



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

Caracterización y evaluación inmunológica de MVs de
Peribacillus simplex aislado del tepache

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO (A) EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
C.DARINKHA DOLORES CUAYA DEHESA

DIRECTOR DE TESIS:
D. C. MARÍA CRISTINA GONZÁLEZ VÁZQUEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS:
D. C. ALEJANDRO CARABARÍN LIMA



ENERO 2026

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de esta travesía académica, han sido muchas las personas que, de una u otra forma, han contribuido a la realización de esta tesis. A todas ellas, expreso mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, dedico este trabajo principalmente a mi mamá y a mi hermana, quienes han sido mi mayor fuente de amor, fortaleza y apoyo incondicional. Su valentía y entereza, incluso en los momentos más difíciles tras la partida de mi papá, me han inspirado a seguir adelante, con su amor constante y fe en mí, ha sido mi mayor inspiración y el motor que me impulsó a superar cada desafío. Este logro es tanto mío como suyo, pues sin su presencia y motivación no habría sido posible.

Agradezco profundamente a mi asesora Dra. María Cristina González Vázquez, por su guía, paciencia y valiosas aportaciones durante cada etapa de este proyecto. Su compromiso y dedicación no solo enriquecieron este trabajo, sino también mi formación profesional.

A mis compañeras de trabajo en el laboratorio y a mis amigos, por su apoyo constante, colaboración y compañía. Gracias a su entusiasmo y disposición, las jornadas fueron mucho más llevaderas. Su apoyo mutuo, sus palabras de aliento en los momentos más difíciles y su presencia fueron fundamentales para superar los retos que surgieron a lo largo de este proceso compartido. Sin duda, su compañía hizo este camino mucho más enriquecedor y menos pesado.

Asimismo, quiero expresar mi gratitud al Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por brindarme las herramientas necesarias para llevar a cabo esta investigación, así como a los profesores y colegas que contribuyeron con su conocimiento y experiencia.

Finalmente, agradezco a la vida y a todas las experiencias, tanto buenas como difíciles, que me han permitido aprender, crecer y llegar hasta aquí, me ayudaron a crecer como persona y como profesional.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
ABREVIATURAS.....	4
1.0 INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 FERMENTADOS TRADICIONALES Y SU RELEVANCIA EN MÉXICO.....	7
1.2 PROBIÓTICOS Y SU RELEVANCIA.....	9
1.3 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS MVs.....	11
1.4 APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS MVs	13
1.5 <i>PERIBACILLUS SIMPLEX</i> EN AGRICULTURA Y MEDIO AMBIENTE.....	14
1.6 IMPLICACIONES CLÍNICAS Y NUEVAS INVESTIGACIONES.....	14
2.0 JUSTIFICACIÓN.....	15
3.0 HIPÓTESIS	17
4.0 OBJETIVOS	17
4.1 OBJETIVO GENERAL	17
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	18
6.0 MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	19
6.2 FILTRACION DEL TEPACHE	19
6.3 USO DE MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES PARA LA IDENTIFICACIÓN	19
6.4 TINCIÓN DE GRAM PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS EN EL TEPACHE	19
6.5 IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA	20
6.6 PRUEBA DE ANTIBIOGRAMA PARA LA DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS	20
6.7 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA	20
6.8 PURIFICACIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA (MVs) DE <i>PERIBACILLUS SIMPLEX</i> EN MEDIOS BHI Y BHI CON AMPICILINA.....	21
6.9 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS UTILIZANDO EL MÉTODO DE BRADFORD.....	21
6.10 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA BACTERIANA A PH ÁCIDO Y NEUTRO	22
6.11 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE MVs DE <i>PERIBACILLUS SIMPLEX</i>	23
6.12 PERFIL PROTEICO DE MVs EN GEL SDS-PAGE	23
6.13 ENSAYO DE TRANSFERENCIA DE MVs EN UN MEDIO LÍQUIDO DE BHI CON <i>E. COLI</i>	24
6.14 PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	24
6.15 AMPLIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	25

6.16 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOGENICA DE LAS MVs Y DISEÑO DEL ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN EN RATONES	26
6.17 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE VESÍCULAS DE MEMBRANA (MVs) PURIFICADAS DE <i>PERIBACILLUS SIMPLEX</i>	27
6.18 ENSAYO DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA <i>PERIBACILLUS SIMPLEX</i> Y SUS MVs	27
6.19 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS EN LAS MVs DE <i>PERIBACILLUS SIMPLEX</i> MEDIANTE WESTERN BLOT. 28	
7.0 RESULTADOS.....	29
7.1 IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA	29
7.2 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MVs.....	31
7.3 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA BACTERIANA A PH ÁCIDO Y NEUTRO.....	32
7.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE MVs DE <i>PERIBACILLUS SIMPLEX</i>	35
7.5 PERFIL PROTEICO DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA MEDIANTE SDS-PAGE.....	37
7.6 ENSAYO DE TRANSFERENCIA DE MVs EN UN MEDIO LÍQUIDO DE BHI CON <i>E. COLI</i>	38
7.7 AMPLIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA POR PCR	39
7.8 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE GENERADA POR EL ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN	40
7.9 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE VESÍCULAS DE MEMBRANA (MVs) PURIFICADAS DE <i>PERIBACILLUS SIMPLEX</i>	40
7.10 ENSAYO DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA <i>PERIBACILLUS SIMPLEX</i> Y SUS MVs	41
7.11 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS EN LAS MVs DE <i>PERIBACILLUS SIMPLEX</i> MEDIANTE WESTERN BLOT	43
8.0 DISCUSION.....	46
9.0 CONCLUSIONES.....	55
10.0 BIBLIOGRAFIA.....	57

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg/µL	Microgramo/Microlitro
µL	Microlitro
DH5α	Células DH5-alfa
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgG	Inmunoglobulina G
mg/mL	Miligramo/Mililitro
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
OM	Membrana externa
OMV's	Microvesículas de membrana externa
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades formadoras de colonias
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de proteínas
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
TAE	Tris-Acetate-EDT

Resumen

Las vesículas de membrana (MVs) son estructuras nanométricas producidas por diversas bacterias. Las MVs desempeñan funciones fundamentales en la comunicación microbiana, en la transferencia de genes y en la modulación de la respuesta inmunológica. En esta investigación, se caracterizaron las MVs producidas por *Peribacillus simplex*, una bacteria Gram positiva, encontrada en el fermento tradicional mexicano denominado: tepache. Además, se analizaron sus características de inmunomodulación, estabilidad estructural y las relaciones con bacterias patógenas en un modelo murino. Las MVs fueron aisladas y purificadas utilizando cultivos en medio BHI, con y sin ampicilina. Notoriamente, se observó una mayor producción de vesículas en situaciones de estrés por antibiótico. Las MVs demostraron estabilidad estructural ante diferentes niveles de pH que simulan el ambiente gastrointestinal; la conservación de su actividad funcional sugiere una integridad suficiente para su potencial uso por vía oral.

Los análisis realizados a las MVs, incluyeron ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano, curvas de crecimiento en co-inoculación y pruebas de transferencia de genes. Los resultados mostraron que las MVs no presentaron actividad antimicrobiana directa, sin embargo, sí promovieron la transmisión horizontal del gen de resistencia a betalactámicos como BlaTEM y controlaron el crecimiento bacteriano. En cuanto a su inmunogenicidad, a través de la inmunización en el modelo murino y la detección de anticuerpos por ELISA, se evidenció que la vía de administración condiciona la respuesta humoral: la intraperitoneal promovió IgG e IgM, mientras que la oral estimuló principalmente IgA, lo que indica una activación diferencial del sistema inmunológico.

La evaluación de proteínas mediante SDS-PAGE y Western blot mostró un perfil particular de proteínas inmunorreactivas, alguna de ellas presente solo en las MVs. Estos resultados resaltan el potencial biotecnológico de las MVs de *P. simplex* como plataformas inmunomoduladoras, lo que propone posibles usos en la creación de vacunas y probióticos optimizados.

Palabras clave: *Peribacillus simplex*, MVs, tepache, inmunomodulación, transferencia horizontal de genes, fermentación tradicional, resistencia antimicrobiana

1.0 INTRODUCCIÓN

En México, los fermentados tradicionales como el tepache, el pulque, el pozol, **tejuino**, **tuba**, representan un patrimonio cultural por su importancia histórica y gastronómica, construyen sistemas biológicos de gran interés científico al funcionar como fuentes naturales de microorganismos con diversas propiedades metabólicas y biológicas. Estos fermentados están conformados por comunidades microbianas complejas, integradas principalmente por levaduras, bacterias y mohos, las cuales interactúan entre sí y con el entorno, dando lugar a la producción de compuestos bioactivos como ácidos grasos, vitaminas, enzimas y otros metabolitos conocidos como postbióticos..

Los probióticos son microorganismos vivos con efectos beneficiosos para la salud; los prebióticos son sustratos que estimulan selectivamente el crecimiento y la actividad de bacterias benéficas en el intestino; y los postbióticos corresponden a los compuestos bioactivos producidos por los probióticos durante el metabolismo de componentes dietéticos. Cada uno cumple una función específica en la relación simbiótica con el huésped y contribuye al mantenimiento de la homeostasis; estos tres componentes han mostrado potencial como estrategias complementarias para promover la salud y apoyar el tratamiento de diversas enfermedades sistémicas (Ji et al., 2023).

Uno de los mecanismos relacionados con los efectos benéficos atribuidos a los probióticos y postbióticos es la liberación de vesículas de membrana (MVs). Estas estructuras nanoesféricas, producidas por diversas bacterias, facilitan la comunicación tanto entre microorganismos como entre las bacterias y el hospedero. Las MVs pueden contener proteínas, lípidos, polisacáridos, ADN y distintos metabolitos bioactivos, lo que les permite intervenir en procesos de señalización celular, competencia microbiana y regulación de la respuesta inmunitaria.

Peribacillus simplex no había sido previamente reportada en el tepache, ni se había descrito su capacidad para producir vesículas de membrana (MVs) en este tipo de fermentados tradicionales. Este estudio permitió identificar la presencia de *P. simplex* en muestras de tepache y se evaluó su capacidad para producir MVs, aportando evidencia novedosa sobre la diversidad microbiana presente en fermentados tradicionales y ampliando el conocimiento sobre el potencial funcional de esta especie en aplicaciones biotecnológicas, alimentarias y médicas.

1.1 FERMENTADOS TRADICIONALES Y SU RELEVANCIA EN MÉXICO

Los alimentos fermentados tradicionales representan una fuente rica y diversa de microorganismos con funciones biológicas que aún poco exploradas. En México bebidas como el pulque, el pozol, el tejuino, la tuba y el tepache representan un valor cultural y gastronómico.

El pulque es un ejemplo de una bebida fermentada tradicional mexicana elaborada a partir del aguamiel del maguey representando uno de los fermentados más emblemáticos del país. Su proceso de fermentación es principalmente por levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias ácido-lácticas, del género *Lactobacillus* ssp (Escalante et al., 2016). Diversos estudios han señalado que el pulque contiene péptidos funcionales, compuestos bioactivos y vitamina B que ayudan a la salud gastrointestinal, favorecen la digestión y promueven la regulación del sistema inmune. Se ha reportado su posible efecto antiinflamatorio y antioxidante esto lo convirtiendo en un alimento funcional que ha generado un interés cada vez mayor en el ámbito científico y nutricional (González et al., 2020).

El tejuino es una bebida tradicional consumida en el norte y occidente de México. En este contexto, se evaluó el potencial probiótico de la cepa *Lactiplantibacillus plantarum* BI-59.1, aislada de esta bebida. La cepa demostró propiedades probióticas relevantes, entre ellas la producción de compuestos antimicrobianos como ácido láctico y la presencia del gen de plantaricina A. Asimismo, presentó capacidad de inhibición de enteropatógenos tanto por células planctónicas como por sus metabolitos, destacando la inhibición de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en su adhesión a células HT29-MTX. Mostrando la capacidad de formación de biopelículas, adhesión bacteriana (3,96 UFC/célula en células HT29-MTX) y tolerancia a condiciones gastrointestinales simuladas, incluyendo pH 3 y sales biliares (García-Reyes et al., 2023).

El vino de palma mejor conocida como tuba es una bebida tradicional elaborada a partir de la savia recolectada de diversas especies de palmeras y consumida en distintas regiones de México en los estados de Guerrero, Colima y Michoacán. Se obtiene mediante la extracción de savia, las inflorescencias de *Cocos nucifera* L. y se consume tanto como bebida tradicional como por sus usos empíricos en el alivio de trastornos gastrointestinales y como rehidratante (Astudillo-Melgar et al., 2019).

Entre otros fermentados tradicionales mexicanos, el pozol es una bebida fermentada elaborada con masa de maíz nixtamalizado y característica de regiones del sureste como Tabasco, Chiapas y Campeche (Xu et al., 2023). Su fermentación involucra una variedad diversa de bacterias ácido-lácticas y levaduras nativas, las cuales transforman los carbohidratos del maíz en ácidos orgánicos, mejorando su digestión y aumenta la cantidad de nutrientes (Velázquez-López et al., 2018). El consumo frecuente está relacionado con beneficios de la regulación de la microbiota intestinal, la aportación de fibra dietética y un efecto probiótico que puede prevenir infecciones intestinales (NTX, 2013).

El **tepache** es una bebida fermentada tradicional mexicana cuyo nombre proviene del náhuatl “tepatli” que significa "bebida de maíz". Sus orígenes se remontan en el México prehispánico y en sus numerosas comunidades indígenas de estados como Oaxaca, Querétaro, Guerrero, Puebla, Chihuahua, Sinaloa, Sonora, Veracruz, Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Tabasco, Chiapas, Morelos, Baja California y Jalisco (Gobierno de México, 2017). Esta bebida históricamente se preparaba a partir del maíz fermentado, en la actualidad se elabora utilizando cáscaras de piña maduras y pulpa de piña madura, generalmente sin lavar, a las que se añade agua y algún tipo de endulzante, como piloncillo o panela. La mezcla se fermenta de manera espontánea a temperatura ambiente durante uno a varios días, en recipientes de barro, plástico o vidrio, sin un control estricto de variables como pH, temperatura o concentración exacta de azúcares, este proceso favorece la microbiota, dependiente de las condiciones ambientales, lo que da lugar a una bebida con características sensoriales distintivas que varían entre regiones y productores.

El tepache se caracteriza porque tiene un sabor dulce y ligeramente ácido, con bajo contenido alcohólico y su asociación con beneficios para la salud, como la mejora del equilibrio de la microbiota intestinal. Durante la fermentación espontánea, los carbohidratos, proteínas y lípidos presentes en la bebida son transformados mediante cambios complejos llevados a cabo principalmente por levaduras y bacterias ácido-lácticas, las cuales desempeñan un papel muy importante por sus propiedades funcionales y sensoriales (Ruíz Valdiviezo, 2022).

Estudios microbiológicos y moleculares han identificado la presencia de especies como *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces*, *Pediococcus*, *Liquorilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* en diferentes muestras de tepache (de la Fuente-

Salcido et al., 2015; Escobar-Ramírez et al., 2020). Estudios metagenómicos basados en secuenciación del gen 16S rRNA e ITS han demostrado que la comunidad microbiana del tepache es más diversa y dinámica de lo previamente descrito, incluyendo además géneros como *Weissella*, *Fructobacillus*, *Acetobacter* y *Gluconobacter*, así como levaduras de los géneros *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida* y *Kazachstania* (Gutiérrez-Sarmiento et al., 2022).

Durante la fermentación las levaduras predominan inicialmente al metabolizar azúcares simples y producir etanol y CO₂; mientras que en fases posteriores se incrementa la abundancia de bacterias ácido-lácticas y ácido-acéticas, responsables de la producción de ácidos orgánicos que contribuyen al descenso del pH y al perfil sensorial característico. El análisis predictivo funcional sugiere la activación de rutas metabólicas asociadas con fermentación de carbohidratos, biosíntesis de aminoácidos y producción de metabolitos bioactivos, lo que posiciona al tepache como un ecosistema microbiano complejo con potencial funcional y biotecnológico (Gutiérrez-Sarmiento et al., 2022).

Diversas bacterias presentes en este fermentado han sido estudiadas por su capacidad para producir compuestos antimicrobianos y tolerar condiciones gastrointestinales, lo que ha despertado interés en su posible aplicación en el ámbito de la salud. En este contexto, los fermentados tradicionales no solo constituyen una herencia cultural, sino también una fuente de microorganismos con relevancia biotecnológica y nutricional, cuyo estudio amplía la comprensión de la relación entre fermentación artesanal y bienestar humano (Cuamatzin-García et al., 2022).

1.2 PROBIÓTICOS Y SU RELEVANCIA

La palabra "probiótico" proviene del griego y significa "para la vida" (Bernal Castro et al., 2017). Los probióticos fueron definidos como "microorganismos vivos" en 2001 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (Gupta et al., 2009). Estos microorganismos tienen un papel fundamental para la salud de los seres humanos, especialmente en el sistema digestivo y en la modulación del sistema inmunológico.

La principal función de los probióticos es su capacidad de interactuar con las tres líneas defensivas presentes en el intestino: la barrera epitelial, la barrera microbiológica y la barrera inmunitaria (Guarner, 2007). La microbiota intestinal está constituida por un conjunto diverso y complejo de microorganismos que incluyen bacterias, virus, hongos y arqueas conforman este sistema microbiano, el cual cumplen funciones esenciales en el metabolismo del hospedero, la modulación del sistema inmunológico y como en la preservación de la integridad de la mucosa intestinal, además actúan como una barrera contra patógenos (Spigaglia, 2024). Diversos estudios han asociado a los probióticos con varios beneficios para la salud, entre los que se incluyen la mejora de la función intestinal, el fortalecimiento del sistema inmunológico, la disminución de trastornos digestivos, la prevención de infecciones urogenitales y el apoyo al bienestar mental (dos Reis et al., 2017).

La actividad metabólica de los probióticos y de otros microorganismos intestinales favorece la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés) son uno de los metabolitos más relevantes producidos por la microbiota intestinal. Estos compuestos son el subproducto de la fermentación de fibras dietéticas en el intestino grueso y teniendo una participación fundamental en la salud del hospedero. Los SCFA, como el butirato, propionato y acetato, no solamente optimizan la salud intestinal, sino que además ayudan a regular la respuesta inmunitaria y fortalecen la mucosa gastrointestinal, que es la barrera más importante entre el medio externo y el sistema inmunológico del cuerpo. Los probióticos funcionan como moduladores de la microbiota intestinal, ayudando a mantener un equilibrio entre bacterias patógenas y benéficas. Los probióticos ayudan a mantener un ecosistema intestinal sano mediante procesos como la producción de compuestos antimicrobianos, como ácidos orgánicos, reuterina, peróxido de hidrógeno la estimulación de la inmunidad y el hecho de competir por nutrientes (Reyes et al, 2011). La producción de metabolitos bioactivos, por ejemplo, los SCFA, que brindan efectos positivos tanto locales como sistémicos en el hospedero (Ney et al., 2023).

Las especies pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* han sido las más estudiadas dentro de los probióticos, debido al amplio respaldo científico que sustenta sus efectos positivos. Investigaciones recientes han evidenciado que otros microorganismos que se encuentran en alimentos fermentados de manera tradicional y en la microbiota ambiental tienen

la capacidad de ofrecer propiedades probióticas. Estos fermentados como: el pulque, el tepache y el pozol representan una fuente natural de microorganismos funcionales y constituyen un campo de interés para investigar la conexión entre la salud humana, la microbiota intestinal y la alimentación tradicional (dos Reis et al., 2017).

Cabe destacar que diversos microorganismos provenientes de la microbiota ambiental y de fermentados tradicionales han demostrado tener la capacidad de funcionar como probióticos, incluyendo efectos antiinflamatorios y benéficos en el metabolismo. Estos efectos resaltan su potencial positivo en la prevención y apoyo terapéutico para muchas enfermedades (Hill et al., 2014).

1.3 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS MVs

Las vesículas de membrana (MVs) generadas por bacterias Gram positivas han surgido como estructuras de alto interés clínico por su capacidad para mediar la comunicación bacteria-hospedero, así como para modular diversas funciones fisiológicas e inmunológicas. Si bien la mayoría de los estudios se han centrado principalmente en las microvesículas de membrana externa (OMVs) provenientes de bacterias patógenas Gram negativas, investigaciones recientes han mostrado su capacidad potencial en el diagnóstico, tratamiento de enfermedades y mantenimiento de la homeostasis microbiana en humanos.

Las vesículas de membrana (MVs), también se conocen como vesículas extracelulares (EVs), son estructuras en forma de esférica de tamaño nanométrico que las bacterias Gram positivas liberan durante su crecimiento. Estas vesículas tienen un diámetro de aproximado entre 10 y 500 nm, se originan a partir de la membrana citoplasmática y atraviesan la capa de peptidoglicano mediante procesos de remodelación de la pared celular. Su estructura está formada por una bicapa lipídica que encierra elementos citoplasmáticos; esta puede liberarse de manera activa o en conjunto con procesos de lisis celular (Bose et al., 2020).

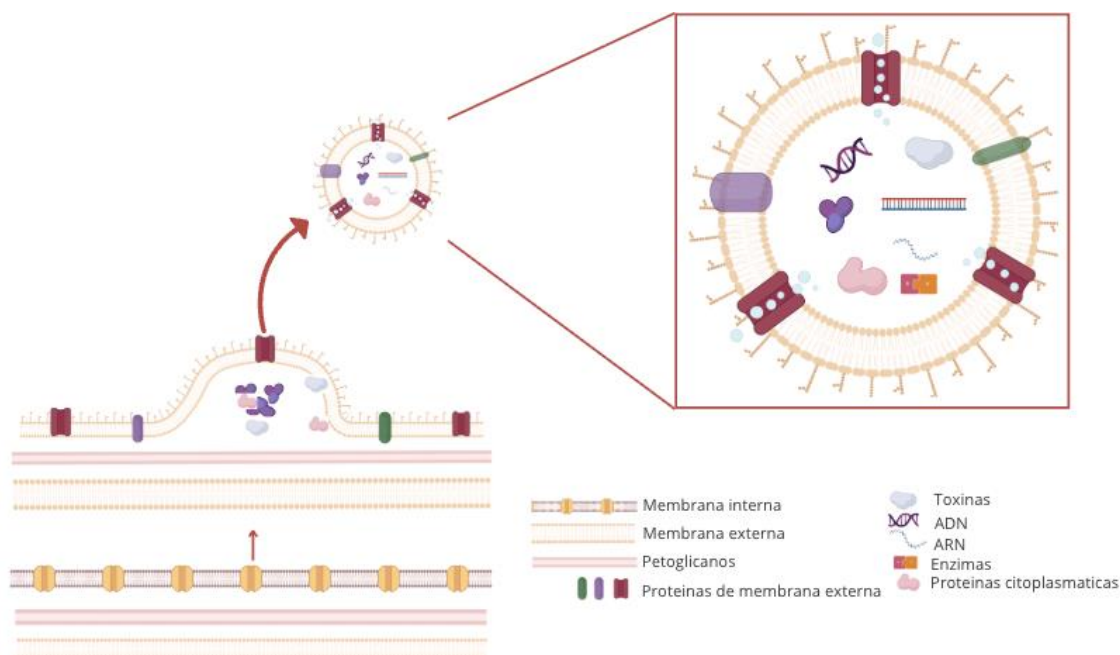


Figura 1. Producción y composición intracelular de vesículas de membrana externa (MVVs) secretadas por bacterias (elaboración propia en BioRender).

Las vesículas de membrana (MVVs) producidas por bacterias Gram positivas tienen una gran variedad de moléculas bioactivas, incluyendo enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, fragmentos de peptidoglicano y lípidos. A diferencia de las bacterias Gram negativas, no tienen componentes periplásmicos y lipopolisacáridos (Liu et al., 2018a). Estas diferencias estructurales no impiden que las OMVs Gram negativas y las MVVs Gram positivas tengan funciones esenciales como la transferencia genética, comunicación intercelular, transporte de moléculas y la regulación de la respuesta inmunitaria (Wang et al., 2025).

Las MVVs desempeñan un papel clave en la inducción de efectos inmunitarios y en la facilitación de la transferencia horizontal de genes, además tienen la capacidad de encapsular toxinas y factores de virulencia, permitiendo su entrega del hospedador y su participación en procesos de colonización y patogénesis (Liu et al., 2018). Estas vesículas han demostrado una alta biocompatibilidad y la capacidad de interactuar con el epitelio intestinal en bacterias Gram positivas con potencial probiótico, por la liberación de enzimas degradativas contra competidores, la transferencia de genes y la regulación de comunidades microbianas (Domingues et al, 2017). Lo que permite mantener la integridad de la barrera epitelial y la

homeostasis intestinal al suministrar compuestos bioactivos como los ácidos grasos de cadena corta(Wang et al., 2025).

Cabe destacar la participación en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial y de la homeostasis intestinal mediante el suministro de compuestos bioactivos, como los ácidos grasos de cadena corta, los cuales ejercen efectos benéficos tanto a nivel local como sistémico. Un ejemplo de la interacción bidireccional mediada por vesículas de membrana (MVs) es ejemplificada entre *Lactobacillus reuteri* DSM17938 y *Bifidobacterium longum subsp. longum* BG-L47; donde la existencia de una especie modula la producción de las vesículas y el efecto inmunomodulador de la otra, evidenciando el papel activo de las MVs en la estabilidad del microbioma y en la respuesta del hospedador(Wang et al., 2025).

A partir de estas evidencias las vesículas extracelulares generadas por bacterias Gram positivas son consideradas estructuras funcionales esenciales. Estas participan en la liberación y el transporte de moléculas bioactivas que intervienen en la comunicación intercelular, la transferencia genética y la modulación de la respuesta inmunitaria del hospedador, contribuyendo a la dinámica y estabilidad del microbioma intestinal (Cao et al, 2021).

1.4 APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS MVs

Las vesículas de membrana (MVs) producidas por bacterias no patógenas, constituyen una alternativa a los antígenos convencionales, debido a que pueden ser usados para aplicaciones biológicas y biotecnológicas. Estas estructuras conservan los componentes antigénicos en su conformación nativa, lo cual ha permitido el uso de estos productos en el desarrollo de vacunas seguras y estables sin la necesidad de emplear microorganismos vivos (van der Pol et al., 2015).

También han demostrado una capacidad adyuvante al promover la activación de células presentadoras de antígeno e inducir respuestas humores y celulares con un menor adyuvante tóxico en comparación con los adyuvantes convencionales. Su estructura de bicapa lipídica les permite encapsular y transportar compuestos bioactivos, lo que ha impulsado su estudio como sistemas de liberación dirigida de fármaco (Bitto et al, 2017), pueden participar en la transferencia de material genético y en la competencia microbiana, contribuyendo a la modulación de la microbiota y a la estabilidad de los ecosistemas microbianos. En conjunto,

estas características posicionan a las MVs de bacterias no patógenas como una plataforma prometedora para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas(Xu et al., 2023).

Las MVs también son agentes antibacterianos indirectos, cuando intervienen en la adhesión de patógenos, secuestran antibióticos o péptidos antimicrobianos; además, regulan la microbiota intestinal. En algunos casos, pueden actuar como señuelos, secuestrando bacteriófagos o neutralizando toxinas, protegiendo bacterias comensales y células del hospedero (Kim et al., 2023).

1.5 PERIBACILLUS SIMPLEX EN AGRICULTURA Y MEDIO AMBIENTE

Peribacillus simplex es una bacteria Gram positiva que tiene morfología bacilar, aeróbica o anaerobia de manera facultativa y formadora de esporas, características que le favorece su elevada resistencia frente a condiciones ambientales adversas. Presenta un amplio rango crecimiento entre 3 °C y 45 °C, con un óptimo crecimiento entre 25 °C y 37 °C. Esta especie se caracteriza por tener una extensa distribución ecológica y ser capaz de vivir en varios entornos, como suelos, rizosfera y sistemas de fermentación (Yoon et al., 2025).

P. simplex muestra propiedades biológicas importante teniendo la capacidad de fomentar el crecimiento de las plantas al aumentar la absorción de nutrientes y generar compuestos bioactivos, además de su capacidad para ejercer biocontrol contra hongos, nematodos y bacterias fitopatógenas, estos efectos pueden estar relacionados principalmente con la producción de resistencia sistémica en las plantas (Valentine et al., 1996). Además, esta especie ha demostrado su potencial en procesos de biorremediación, participando en la degradación de contaminantes ambientales como hidrocarburos aromáticos y metales pesados, lo que demuestra su capacidad de adaptación y su versatilidad metabólica (Manetsberger et al., 2023).

1.6 IMPLICACIONES CLÍNICAS Y NUEVAS INVESTIGACIONES

Si bien *Peribacillus simplex* ha sido tradicionalmente considerada una bacteria ambiental, existen reportes clínicos que sugieren su posible papel como patógeno oportunista. En un caso reciente, se documentó una infección urinaria grave (pionefrosis) en un paciente diabético de 64 años, causada por una coinfección de *Klebsiella pneumoniae* y *P. simplex*, lo que

representa el primer caso de pionefrosis asociada a esta última. El paciente presentó dolor lumbar agudo, fiebre y alteración del estado de conciencia. Las imágenes revelaron hidronefrosis severa y abscesos en el músculo psoas. El tratamiento incluyó drenaje quirúrgico y nefrectomía. Los cultivos microbiológicos confirmaron la presencia de ambas bacterias (Malihiy et al., 2025).

Este hallazgo resalta la importancia de considerar a bacterias ambientales como *P. simplex* en cuadros infecciosos graves, así como la necesidad de establecer protocolos rigurosos que descarten contaminaciones de laboratorio. Estos hallazgos sugieren la pertinencia de futuras investigaciones orientadas al estudio de sus vesículas de membrana. La patogenicidad de esta bacteria, anteriormente subestimada por su clasificación como organismo ambiental, se sustenta en factores de virulencia en específico, la capacidad de formar biopelículas para adherirse a superficies biológicas e inorgánicas, la secreción de proteasas que contribuyen al daño tisular, la resistencia intrínseca o adquirida a ciertos antibióticos como la penicilina, y la producción de endosporas, las cuales le confieren una notable persistencia en entornos hospitalarios (Lu et al., 2025; Manetsberger et al., 2023b).

2.0 JUSTIFICACIÓN

Actualmente, existe información limitada sobre la producción y secreción de vesículas de membrana (MVs) por *Peribacillus simplex*, por lo que se desconoce en gran medida la composición y función biológica de su carga. *P. simplex* una bacteria Gram positiva no patógena asociada a fermentados tradicionales como el tepache, donde participa en interacciones microbianas complejas.

Aunque no se considera patógena, la secreción de MVs por *P. simplex* podría representar un mecanismo relevante de comunicación, adaptación ambiental y competencia microbiana, al contener moléculas bioactivas como proteínas, enzimas o péptidos antimicrobianos que podrían intervenir en la modulación de la respuesta inmunitaria y en la inhibición de microorganismos competidores. Por ello, el presente trabajo se enfoca en caracterizar las MVs producidas por una cepa de *P. simplex* aislada del tepache y evaluar su posible actividad inmunomoduladora y antimicrobiana en modelos murinos, así como de su actividad antimicrobiana, resulta necesaria para comprender su papel ecológico y funcional, y para explorar posibles aplicaciones biotecnológicas desde un enfoque no patogénico.

3.0 HIPÓTESIS

Las vesículas de membrana (MVs) secretadas por *Peribacillus simplex* aislado del tepache mostrarán propiedades inmunomoduladoras y antimicrobianas, en un modelo murino.

4.0 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

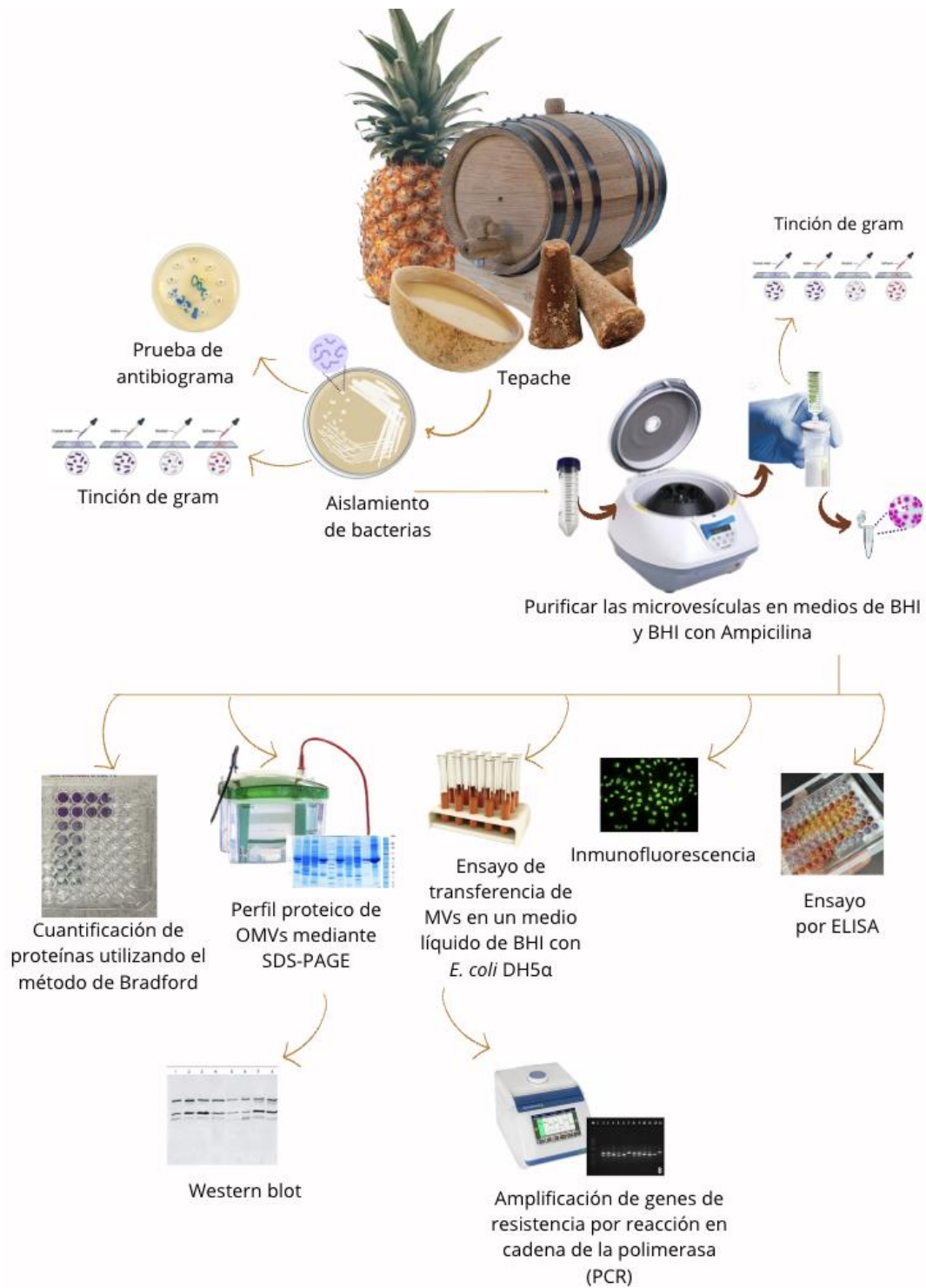
Caracterizar vesículas de membrana (MVs) secretadas por *Peribacillus simplex* aislado del tepache y evaluar su efecto inmunomodulador, antimicrobiano y potencial de transferencia genética en un modelo murino mediante administración intraperitoneal.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Confirmar que los aislados sean Gram positivos y descartar la presencia de bacterias Gram negativas.
2. Aislar y purificar MVs de *Peribacillus simplex* cultivado en condiciones estándar mediante centrifugación diferencial y filtración.
3. Analizar la actividad antimicrobiana de las MVs frente a bacterias patógenas seleccionadas mediante la evaluación del crecimiento bacteriano en presencia de diferentes concentraciones de MVs en medio líquido sobre su crecimiento.
4. Evaluar la capacidad de las MVs para facilitar la transferencia horizontal de genes de resistencia en cepas receptoras.
5. Evaluar la respuesta inmune humoral en ratones inmunizados con MVs por vía intraperitoneal para la cuantificación de anticuerpos.
6. Caracterizar el perfil proteico e inmunogénico de las MVs.

5.0 Metodología e investigación

5.1 Diseño experimental



6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se utilizaron muestras de tepache provenientes de la ciudad de Atlixco, Puebla, México. Las muestras se transportaron en condiciones estériles y fueron procesadas inmediatamente para el aislamiento bacteriano y la posterior caracterización.

6.2 FILTRACIÓN DEL TEPACHE

La muestra de tepache fue sometida a un proceso de filtración utilizando filtros de PVDF (Durapore, MF- Millipore) estériles con poro de 0.45 μm y 0.22 μm , con el objetivo de separar las fracciones celulares y obtener el sobrenadante libre de bacterias. Previamente, la muestra fue centrifugada a 6000 rpm a 4°C durante 20 min para eliminar residuos sólidos gruesos, conservándose tanto el precipitado como el sobrenadante para posteriores análisis. El sobrenadante y el precipitado filtrado se inocularon en caldo Luria-Bertani (LB) como medio rico para favorecer el crecimiento bacteriano y facilitar la identificación de las especies presentes.

6.3 USO DE MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA BACTERIA AISLADA

Para realizar el aislamiento y la diferenciación de las bacterias presentes en las muestras, se emplearon medios de cultivo selectivos y diferenciales, entre ellos Agar MacConkey, TSA (Tryptic Soy Agar) y agar sal manitol (Becton Dickinson). Este último fue utilizado específicamente para la detección de bacterias Gram positivas halotolerantes. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 a 48 horas bajo condiciones aeróbicas. Posteriormente, se evaluaron las colonias formadas en cada medio con base en sus características morfológicas y cromáticas, permitiendo así una clasificación preliminar de los microorganismos presentes.

6.4 TINCIÓN DE GRAM PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS EN EL TEPACHE

La tinción de Gram se utilizó como una prueba de control para confirmar que los aislados correspondieran a bacterias Gram positivas y para descartar la presencia de Gram negativas,

ya que uno de los objetivos del estudio fue evaluar la producción de vesículas por bacterias Gram positivas no patógenas. Para ello, se tomó una alícuota de 20 µL de cada muestra (sobrenadante y precipitado), se extendió sobre un portaobjetos y se fijó con calor. Se aplicó cristal violeta al 1% durante 1 minuto, seguido de lavado con agua destilada, Lugol como mordiente durante 1 minuto, decoloración con alcohol-acetona durante 15 a 30 segundos, y contraste con safranina durante 1 minuto. Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio óptico (Motic) en objetivo de 100X para la determinación de la morfología y tinción de la pared celular.

6.5 IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA

Los aislados bacterianos obtenidos y caracterizados de forma preliminar se enviaron a un laboratorio especializado para su identificación molecular mediante MALDI-TOF.

6.6 PRUEBA DE ANTIBIOGRAMA PARA LA DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

Se evaluó la sensibilidad de *Peribacillus simplex* a diferentes antibióticos mediante la técnica de difusión en disco en agar Mueller-Hinton. Para ello, se sembró la bacteria en 3 mL de medio BHI líquido y se incubó por 24 horas a 37 °C para permitir su crecimiento. Posteriormente, con un hisopo estéril, la suspensión bacteriana se distribuyó uniformemente sobre la superficie de placas con agar Mueller-Hinton. A continuación, se colocaron discos impregnados con distintos antibióticos (Reactivos para Diagnóstico®) sobre el agar, las placas se incubaron nuevamente durante 24 horas a 37 °C. Finalmente, la sensibilidad antibiótica se determinó midiendo los diámetros de los halos de inhibición generados alrededor de los discos, siguiendo criterios estándar de interpretación.

6.7 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA

Para evaluar el tiempo óptimo de producción de vesículas de membrana, se cultivaron cepas de *Peribacillus simplex* en medio BHI durante 24, 36, y 48 horas. Las muestras fueron tomadas a intervalos específicos y se realizaron análisis de crecimiento bacteriano y se realizaron observaciones al microscopio utilizando tinción de Gram para identificar el

crecimiento bacteriano y la presencia de vesículas de membrana en el medio de cultivo. La cantidad de vesículas de membrana se estimó visualmente en función de su tamaño y forma en las preparaciones microscópicas.

6.8 PURIFICACIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA (MVs) DE *PERIBACILLUS SIMPLEX* EN MEDIOS BHI Y BHI CON AMPICILINA

Para realizar la purificación de vesículas de membrana (MVs) de *Peribacillus simplex*, la bacteria se cultivó en caldo BHI, sin y con la adición de ampicilina (100 µg/mL), a 37 °C y 150 rpm durante 48 horas hasta alcanzar la fase estacionaria, finalizando los cultivos se sometieron a centrifugación a 6000 rpm a 4 °C durante 30 min. para eliminar las células y otros residuos celulares. El sobrenadante obtenido se filtró a través de membranas de 0.45 µm y 0.22 µm para asegurarla la eliminación completa de células residuales.

Para la precipitación de las MVs, se añadió acetona fría en una proporción 1:1 (v/v) al sobrenadante filtrado, y se incubó a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se realizó una nueva centrifugación a 6000 rpm durante 30 min. a 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en 2 mL de solución PBS estéril.

Con el objetivo de verificar la pureza de las vesículas de membrana obtenidas, se llevaron a cabo tinciones de Gram y cultivos en agar BHI por 24 h a 37°C. La ausencia de crecimiento bacteriano en las placas se consideró como un indicador de muestras libres de contaminación.

6.9 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS UTILIZANDO EL MÉTODO DE BRADFORD

La concentración de proteínas en las MVs de *Peribacillus simplex* (MVs) se cuantificó usando el método de Bradford. Se preparó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA), a partir de una solución stock de 1 µg/µL a diferentes concentraciones de BSA (Tabla 1) mediante diluciones seriadas en PBS, ajustando a un volumen final de 150 µL. Se añadieron 50 µL del reactivo de Bradford a cada mezcla y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 595 nm en un espectrofotómetro. La concentración de proteínas de las MVs se calculó interpolando los valores de absorbancia obtenidos en la curva estándar.

Las concentraciones empleadas en la curva estándar se indican en la siguiente tabla:

Tabla 1- Concentraciones específicas de BSA para la determinación de MVs

Tubo	BSA (μL)	PBS (μL)	Bradford (μL)
1	0	150	50
2	0.5	149.5	50
3	5	145	50
4	10	140	50
5	20	130	50
6	30	120	50
7	40	110	50

En el caso de las muestras de MVs, se utilizaron 5 μL de muestra, completando el volumen con 145 μL de PBS antes de la adición de 50 μL del reactivo de Bradford.

La concentración de proteínas presentes en las muestras de MVs se determinó mediante interpolación de los valores de absorbancia obtenidos, comparándolos con la curva estándar de BSA. Este procedimiento permitió una cuantificación precisa de las proteínas para su posterior análisis.

6.10 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA BACTERIANA A PH ÁCIDO Y NEUTRO

Se evaluó la resistencia de las bacterias a diferentes condiciones de pH, simulando un ambiente ácido similar al del estómago y un pH neutro comparable al del tracto gastrointestinal. Las bacterias se prepararon a una concentración estándar de 0.5 McFarland, se agregaron 20 μL de suspensión bacteriana en 5 mL de medio BHI ajustado a pH 1.3, 3 y 7. Las muestras se incubaron a 37 °C y se registró el crecimiento bacteriano mediante lecturas de densidad óptica a 600 nm a intervalos de 0, 1, 2, 3 y 24 horas, centrándose el análisis en las primeras 3 horas, ya que a esta concentración inicial los cambios en viabilidad y adaptación bacteriana son más evidentes.

De manera complementaria, se evaluó la estabilidad de las MVs frente a las mismas condiciones de pH. Para ello, se incubaron 10 μg/μL de MVs en 5 mL de BHI ajustado a pH 1.3,

3 y 7, manteniéndolas a 37 °C, y se midió la densidad óptica a 600 nm a los mismos intervalos de tiempo, con el fin de analizar su integridad y resistencia frente a ambientes ácidos y neutros.

6.11 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE MVs DE *PERIBACILLUS SIMPLEX*

Se realizó un ensayo in vitro para evaluar el efecto antimicrobiano de las vesículas de membrana (MVs) de *Peribacillus simplex* frente a bacterias patógenas de importancia clínica: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii* y *Leclercia adecarboxylata*.

En placas de 96 pozos se colocaron 100 µL de caldo LB estéril, 50 µL de las MVs a diferentes concentraciones (20, 50, 100, 200, 300 y 400 µg/mL) y 10 µL de la suspensión bacteriana ajustada a 0.5 McFarland.

Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas. Finalmente, se realizó la lectura de absorbancia a 630 nm en un lector de microplacas con la finalidad de evaluar el crecimiento bacteriano y determinar el posible efecto inhibidor de las MVs (Santos et al., 2022).

6.12 PERFIL PROTEICO DE MVs EN GEL SDS-PAGE

Para obtener el perfil proteico de las vesículas de membrana (MVs) de *Peribacillus simplex* se realizó la técnica de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS). Las muestras de MVs previamente purificadas y cuantificadas fueron sometidas a una lisis con urea 1:1 es decir un volumen de solución de urea y un volumen de la suspensión de MVs, lo que facilitó la disolución de las vesículas de membrana y la liberación de sus proteínas. Además, se preparó una muestra del lisado total de la bacteria utilizando una lisis con buffer RIPA compuesto por Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, NP-40 al 1 %, deoxicolato de sodio al 0.5 % y SDS al 0.1 %, suplementado con inhibidores de proteasas antes de su uso, para obtener el contenido proteico de la célula bacteriana completa. Ambas muestras, MVs y lisado total, fueron diluidas en una solución de carga que contenía SDS y agentes reductores como el β -mercaptoetanol para desnaturalizar las proteínas y luego se sometieron a desnaturalización térmica a 95 °C durante 5 minutos.

Para la electroforesis, se prepararon dos fases de gel: el gel de resolución, compuesto por una solución al 10% de acrilamida, Tris-HCl pH 8.8, SDS, APS y TEMED, y el gel concentrador, elaborado con una solución al 4-5% de acrilamida, Tris-HCl pH 6.8, SDS, APS y TEMED. Las muestras se cargaron en los pocillos del gel junto con un marcador de peso molecular. Se aplicó un voltaje inicial de 80 V para permitir la alineación de las muestras en el gel concentrador, incrementándose posteriormente a 120 V para separar las proteínas en el gel de resolución. Una vez concluida la migración, el gel se sumergió en una solución de azul de Coomassie Brilliant Blue G-250 al 0.1 % (w/v) preparada en una mezcla de 20 % (v/v) metanol y 10 % (v/v) ácido acético durante 2 horas para la tinción de proteínas. Finalmente, se realizó un proceso de decoloración con una solución desteñidora con 50 % (v/v) metanol y 10 % (v/v) ácido acético hasta visualizar claramente las bandas proteicas.

6.13 ENSAYO DE TRANSFERENCIA DE MVs EN UN MEDIO LÍQUIDO DE BHI CON *E. COLI*

Para evaluar la transferencia de vesículas de membrana (MVs) en un medio líquido de BHI con *Escherichia coli* DH5 α , se cultivó *E. coli* DH5 α en medio BHI a 37 °C con agitación. La bacteria fue ajustada a una densidad óptica de 0.5 McFarland para garantizar una concentración adecuada de células. Una vez que la bacteria alcanzó la fase logarítmica de crecimiento, se inocularon las MVs previamente purificadas de *Peribacillus simplex* a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. En los tubos de cultivo con 3 mL de medio BHI, se añadió 1.5 μL de ampicilina para evitar el crecimiento bacteriano en las condiciones de control negativo, mientras que los tubos con MVs no contenían ampicilina. El cultivo con *E. coli* DH5 α y MVs se mantuvo en agitación a 37 °C durante 24 horas para permitir la interacción entre las MVs y las bacterias receptoras.

Al final de la incubación, se recogieron muestras de cada tiempo de incubación para la evaluación de la viabilidad bacteriana. La viabilidad de *E. coli* DH5 α se determinó mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de agar MacConkey.

6.14 PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Para la extracción de ADN genómico, se inoculó 3 mL de medio BHI con la muestra bacteriana en los tubos utilizados previamente en la prueba de transferencia de MVs. Luego, se centrifugó

durante 1 minuto a 11,000 rpm para eliminar completamente el medio. Se añadió 250 µL de buffer de lisis y una pizca de lisozima, mezclando manualmente, especialmente en el caso de bacterias Grampositivas. La mezcla se incubó en un termobloque a 37 °C durante 30 minutos. Después, se añadió 50 µL de Sarcosil al 20%, se mezcló y se añadió un volumen de fenol-Tris pH 8 (fase inferior). La mezcla se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 minutos, y se recuperó la fase superior, descartando la fase inferior. A continuación, se añadió un volumen de cloroformo, se agitó y se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 11,000 rpm. La fase superior se transfirió a un tubo limpio, y se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto frío junto con 0.5 mL de acetato de amonio 7.5 M o 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 7. La mezcla se congeló durante 30 minutos. Después de la congelación, se centrifugó a 11,000 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 200 µL de etanol al 70%. Se decantó nuevamente y se secó el ADN con un palillo estéril, sin tocar la pastilla de ADN. Finalmente, se resuspendió el ADN en 100 µL de agua estéril y se almacenó a -20 °C para su posterior uso.

6.15 AMPLIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La amplificación de genes de resistencia por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo para identificar los genes asociados a la resistencia antimicrobiana presentes en las muestras de *E. coli* DH5-α y las MVs. Se diseñaron cebadores específicos para los genes TEM (Hansen et al 2004), CTX-M (Bauernfeind et al 1996) y KPC (Patrick et al 2009), relacionados con la resistencia a ampicilina, basándose en bases de datos genómicas. La calidad del ADN se comprobó a través de una electroforesis en agarosa, analizando la integridad de las bandas y descartando degradación o contaminación por presencia de RNA o proteínas visibles antes de realizar las reacciones de la PCR. Posteriormente, se preparó la mezcla de reacción para PCR en un volumen final de 25 µL, que contenía 12.5 µL de Green Taq DNA polymerase (Invitrogen), 1 µL de oligonucleótido Forward, 1 µL de oligonucleótido Reverse, 10.5 µL de agua libre de nucleasas, ADN molde, dNTPs, tampones de PCR, y MgCl₂.

La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Biorad) utilizando las mismas condiciones para los tres pares de cebadores. Estas incluyeron un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C

durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos que consistieron en desnaturalización a 95 °C durante 3 segundos, alineación a 50 °C durante 1 minuto, y extensión a 72 °C durante 1 minuto. Finalmente, se llevó a cabo una extensión final a 72 °C durante 5 minutos (Hansen et al 2004, Bauernfeind et al 1996, Patrick et al 2009).

Tabla 2 -. Características de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de genes de resistencia

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tamaño del gen(pb)	Bibliografías
TEM-F	TTATCCGCCTCCATCCAGTC	526	Hansen et., al 2004
TEM-R	TGGGTGCACGAGTGGGTAC		
CTX-M-F	TCTTCCAGAATAAGGAATCCC	909	Bauernfeind et., al 1996
CTX-M-R	CCGTTTCCGCTATTACAAAC		
KPC-F	ATGTCACGTATCGCCGTCT	882	Patrick et., al 2009
KPC-R	TTACTGCCCCGTTGACGCCCA		

6.16 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOGENICA DE LAS MVs Y DISEÑO DEL ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN EN RATONES

Después de la caracterización de las MVs, se evaluó la capacidad inmunogénica, inmunizando ratones de laboratorio con un peso promedio de 25 g y una edad adulta. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas con acceso libre a agua y alimento estandarizado.

Las MVs purificadas fueron administradas por vía intraperitoneal en una dosis de 21 µg/µl por ratón. El esquema de inmunización consistió en aplicaciones los días 7, 14, 21 y 28. Las MVs se administraron con el adyuvante Titer Max en una proporción 1:1.

El día 28, se recolectaron muestras de sangre para evaluar la respuesta inmunitaria. Las muestras fueron centrifugadas a 3,000 rpm durante 10 minutos para separar el suero, que fue almacenado a -18°C hasta su análisis. La inmunogenicidad de las MVs se verificó a través de un ensayo de ELISA indirecta, en la cual se cuantificaron anticuerpos específicos del suero de los ratones. El incremento de los valores de absorbancia en los grupos inmunizados, respecto

al control negativo sin MVs, indicó que fueron capaces de inducir una respuesta humoral específica.

6.17 INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA DE VESÍCULAS DE MEMBRANA (MVs) PURIFICADAS DE *PERIBACILLUS SIMPLEX*.

Se realizó inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos específicos contra *Peribacillus simplex* (*P. simplex*) en muestras de vesículas de membrana (MVs). Las MVs fueron lavadas con PBS y se fijó una alícuota de 20 µL de la muestra en un portaobjetos utilizando 10 µL de paraformaldehído al 4%, dejándolas reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra fue lavada con 3 mL de PBS para eliminar el exceso de paraformaldehído y tratada con 1 mL de cloruro de amonio al 1% durante 15 minutos para reducir la autofluorescencia.

Se bloqueó la muestra con albúmina al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, las muestras fueron incubadas toda la noche a 4°C con 10 µL del primer anticuerpo específico contra *P. simplex*, cubriéndolas con un cubreobjetos. Tras tres lavados con PBS, las muestras fueron incubadas con 10 µL del segundo anticuerpo conjugado con fluorocromo durante 1 hora a temperatura ambiente, protegiendo las muestras de la luz.

Después de los lavados finales con PBS, se añadió 5-8 µL de vectashield al portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. Los bordes fueron sellados con barniz comercial. La muestra se almacenó en una cámara húmeda y se observó al microscopio de epifluorescencia (Motic).

6.18 ENSAYO DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA *PERIBACILLUS SIMPLEX* Y SUS MVs

Para la isotipificación de anticuerpos utilizando el KIT ISO2 de Sigma, se preparó una placa de microtitulación diluyendo el antígeno a 10 µg/mL y adicionando 30 µL por pozo, incubando a 4°C durante toda la noche o 1 hora a 37°C. Luego, se bloqueó la superficie de la placa con 100 µL de BSA al 1% durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con buffer de lavado (PBS 0.05% Tween 20), y se añadieron 100 µL de los sueros de ratones inmunizados

en la dilución requerida, incubando 2 horas a temperatura ambiente o 1 hora a 37°C. Tras el lavado, se agregó 50 µL de la dilución de la subclase de Ig's (1:1000 en PBS) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de 4 lavados, se añadió 50 µL de HRP-goat anti-rabbit IgG (1:3000), incubando 30 minutos a temperatura ambiente y realizando 4 lavados adicionales. A continuación, se adicionaron 100 µL de solución de sustrato TMB por pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, monitoreando la coloración azul a 370 nm o 655 nm. Finalmente, se añadió 50 µL de 1 M HCl o 0.5 M H₂SO₄ para detener la reacción y permitir la lectura en amarillo a 450 nm. La reacción fue estable durante 1 hora.

Para la determinación de anticuerpos, se diluyó el antígeno a 10 µg/mL y se adicionaron 30 µL por pozo, incubando a 4°C durante toda la noche o 1 hora a 37°C. Posteriormente, se decantó y se adicionaron 200 µL de BSA al 1%, incubando a 37°C durante 1 hora. Después de decantar, se realizaron 3 lavados con buffer de lavado (PBS 0.05% Tween 20). Se añadieron 100 µL de los sueros de los ratones a las siguientes diluciones en PBS (1:100, 1:1,000, 1:5,000, 1:10,000, 1:20,000) e incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras decantar, se dieron 3 lavados con PBST 0.05% Tween 20 y se añadieron 50 µL de HRP-goat anti-mouse IgG (1:5,000 en PBS) por pozo, incubando de 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de realizar 4 lavados, se añadieron 100 µL de TMB y se incubaron a temperatura ambiente, monitoreando la reacción durante 10 minutos. Se realizó la lectura a 370 nm o 620-655 nm. Finalmente, se añadió 50 µL de 0.5 M H₂SO₄ y la lectura se realizó a 450 nm en un microlector para placas de ELISA (ACCUR01190).

6.19 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS EN LAS MVs DE *PERIBACILLUS SIMPLEX* MEDIANTE WESTERN BLOT

Detección de proteínas en las MVs de *Peribacillus simplex* y anticuerpos generados en ratones inmunizados se llevó a cabo de la siguiente manera: las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa a 100 V durante 1 hora, y las membranas se bloquearon con leche libre de grasa al 5% en TBS-Tween 0.05% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron con suero de los ratones diluido 1:100 en PBS durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación primaria, se empleó un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa diluido 1:5,000 para la detección secundaria. Finalmente, se utilizó el sustrato BCIP-NBT

(Sigma) como solución de revelado para visualizar las bandas específicas, que fueron registradas mediante un sistema de captura de imágenes.

7.0 RESULTADOS

7.1 IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA

Los aislados bacterianos obtenidos a partir de muestras de tepache mostraron crecimiento en agar TSA y agar sal manitol, mientras que no se observó crecimiento en agar MacConkey, lo que indica predominancia de bacterias Gram positivas y ausencia de bacterias Gram negativas cultivables bajo las condiciones empleadas. En agar sal manitol, las colonias crecieron sin producir el cambio de coloración hacia amarillo, lo que sugiere que no fermentaron manitol.

Las colonias cultivadas en TSA se caracterizaron por ser lisas, redondeadas, blanquecinas y con crecimiento aeróbico a 37 °C en un periodo de 24 a 48 horas. La tinción de Gram confirmó la presencia de bacterias Gram positivas con morfología bacilar.

La identificación molecular realizada por un laboratorio especializado, se envió la cepa únicamente con fines de identificación taxonómica. El laboratorio determinó que la bacteria correspondía a *Peribacillus simplex*.

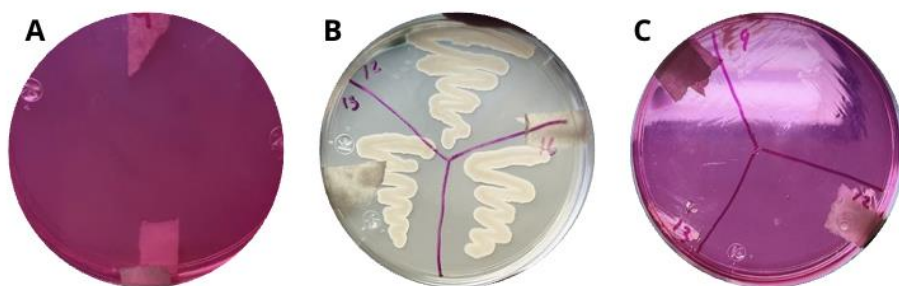


Figura 2. Se muestran imágenes representativas del crecimiento bacteriano en los medios evaluados: la imagen **A** corresponde al agar MacConkey, donde no se observa crecimiento; la imagen **B** muestra el crecimiento en agar TSA, y la imagen **C** corresponde al agar sal manitol, donde se observa crecimiento, pero sin cambio de coloración.

Además de su identificación, se evaluó el perfil de sensibilidad antimicrobiana de la cepa mediante antibiograma, con el fin de conocer su resistencia o susceptibilidad frente a antibióticos comunes. El ensayo se realizó mediante el método de difusión en disco y se interpretaron los resultados de acuerdo con los criterios del **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**.

Tabla 3. Resultados del antibiograma de *Peribacillus simplex* frente a diferentes antibióticos

Antibiótico	Zona de inhibición en mm	Resultados
Polimixina E	15	Sensible
Clindamicina	17	Sensible
Cefotaxima	16	Intermedia
Cefalotina	19	Sensible
Ampicilina	15	Resistente
Nitrofurantoína	23	Sensible

Interpretación de los resultados:

- *Peribacillus simplex* mostró **sensibilidad** frente a polimixina E, clindamicina, cefalotina y nitrofurantoína, con zonas de inhibición iguales o superiores a los valores de corte establecidos para cada antibiótico.
- Se observó **resistencia frente a ampicilina**, a pesar de presentar un halo de 15 mm, debido a que el punto de corte para sensibilidad es más alto para este antibiótico según el CLSI.
- La respuesta a **cefotaxima** fue **intermedia**, lo cual indica una susceptibilidad parcial o reducida frente a este antibiótico.

Estos resultados indican que *Peribacillus simplex* presentó resistencia únicamente frente a ampicilina, lo cual es relevante para futuras aplicaciones terapéuticas o estudios sobre la resistencia bacteriana.

7.2 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MVs

Una vez identificada la bacteria y su resistencia a Amp, se realizaron ensayos de secreción de MVs. A las 24 horas de cultivo, se observó una cantidad baja de vesículas de membrana tanto en las muestras sin ampicilina (Amp) como en las tratadas con Amp. A las 48 horas, en las muestras tratadas con Amp, se notó una mayor aglomeración de vesículas de membrana, mientras que, en las muestras sin Amp, la cantidad de vesículas de membrana aumentó de forma gradual, aunque en menor cantidad que en las tratadas con Amp. Sin embargo, a pesar de la mayor presencia de vesículas de membrana en las muestras con Amp, la cantidad no fue tan alta como se observó en las muestras sin Amp en otros intervalos de tiempo. Esto sugiere que la presencia de Amp influye en la producción y secreción de vesículas de membrana, pero no de manera tan pronunciada como en las muestras sin tratamiento.

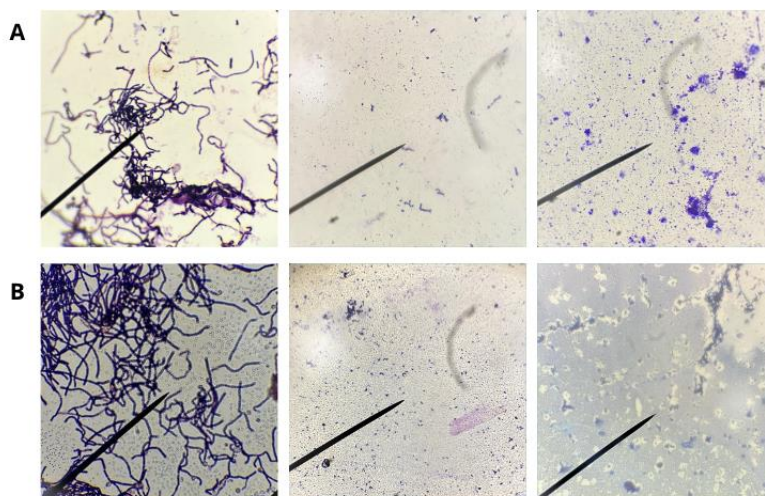


Figura 3. Secreción de vesículas de membrana de *Peribacillus simplex* a las 24 y 48 horas de cultivo bajo diferentes condiciones de tratamiento. A. Bacterias de *P. simplex* sin tratamiento con ampicilina. B. Bacterias de *P. simplex* tratadas con ampicilina.

Se notó un incremento progresivo en el número de vesículas de membrana en las muestras sin tratamiento con ampicilina (Amp) durante el cultivo, desde las 24 hasta las 48 horas. Las muestras que recibieron Amp contenían una cantidad parecida de vesículas de membrana a las 24 horas que las que no lo recibieron, pero a las 48 horas se observó un aumento en la agregación de MVs, aunque con menos cantidad que el grupo sin tratamiento. Estas

observaciones se realizaron mediante microscopía a 100X. Estos descubrimientos muestran el patrón de secreción de MVs de *P. simplex* y brindan datos acerca de cómo la exposición a antibióticos puede afectar la producción.

En las micrografías, se identificaron tanto las bacterias de *P. simplex* como las vesículas de membrana (MVs). Las células bacterianas presentan un tamaño considerablemente mayor que las MVs, lo que es evidente al compararlas en las imágenes. *Peribacillus simplex* muestra la morfología típica de las bacterias Grampositivas, con una coloración morada intensa en la tinción de Gram. Por otro lado, las MVs se observan como estructuras esferoidales de menor tamaño, esta diferencia morfológica y dimensional facilita su distinción y respalda la observación de variaciones en la producción vesicular bajo diferentes condiciones y tiempos de cultivo.

7.3 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA BACTERIANA A PH ÁCIDO Y NEUTRO

Con el objetivo de evaluar la capacidad de *Peribacillus simplex* para resistir condiciones gastrointestinales simuladas, se analizó su crecimiento en medios con distintos valores de pH (1.3, 3 y 7). Esta prueba permitió determinar su tolerancia fisiológica al estrés ácido y evaluar si la bacteria podía mantener la producción de vesículas de membrana externa (MVs) bajo dichas condiciones. Para ello, se monitoreó el crecimiento bacteriano mediante absorbancia a 600 nm en distintos tiempos (1, 2, 3 y 24 horas) y, de manera complementaria, se cuantificaron las MVs antes y después de la exposición a los diferentes pH para evaluar su integridad.

Se evaluó el crecimiento de *Peribacillus simplex*. En el eje X de la figura 4 se representan las condiciones de pH a diferentes valores de pH (1.3, 3 y 7) incubando a 37 °C y el eje Y la absorbancia (UA) midiendo la absorbancia a 600 nm en distintos tiempos (1, 2, 3 y 24 horas).

En pH de 1.3 se observó un aumento inicial de absorbancia a la primera hora (0.313) y la cual fue disminuyendo de manera discreta en las horas siguientes (0.270 a las 2 h y 0.244 a las 3 h), y se mantuvo prácticamente igual después de 24 horas (0.249). En esta situación, el control positivo tuvo un valor de 0.219, mientras que el control negativo (sin bacteria) mostró un valor de 0.099. Aunque se observa un aumento inicial de absorbancia a la primera hora, la disminución posterior indica que la bacteria no crece, sino que únicamente sobrevive transitoriamente. Esto indica que se activan sistemas de tolerancia al ácido, como alteraciones

en la permeabilidad de la membrana o reacción general ante el estrés; sin embargo, no son suficientes para mantener la proliferación.

En pH 3 el crecimiento se mantuvo estable durante las primeras 3 horas y hasta la 24 hora, con valores de 0.239 a 1 hora, 0.268 a las 2 horas, 0.247 a las 3 horas y 0.276 a las 24 horas. Aquí el control positivo, bacteria agregada a la hora fue de 0.115 y el control negativo sin bacteria de 0.056.

Esto indica que *P. simplex* es capaz de mantener su viabilidad celular, aunque no presenta un incremento significativo en la biomasa, indicando una adaptación fisiológica para tolerar el estrés ácido. Mientras que en pH 7 se observó un aumento gradual del crecimiento con valores 0.242 a 1 hora, 0.270 a las 2 horas, 0.280 a las 3 horas y alcanzando 0.378 a las 24 horas lo cual es consistente con el pH normal del medio BHI. En esta condición, el control positivo con bacteria agregada a las 0 horas fue de 0.228, mientras que el control negativo sin bacteria fue de 0.059. Estos valores confirman el crecimiento de *P. simplex* en condiciones neutras, acorde con el pH del medio BHI. La diferencia entre los valores experimentales y los controles indica que el incremento en la densidad óptica corresponde al crecimiento bacteriano y no a interferencias del medio de cultivo.

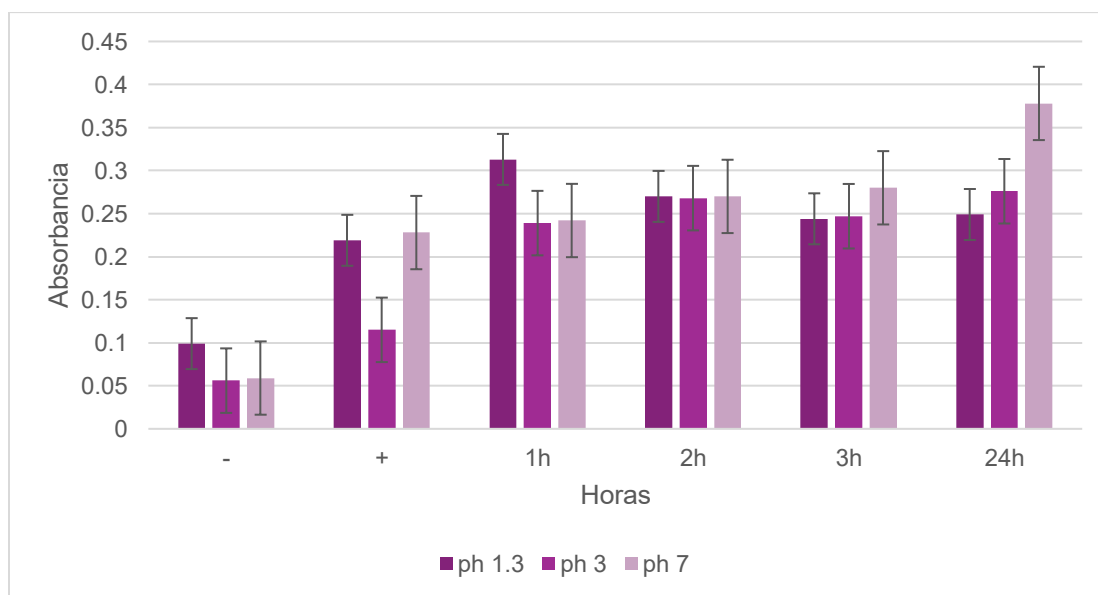


Figura 4. Comportamiento del crecimiento de *P. simplex* en los diferentes valores de pH evaluados, medido por absorbancia a 600 nm en distintos tiempos de incubación.

En la figura 4 se observa que existe un aumento significativo de la absorbancia a lo largo del tiempo debido al crecimiento de la bacteria, especialmente en pH neutro (7), los resultados muestran *Peribacillus simplex* es tolerante a la acidez; sin embargo, su multiplicación sólo sucede en situaciones próximas a la neutralidad.

Esto podría ser un reflejo de su adaptación ecológica a entornos fermentativos con fluctuaciones en las condiciones de pH, aunque éstas rara vez son muy ácidas. Asimismo, ser capaz de sostenerse viable a un pH bajo podría ayudar a su supervivencia temporal en ambientes hostiles o durante procesos de fermentación que son dinámicos.

Se evaluó la estabilidad de las MVs de *P. simplex* bajo las mismas condiciones de pH simuladas, incubando 10 µg/mL de vesículas en 5 mL de cada solución a 37 °C. La cuantificación mediante espectrofotometría en tiempos similares consideró como control negativo la absorbancia inicial del medio sin MVs. En todos los pH evaluados, el control negativo presentó valores de absorbancia bajos y estables.

En pH 1.3. La absorbancia inicial para el control negativo fue 0.054 mientras con la muestra con MVs fue 0.064 UA para pH 3. La absorbancia del control negativo fue 0.081 y la absorbancia con MVs fue 0.094 UA, para pH 7 la absorbancia del control negativo fue de 0.081 UA y la absorbancia con MVs fue de 0.094 UA, manteniéndose estos valores prácticamente constantes hasta las 24 h de incubación.

En presencia de MVs, la absorbancia se mantuvo estable durante todo el período de incubación, lo que indica una estabilidad y persistencia, no sufrieron degradación ni pérdida significativa, lo que indica de manera indirecta que la integridad estructural no se vio comprometida durante todo el intervalo de incubación ($\lambda = 600 \text{ nm}$).

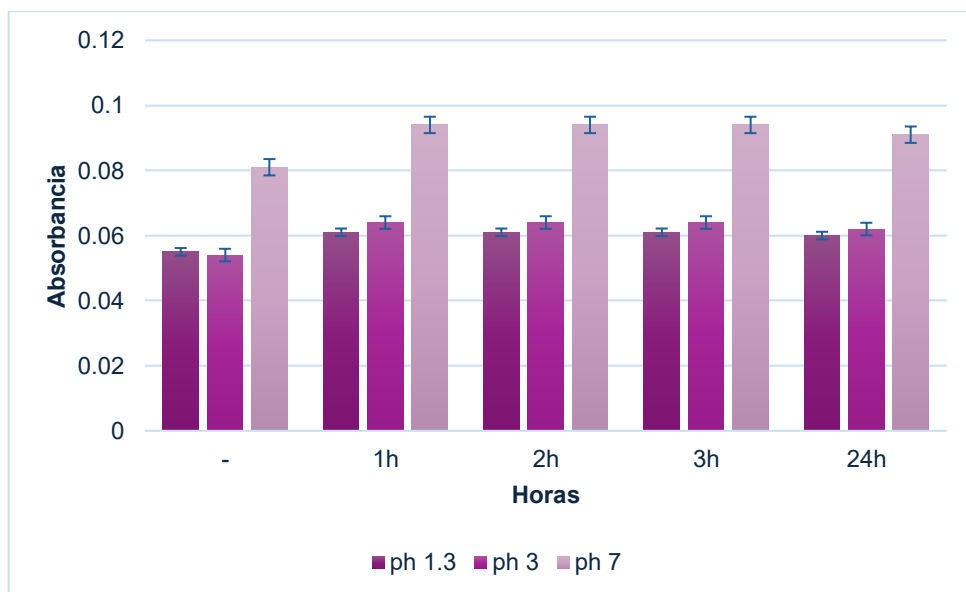


Figura 5. Integridad estructural de las MVs de *Peribacillus simplex* bajo condiciones simuladas de pH ácido y neutro.

A diferencia de la Figura 4, donde se observa un aumento progresivo de la absorbancia asociado al crecimiento bacteriano, en la figura 5 la concentración de MVs se mantiene estable a lo largo del tiempo, lo que evidencia que las vesículas conservan su integridad estructural, y que tienen potencial adaptativo o funcional en ambientes de pH ácido.

7.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE MVs DE *PERIBACILLUS SIMPLEX*

Con el fin de explorar el posible papel funcional de las vesículas de membrana (MVs) producidas por *Peribacillus simplex*, se evaluó su efecto antimicrobiano frente a diversas bacterias patógenas. Este análisis buscó determinar si las MVs presentan actividad inhibitoria sobre el crecimiento de otras bacterias, lo cual podría sugerir un mecanismo de competencia microbiana o defensa ecológica en entornos fermentativos. Para ello, se utilizó una placa de 96 pozos, que consistió en cultivar bacterias indicadoras en presencia de diferentes concentraciones de MVs. Posteriormente, se midió la densidad óptica a 630 nm como indicador del crecimiento bacteriano. Esta metodología permite evaluar de manera cuantitativa el posible efecto antimicrobiano de las MVs en condiciones controladas y reproducibles.

Los resultados del ensayo se presentan en la Tabla 4. En general, no se observó una disminución significativa en los valores de absorbancia con las diferentes concentraciones de MVs (50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL) en comparación con el control negativo (sin MVs). Por el contrario, se registró un aumento progresivo en la absorbancia en la mayoría de las bacterias evaluadas.

Tabla 4. Absorbancia obtenida en el ensayo realizado en una placa de 96 pozos para evaluar el efecto antimicrobiano de MVs de *Peribacillus simplex*.

MVs	<i>Peribacillus simplex</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Leclercia</i>
-	0.055	0.056	0.055	0.054	0.056	0.054
+	0.903	0.992	0.881	0.633	0.925	0.586
50 µg	0.841	0.941	0.724	0.701	0.836	0.734
100µg	0.814	0.953	0.696	0.741	0.815	0.783
200µg	0.834	0.865	0.754	0.709	0.826	0.775
300µg	0.934	0.983	0.79	0.718	0.825	0.788
400µg	0.856	1.008	0.773	0.74	0.811	0.802
500µg	0.85	1.024	0.869	0.791	0.769	0.802

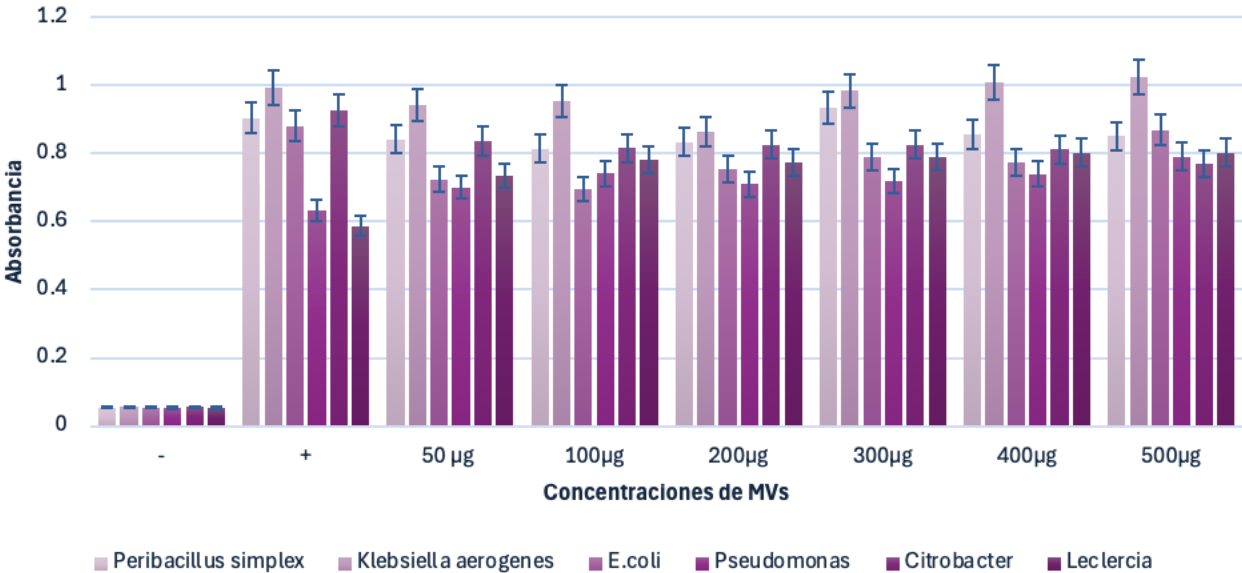


Figura 6. Gráfica comparativa de los valores de absorbancia para cada bacteria según las concentraciones de MVs agregadas. El control negativo es medio LB solo y el positivo es la absorbancia del crecimiento bacteriano posterior a 24 horas de incubación.

El eje Y de la figura 6 refleja los valores de absorbancia (UA) a 630 nm, que corresponden al desarrollo bacteriano cuando están presentes diferentes concentraciones de MVs. El eje X representa las concentraciones empleadas en la prueba. La escala de colores de morado claro a morado más intenso, identifica a cada una de las bacterias evaluadas: *Peribacillus simplex*, *Klebsiella aerogenes*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* y *Leclercia*.

7.5 PERFIL PROTEICO DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA MEDIANTE SDS-PAGE

El análisis del perfil proteico de las vesículas de membrana (MVs) de *Peribacillus simplex* mediante SDS-PAGE reveló un patrón de bandas distintivo en comparación con el lisado total de la bacteria. Las MVs presentaron un conjunto de bandas proteicas bien definidas, con un rango de pesos moleculares predominante entre 20 y 100 kDa. Algunas de estas bandas fueron exclusivas de las MVs, lo que sugiere la presencia de proteínas específicas asociadas a estas estructuras vesiculares.

En comparación con el perfil proteico del lisado total de *P. simplex*, se observó que ciertas bandas proteicas estaban ausentes o menos intensas en las MVs, lo que indica un enriquecimiento selectivo de ciertas proteínas en estas vesículas de membrana.

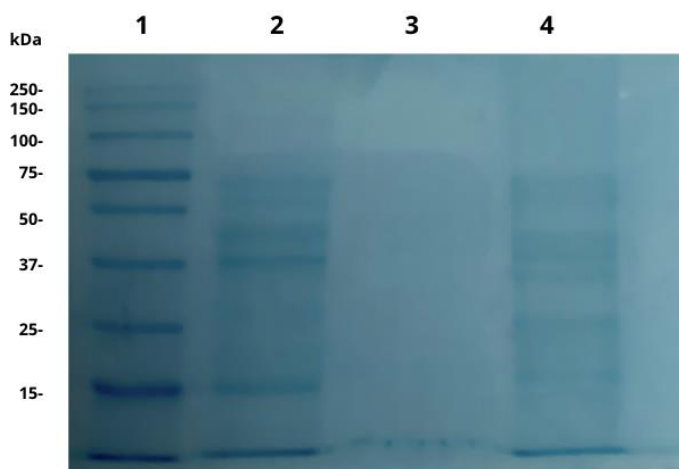


Figura 7. Perfil proteico de MVs de *Peribacillus simplex* mediante SDS-PAGE. Carril 1: marcador molecular (kDa); carril 2: lisado total bacteriano; carril 3: MVs purificadas; carril 4: MVs tratadas con urea, que liberan proteínas asociadas. Las bandas más intensas (~15, 55, 75 y 100 kDa) se encuentran principalmente entre 20 y 100 kDa.

Estos resultados confirman que las MVs de *P. simplex* contienen un repertorio proteico similar al del extracto total de la bacteria.

7.6 ENSAYO DE TRANSFERENCIA DE MVs EN UN MEDIO LÍQUIDO DE BHI CON *E. COLI*

El objetivo de este ensayo fue evaluar la capacidad de las MVs de *Peribacillus simplex* para interactuar con células de *Escherichia coli* DH5 α en un medio líquido (BHI), con el fin de identificar posibles procesos de agregación, asociación o transferencia entre las vesículas y las bacterias receptoras, que pudieran indicar un mecanismo de comunicación o modulación interbacteriana.

Se evaluó la transferencia de material genético presente en las MVs de *Peribacillus simplex* a *E. coli* DH5 α en medio líquido BHI, incubando con concentraciones crecientes de MVs (5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) con cultivos bacterianos ajustados a 0.5 McFarland a 37 °C durante 24 horas.

Se observó un aumento progresivo en la turbidez de las muestras a medida que se incrementaba la concentración de MVs, siendo la muestra con la mayor concentración 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ la que mostró mayor opacidad visual (Figura 8). Este incremento en la turbidez sugiere una mayor presencia de partículas en suspensión, indicando un crecimiento optimizado en el medio, posiblemente derivado de la interacción entre las MVs y las células bacterianas y la transmisión de genes.



Figura 8. Ensayo de transferencia en medio BHI con *E. coli* DH5 α . De izquierda a derecha: control negativo (*E.coli* DH5 α con AMP), control positivo (*E.Coli* DHS α sin AMP) y concentraciones de 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de MVs. Se observa un aumento progresivo en la turbidez conforme aumenta la concentración de MVs.

Estos resultados preliminares indican que las MVs pueden interactuar con *E. coli* DH5 α en medio líquido, generando efectos visuales que reflejan la presencia y concentración de las vesículas.

7.7 AMPLIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS POR PCR

Para evaluar la posible transferencia horizontal de material genético mediada por las MVs, se procedió a realizar la extracción de ADN genómico tanto de los cultivos de *E. coli* DH5 α como de las propias MVs obtenidas de *P. simplex*. Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación por PCR de genes de resistencia a antibióticos, específicamente las betalactamasas de espectro extendido **TEM**, **CTX-M** y **KPC**, conocidos por su papel clínico en la resistencia bacteriana a β -lactámicos.

Los resultados de la PCR mostraron la amplificación del gen **TEM** en todas las concentraciones de MVs evaluadas (5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), como se muestra en la Figura 9. En contraste, no se observó amplificación para los genes **CTX-M** ni **KPC** en ninguna de las muestras, lo que sugiere su ausencia tanto en las vesículas como en la cepa utilizada.

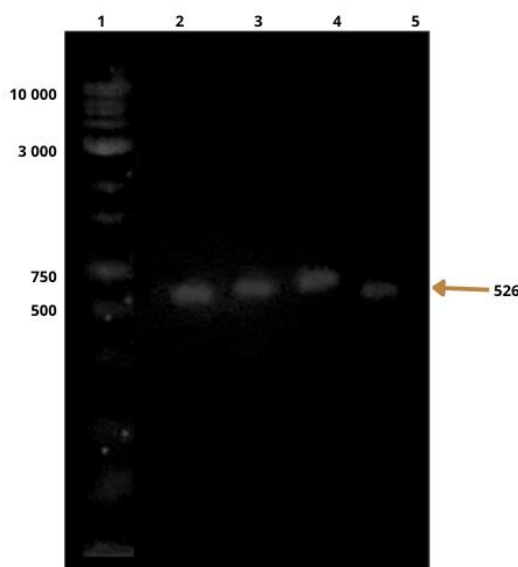


Figura 9. Amplificación del gen **TEM** en *E. coli* DH5α con MVs a distintas concentraciones (5, 10, 50 y 100 µg/µL). Carril 1: marcador molecular. El gen **TEM** está presente en todas las muestras; no se amplificaron **CTX-M** ni **KPC**.

La presencia del gen **TEM** en las MVs sugiere que estos nanocomponentes extracelulares podrían participar en la diseminación horizontal de genes de resistencia entre bacterias, un fenómeno de gran relevancia desde el punto de vista microbiológico y clínico. Por otro lado, la falta de amplificación de **CTX-M** y **KPC** puede explicarse por el hecho de que *P. simplex* es una bacteria ambiental no patógena, que no suele portar genes asociados a resistencia clínica en *Enterobacteriaceae*, como es el caso de **CTX-M** y **KPC**. Además, *E. coli* DH5α es una cepa de laboratorio genéticamente modificada para carecer de genes de resistencia clínicamente relevantes, lo que justifica también su ausencia en esta cepa.

7.8 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE GENERADA POR EL ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN

Tras la implementación del esquema de inmunización (aplicaciones los días 7, 14, 21 y 28 con una dosis de 21 µg/µL por ratón), se evaluó la respuesta humoral inducida por las vesículas de membrana (MVs) de *Peribacillus simplex* administradas por vía intraperitoneal con adyuvante TiterMax. Al finalizar el protocolo, se recolectaron muestras de sangre, se separó el suero por centrifugación y se almacenó para su análisis.

7.9 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE VESÍCULAS DE MEMBRANA (MVs) PURIFICADAS DE *PERIBACILLUS SIMPLEX*.

Se utilizó inmunofluorescencia indirecta para identificar de manera cualitativa las vesículas de membrana (MVs) secretadas por *Peribacillus simplex*. Las muestras fueron purificadas y analizadas usando anticuerpos específicos de las MVs de *Peribacillus simplex*. Los resultados mostraron la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos al interactuar con la superficie de las vesículas de membrana y se observó un agrupamiento característico. Estos resultados confirman que las estructuras observadas corresponden a MVs, contiene proteínas que podrían tener un papel importante en las interacciones entre el organismo y su entorno.

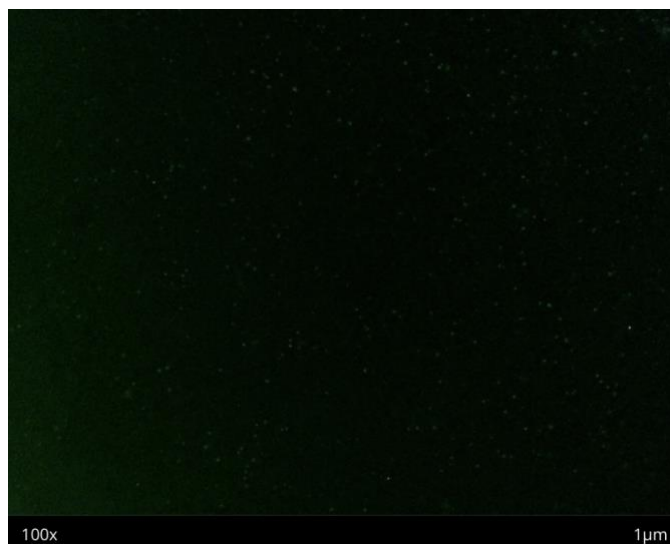


Figura 10. Inmunofluorescencia indirecta de MVs purificadas de *Peribacillus simplex*.

7.10 ENSAYO DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA *PERIBACILLUS SIMPLEX* Y SUS MVs

Se llevó a cabo un ensayo ELISA para determinar los títulos de anticuerpos en ratones inmunizados con las MVs de *Peribacillus simplex* por vía intraperitoneal, con el objetivo de cuantificar los títulos de anticuerpos producidos como respuesta a la inmunización. Se utilizaron 10 µg/µL de MVs y una dilución 1:100 del anticuerpo. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 630 nm posterior a la adición del sustrato TMB y a 450 nm utilizando H₂SO₄ 0.5 M para detener la reacción.

La inmunización intraperitoneal favoreció un incremento en los niveles de IgG1 (1.3645), IgG2a (0.7785), IgG2b (1.1905) e IgM (2.205) en la lectura a 630 nm. Las lecturas a 450 nm mostraron valores más altos IgG1 (1.774), IgG2a (1.012), IgG2b (1.548) e IgM (2.86). Estas diferencias se deben a que la absorbancia medida dependen de la densidad óptica refleja una mayor intensidad de señal detectada a esa longitud de onda específica; sin embargo, esto no implica necesariamente una mayor concentración absoluta de anticuerpos, óptica refleja una mayor intensidad de señal detectada a esa longitud de onda específica; sin embargo, esto no implica necesariamente una mayor concentración absoluta de anticuerpos, sino una diferencia en la eficiencia de detección del producto cromogénico bajo esas condiciones de lectura.

Se utilizaron dos longitudes de onda con el fin de evaluar el efecto del tiempo de lectura y del estado del sustrato sobre la detección. El TMB presenta inicialmente un color azul (máx. ~650 nm), y al agregarse el ácido sulfúrico cambia a amarillo (450 nm), que corresponde a la lectura estándar del protocolo. Al agregar la lectura a 630 nm, se pudo contrastar las mediciones previas y posteriores a la detención de la reacción, garantizando la consistencia de los resultados. El protocolo establece que la lectura oficial es a 450 nm, porque este representa el punto final de la reacción en su estado estable y medible.

La inmunización por vía intraperitoneal con MVs de *P. simplex* indujo eficazmente la respuesta humoral sistémica, lo cual se comprobó por medio de la producción de diversos tipos de anticuerpos. La detección de IgM confirma que el sistema inmune ha sido activado al principio de la inmunización con las MVs, mientras que la identificación de niveles significativos de IgG, el anticuerpo predominante en circulación señala una respuesta ya desarrollada que genera memoria inmunológica y mecanismos efectores poderosos como la neutralización de toxinas. Es importante mencionar que el surgimiento de IgA, generalmente relacionado con la inmunidad mucosas, indica que estas MVs podrían ser capaces de brindar protección a nivel sistémico y en las barreras mucosas. En general, este perfil de anticuerpos muestra una respuesta inmunitaria policlonal y diversificada, que incluye la colaboración entre células T y B, mejorando la protección del hospedero frente a diversos epítomos bacterianos y destacando el potencial promisorio de las MVs como posibles candidatos vacunales polivalentes.

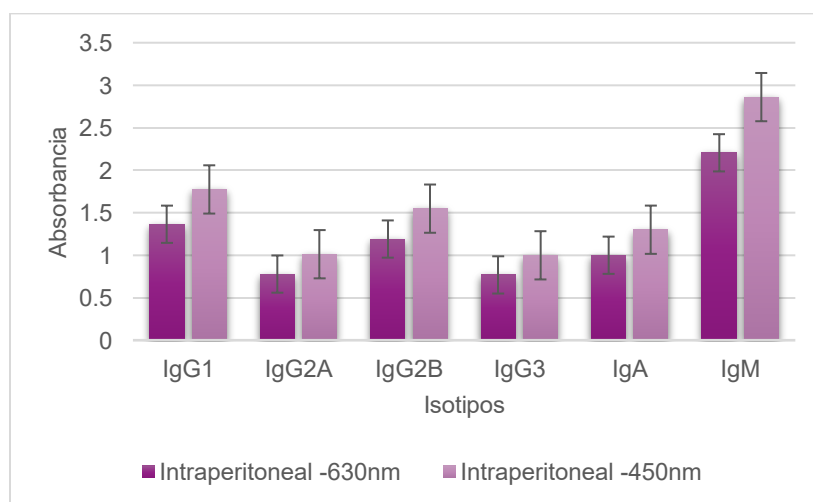


Figura 11. Títulos de anticuerpos en suero de ratones inmunizados por vía intraperitoneal, mostrando predominio de isotipos IgG y valores más altos a 450 nm. El experimento se realizó por triplicado ($n = 3$) y las barras de error representan el error estándar de la media (SEM), que muestra las diferencias entre las tres réplicas.

Además, se evaluaron los títulos de anticuerpos generados en respuesta a distintas diluciones de anticuerpos (1:100, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10000) y de MVs (*Peribacillus simplex*) utilizando una concentración constante de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de MVs y diluciones. Se midió la absorbancia a 630 nm y 450 nm antes y después de la inmunización.

Esto permite comparar cómo diferentes diluciones de anticuerpo y MVs afectan la señal detectada y cómo el uso de TMB como sustrato cromogénico y al detener la reacción con HCl se modifica la lectura. En este caso, el TMB adquiere un color azul que se transforma en amarillo al detener la reacción con ácido clorhídrico. Esto es lo que explica las variaciones de absorbancia entre 450 nm y 630 nm.

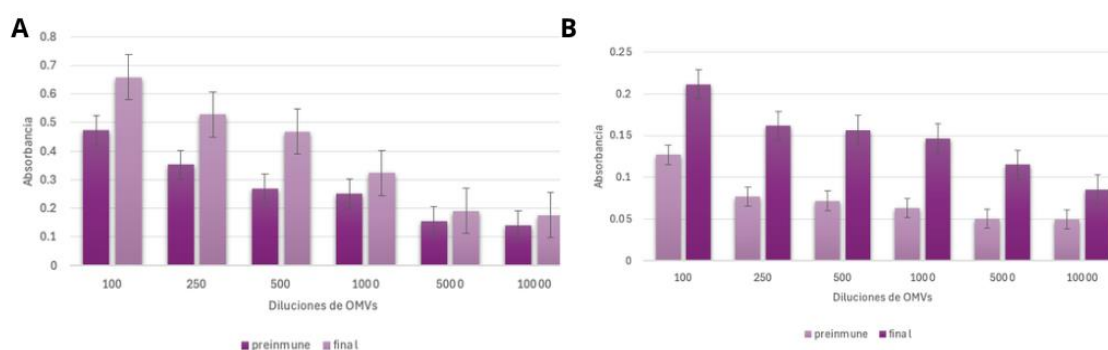


Figura 12. Títulos de anticuerpos frente a distintas diluciones de MVs de *Peribacillus simplex* en ratones inmunizados por vía intraperitoneal: (a) lectura a 630 nm y (b) lectura a 450 nm.

La absorbancia basal de los sueros preinmunes fueron altos desde la dilución 1:100, sin embargo, este efecto se mantiene constante en las diferentes diluciones, indicativo del fondo del ensayo, y después de la inmunización intraperitoneal con MVs de *P. simplex*, el título de anticuerpos se incrementa con respecto al suero preimmune. Este aumento, a pesar de que la

diferencia absoluta es moderada por el fondo basal de los sueros preinmunes, muestra la producción de anticuerpos específicos. Este patrón muestra una reacción policlonal humoral dirigida a varios epítomos, mayormente de tipo sistémico, lo que demuestra la efectividad de la inmunización intraperitoneal con MVs.

7.11 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS EN LAS MVs DE *PERIBACILLUS SIMPLEX* MEDIANTE WESTERN BLOT

Se realizó un ensayo de Western blot con el objetivo de detectar proteínas específicas presentes en las vesículas de membrana (MVs) purificadas de *Peribacillus simplex*, reconocidas por los anticuerpos generados en los ratones inmunizados. Tras la separación electroforética en gel SDS-PAGE, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y bloqueadas para evitar uniones inespecíficas. Posteriormente, se incubaron con suero de ratón diluido (1:100) como anticuerpo primario y con un anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con peroxidasa. La visualización se llevó a cabo mediante el sustrato cromogénico **BCIP** (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina).

El análisis reveló dos bandas inmunorreactivas de interés (Figura 13): una banda de mayor peso molecular, ubicada entre los 70 y 50 kDa, y una segunda señal en 5 y 2 kDa que corresponden a proteínas de tamaño típico en MVs, pero que no pueden interpretarse como proteínas inmunogénicas, ya que péptidos de ese tamaño no tienen la longitud necesaria para ser reconocidos por células inmunes para inducir una respuesta inmune solos. Por lo tanto, la banda de bajo peso molecular debe ser analizada con precaución y no como un indicio de la presencia de un antígeno específico en las MVs.

Es importante señalar que se llevaron a cabo dos geles SDS-PAGE iguales para la caracterización proteica de las MVs de *P. simplex*. Una de las membranas se utilizó como medio de transferencia para el Western blot, mientras que la otra se usó para la tinción y visualización directa de las proteínas. Cabe destacar que el gel para el Western blot fue migrado en modo espejo lo que significa que se dio la vuelta a las bandas del gel original. Esta inversión no tiene un impacto en la interpretación de los resultados, porque el orden y las concentraciones de las muestras se conservaron iguales a las del SDS-PAGE original. Este ensayo permitió

correlacionar el patrón proteico total que se observó en el SDS-PAGE y la existencia de proteínas inmunológicamente activas que fueron detectadas mediante Western blot.

La detección de estas bandas confirma que las MVs de *P. simplex* contienen componentes proteicos inmunológicos lo cual respalda los resultados obtenidos por ELISA y sugiere un potencial uso de estas vesículas en estrategias inmunológicas futuras. Cuando se observan dos bandas que corresponden a un mismo antígeno, cada una de ellas representada por proteínas diferentes debido a las variaciones en el peso molecular (70–50 kDa y 5–2 kDa), se demuestra la habilidad de generar una respuesta inmunológica policlonal enfocada en varios epítopos. Esto corrobora su importancia como elementos inmunogénicos presentes en las MVs.

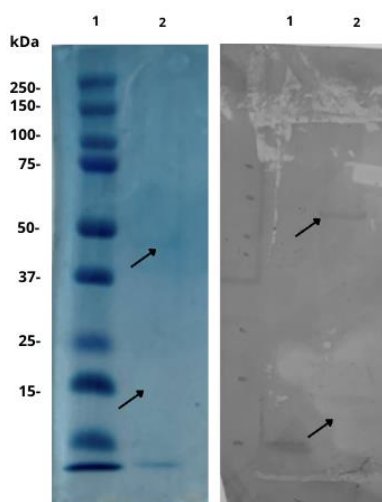


Figura 13. Western Blot de proteínas presentes en las MVs de *Peribacillus simplex*, reveladas con suero de ratones inmunizados. Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: bacteria total lisada con RIPA. Se observa una banda entre 70–50 kDa en carriles y otra entre 5–2 kDa. El gel se corrió en modo espejo.

Este hallazgo es esencial porque indica que las MVs de *P. simplex* no solo muestran el antígeno diana de una manera accesible para el sistema inmunológico, sino que también brindan una complejidad antigénica capaz de fortalecer una respuesta inmunitaria protectora más firme y flexible. Esto resulta muy prometedor para la creación de vacunas o instrumentos de inmunoterapia en el futuro.

8.0 DISCUSIÓN

Esta investigación permitió identificar la secreción de vesículas de membrana (MVs) producidas por *Peribacillus simplex*, una bacteria aislada a partir del tepache, un fermento tradicional. Los resultados obtenidos indican la estabilidad, interacción funcional, composición y potencial inmunomodulador de estas vesículas, lo que permite pensar en ellas como potenciales instrumentos para su uso en microbiología ambiental, inmunología y biotecnología

La caracterización microbiológica inicial reveló que los aislados obtenidos del tepache correspondieron a *Peribacillus simplex*, una bacteria Gram positiva, aerobia y no fermentadora de manitol. El crecimiento exclusivo en medios como TSA y agar sal manitol, y la ausencia en MacConkey, refuerzan su naturaleza Gram positiva, tal como ha sido reportado para otras especies del género *Peribacillus* (Liu et al., 2015). Este aislamiento adquiere importancia si se tiene en cuenta que el tepache, al ser un fermentado tradicional de México, representa un ecosistema microbiano complejo y aún poco explorado, en el cual predominan géneros como *Bacillus* o *Lactobacillus* (Tamang et al., 2016). La identificación de *P. simplex* en este contexto representa un hecho innovador que expande el espectro microbiano del tepache y propone una posible función probiótica en la modulación de la microbiota intestinal y fermentación (Gutiérrez-Sarmiento et al., 2022). La identificación de esta bacteria aporta información importante para la caracterización microbiológica del tepache y establece una base para estudios funcionales posteriores sobre esta especie en fermentaciones tradicionales.

Se analizó el perfil de sensibilidad antimicrobiana de *P. simplex* mediante el método de difusión en disco, conforme a las directrices del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2023). Esta evaluación permitió determinar la susceptibilidad frente a antibióticos comúnmente empleados en entornos clínicos y ambientales, lo cual es fundamental para valorar su seguridad, especialmente si se considera su potencial uso en aplicaciones biotecnológicas o alimentarias. Los resultados mostraron que *P. simplex* fue sensible a polimixina E, clindamicina, cefalotina y nitrofurantoína, lo cual indica que no presenta mecanismos de resistencia frente a estos compuestos, al menos bajo las condiciones evaluadas. Por otro lado, se observó resistencia a ampicilina, a pesar de que el halo de inhibición fue de 15 mm, ya que dicho valor se encuentra por debajo del punto de corte considerado para sensibilidad en bacilos

Gram positivos, lo que concuerda con reportes que señalan una resistencia natural a β -lactámicos en especies del género *Peribacillus* y otros bacilos ambientales (Imori et al., 2017). En cuanto a cefotaxima, la respuesta fue intermedia, lo cual indica una susceptibilidad parcial que podría estar relacionada con mecanismos de entrada limitada o presencia de β -lactamasas de espectro reducido (Choi et al, 2019).

Respecto a la producción de MVs, se observó una baja cantidad a las 24 horas de cultivo en ambos grupos, con y sin ampicilina. A las 48 horas, las muestras tratadas con ampicilina mostraron una mayor aglomeración de MVs, aunque en algunos momentos la producción fue mayor en las muestras sin tratamiento, indicando que la secreción vesicular depende tanto del estrés antimicrobiano como del tiempo de cultivo. Las micrografías confirmaron la presencia de vesículas esféricas más pequeñas que las bacterias, lo que permitió distinguir claramente las MVs del tamaño de la bacteria. Estos resultados sugieren que *P. simplex* produce MVs de forma natural y que su liberación puede ser modulada por factores externos, lo que representa un mecanismo adaptativo relevante para su supervivencia, como la presencia de antibióticos y función probiótica.

La producción de MVs inducida o modulada en respuesta a estímulos externos es un mecanismo que contribuye a la adaptación bacteriana al ambiente, ya que estas vesículas participan en procesos como la comunicación intercelular, el transporte de moléculas bioactivas, la transferencia horizontal de genes y la defensa frente a agentes adversos (Brown et al., 2015). En particular, la exposición a ampicilina podría generar un estrés subletal que estimule la formación de MVs como una estrategia para eliminar o modificar componentes de la pared celular dañados, o para exportar factores de virulencia y señales moleculares (Toyofuku et al., 2019).

Este fenómeno, descrito principalmente en bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* y *Leclercia adecarboxylata* ha sido menos estudiado en Gram positivas como *P. simplex*, por lo que estos hallazgos aportan evidencia importante sobre la capacidad de estas bacterias para producir MVs bajo estrés y la posible función que cumplen en fermentaciones tradicionales o ambientes naturales. El entendimiento

de esta dinámica vesicular abre la puerta para explorar aplicaciones biotecnológicas, como el desarrollo de agentes antimicrobianos basados en MVs o su uso en modulación inmunológica.

La estabilidad estructural de las MVs frente a distintas condiciones de pH fue notable, especialmente en condiciones que simulan el ambiente gastrointestinal. Las MVs se mantuvieron estables incluso a pH 1.3, que corresponde al entorno gástrico, esta etapa de la digestión en la que la interacción entre las bacterias y el medio ácido es más relevante.

Después de la incubación, las muestras fueron cuantificadas con espectrofotometría para determinar si había habido cambios en la concentración de vesículas, lo cual indica su integridad estructural (Palmieri et al., 2021). Esta estrategia experimental fue diseñada teniendo en consideración la necesidad de establecer si las MVs y las bacterias podían resistir el entorno ácido simulado, su viabilidad y estabilidad en estas condiciones son cruciales para su capacidad de ser utilizados como agentes inmunomoduladores o probióticos, o como plataformas para introducir compuestos bioactivos en aplicaciones biotecnológicas o terapéuticas.

Esta resistencia es fundamental para usos orales, como la administración de medicamentos, compuestos bioactivos o agentes inmunomoduladores, lo que potencia su capacidad como instrumento funcional probiótico (Ellis et al, 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación muestran que las MVs mantienen su integridad estructural sin mostrar alteraciones detectables. Este comportamiento señala que, en condiciones neutras, las vesículas no presentan una reorganización significativa, ni agregación o desestabilización; más bien se mantienen estables y químicamente inalteradas, lo que demuestra que este rango de pH es compatible con su estructura natural, al ser sometidas a un amplio rango de pH simulando a un ambiente ácido extremo (pH 1.3) hasta condiciones neutras (pH 7). Esta resistencia es particularmente relevante, dado que el pH en el tracto gastrointestinal varía considerablemente, desde valores muy ácidos en el estómago hasta casi neutros en el intestino delgado (Walter, 2008). Este comportamiento es consistente con estudios que reportan que las MVs de bacterias Gram positivas, gracias a su composición lipídica y proteica, son capaces de soportar variaciones en pH, temperatura y otras condiciones ambientales (Schwechheimer et al, 2015).

Es importante destacar que el control negativo formado por el medio sin MVs en cada pH—mostró absorbancias estables y bajas, lo que confirma que los cambios observados en la absorbancia de los grupos experimentales se deben únicamente a la estabilidad y presencia de las vesículas. La ligera disminución de absorbancia en pH ácido puede asociarse a una pérdida parcial de integridad vesicular o a una reducción de su capacidad de dispersión óptica, fenómeno que también ha sido documentado en otros estudios bajo condiciones extremas de pH (Toyofuku et al., 2019).

Estos resultados sugieren que las MVs producidas por *P. simplex* mantienen su integridad bajo condiciones ácidas y neutras simuladas del tracto gastrointestinal, la capacidad de la bacteria para secretar vesículas tanto en condiciones fisiológicas como bajo estrés sugiere un mecanismo adaptativo que favorece su supervivencia y funcionalidad en distintos entornos. Esta característica relevante para su potencial uso en aplicaciones orales, ya sea como agentes inmunomoduladores, probióticos o plataformas para la entrega de compuestos bioactivos. La combinación de resistencia antimicrobiana moderada, producción vesicular adaptable y estabilidad en distintos pH convierte a *P. simplex* en un candidato atractivo para futuras investigaciones y aplicaciones industriales. (Harrell et al., 2021).

En cuanto a su efecto sobre el crecimiento bacteriano, los resultados mostraron que las MVs de *Peribacillus simplex* no presentan actividad antimicrobiana evidente frente a las cepas indicadoras utilizadas (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Citrobacter spp.* y *Leclercia spp.*), al menos bajo las condiciones experimentales empleadas. Por el contrario, se observó un incremento progresivo en los valores de absorbancia a medida que la concentración de MVs se incrementaba. Esto indica que las MVs no tuvieron un efecto inhibitorio y podrían, incluso, estar promoviendo el crecimiento de bacterias en algunos casos. Lo cual indica que las vesículas de membrana liberadas mantienen una fracción considerable de las proteínas celulares que existen en la bacteria. Este comportamiento fue particularmente notorio en *K. aerogenes* y *E. coli*, en las que se alcanzaron los valores de absorbancia más elevados a 500 µg/mL de MVs, con registros superiores al control sin vesículas.

Este tipo de efecto ha sido descrito previamente, señalándose que las MVs actúan como plataformas para el intercambio de proteínas y lípidos, participando activamente en procesos

de señalización, formación de biopelículas, comunicación metabólica y transferencia genética, en lugar de ejercer efectos antimicrobianos directos (S. Chen et al., 2023). También se ha observado que estas estructuras facilitan la cooperación y supervivencia bacteriana mediante el transporte de metabolitos y componentes transportados por las MVs con capacidad para la activación de diferentes señales como son: autoinductores de quorum sensing (como acil-homoserina lactonas en Gram negativas), factores de virulencia, enzimas metabólicas, pequeños ARN reguladores y moléculas de estrés o señalización ambiental que pueden beneficiar el crecimiento de bacterias receptoras (Gu et al., 2019; Mashburn-Warren & Whiteley, 2006; Miller & Bassler, 2001). Más aún, se ha propuesto que las MVs se comportan como vehículos de entrega molecular que promueven la interacción comunitaria y la homeostasis microbiana, en lugar de representar una amenaza para otros microorganismos (Bitto & Kaparakis-Liaskos, 2017)

El perfil proteico obtenido por SDS-PAGE de las MVs de *Peribacillus simplex* mostró un patrón claramente diferenciado del lisado bacteriano total, lo que indica que estas vesículas presentan un empaquetamiento selectivo de proteínas. Se identificó un rango predominante de bandas entre 20 y 100 kDa, algunas de las cuales fueron exclusivas o más intensas en las MVs, sugiriendo la presencia de proteínas específicas asociadas a funciones particulares de estas estructuras. Este hallazgo concuerda con reportes en otras bacterias donde las vesículas son vehículos especializados que transportan proteínas implicadas en procesos como virulencia, adhesión o comunicación celular, presentando perfiles proteicos que difieren notablemente del proteoma celular (Altindis et al., 2014; Lee et al., 2009). En bacterias Gram positivas, en particular, las MVs cumplen un rol importante como mecanismos de secreción alternativos, debido a la ausencia de sistemas de secreción tipo I o III en bacterias Gram negativas, que permiten transportar proteínas directamente al medio extracelular o translocarlas en células hospedadoras para modular respuestas (Brown et al., 2015). La detección de proteínas liberadas tras el tratamiento con urea indica que estas vesículas contienen no solo componentes estructurales integrales, sino también proteínas periféricas con posibles funciones biológicas relevantes, tales como moduladores de la comunicación microbiana o facilitadores de la transferencia genética (Maucourt et al., 2020). Además, la presencia de un repertorio proteico parcialmente compartido con el lisado total, similar a lo descrito en *Bacillus subtilis*, sugiere

que las MVs pueden participar en la respuesta al estrés y en el transporte de moléculas necesarias para la supervivencia y la adaptación bacteriana (Toyofuku et al., 2019a).

La interacción de las MVs de *Peribacillus simplex* con *Escherichia coli* DH5α en medio líquido evidenció un aumento progresivo en la turbidez proporcional a la concentración de MVs. Este incremento sugiere que las MVs pueden favorecer la agregación o la asociación con las células receptoras, lo que podría facilitar la transferencia de moléculas y la comunicación intercelular. Estudios previos indican que las MVs actúan principalmente como vehículos de entrega molecular, transportando proteínas, lípidos, y material genético que modulan funciones celulares y la interacción microbiana (Adamus, 2017; Schwechheimer et al, 2015).

En este contexto, el perfil proteico identificado en las MVs de *P. simplex*, incluye proteínas asociadas a la adhesión, al transporte y a la estabilización del material genético, indica que estas MVs no solo intervienen en la comunicación entre microorganismos, sino que además tienen el potencial de promover la transferencia horizontal de genes (Shen et al., 2024). La posibilidad de que las bacterias, como *E. coli* (Dell'Annunziata et al., 2021), absorban o expresen temporalmente fragmentos génicos contenidos en las MVs aumenta cuando se combinan proteínas que tienen la capacidad de proteger el ADN extracelular y de promover la interacción con células receptoras (Abolhasani et al., 2025). Esto concuerda con lo reportado en otras bacterias, en las que las MVs sirven como medios eficaces para propagar genes de resistencia y elementos virulentos al llevar el material genético protegido del entorno y distribuirlo de manera directa a células nuevas.

La amplificación del gen BLA-TEM en las muestras de *E. coli* expuestas a MVs de *P. simplex* evidencia que estas vesículas pueden contener genes de resistencia que son transferibles entre bacterias, sugiriendo un rol activo en la diseminación horizontal de genes. Se amplificó el gen **TEM** porque codifica a una β-lactamasa de espectro extendido (BLEE) que pertenece al tipo **TEM**, la cual es una enzima que tiene la capacidad de hidrolizar antibióticos β-lactámicos como las cefalosporinas y las penicilinas, otorgándoles resistencia a estos medicamentos. Es importante detectarla porque es uno de los mecanismos clásicos de resistencia adquirida en las bacterias Gramnegativas, y su presencia muestra la posibilidad de que ocurra una transferencia de resistencia a través de MVs (Kim et al., 2018).

En conjunto, ambos genes son indicadores importantes de resistencia a múltiples fármacos (MDR), debido a que confieren resistencia a distintas clases de antibióticos y limitan considerablemente las alternativas de tratamiento (C. Chen et al., 2022; Ghenea et al., 2022).

Los genes **CTX-M** y **KPC**, también codifican β -lactamasas, pero de mayor espectro y relevancia clínica. El gen **CTX-M** es responsable de una β -lactamasa de espectro extendido (ESBL) que desactiva cefalosporinas de tercera generación; el gen **KPC** (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa), ambos genes son indicadores cruciales de resistencia a múltiples medicamentos (MDR por sus siglas en inglés), dado que otorgan resistencia a varias clases de antibióticos y restringen significativamente las alternativas terapéuticas disponibles (C. Chen et al., 2022; Ghenea et al., 2022). La ausencia de amplificación para **CTX-M** y **KPC** puede estar relacionada con la naturaleza ambiental y no patógena de *P. simplex*, que probablemente no porta estos genes clínicamente relevantes, y con el uso de una cepa *E. coli* DH5 α diseñada para carecer de resistencia (Sun et al., 2019).

Estos resultados resaltan la importancia de las MVs no solo como estructuras de comunicación microbiana sino también como vehículos potenciales para la transferencia genética en comunidades bacterianas. Este mecanismo puede influir en la dinámica microbiana y en la adaptación a ambientes diversos, como fermentados tradicionales o ecosistemas naturales, donde la transferencia de genes podría conferir ventajas selectivas (Koeppen et al., 2016).

Con el objetivo de evaluar la capacidad inmunogénica de las vesículas de membrana (MVs) de *Peribacillus simplex*, se inmunizaron ratones por vía intraperitoneal para analizar la respuesta sistémica inducida frente a las MVs. Esta vía permitió evaluar la respuesta inmune general mediada por anticuerpos circulantes. El procedimiento tuvo como finalidad determinar si dichas vesículas eran capaces de inducir la producción de anticuerpos específicos frente a sus componentes proteicos, confirmando así su potencial como antígenos reconocibles por el sistema inmune.

La inmunofluorescencia indirecta permitió confirmar cualitativamente la presencia y especificidad de los anticuerpos generados contra las MVs purificadas de *Peribacillus simplex*. La señal fluorescente observada indica que los anticuerpos reconocieron epítopos en

su superficie, lo que sugiere que estas vesículas conservan proteínas antigénicas tras el proceso de purificación, en concordancia con estudios que reportan la presencia de proteínas funcionales en MVs bacterianas (Parra et al., 2025).

La ausencia de fluorescencia inespecífica o de señales bacterianas indica la pureza de las muestras, validando la eficacia del protocolo de aislamiento. El patrón de agrupamiento detectado podría relacionarse con propiedades fisicoquímicas de las MVs, como su carga superficial o proteínas adhesivas, fenómeno observado en vesículas de otras bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* y *Leclercia adecarboxylata*, asociado con procesos de señalización o interacción con el entorno (Adamus, 2017).

Los resultados obtenidos con el esquema de inmunización con MVs de *Peribacillus simplex* indican que la vía de administración tiene un impacto importante en la respuesta inmune. La inmunización intraperitoneal, junto con el adyuvante Titer Max (1:1), favoreció la generación de isotipos de inmunoglobulinas vinculados a la inmunidad sistémica, como IgG1, IgG2A, IgG2B e IgM (Cribbs, 2003). Este adyuvante se elabora a partir de una emulsión de escualeno y copolímero no tóxico, cuyo objetivo es mejorar la reacción inmune celular y humoral mediante una liberación constante del antígeno y una reacción inflamatoria mínima en el sitio de aplicación (Ross et al., 2022).

Esta diferencia puede atribuirse a los mecanismos inmunológicos activados por cada ruta. La vía intraperitoneal favorece la captación del antígeno por células presentadoras como macrófagos y células dendríticas en el peritoneo, lo que estimula ganglios linfáticos regionales y activa predominantemente linfocitos B del compartimento sistémico. Este proceso lleva a la producción de IgG e IgM, que son las principales inmunoglobulinas circulantes y desempeñan un papel clave en la neutralización de patógenos en sangre y tejidos profundos (Abbas et al., 2022; Lycke, 2012).

Los datos del ELISA mostraron títulos de anticuerpos consistentemente más altos en las lecturas realizadas a 450 nm en comparación con aquellas a 630 nm, lo que refleja una mayor sensibilidad del sistema cromogénico a esta longitud de onda. Esta diferencia ha sido ampliamente documentada en la literatura, y específicamente por (Böröcz et al., 2019), quienes

demostraron que la absorbancia a 450 nm permite una detección más eficiente de complejos antígeno-anticuerpo en ensayos ELISA, particularmente cuando se utiliza TMB como sustrato. Este aspecto técnico fortalece la interpretación de nuestros datos, ya que permite cuantificar con mayor precisión la magnitud de la respuesta humoral inducida por las MVs.

Asimismo, el análisis de las diluciones permitió evaluar el título de anticuerpos, que se entiende como la dilución más alta del suero en la que todavía se observa una reacción inmunológica específica. Por vía intraperitoneal, se notaron los niveles más altos en diluciones bajas; a medida que las diluciones eran más altas, la señal fue disminuyendo de manera continua. Esta conducta es coherente con una respuesta humoral que depende de la concentración de anticuerpos y muestra el tamaño de la reacción provocada por las MVs. Asimismo, el hecho de que la señal se detecte incluso cuando las diluciones son altas indica que las MVs mantienen su capacidad antigénica y que el sistema inmune las identifica de manera efectiva.

Por el contrario, la vía intraperitoneal con adyuvante produjo una respuesta sistémica con niveles de IgG e IgM más elevados, lo cual señala una activación inmune más intensa. Esto demuestra que la administración intraperitoneal de las MVs de *P. simplex* provoca una respuesta humoral extensa y efectiva. Sin embargo, estas observaciones solo se restringen a la vía intraperitoneal, porque no se examinaron otros métodos de inmunización. En consecuencia, no es factible determinar cuál vía de administración podría ser más efectiva o hacer comparaciones directas entre ellas. Lo que se puede asegurar es que, en el marco del diseño experimental empleado, la vía intraperitoneal fue adecuada para provocar una respuesta sistémica estable y detectable.

Los datos del Western blot evidencian que las MVs de *P. simplex* contienen proteínas reconocidas por el sistema inmune, tal como se reflejaron en la ELISA. La presencia de una banda entre 70–50 kDa, detectada tanto en el lisado bacteriano total, indica que estas MVs incorporan proteínas estructurales o periplásmicas que forman parte del exoproteoma de la célula madre. Estudios exhaustivos con proteómica han identificado miles de proteínas en MVs en diferentes bacterias (como *Campylobacter jejuni*, *Neisseria meningitidis* y *Brucella melitensis*), en nuestro estudio el Western blot se realizó a partir de geles en una dimensión donde solo se identifican dos bandas, la técnica identifica aquellas proteínas que son

reconocidas por los anticuerpos existentes en el suero de ratones inmunizados, de tal manera podrían haber más proteínas presentes en estas dos bandas("[Decisions 1991; Saino et al., 1982).

Los anticuerpos producidos en los ratones inmunizados identifican principalmente las proteínas inmunodominantes, que tienden a ser más abundantes expuestas en la superficie de las MVs y con alta capacidad antigénica. En cambio, no detectan otras proteínas que son menos inmunogénicas o que se encuentran en menor cantidad. Esta selectividad es propia del método inmunológico del Western blot incluyendo proteínas de membrana, factores de virulencia, transporte y adhesión, que están presentes tanto en lisado celular como en MVs (Socorro Ruiz-Palma et al., 2021).

La banda de bajo peso molecular (~5–2 kDa) indica la presencia de pequeños péptidos o proteínas pequeñas que pueden hallarse ocultas en la estructura intacta de las vesículas y que se liberan al desnaturalizarse con urea, exponiendo epítomos antigénicos internos. Estudios con MVs de otras bacterias también han reportado que ciertas proteínas citoplasmáticas o periplásmicas quedan atrapadas en su interior, y pueden ser detectadas tras condiciones de procesamiento, como tratamiento con agentes desnaturalizantes (Jang et al., 2014; Zhang et al., 2023). La detección de bandas inmunorreactivas a distintos pesos molares refuerza la hipótesis de que las MVs de *P. simplex* pueden incluir numerosos antígenos importantes, tanto de tamaño medio como pequeñas proteínas o péptidos, con valor potencial en el desarrollo de estrategias inmunológicas basadas en vesículas.

En conjunto, estas observaciones indican que las MVs de *Peribacillus simplex* son estructuras adaptables que pueden sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal, modificar la microbiota y producir reacciones humorales específicas. Por lo tanto, se presentan como opciones prometedoras para usos biotecnológicos, inmunomoduladores y probióticos, fusionando el saber tradicional sobre fermentados mexicanos con avances científicos.

9.0 CONCLUSIONES

Esta investigación permitió obtener las siguientes conclusiones relevantes:

- *Peribacillus simplex*, aislado del tepache, produce MVs de forma natural, y su liberación aumenta con el tiempo de cultivo y la presencia de ampicilina.
- El protocolo de purificación empleado permitió obtener MVs libres de contaminantes y con integridad estructural.
- Las MVs mostraron alta estabilidad frente a condiciones de pH ácido y neutro, simulando el ambiente gastrointestinal.
- No se observó efecto antimicrobiano directo, pero las MVs promovieron el crecimiento de bacterias patógenas en medios líquidos.
- Las MVs transfirieron el gen de resistencia BLA_{TEM} a *E. coli*, confirmando su papel en la transferencia horizontal de genes.
- El perfil proteico de las MVs presentó proteínas inmunogénicas detectadas mediante Western blot e inmunofluorescencia.
- La administración por vía intraperitoneal indujo la producción de anticuerpos IgG/IgM, indicando la capacidad de las MVs de activar una respuesta humoral específica.
- Las MVs de ***P. simplex*** tienen potencial como herramientas inmunomoduladores y para aplicaciones biotecnológicas orales.

10.0 BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K. ., Lichtman, A. H. ., & Pillai, Shiv. (2022). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier.
- Abolhasani, F. S., Vaghefinanekaran, N., Yarahmadi, A., Akrami, S., Mirmahdavi, S., Yousefi, M. H., Afkhami, H., & Shafiei, M. (2025). Outer membrane vesicles in gram-negative bacteria and its correlation with pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1541636>
- Adamus, G. (2017). Impact of Autoantibodies against Glycolytic Enzymes on Pathogenicity of Autoimmune Retinopathy and Other Autoimmune Disorders. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00505>
- Altindis, E., Fu, Y., & Mekalanos, J. J. (2014). Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(15). <https://doi.org/10.1073/pnas.1403683111>
- Astudillo-Melgar, F., Ochoa-Leyva, A., Utrilla, J., & Huerta-Beristain, G. (2019). Bacterial Diversity and Population Dynamics During the Fermentation of Palm Wine From Guerrero Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00531>
- Bernal Castro, C. A., Díaz-Moreno, C., & Gutiérrez-Cortés., C. (2017). Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: avances en el desarrollo de bebidas de frutas. *Revista chilena de nutrición*, 44(4), 383–392. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182017000400383>
- Bitto, N., & Kaparakis-Liaskos, M. (2017). The Therapeutic Benefit of Bacterial Membrane Vesicles. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1287. <https://doi.org/10.3390/ijms18061287>
- Böröcz, K., Csizmadia, Z., Markovics, Á., Mészáros, V., Farkas, K., Telek, V., Varga, V., Maloba, G. O., Bodó, K., Najbauer, J., Berki, T., & Németh, P. (2019). Development of a robust and standardized immunoserological assay for detection of anti-measles IgG antibodies in human sera. *Journal of Immunological Methods*, 464, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.07.009>
- Bose, S., Aggarwal, S., Singh, D. V., & Acharya, N. (2020). Extracellular vesicles: An emerging platform in gram-positive bacteria. *Microbial Cell*, 7(12), 312–322. <https://doi.org/10.15698/mic2020.12.737>
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 620–630. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>
- Cao, Y., & Lin, H. (2021). Characterization and function of membrane vesicles in Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(5), 1795–1801. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11140-1>
- Chen, C., Shi, Q., Hu, X., Liu, X., Liu, Y., & Liu, R. (2022). Co-Existence of KPC-2, LAP-2, and CTX-M-65 in an ST1469 Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain in China. *Infection and Drug Resistance*, Volume 15, 6731–6737. <https://doi.org/10.2147/IDR.S392063>
- Chen, S., Lei, Q., Zou, X., & Ma, D. (2023). The role and mechanisms of gram-negative bacterial outer membrane vesicles in inflammatory diseases. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1157813>

- Choi, U., & Lee, C.-R. (2019). Distinct Roles of Outer Membrane Porins in Antibiotic Resistance and Membrane Integrity in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00953>
- Cribbs, D. H. (2003). Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *International Immunology*, 15(4), 505–514. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg049>
- Cuamatzin-García, L., Rodríguez-Rugarcía, P., El-Kassis, E. G., Galicia, G., Meza-Jiménez, M. de L., Baños-Lara, Ma. del R., Zaragoza-Maldonado, D. S., & Pérez-Armendáriz, B. (2022). Traditional Fermented Foods and Beverages from around the World and Their Health Benefits. *Microorganisms*, 10(6), 1151. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061151>
- de la Fuente-Salcido, N. M., Castañeda-Ramírez, J. C., García-Almendárez, B. E., Bideshi, D. K., Salcedo-Hernández, R., & Barboza-Corona, J. E. (2015). Isolation and characterization of bacteriocinogenic lactic bacteria from M-Tuba and Tepache, two traditional fermented beverages in México. *Food Science & Nutrition*, 3(5), 434–442. <https://doi.org/10.1002/fsn3.236>
- [Decisions at the 63d conference of public health ministers and representatives of participating countries in Berlin, 22-23 November 1990]. (1991). *Das Öffentliche Gesundheitswesen*, 53(2), 89–97.
- Dell'Annunziata, F., Dell'Aversana, C., Doti, N., Donadio, G., Dal Piaz, F., Izzo, V., De Filippis, A., Galdiero, M., Altucci, L., Boccia, G., Galdiero, M., Folliero, V., & Franci, G. (2021). Outer Membrane Vesicles Derived from *Klebsiella pneumoniae* Are a Driving Force for Horizontal Gene Transfer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8732. <https://doi.org/10.3390/ijms22168732>
- Domingues, S., & Nielsen, K. M. (2017). Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.012>
- Ellis, T. N., & Kuehn, M. J. (2010). Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 81–94. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-09>
- Escalante, A., López Soto, D. R., Velázquez Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., & López-Munguía, 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>
- Escobar-Ramírez, M. C., Jaimez-Ordaz, J., Escorza-Iglesias, V. A., Rodríguez-Serrano, G. M., Contreras-López, E., Ramírez-Godínez, J., Castañeda-Ovando, A., Morales-Estrada, A. I., Felix-Reyes, N., & González-Olivares, L. G. (2020). *Lactobacillus pentosus* ABHEAU-05: An in vitro digestion resistant lactic acid bacterium isolated from a traditional fermented Mexican beverage. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(4), 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.10.005>
- F. Guarner. (2007). Role of intestinal flora in health and disease. *Nutr. Hosp.*, 22, 1699–5198.
- García-Reyes, R. A., García-Cancino, A., Arrevillaga-Boni, G., Espinoza-Monje, M., Gutiérrez-Zamorano, C., Arrizon, J., & González-Avila, M. (2023). Identification and Characterization of Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* BI-59.1 Isolated from tejuino and Its Capacity to Produce Biofilms. *Current Microbiology*, 80(7), 220. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03319-8>
- Ghenea, A. E., Zlatian, O. M., Cristea, O. M., Ungureanu, A., Mititelu, R. R., Balasoïu, A. T., Vasile, C. M., Salan, A.-I., Iliuta, D., Popescu, M., Udriștoiu, A.-L., & Balasoïu, M. (2022). TEM,CTX-M,SHV Genes in ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Samples in a County Clinical Emergency Hospital Romania-Predominance of CTX-M-15. *Antibiotics*, 11(4), 503. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040503>
- Gobierno de México. (2017). Tepache: disfruta de este refrescante sabor prehispánico. *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*.

- Gu, L., Meng, R., Tang, Y., Zhao, K., Liang, F., Zhang, R., Xue, Q., Chen, F., Xiao, X., Wang, H., Wang, H., Billiar, T. R., & Lu, B. (2019). Toll-Like Receptor 4 Signaling Licenses the Cytosolic Transport of Lipopolysaccharide From Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Shock*, 51(2), 256–265. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001129>
- Gupta, V., & Garg, R. (2009). PROBIOTICS. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(3), 202–209. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.53201>
- Gutiérrez-Sarmiento, W., Peña-Ocaña, B. A., Lam-Gutiérrez, A., Guzmán-Albores, J. M., Jasso-Chávez, R., & Ruíz-Valdiviezo, V. M. (2022a). Microbial community structure, physicochemical characteristics and predictive functionalities of the Mexican tepache fermented beverage. *Microbiological Research*, 260, 127045. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127045>
- Gutiérrez-Sarmiento, W., Peña-Ocaña, B. A., Lam-Gutiérrez, A., Guzmán-Albores, J. M., Jasso-Chávez, R., & Ruíz-Valdiviezo, V. M. (2022b). Microbial community structure, physicochemical characteristics and predictive functionalities of the Mexican tepache fermented beverage. *Microbiological Research*, 260, 127045. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127045>
- Gutiérrez-Sarmiento, W., Peña-Ocaña, B. A., Lam-Gutiérrez, A., Guzmán-Albores, J. M., Jasso-Chávez, R., & Ruíz-Valdiviezo, V. M. (2022c). Microbial community structure, physicochemical characteristics and predictive functionalities of the Mexican tepache fermented beverage. *Microbiological Research*, 260, 127045. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127045>
- Harrell, J. E., Kurtz, J. R., Bauer, D. L., Prior, J. T., Gellings, P. S., Morici, L. A., & McLachlan, J. B. (2021). An Outer Membrane Vesicle-Adjuvanted Oral Vaccine Protects Against Lethal, Oral Salmonella Infection. *Pathogens*, 10(5), 616. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050616>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Imori, P. F. M., Campioni, F., Cao, G., Kastanis, G., Leon, M. S., Allard, M. W., & Falcão, J. P. (2017). Draft Genome Sequences of *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*, and *Yersinia kristensenii* Strains from Brazil. *Genome Announcements*, 5(32). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00780-17>
- Jang, K.-S., Sweredoski, M. J., Graham, R. L. J., Hess, S., & Clemons, W. M. (2014). Comprehensive proteomic profiling of outer membrane vesicles from *Campylobacter jejuni*. *Journal of Proteomics*, 98, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.12.014>
- Ji, J., Jin, W., Liu, S., Jiao, Z., & Li, X. (2023). Probiotics, prebiotics, and postbiotics in health and disease. *MedComm*, 4(6). <https://doi.org/10.1002/mco2.420>
- Jorge A. Reyes Esparza, L. R. F. (2011). Los probióticos: ¿cómo una mezcla de microorganismos hacen un gran trabajo? *Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos*.
- Juan Carlos González-Hernández Evelyn Vázquez Chávez. (2020, junio). *Pulque: Una bebida con prebióticos*. Saber Más, (51).
- Kim, S. W., Park, S. Bin, Im, S. P., Lee, J. S., Jung, J. W., Gong, T. W., Lazarte, J. M. S., Kim, J., Seo, J.-S., Kim, J.-H., Song, J.-W., Jung, H. S., Kim, G. J., Lee, Y. J., Lim, S.-K., & Jung, T. S. (2018). Outer membrane vesicles from β -lactam-resistant *Escherichia coli* enable the survival of β -lactam-susceptible *E. coli* in the presence of β -lactam antibiotics. *Scientific Reports*, 8(1), 5402. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23656-0>

- Koeppen, K., Hampton, T. H., Jarek, M., Scharfe, M., Gerber, S. A., Mielcarz, D. W., Demers, E. G., Dolben, E. L., Hammond, J. H., Hogan, D. A., & Stanton, B. A. (2016). A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles. *PLOS Pathogens*, 12(6), e1005672. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005672>
- Lee, E., Choi, D., Kim, D., Kim, J., Park, J. O., Kim, S., Kim, S., Desiderio, D. M., Kim, Y., Kim, K., & Ghoo, Y. S. (2009). Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus* -derived membrane vesicles. *PROTEOMICS*, 9(24), 5425–5436. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900338>
- Liu, Y., Defourny, K. A. Y., Smid, E. J., & Abee, T. (2018). Gram-Positive Bacterial Extracellular Vesicles and Their Impact on Health and Disease. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01502>
- Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J. P., Wang, M., Sun, Y., Wang, L., & Shao, Z. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports*, 5(1), 14082. <https://doi.org/10.1038/srep14082>
- Lu, S., Li, H., Ma, C., & Li, X. (2025). Systemic and localized infections in humans caused by *Paenibacillus*: a case report and literature review. *BMC Ophthalmology*, 25(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s12886-025-03966-4>
- Lycke, N. (2012). Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), 592–605. <https://doi.org/10.1038/nri3251>
- Malihi, Z., Abassor, T., Ben Lahlou, Y., Benaissa, E., & Chadli, M. (2025). *Peribacillus simplex* and *Klebsiella pneumoniae* responsible for pyonephrosis with secondary psoas abscess: a case report. *Access Microbiology*, 7(1). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000911.v3>
- Manetsberger, J., Caballero Gómez, N., Soria-Rodríguez, C., Benomar, N., & Abriouel, H. (2023a). Simply Versatile: The Use of *Peribacillus simplex* in Sustainable Agriculture. *Microorganisms*, 11(10), 2540. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102540>
- Manetsberger, J., Caballero Gómez, N., Soria-Rodríguez, C., Benomar, N., & Abriouel, H. (2023b). Simply Versatile: The Use of *Peribacillus simplex* in Sustainable Agriculture. *Microorganisms*, 11(10), 2540. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102540>
- Mashburn-Warren, L. M., & Whiteley, M. (2006). Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 61(4), 839–846. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05272.x>
- Maucourt, B., Vuilleumier, S., & Bringel, F. (2020). Transcriptional regulation of organohalide pollutant utilisation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(2), 189–207. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa002>
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 165–199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Ney, L.-M., Wipplinger, M., Grossmann, M., Engert, N., Wegner, V. D., & Mosig, A. S. (2023). Short chain fatty acids: key regulators of the local and systemic immune response in inflammatory diseases and infections. *Open Biology*, 13(3). <https://doi.org/10.1098/rsob.230014>
- NTX. (2013). *Investigadores de la Universidad Nacional Autónoma de México intentan producir bebida probiótica con pozol*. Unam.
- Palmieri, E., Arato, V., Oldrini, D., Ricchetti, B., Aruta, M. G., Pansegrau, W., Marchi, S., Giusti, F., Ferlenghi, I., Rossi, O., Alfini, R., Giannelli, C., Gasperini, G., Necchi, F., & Micoli, F. (2021). Stability of Outer Membrane Vesicles-Based Vaccines, Identifying the Most Appropriate Methods to Detect Changes in Vaccine Potency. *Vaccines*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/vaccines9030229>

- Parra, F., Carreño, A., Ancede-Gallardo, E., Majluf, D., Soto, J. A., Sepúlveda, R. V., Aguayo, D., Otero, M. C., Calderón, I. L., Gil, F., & Fuentes, J. A. (2025). Benzimidazole-Derived B2 as a Fluorescent Probe for Bacterial Outer Membrane Vesicle (OMV) Labeling: Integrating DFT, Molecular Dynamics, Flow Cytometry, and Confocal Microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(10), 4682. <https://doi.org/10.3390/ijms26104682>
- Ross, Ted. M., Gokanapudi, N., Ge, P., Shi, H., Richardson, R. A., Pierce, S. R., Sanchez, P., Ullah, S., De Luca, E., & Sautto, G. A. (2022). Kinetic of the Antibody Response Following AddaVax-Adjuvanted Immunization with Recombinant Influenza Antigens. *Vaccines*, 10(8), 1315. <https://doi.org/10.3390/vaccines10081315>
- Saino, Y., Kobayashi, F., Inoue, M., & Mitsuhashi, S. (1982). Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 22(4), 564–570. <https://doi.org/10.1128/AAC.22.4.564>
- Santos, A. C. C., Malta, S. M., Dantas, R. C. C., Coelho Rocha, N. D., Ariston de Carvalho Azevedo, V., & Ueira-Vieira, C. (2022). Antimicrobial activity of supernatants produced by bacteria isolated from Brazilian stingless bee's larval food. *BMC Microbiology*, 22(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02548-4>
- Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 605–619. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>
- Shen, Z., Qin, J., Xiang, G., Chen, T., Nurxat, N., Gao, Q., Wang, C., Zhang, H., Liu, Y., & Li, M. (2024). Outer membrane vesicles mediating horizontal transfer of the epidemic blaOXA-232 carbapenemase gene among Enterobacterales. *Emerging microbes & infections*, 13(1), 2290840. <https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2290840>
- Socorro Ruiz-Palma, M. del, Avila-Calderón, E. D., Aguilera-Arreola, Ma. G., López-Merino, A., Ruiz, E. A., Morales-García, M. del R., López-Villegas, E. O., Gomez-Lunar, Z., Arellano-Reynoso, B., & Contreras-Rodríguez, A. (2021). Comparative proteomic analysis of outer membrane vesicles from *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis* and *Brucella neotomae*. *Archives of Microbiology*, 203(4), 1611–1626. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02170-w>
- Spigaglia, P. (2024). Clostridioides difficile and Gut Microbiota: From Colonization to Infection and Treatment. *Pathogens*, 13(8), 646. <https://doi.org/10.3390/pathogens13080646>
- Sun, D., Jeannot, K., Xiao, Y., & Knapp, C. W. (2019). Editorial: Horizontal Gene Transfer Mediated Bacterial Antibiotic Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01933>
- Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Toyofuku, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2019a). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), 13–24. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>
- Toyofuku, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2019b). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), 13–24. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>
- Valentine, N. B., Bolton, H., Kingsley, M. T., Drake, G. R., Balkwill, D. L., & Plymale, A. E. (1996). Biosorption of cadmium, cobalt, nickel, and strontium by a *Bacillus simplex* strain isolated from the vadose zone. *Journal of Industrial Microbiology*, 16(3), 189–196. <https://doi.org/10.1007/BF01570003>
- van der Pol, L., Stork, M., & van der Ley, P. (2015). Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. *Biotechnology Journal*, 10(11), 1689–1706. <https://doi.org/10.1002/biot.201400395>
- Velázquez-López, A., Covatzin-Jirón, D., Toledo-Meza, M. D., & Vela-Gutiérrez, G. (2018). Bebida fermentada elaborada con bacterias ácido lácticas aisladas del pozol tradicional chiapaneco. *CienciaUAT*, 13(1), 165. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i1.871>

- Víctor Manuel Ruíz Valdiviezo, W. G. S. R. J. C. M. G.-A. A. L.-G. B. A. P. O. (22d. C.). Investigadores identifican microorganismos saludables en el Tepache, una bebida ancestral mexicana. *"Ciencia y Tecnología con Sentido Humano"* Departamento de Comunicación y Difusión TecNM campus Tuxtla Gutiérrez.
- Walter, J. (2008). Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 4985–4996. <https://doi.org/10.1128/AEM.00753-08>
- Wang, Y., Duan, C., & Yu, X. (2025). Extracellular vesicles of Gram-negative and Gram-positive probiotics. *Journal of Microbiology*, 63(7), e2506005. <https://doi.org/10.71150/jm.2506005>
- Xu, Y., Xie, C., Liu, Y., Qin, X., & Liu, J. (2023). An update on our understanding of Gram-positive bacterial membrane vesicles: discovery, functions, and applications. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1273813>
- Yoon, H., Lee, J., Kim, Y., Han, J. A., Lee, H.-S., & Kim, E. Y. (2025). Genome report of *Peribacillus simplex* strain IMG9 isolated from soil. *Microbiology Resource Announcements*, 14(1). <https://doi.org/10.1128/mra.00860-24>
- Zhang, X., Wang, Y., Fan, R., Zhang, L., Li, Z., Zhang, Y., Zheng, W., Wang, L., Liu, B., & Quan, C. (2023). Quantitative Proteomic Analysis of Outer Membrane Vesicles from *Fusobacterium nucleatum* Cultivated in the Mimic Cancer Environment. *Microbiology Spectrum*, 11(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00394-23>