación de bases de datos de secuencia de nucleótidos de múltiples microorganismos ha provocado un incremento en el registro de las bases de datos de un 456%<sup>50</sup>.

Un porcentaje mayor al 97% de identidad en las bases de datos puede interpretarse como pertenencia a un taxón definido o en su defecto la descripción de una nueva especie, lo que suele asociarse con bacterias lácticas, debido a su presencia en diversos nichos ecológicos, ambientes ricos de estrés, sales, pH, entre otros, provocando una adaptabilidad distinta en cada nicho y con ello cambios en su genoma<sup>51</sup>, por lo cual se sugiere el empleo de genes housekeeping (*hsp*, *rpoB* y *recA*), para la identificación hasta el nivel de especie<sup>41</sup>.



## 12.0 Conclusiones

A través de la investigación realizada se determinó la existencia de BAL con capacidad inhibitoria frente a las bacterias asociadas a ETA como *S. aureus* ATCC 25923, EHEC O157:H7 ATCC 70092, *S. enterica* serovar typhimurium ATCC 14028, *B. cereus* y *L. monocytogenes*, llegando a las siguientes conclusiones:

1. Los extractos libres de células de las cepas aisladas de aguamiel por un periodo de incubación de 48 h en caldo MRS, tienen actividad inhibitoria frente a las cepas asociadas a ETA como *S. entérica* serovar typhimurium ATCC 14028ATCC 14028, *E. coli* O157:H7 ATCC 70092, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* y *L. monocytogenes*.
2. Las cepas aisladas de aguamiel se identificaron como *Lactobacillus paracasei*.



### 13.0 Bibliografía

1. Dreyfus, G. (2009). *El mundo de los microbios* (4<sup>a</sup> ed.). Ciudad de México. Colec. Ciencia para Todos.
2. Porter, J. R. (1976). Antony van Leeuwenhoek: Tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40(2), 260–269.
3. Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1–29. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413956/>
4. Aznar, R., & Zúñiga, M. (s/f). ¿Qué son las bacterias lácticas? *Instituto de Agroquímica y Tecnología de alimentos*, 1-8.
5. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W. (Eds.). (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York, Estado Unidos de America; Springer-Verlag Recuperado de <http://www.springer.com/series/4157>.
6. Sáenz, T. A., & Gorbeña, J. C. R. (2008). Bacterias ácido lácticas: biopreservante de los alimentos. *Biotempo*, 8, 54-64. Recuperado de <http://www.urp.edu.pe/pdf/biologia/BACTERIAS.pdf>
7. Taxonomy Browser. (2018). Recuperado el 24 de mayo de 2018, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1239>
8. Jay, M. J., Loessner J. M. & Golden D.A (2006). *Modern Food Microbiology*, (4th ed):Springer. Recuperado de <https://www.abebooks.com/9780412076916/Modern-Food-Microbiology-Science-Texts-0412076918/plp>
9. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E. (Eds.). (2006). *The Prokaryotes: Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes* (3a ed.).
10. Haakensen, M., Dobson, C. M., Hill, J. E., & Ziola, B. (2009). Reclassification of *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White 1964) Back 1978 (Approved Lists 1980) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. Nov., and emended description of the genus *Lactobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(3), 615–621. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65779-0>



11. Facklam, R. (2002). What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 613–630. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.613-630.2002>
12. Archibald, F. S., & Fridovich, I. (1981). Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 146(3), 928–936
13. Peña, A. (2014). *Las membranas de las células*. Ciudad de México, México: Fondo de Cultura Económica.
14. Sadeghi, A., Raeisi, M., Ebrahimi, M., & Sadeghi, B. (2018). Effects of temperature, pH, and bile salt on antimicrobial activity of bacteriocin-like substances obtained from barley sourdough LAB. *Comparative Clinical Pathology*, 27(3), 611–619. <https://doi.org/10.1007/s00580-017-2635-8>
15. Cervantes, C. M., & Pedroza R., A. M. (2007). El pulque: Características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *Nova-Publicación científica en Ciencias Biomédicas*, 5 (8), 101-212.
16. Escalante, A., López, S.D. R., Velázquez, G. J. E., Giles. M., Bolívar, F., & López-M, A. (2016). Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>
17. Lappe, O. P., Moreno T. R., Arrizón, G. J., Herrera, S. T., García, M. A., & Gschaedler, M. A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1037–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430>.
18. Sánchez, M. A., & Hope, P. H. (1953). Agave Juice, Fermentation and Chemical Composition Studies of Some Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(3), 246–249. <https://doi.org/10.1021/jf60003a007>
19. Sánchez M. A., & Piso, J. (1957). *Estudios Microbiología I*, 167–174.
20. Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281–370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>



21. Lau, M. W., Gunawan, C., Balan, V., & Dale, B. E. (2010). Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 11. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-11>
22. Chellapandian, M., Larios, C., Sánchez, G. M., & López, M., A. (1998). Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from 'pulque', a traditional Aztec alcoholic beverage. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 21, 51–56. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900560>
23. Torres, R. I., Rodríguez, A. M. E., Miranda, M. A., Giles, G. M., Conca, M., R., López, M. A., ... Escalante, A. (2014). Screening and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Leuconostoc kimchii* isolated from traditional fermented pulque beverage. *SpringerPlus*, 3, 583. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-583>
24. Raspor, P., & Goranovic, D. (2008). Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), 101–124. <https://doi.org/10.1080/07388550802046749>
25. WHO | World Health Organization. (2018). Recuperado el 25 de agosto de 2018, de <http://www.who.int>
26. World Health Organization, & Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. (2015). *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases*. Recuperado de <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165%5Feng.pdf?ua=1>
27. Morpeth, S. C., Ramadhani, H. O., & Crump, J. A. (2009). Invasive Non-Typhi Salmonella Disease in Africa. *Clinical Infectious Diseases*, 49(4), 606–611. <https://doi.org/10.1086/603553>
28. Miller, R. A., Jian, J., Beno, S. M., Wiedmann, M., & Kovac, J. (2018). Genomic and phenotypic characterization of type strains and dairy-associated isolates in the *Bacillus cereus* group indicates considerable intra-clade variability in toxin production and cytotoxicity. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM.02479-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02479-17>



29. López, V., Suárez, M., Chico, C. I., Navas, J., & Martínez-Suárez, J. V. (2006). *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos? *Revista argentina de microbiología*, 38(4), 224–234.
30. OMS | Listeriosis. (2018). Recuperado el 8 de junio de 2018, de WHO website: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/listeriosis/es/>
31. OMS | Fiebre tifoidea. (2018). Recuperado el 12 de junio de 2018, de WHO website: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/typhoid/es/>
32. Cohen, M. B., & Giannella, R. A. (1992). Hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. *Advances in Internal Medicine*, 37, 173–195.
33. Lim, J. Y., Yoon, J. W., & Hovde, C. J. (2010). A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(1), 5–14.
34. Hiriart, Y., Pardo, R., Bukata, L., Lauché, C., Muñoz, L., Goldbaum, F. ... Zylberman, V. (2018). Desarrollo de un producto anti-toxina shiga para la prevención del síndrome urémico hemolítico. *Medicina (Buenos Aires)*, 78(2), 107–112.
35. Bustos, M. J. A., Hamdan, P. A., & Gutiérrez, C. M. (2006). *Staphylococcus aureus*: La reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Revista Biomédica*, 17(4), 287–305.
36. Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., ... Kozaki, S. (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: Estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*, 130(1), 33–40.
37. Pirhonen, T. I., Andersson, M. A., Jääskeläinen, E. L., Salkinoja-Salonen, M. S., Honkanen-Buzalski, T., & Johansson, T. M. L. (2005). Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case. *Food Microbiology*, 22(1), 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.04.002>
38. Pérez, P. I. (2018). *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias. *Revista Online*. Recuperado el 13 de junio de 2018, website: [http://bvs.sld.cu/revistas/spu/vol38\\_1\\_12/spu10112.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/spu/vol38_1_12/spu10112.htm)
39. “Bacterias ácido lácticas ”EcuRed. (2018). Recuperado el 15 de junio de 2018, de [https://www.ecured.cu/Bacterias\\_%C3%A1cido\\_1%C3%A1cticas](https://www.ecured.cu/Bacterias_%C3%A1cido_1%C3%A1cticas)



40. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
41. Forney, L., Zhou, X., & Brown, C. (2004). Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology*, 7(3), 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.015>
42. Escalante, A., Rodríguez, E. M., Martínez, A., López M. 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 Microbiology Letters*, 235(2), 273–279. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09599.x>
43. Giles, G. M., García, J. G. S., Matus, V., Quintana, I. C., Bolívar, F., & Escalante, A. (2016). In vitro and in vivo probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage. *SpringerPlus*, 5(1), 708.
44. Vargas, F. T., & Kuno V. A. (2014). Morfología Bacteriana. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 49, 2594.
45. Roca, I., Akova, M., Baquero, F. Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S. et al. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. *New Microbes New Infect. Elsevier Ltd*; 2015;6(April 2015):22–9. 2.
46. Fernández, K.J., Chanci, I.C., Wilches L., Cardona, J.A. (2014) Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibidor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura, 2008-2012. *Revista Biosalud*, 13 (1): 45-61.
47. Bortolaia, V., Espinosa, G. C., & Guardabassi, L. (2016). Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.003>
48. Rabines, A. R. A., & Silva, .K. A., (2019). Efecto del sobrenadante de los cultivos de *Lactobacillus spp.* Aislados de queso artesanal sobre la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.



49. Sánchez, L., & Tromps, J. (2014). Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Revista de Salud Animal*, 36(2), 124–129.
50. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
51. Palud, A., Scornec, H., Cavin, J.-F., & Licandro, H. (2018). New Genes Involved in Mild Stress Response Identified by Transposon Mutagenesis in *Lactobacillus paracasei*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00535>

## 14.0 Anexos

### 14.1 Anexo A.- Resultados obtenidos en el análisis de la secuenciación con el software

#### Finch TV de la colonia Ag1.13 A

##### Secuencia

GATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGA  
TGATCGGTGCTTGACCGAGATTCAACATAGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA  
CCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCA  
TGGTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTG  
GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAAGTGGAGGTTGATCGGCCACATTGGG  
ACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGT  
CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGA  
ATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG  
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCA  
GGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAA  
ACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAG  
AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCG  
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCG  
CCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATCCGCCTGGGGAGTACGACCG

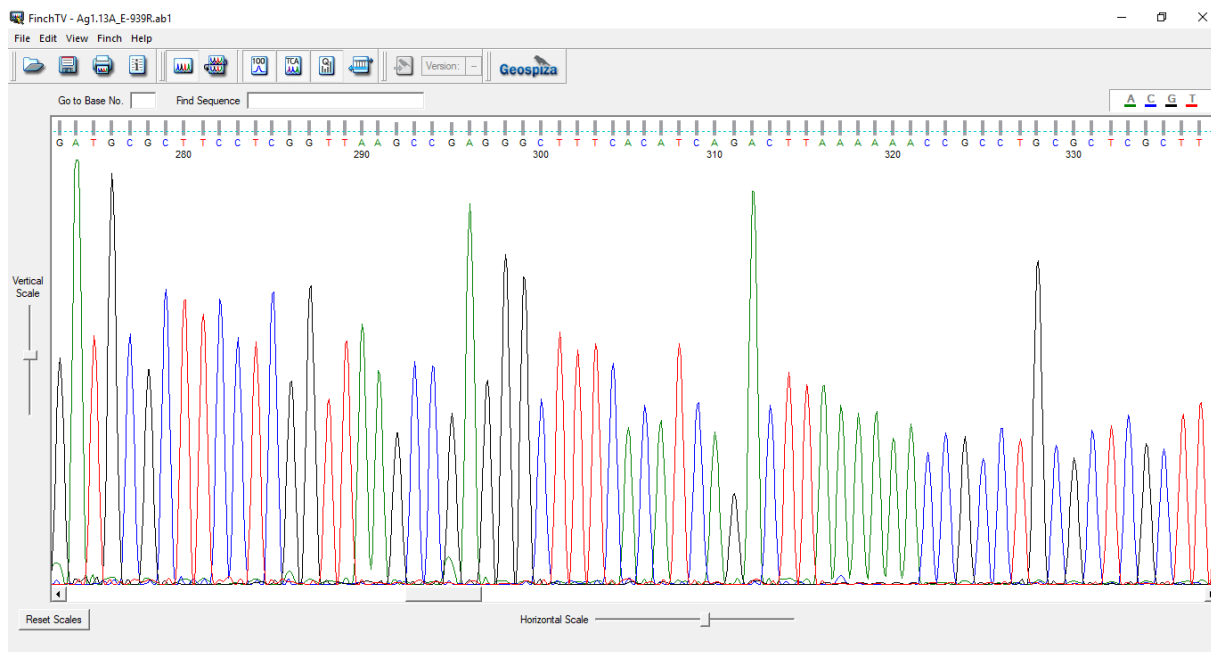
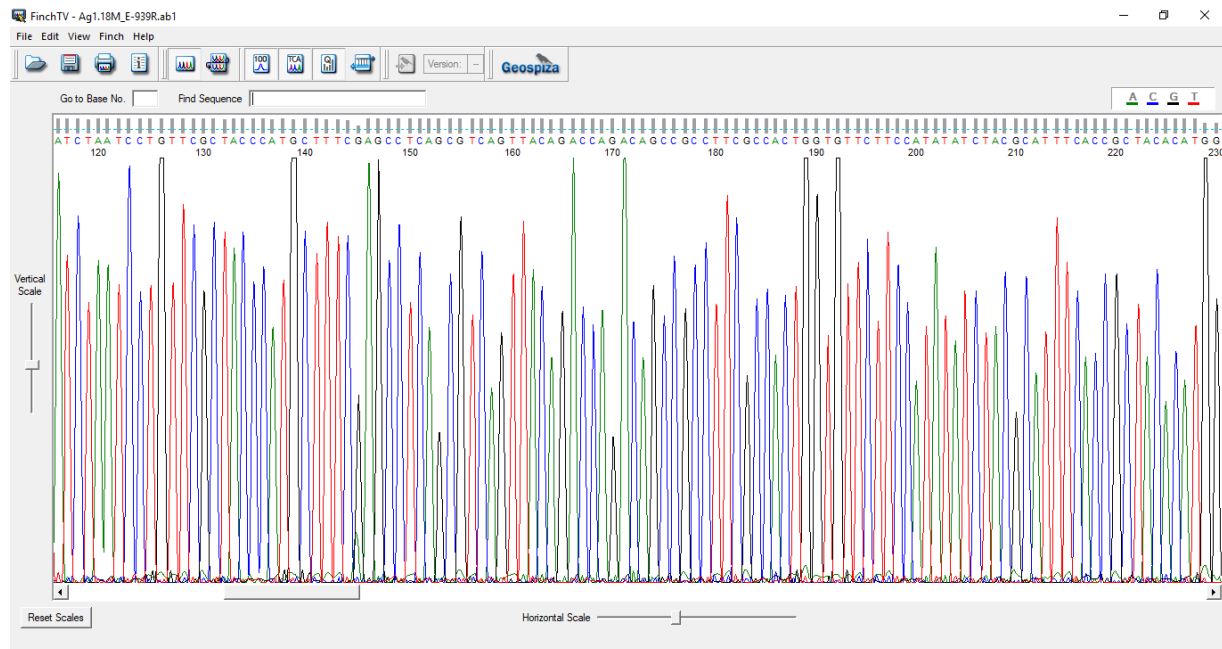


Figura 10.- Electroferograma de la secuencia de la cepa Ag1.13 A, analizado con el software Finch TV

## 14.2 Anexo B.- Resultados obtenidos en el análisis de la secuenciación con el software Finch TV de la colonia Ag1.18 M

### Secuencia

TGCAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGC  
GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTA  
ATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGG  
TGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAA  
CTGAGAGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  
GGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGG  
TCGTAAAACCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCCGGCGTGACGGTATCCA  
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCG  
GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACC  
GAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGC  
GGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACG  
CTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATG  
AATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATCCGCCTGGG  
GAGTACGACCG



**Figura 11.-** Electroferograma de la secuencia de la cepa Ag1.18M, analizada con el software Finch TV

### 14.3 Anexo C.- Resultados obtenidos en el análisis de la secuenciación con el software Finch TV de la colonia Ag1.23 M

#### Secuencia

TCGAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGAACGAGNGGC  
GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTA  
ATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGG  
TGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAA  
CTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  
GGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGG  
TCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCA  
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCG  
GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACC  
GAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGC  
GGTGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACG  
CTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATG  
AATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGG  
GAGTACGACCG

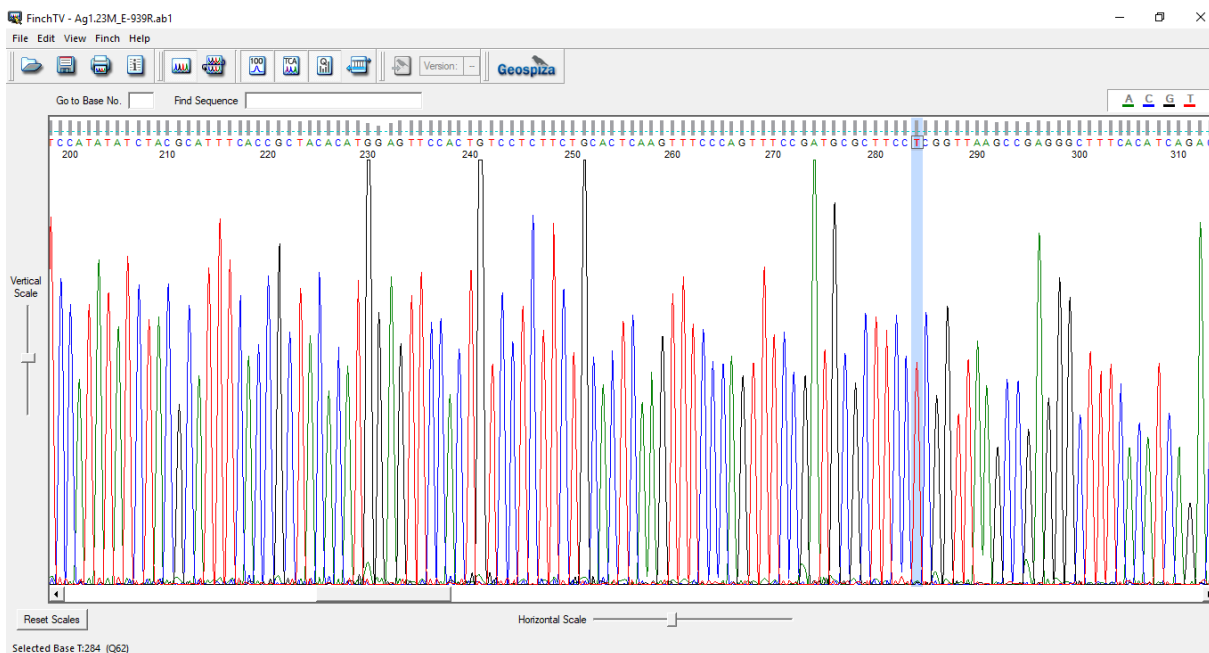


Figura 12.- Electroferograma de la secuencia de la cepa Ag1.23 M, analizada con el software Finch TV

## 14.4 Anexo D.- Resultados obtenidos en el análisis de la secuenciación con el software Finch TV de la colonia Ag1.27M

### Secuencia

TACATGCAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGAACGAG  
TGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGAT  
GCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTT  
GGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCC  
GAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTC  
GGTTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTAT  
CCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTAT  
CCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTA  
ACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGT  
AGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTA ACTG  
ACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACG  
ATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATCCGCCTG  
GGGAGTACGACCG

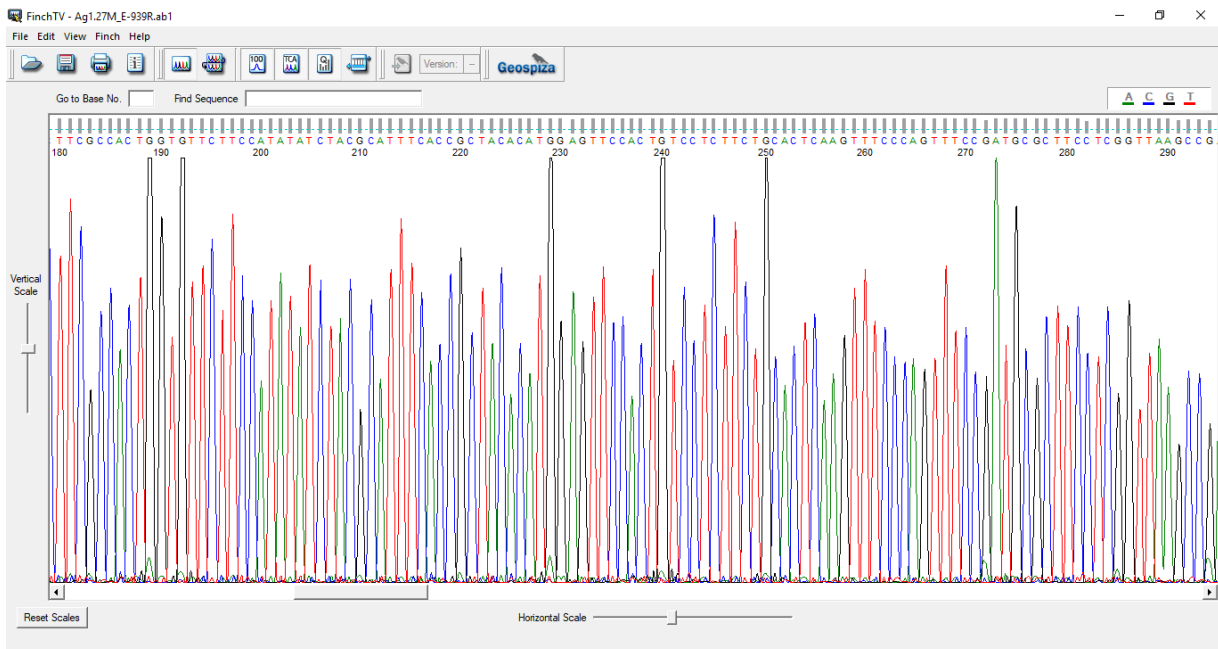


Figura 13.- Electroferograma de la secuencia de la cepa Ag1.27 M, analizada con el software Finch TV