



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO
LÁCTICAS AISLADAS DE ALIMENTOS DE
VILLAHERMOSA, TABASCO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

MOYA VILLEGAS ERIK

ASESOR

DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

Ciudad Universitaria, CDMX. Diciembre, 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE

VOCAL: RUIZ TERÁN FRANCISCO

SECRETARIO: MINA CETINA ALEIDA

1er. SUPLENTE: JIMÉNEZ REYES GENARO

2do. SUPLENTE: DÍAZ RUIZ GLORIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

**Laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio E,
Facultad de Química, Ciudad Universitaria.**

ASESOR DEL TEMA

Dra. María del Carmen Wacher Rodarte

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. Gloria Díaz Ruíz

SUSTENTANTE

MOYA VILLEGAS ERIK

RECONOCIMIENTO

Al programa PAPIIT de la UNAM por el apoyo económico recibido por el proyecto IN-223917 “Combinando la microbiología y la bioquímica clásicas con las ómicas y las biofísicas para entender la fermentación del pozol”.

ÍNDICE

A. Índice de figuras	iii
B. Índice de tablas	iv
1. Abreviaturas y Símbolos	v
2. Resumen	vi
3. Introducción	1
4. Antecedentes	3
4.1 Alimentos fermentados	3
4.1.1 Alimentos fermentados tradicionales	3
4.1.2 Alimentos fermentados tradicionales a base de maíz	4
4.2 Atole agrio	5
4.2.1 Historia del atole agrio	5
4.2.2 Proceso de elaboración del atole agrio	6
4.2.3 Microbiota presente en el atole agrio	6
4.3 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)	7
4.3.1 Lactobacilos	8
4.3.2 <i>Lactococcus lactis</i>	9
4.4 Bacteriocinas	10
4.4.1 Definición	10
4.4.2 Biosíntesis de las bacteriocinas	10
4.4.3 Clasificación de las bacteriocinas	11
4.5 Identificación de microorganismos por métodos fenotípicos	12
4.5.1 Pruebas bioquímicas	13
4.5.2 Tira API 50CHL	13
4.6 Identificación de microorganismos por métodos genotípicos	14
4.6.1 Gen rRNA 16S	15
4.7 Bacterias patógenas aisladas de alimentos fermentados	16
4.7.1 Bacterias gram-negativas	17
4.7.1.1 <i>Salmonella</i> spp	17
4.7.2 Bacterias gram-positivas	17

4.7.2.1	<i>Bacillus cereus</i>	17
4.7.2.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	18
4.7.2.3	Bacterias aisladas de cavidad bucal	19
4.7.2.3.1	<i>Streptococcus sanguinis</i>	19
5.	Hipótesis	21
6.	Objetivos	22
7.	Metodología	23
7.1	Recuperación y reactivación de las cepas de BAL en MRSo	25
7.2	Caracterización fenotípica	25
7.3	Determinación de la actividad antimicrobiana	25
7.4	Caracterización genotípica	26
7.4.1	Extracción de DNA cromosomal y verificación de su extracción y pureza mediante electroforesis en gel de agarosa	26
7.4.2	Cuantificación del DNA cromosomal extraído	26
7.4.3	Amplificación del gen ribosomal 16S por PCR	27
7.4.4	Purificación de la amplificación de DNAr 16S	28
7.4.5	Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado	28
7.4.6	Construcción del dendrograma	29
7.4.7	Secuenciación del DNA ribosomal e identificación del microorganismo	29
8.	Resultados	30
8.1	Recuperación y reactivación de las cepas de BAL en MRSo.	30
8.2	Determinación de la actividad antimicrobiana	30
8.3	Caracterización fenotípica	38
8.4	Caracterización genotípica	41
9.	Conclusiones	55
10.	Perspectivas	56
11.	Bibliografía	57
12.	Anexos	64

A. Índice de figuras.

Figura 1. Proceso de elaboración del atole agrio.	6
Figura 2. Tira Api 50CH para la identificación de bacterias del género <i>Lactobacillus</i>	14
Figura 3. Diagrama de flujo del proceso experimental.	24
Figura 4. Halos de inhibición producidos por extractos de cepas de BAL contra cepas patógenas: <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella Typhimurium</i> .	32
Figura 5. Halos de inhibición producidos por extractos de cepas de BAL contra cepas patógenas: <i>Streptococcus sanguinis</i> y <i>Bacillus cereus</i> .	36
Figura 6. Resultados de las pruebas de identificación de las cepas de BAL mediante sistema API 50CH.	38
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de DNA de las cepas aisladas y purificadas del atole agrio.	42
Figura 8. Electroforesis de la extracción de DNA cromosomal de algunas cepas de BAL.	67
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para productos de PCR de las cepas aisladas y purificadas del atole agrio.	44
Figura 10. Electroforesis de productos de amplificación del DNA de algunas BAL aisladas del atole agrio.	69
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% del análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado con enzima de restricción Hae III.	46
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% del análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado con enzima de restricción Hinf I.	47
Figura 13. Dendograma elaborado a partir de los perfiles de restricción de la enzima Hae III con el programa Phylip-3.695.	49
Figura 14. Electroforesis de la purificación del DNAr 16S de las cepas a secuenciar	50

B. Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de <i>Lactobacillus</i> con base en el tipo de fermentación que llevan a cabo.	9
Tabla 2. Bacteriocinas representativas producidas por BAL.	12
Tabla 3. Pruebas realizadas a cepas de atole agrio aisladas y purificadas realizadas en el proyecto Aislamiento y caracterización de microorganismos con potencial probiótico de la fermentación del maíz de elote y dobla.	64
Tabla 4. Formulación de placas y sobrecapas de medio BHI para prueba de difusión en agar.	65
Tabla 5. Mezcla de reacción de PCR.	27
Tabla 6. Cebadores utilizados para amplificar el gen 16S RNA en bacterias.	27
Tabla 7. Condiciones de PCR para amplificar el gen 16S rRNA en bacterias.	28
Tabla 8. Reacción de digestión enzimática.	28
Tabla 9. Pruebas de actividad antimicrobiana de cepas aisladas del atole agrio contra <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i> Typhimurium.	30
Tabla 10. Pruebas de actividad antimicrobiana de cepas aisladas del atole agrio contra <i>S. sanguinis</i> y <i>Bacillus cereus</i> .	34
Tabla 11. Resultados de las cepas seleccionadas mediante identificación con sistema API.	39
Tabla 12. Resultados obtenidos de la cuantificación de DNA cromosomal.	68
Tabla 13. Matriz de ausencia y presencia de fragmentos.	70
Tabla 14. Identidad de las cepas mediante el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S.	51
Tabla 15. Resultados de la identificación de bacterias lácticas aisladas del pozol mediante comparación de sistema API 50CH y método ARDRA.	54

1. Abreviaturas y Símbolos

%	Por ciento
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
ARDRA	Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
BHI	Infusión Cerebro Corazón
°C	Grados Celsius
cm	Centímetros
µg	Microgramos
h	Hora
µL	Microlitros
L	Litros
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MPM	Marcador de Peso Molecular
nM	Nanomolar
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Peso Molecular
ppm	Partes Por Millón
rpm	Revoluciones Por Minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico

2. Resumen

El atole agrio es un alimento fermentado hecho a base de maíz de doble o maíz tierno que involucra dos procesos diferentes para su elaboración. A partir de la molienda del maíz, puede ser preparado mediante una fermentación sólida o una fermentación líquida. Para la elaboración del atole mediante una fermentación sólida, se forman bolas que se dejan fermentar por 12h a temperatura ambiente (30-35°C). Por el contrario, para la elaboración del atole agrio mediante una fermentación líquida, se lleva a cabo la adición de agua posterior a la molienda del maíz y se deja fermentar por 6 horas a temperatura ambiente. Independientemente del tipo de fermentación, será necesario realizar el colado para después someterlos a ebullición hasta espesar para así obtener esta bebida típica del sureste de México que es consumida en gran parte por las comunidades mazatecas. Esta bebida es fermentada por una microbiota compleja que comprende un grupo de bacterias lácticas (BAL) de los géneros: *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Debido a las condiciones en las que es elaborado, ya que es un producto artesanal, las buenas prácticas de manufactura no son llevadas a cabo correctamente y por ello es posible que se desarrollen microorganismos indeseables, entre ellos bacterias patógenas, causantes de enfermedades. Existen bacterias capaces de producir sustancias antimicrobianas que actúan contra microorganismos no deseados, entre éstas se encuentran las bacteriocinas. Se llevó a cabo la identificación de una colección de BAL aisladas y purificadas previamente para determinar si existe relación en los resultados obtenidos para la identificación de BAL mediante métodos fenotípicos y genotípicos. Al mismo tiempo se estudió la presencia de sustancias antimicrobianas, atribuidas a la presencia de bacteriocinas mediante pruebas de difusión en agar contra cepas de bacterias patógenas, de importancia a nivel mundial en la contaminación de alimentos y enfermedades transmitidas por estos: *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y una cepa de la cavidad oral: *Streptococcus sanguinis*.

Se determinó la actividad antimicrobiana de cepas de bacterias lácticas contra cepas de bacterias patógenas y solamente once de las veintiocho cepas presentaron actividad antimicrobiana.

Dentro de la colección de cepas estudiadas se identificaron mediante el sistema API 50CH a *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus pentosus* y *Leuconostoc mesenteroides* todas de tipo de fermentación ácido-láctica.

Se realizó un análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado (ARDRA) para el gen rRNA16S de las 28 cepas y se encontraron un total de 18 perfiles únicos de restricción. Se realizó un dendrograma donde se visualizaron 6 agrupaciones principales, por lo que se realizó la secuenciación del gen rRNA 16S de los representantes de cada agrupación y de esta forma se identificó la presencia de tres géneros distintos: *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus*, dentro de las cuales dos cepas de *Lactobacillus plantarum*, dos cepas de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, una cepa de *Leuconostoc lactis* y una cepa de *Lactococcus lactis* coincidieron en su identificación bioquímica (API) y molecular (ARDRA).

3. Introducción

En la historia del hombre, la dieta ha sido el factor evolutivo más fuerte. Su evolución se remonta a unos siete millones de años, lapso en el cual la alimentación experimentó varias transformaciones. En la vida arbórea, la base de alimentación fue de frutas. El advenimiento de la agricultura y de la ganadería modificó drásticamente el patrón paleolítico y tuvo como resultado una dependencia de cereales que aportaban aproximadamente el 90% de la dieta y muy pequeñas cantidades de proteína animal. Estos desarrollos modificaron drásticamente las relaciones del hombre con el ambiente (Arroyo, 2008).

Seguramente surgió la necesidad de almacenar los excedentes, es decir, de conservar los alimentos. Surgió también la posibilidad de cocinarlos o prepararlos de formas variadas. Dentro de estas formas quizás la más sencilla fue el secado al sol y la más compleja la fermentación. Ambas formas surgieron derivadas de la observación y la experimentación, dado que un alimento que conserva su humedad se descompone, mientras que el que quedó expuesto al sol y se secó, pudo consumirse posteriormente después de recuperar su humedad (Wacher, 2014).

La fermentación es una técnica de procesamiento de alimentos que se remonta a miles de años. La historia de la comida fermentada se pierde en la antigüedad. Parece que el arte de la fermentación se originó en el subcontinente indio, en los asentamientos que son anteriores a la gran civilización del valle del Indo (Prajapati y Nair, 2003).

La fermentación es un proceso más complejo, ya que la transformación del alimento (el cereal, la fruta o, eventualmente, la leche) se produce por acción de microorganismos del medio ambiente, los cuales, al utilizar los componentes disponibles del alimento, pueden reproducirse transformando el sabor, el color, el olor, la textura e incluso el valor nutricional del producto en el que están creciendo y fermentando (Wacher, 2014).

Los alimentos fermentados son producidos alrededor del mundo utilizando diversas técnicas, materias primas y microorganismos, en el caso del atole agrio, la fuente principal para la elaboración es el maíz tierno o maíz de dobla. La microbiota de

este alimento fundamentalmente se encuentra la presencia de BAL, como *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Estudios recientes han demostrado la capacidad de ciertas BAL para inhibir el crecimiento de ciertas bacterias indeseables causantes de enfermedades gastrointestinales provenientes de bacterias patógenas como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* entre muchas más. Por ello, con el fin de comprender los eventos que ocurren durante la fermentación y eventualmente producirla en condiciones controladas o emplear las cepas en la industria alimentaria, se caracterizó una colección de cepas de BAL aisladas del atole agrio proveniente de Villahermosa, Tabasco y se probó si las cepas de BAL presentaban propiedades antimicrobianas. Esto abre la posibilidad de estudiarlas más a fondo y realizar pruebas correspondientes para determinar si alguna de las BAL caracterizadas pudiera denominarse como probiótico y de esta manera emplearlas en la industria alimentaria.

4. Antecedentes

4.1 Alimentos fermentados

En el mundo existen gran cantidad de alimentos fermentados que se consumen en pequeñas regiones, que se conocen como alimentos fermentados tradicionales. Los sustratos más usados en México para estas fermentaciones son los agaves y el maíz (Wacher *et al.*, 1993).

Los alimentos fermentados tradicionales son aquellos en los cuales ocurren cambios microbiológicos/ enzimáticos en los sustratos utilizados para su elaboración, generándose sabores, aromas y texturas aceptables para los consumidores humanos. Se obtienen mediante fermentaciones naturales, es decir, no se añaden inóculos, sino que actúan los microorganismos naturalmente presentes en el alimento y están constituidos por microbiotas complejas. Se elaboran a partir de sustratos amiláceos (maíz, sorgo, trigo, etc.) o azucarados (frutas, savia de algunas plantas) y se consumen con diversos fines, pudiendo ser nutricionales, estimulantes, medicinales y/o ceremoniales (Díaz y Wacher, 2003).

Algunas características benéficas de los alimentos fermentados incluyen (Steinkraus, 1996):

- a) Conservación de una gran cantidad de alimentos debido a la fermentación láctica, acética, alcohólica y/o alcalina.
- b) El crecimiento de microorganismos de descomposición o patógenos se inhibe y los productos se conservan.
- c) El valor nutritivo puede incrementarse, debido al enriquecimiento biológico del alimento, con proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos orgánicos, ácidos grasos esenciales y vitaminas.
- d) La digestibilidad del alimento fermentado generalmente mejora en comparación con la del sustrato del cual se parte.
- e) Destoxificación durante el proceso fermentativo.

- f) Disminución en los requerimientos energéticos de los alimentos y tiempos de cocción del alimento fermentado
- g) Enriquecimiento de la dieta a través del desarrollo de una diversidad de aromas, sabores y texturas en sustratos de alimentos.

El maíz es la base de la alimentación de los pueblos mesoamericanos, para quienes además tuvo un significado religioso, ya que se creía que los seres humanos habían sido hechos de este grano. Actualmente, a partir del maíz se preparan una gran variedad de platillos y dentro de estos se encuentran los alimentos fermentados. La mayoría son bebidas lácticas, aunque también se elaboran alimentos sólidos y bebidas alcohólicas. Dentro de los alimentos de maíz producidos por fermentación láctica, destacan las bebidas, como el pozol, chorote y los atoles agrios, y dentro de las bebidas alcohólicas el tesgüino. Se usan como sustrato el maíz, el maíz nixtamalizado, el maíz tierno y en ocasiones otros ingredientes, como el cacao y la “hierba dulce” (Wacher *et al.*, 1993).

La fermentación es uno de los métodos de conservación más antiguos empleados en los alimentos alrededor del mundo. Los indígenas utilizaron la fermentación durante cientos de años en la preparación de diversos alimentos y bebidas (Battcock y Azam-Ali, 1998). En la actualidad, alimentos fermentados –como el vino, la cerveza, el pan y el yogurt– se producen de manera industrial y se encuentran al alcance de muchas personas en el mundo. Sin embargo, existen otros alimentos fermentados que se producen en menor escala, de forma artesanal, semicomercial, o bien, sólo los consumen ciertos grupos sociales o etnias. Éstos son conocidos como "alimentos fermentados tradicionales" (Wacher-Rodarte, 2002). Dentro de las bebidas tradicionales fermentadas mexicanas se encuentran el pozol, el tesgüino, el pulque, el colonche y el tepache (Ben Omar y Ampe, 2000). La mayoría de estas fermentaciones son naturales, es decir, los microorganismos que participan se encuentran naturalmente en el sustrato y por lo general son microbiotas mixtas complejas. Por su parte el atole agrio o atol agrio es una bebida fermentada elaborada con maíz joven no nixtamalizado elaborado y consumido en el sureste de México, en Tabasco, Chiapas y Veracruz.

4.2 Atole agrio

El atole agrio (del náhuatl xocoatolli; xococ: agrio, atolli: atole) es una bebida típica del sureste de México, es consumido en Tabasco, Chiapas y el sur de Veracruz; por comunidades mazatecas. Se prepara a partir de maíz cuando se encuentra en la etapa de madurez fisiológica, se cosecha y se deja secar, para obtener el maíz duro. El maíz recién cosechado o tierno contiene aproximadamente 30% de humedad, por lo que los microorganismos presentes podrían desarrollarse fácilmente. Para evitar esto el maíz se dobla dentro de la misma planta y se deja que pierda humedad. La mazorca está protegida del ataque microbiano, ya que sigue siendo parte de la planta, que cuenta con sistemas antimicrobianos. El doblado del tallo de la planta se realiza treinta días antes de cosechar. Antiguamente las comunidades prehispánicas de esta zona, consumían el atole agrio durante las festividades de Hueytozotli (gran vigilia) del calendario azteca que era el periodo de adoración de los dioses del maíz. Tradicionalmente es consumido por las mujeres que acaban de dar a luz y se encuentran en el periodo de lactancia, ya que se cree que este aumenta la cantidad de leche que se produce. También se prepara para la celebración del día de muertos para colocarlo en las ofrendas para los difuntos que disfrutaban de esta bebida. Para su elaboración se lleva a cabo a partir de dos tipos de fermentación: una sólida y una líquida (Esquivel, 2012).

En la Figura 1 se presenta el procedimiento para la elaboración del atole agrio a partir del maíz tierno o de dobla como base para su elaboración, haciendo notar los dos diferentes tipos de fermentación por los que se puede obtener el atole agrio como producto final.

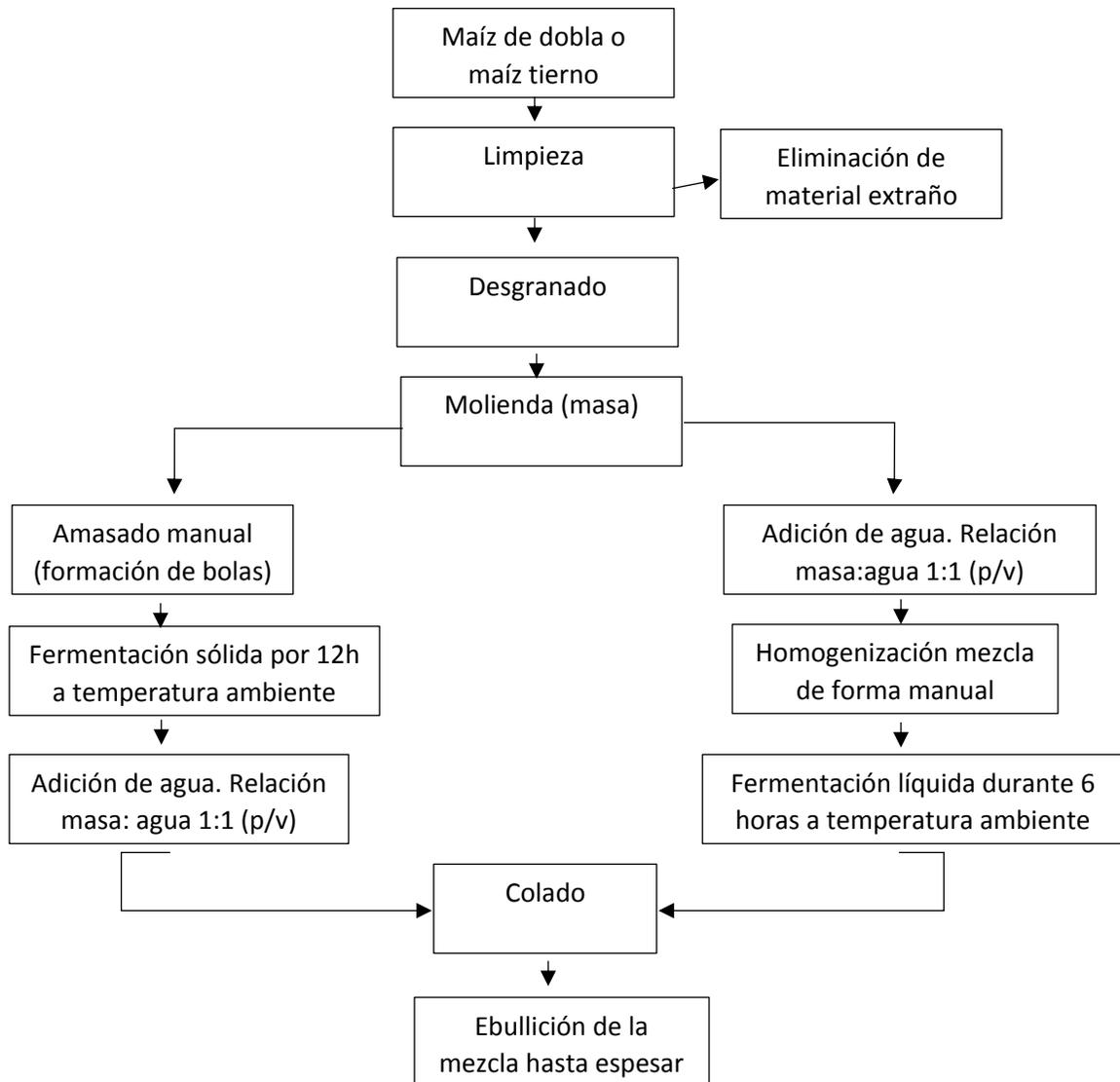


Figura 1. Proceso de elaboración del atole agrio (Esquivel, 2012).

La microbiota de este producto no está bien definida. Aunque las bacterias acidolácticas acidifican el producto, los coliformes totales y enterobacterias persisten o crecen en el producto (Esquivel, 2012). La fermentación del atole agrio es un proceso con una abundante presencia de enterobacterias al inicio de la fermentación (22×10^7 ufc/g, fermentación sólida); las bacterias ácido lácticas más abundantes son: *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Además, existen bacterias ácido lácticas que muestran cierta actividad antimicrobiana como *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*,

Pediococcus pentosaceus debido a que presentan buenas propiedades para acidificar y crecer (Väkeväinen, 2017).

4.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

Las BAL son microorganismos diversos aislados de diferentes entornos, como productos vegetales (cereales, como el maíz, el trigo, la cebada; verduras), carne, leche, y también se han aislado del tracto digestivo y de la vagina de mamíferos. Se usan como cultivos iniciadores en la manufactura de productos lácteos como leches acidificadas, yogurt y quesos; también son aplicadas comercialmente en el procesamiento de bebidas alcohólicas (vino, cerveza), carnes, verduras, encurtidos, ensilajes y embutidos. Las bacterias ácido lácticas son un grupo de microorganismos que producen como principal metabolito al ácido láctico. Son organismos nutricionalmente exigentes y son capaces de hidrolizar péptidos de la leche. Estas bacterias además de contribuir en la conservación de los alimentos, mejoran sus características sensoriales (sabor, olor, textura) y aumentan su calidad nutritiva (Caplice y Fitzgerald, 1999).

Las BAL son un grupo de bacterias representadas por diversos géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común, en general son cocos o bacilos Gram-positivos, no esporulados, inmóviles, microaerofílicos o aerotolerantes.

Las BAL son microorganismos mesófilos, que pueden crecer en temperaturas desde 4 y hasta 45°C y crecen en sustratos con valores de pH alcalinos, neutros y ácidos (Caplice y Fitzgerald, 1999). La característica primordial de este grupo de bacterias es la producción de ácido láctico a partir del metabolismo de hexosas, obteniendo su energía por una fosforilación a nivel de sustrato al carecer de un ciclo de Krebs funcional, obteniendo así ácidos orgánicos, alcohol y dióxido de carbono a partir de carbohidratos. Dependiendo del tipo de metabolismo por el cual se obtiene el ácido láctico, estas pueden clasificarse en homofermentativas que solo producen lactato como producto final de la vía Embden-Meyerhoff y

heterofermentativas por producir lactato y etanol como productos finales mediante la vía de las Pentosas fosfato; siendo las primeras las de aplicación en la industria. Como resultado de estas vías metabólicas, también se producen sustancias que le dan características deseables a los alimentos fermentados, tal es el caso del diacetilo, acetaldehído y algunos compuestos que pueden tener implicaciones positivas en la salud de los consumidores como algunas vitaminas, antioxidantes, y péptidos bioactivos. También se les considera como levemente proteolíticas aunque existen algunas excepciones (Caplice y Fitzgerald, 1999).

4.3.1 Lactobacilos

Este género de bacterias normalmente presenta morfología bacilar que puede variar de bacilos largos esbeltos a bacilos cortos y curvados.

Se pueden clasificar en 3 grupos de acuerdo con la fermentación de azúcares que realizan, el grupo I que se encuentra integrado por los homofermentativos, aquellos que fermentan los carbohidratos mediante la glicólisis para generar ácido láctico como producto final, las del grupo II que se refiere a los homofermentativos facultativos, son los que dan origen al ácido láctico como metabolito principal pero que también generan etanol y CO₂ sin ningún otro aceptor de electrones que se encuentre disponible y por ultimo las heterofermentativas obligadas que integran el grupo III, que pueden usar tanto la vía de la glicólisis como la vía de las pentosas fosfato. En la Tabla 1 se presentan ejemplos de *Lactobacillus* pertenecientes a cada uno de los grupos.

Los *Lactobacillus* se encuentran naturalmente asociados a: Plantas, productos vegetales fermentados, masas fermentadas y a bebidas alcohólicas destiladas, su capacidad de crecer en ambientes ácidos y en presencia de etanol. Normalmente son más resistentes a condiciones ácidos, de modo que les permite seguir creciendo durante la fermentación láctica (Lahtien *et al*, 2012; Madigan *et al.*, 2009).

Tabla 1. Clasificación de *Lactobacillus* con base en el tipo de fermentación que llevan a cabo (Lahtinen *et al.*, 2012).

Homofermentativo	Heterofermentativo facultativo	Heterofermentativo obligado
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. helveticas</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. salivarius</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. pontis</i>

4.3.2 *Lactococcus lactis*

A pesar de la asociación común de *Lactococcus lactis* con productos lácteos, la bacteria se aisló originalmente de plantas en las que se creía que estaba inactiva, y solo se volvió activa y se multiplicó en el tracto gastrointestinal después de ser consumida por los rumiantes. Originario del género *Streptococcus* y reclasificado en el género *Lactococcus* en 1985, *L. lactis* se divide en tres subespecies, a saber, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, y *L. lactis* subsp. *hordniae*. Fenotípicamente, se clasifica como una bacteria intestinal Gram positiva, esférica, homoláctica, no esporulante y anaeróbica facultativa con cientos de cepas y biovariantes publicados hasta la fecha (Song *et al.*, 2017).

Lactococcus lactis se ha utilizado durante siglos en la fermentación de alimentos, especialmente el queso, el yogur, el chucrut y similares, por lo que la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) generalmente reconoce su estado como seguro (GRAS). Además de impartir sabor, *L. lactis* es una bacteria ácido-láctica que también produce ácido que conserva los alimentos. Algunas cepas mejoran aún más esta propiedad de conservación con la producción de bacteriocinas, lo que refuerza su papel en la industria alimentaria. Además de su importante función en los alimentos, *L. lactis* se ha convertido en el modelo BAL en lo que respecta a la ingeniería genética. Varios factores, incluido su genoma completamente secuenciado de tamaño aproximado a (2.3 Mbp), y el desarrollo con éxito de herramientas de ingeniería genética compatibles, como los sistemas de clonación y expresión con opciones personalizables, lo han convertido en un modelo deseable. En las últimas dos décadas, *L. lactis* ha ampliado su aplicación de alimento a ser una fábrica exitosa de células microbianas y en muchas ocasiones, actúa como una

alternativa Gram-positiva a *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus plantarum*, o su contraparte Gram-negativa, *Escherichia coli*. (Song *et al.*, 2017)

4.4 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por un gran número de bacterias, incluyendo las del grupo BAL. Normalmente actúan contra microorganismos no deseados, estrechamente relacionados o responsables del deterioro de alimentos y causantes de enfermedades. Por esta razón, se utilizan en varias aplicaciones, como la conservación o extensión de la vida útil, la acción antimicrobiana en alimentos y clínica (Marcos *et al.*, 2013).

El término “bacteriocinas” fue propuesto por primera vez por Jacob y colaboradores en 1953 para referirse a sustancias proteicas con actividad antimicrobiana de origen bacteriano; luego, en 1976, Tagg y colaboradores las definieron como un grupo de sustancias antimicrobianas de origen bacteriano caracterizadas por poseer un componente proteico biológicamente activo y por ejercer un modo de acción bactericida (Cristóbal, 2008). No obstante, se tienen reportes que la primera bacteriocina fue identificadas por Gratia en 1925, como una proteína antimicrobiana producida por *Escherichia coli* (Marcos *et al.*, 2013).

Las bacteriocinas comprenden un grupo grande y diverso de proteínas y péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente, algunos de los cuales presentan modificaciones post-traduccionales, que tienen un efecto bactericida o bacteriostático en otras bacterias, ya sean de la misma especie (espectro estrecho) o de otros géneros (espectro amplio) (Marcos *et al.*, 2013). La célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano, o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida (Vásquez *et al.*, 2009). Estos péptidos son producidos por varias especies bacterianas, donde son de particular interés para la industria alimentaria las que provienen de BAL que tiene el status de GRAS por sus siglas en inglés (Generalmente Reconocido como Seguro), ya que estos microorganismos son considerados como seguros para la

salud. Gracias a que sus metabolitos han sido consumidos en alimentos fermentados por innumerables generaciones sin que se detectaran efectos adversos en la población (Joerger, 2003). Dentro de este grupo se ha estudiado especialmente el género *Lactobacillus*, por su capacidad de conservación de los alimentos.

La síntesis de las bacteriocinas se produce, generalmente, cuando las bacterias que las sintetizan, se encuentran en situaciones de estrés. La síntesis de las bacteriocinas también depende del ecosistema, pH, potencial de óxido-reducción, cantidad de nutrientes, fase de crecimiento, temperatura y oxígeno disponible. Así mismo son inactivadas con enzimas como la tripsina y la pepsina, las cuales al encontrarse en el tracto digestivo interfieren con las bacteriocinas, disminuyendo su acción (Marcos *et al.*, 2013).

4.4.3 Clases de bacteriocinas

Las bacteriocinas pueden agruparse en cuatro clases. La clase I está conformada por antibióticos de amplio espectro, de bajo peso molecular y con modificaciones post-traduccionales; de este el más representativo es la nisina.

La clase II incluye péptidos termoestables de bajo peso molecular sin modificaciones, cuya principal característica es la actividad antilisterial (Naghmouchia *et al.*, 2007).

La clase III agrupa a péptidos de mayor tamaño, termolábiles como la helveticina (Hill, 1995).

La clase IV está conformada por moléculas complejas con fracciones de lípidos y carbohidratos (Papagianni y Anastasiadou, 2009). En la Tabla 2 se presentan algunas de estas bacteriocinas.

Tabla 2. Bacteriocinas representativas producidas por BAL (Adaptada de Hill 1995).

Bacteriocinas	Productor	Espectro de inhibición	Tamaño (Número de aminoácidos)
Clase I : Lantibióticos			
Nisina (A y Z)	<i>Lactococcus lactis</i>	Amplio	34
Lactinica 481	<i>Lactococcus lactis</i>	Amplio	27
Lactocina S	<i>Lactobacillus sake</i>	Amplio	37
Carnocina U149	<i>Carnobacterium piscicola</i>	Amplio	35-37
Clase II: No lantibióticos. Termoestables			
Lactococcina A	<i>Lactococcus lactis</i>	Estrecho	54
Lactococcina B	<i>Lactococcus lactis</i>	Estrecho	47
Lactacina F	<i>Lactobacillus jhonsonii</i>	Estrecho	57-48
Plantaricina*	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Amplio	34
Sakacina P	<i>Lactobacillus sake</i>	Amplio	41
Pediocina Ach	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Amplio	44
Divergicina M35*	<i>Carnobacterium divergens</i>	Amplio	43
Enterocina P*	<i>Enterococcus faecium</i>	Estrecho	44
Clase III: Mayor tamaño, termolábiles			
Helveticina J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Estrecho	333
Clase IV: moléculas complejas			
Cicularina A*	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	-	76
Tomado de: Hammami y otros s.f.			

4.5 Identificación de microorganismos por métodos fenotípicos

Actualmente, la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y costo los hace más asequibles.

Estos métodos constituyen la base de descripciones formales taxonómicas desde familia, género, especie y subespecies. Las características fenotípicas clásicas de las bacterias comprenden su morfología, fisiología y bioquímica.

Dentro de las técnicas fenotípicas se encuentran la tipificación por:

- crecimiento y característica morfológicas
- características bioquímicas.
- características serológicas.
- características funcionales.

En el cultivo es esencial la correcta elección del medio de crecimiento y de las condiciones de incubación (Bou *et al.*, 2011).

4.5.1 Pruebas bioquímicas

1) Pruebas que se utilizan en la identificación preliminar y con lectura inmediata como la catalasa y oxidasa; 2) otras pruebas rápidas, con lectura en menos de 6h tal y como la hidrólisis del hipurato, la β -galactosidasa (ONPG), las aminopeptidasas, la ureasa y el indol; 3) pruebas lentas, con lectura de 18 a 48h que incluirían la óxido-fermentación, reducción de nitratos, rojo de metilo, Voges-Proskauer, agar hierro de Kligler, fermentación de azúcares, hidrólisis de la esculina, coagulasa, fenilalanina-desaminasa, DNasa, hidrólisis de la gelatina, decarboxilasas, lipasa, lecitinasa, utilización de citratos, utilización de malonato, y prueba de CAMP entre las más frecuentes, y 4) pruebas basadas en caracteres de resistencia a ciertas sustancias tal y como optoquina, bacitracina, solubilidad en bilis, y crecimiento en caldo hipersalino (Bou *et al.*, 2011).

4.5.2 Identificación mediante sistema API 50CHL

La galería del sistema API 50 CHL Medium, destinado a la identificación del género *Lactobacillus* y microorganismos próximos, se presenta listo para su empleo y permite realizar el estudio de fermentación de los 49 azúcares de la galería API 50 CH (Figura 2).

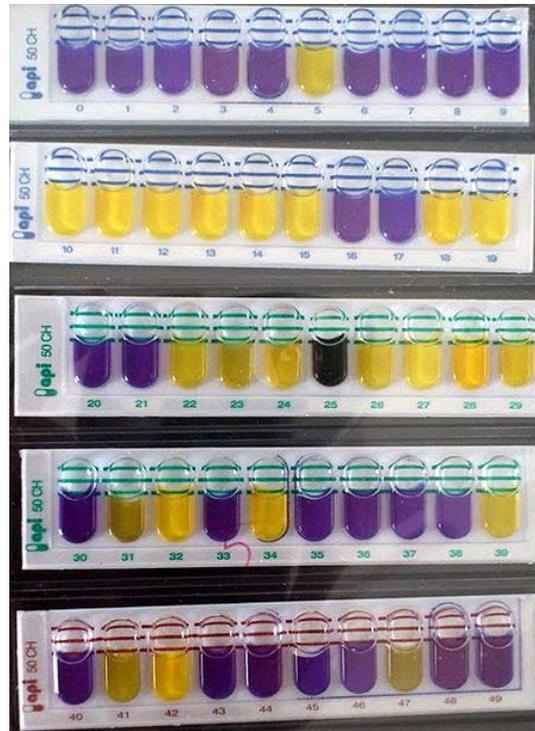


Figura 2. Tira Api 50CH para la identificación de bacterias del género *Lactobacillus*.

Se pone en suspensión el microorganismo a estudiar en el medio y después se inocula en cada tubo de la galería. Durante la incubación, el catabolismo de los glúcidos produce ácidos orgánicos que hacen virar el indicador del pH. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico y permiten la identificación del microorganismo con la ayuda de un programa informático de identificación llamado ApiWeb diseñado por BioMérieux que compara los perfiles obtenidos con los de una base de datos para obtener el nombre del microorganismo correspondiente (BioMérieux SA, 2006).

4.6 Identificación de microorganismos por métodos genotípicos

La ausencia de concordancia entre las características observables, morfológicas y/o fenotípicas del aislamiento en estudio y las correspondientes a la(s) cepa(s) de la especie tipo, hacen que los métodos fenotípicos realicen la identificación más probable y no definitiva. Para solventar los problemas inherentes presentados por los sistemas de identificación fenotípica —no todas las cepas de una misma especie muestran una característica específica; una misma cepa puede generar diferentes resultados en ensayos repetidos; y las limitaciones en la base de datos de bacterias

correspondiente, entre otros— se han impuesto a los métodos genotípicos de identificación bacteriana como procedimientos complementarios o alternativos.

Una amplia variedad de genes han sido utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en los distintos géneros y especies bacterianas, constituyendo el análisis del ARNr 16S el marcador inicial y en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa. Sin embargo, en otras circunstancias, la alta homología genética presente en determinados géneros bacterianos o un reciente cambio en su asignación taxonómica, no permite realizar con el ARNr 16S una identificación a nivel de especie o de géneros. En estos casos, podemos recurrir a otros genes dianas para realizar asignación de especie como el 16S-23S ARNr, *rpoB* (subunidad β de la ARN polimerasa), *gyrB* (subunidad β de la ADN girasa) (Bou *et al.*, 2011).

4.6.1 Gen rRNA 16S

El ARN ribosomal 16S, es un componente de la subunidad 30S de los ribosomas procariotes. El uso de la secuencia del gen rRNA 16S para el estudio de filogenética y taxonomía bacteriana se ha usado como el marcador genético preferente.

Debido a la probable antigüedad de la maquinaria sintetizadora de proteínas, los ADNs ribosómicos son moléculas excelentes para discernir las relaciones evolutivas entre los seres vivos, son funcionalmente constantes, están universalmente distribuidos y su secuencia esta moderadamente bien conservada a través de amplias distancias filogenéticas. Debido al elevado número de diferentes secuencias posibles de moléculas grandes, la similitud entre dos secuencias, o el porcentaje de bases que comparten, indica que están relacionadas, o que se parecen. El grado de semejanza de las secuencias del ADN ribosómico de dos organismos indica su parentesco evolutivo relativo. La homología entre dos secuencias indica su relación filogenética.

El ADN ribosomal 16S contiene varias regiones de secuencias altamente conservadas que resultan útiles para obtener alineamientos apropiados, pero al

mismo tiempo la variabilidad suficiente en otras regiones de la molécula para servir como excelente cronómetro filogenético.

El desarrollo de técnicas moleculares basadas en el análisis de los ácidos nucleicos, ha permitido la posibilidad de discriminar entre una gran cantidad de cepas para así agrupar en tipos genéticos únicos que posteriormente son identificados por comparación de las secuencias de ADN ribosómico 16S con secuencias de microorganismos previamente caracterizados y depositadas en bases de datos (Tiedje *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2009).

4.7 Bacterias patógenas aisladas de alimentos fermentados

Los microorganismos patógenos son aquellos que al ingresar a un hospedero, son capaces de provocar una enfermedad o infección de en ellos.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son términos que se aplican a todas las enfermedades que se adquieren por medio del consumo de alimentos contaminados. Las causas más comunes son intoxicaciones e infecciones.

Las infecciones son causadas por microorganismos como bacterias, virus o parásitos dentro de un organismo superior. Estas infecciones pueden ser invasivas, como las de *Salmonella* spp., en las cuales el microorganismo entra y atraviesa la célula intestinal, o no invasivas cómo las de *Vibrio cholerae*, que actúan desde fuera de la célula intestinal.

Las intoxicaciones alimenticias son enfermedades provocadas por alimentos contaminados o por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas o animales o de productos metabólicos de microorganismos en los alimentos (Esquivel, 2012).

4.7.1 Bacterias Gram-negativas

4.7.1.1 *Salmonella* spp.

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram-negativos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, provistos de flagelos y móviles (Jurado *et al.*, 2010); las bacterias de este género son ubicuas y resistentes, pueden sobrevivir varias semanas en ambientes secos y meses en agua, por esta razón son una causa importante de enfermedades transmitidas por alimentos en humanos principalmente la salmonellosis. Es la principal bacteria causante de enfermedades gastrointestinales en el mundo, siendo la especie *Salmonella enterica*, cuyos principales serotipos son: *Typhimurium*, *Enteritidis* y *Typhi*, en su mayoría se encuentran en productos de origen animal como huevos contaminados, aves de corral, carnes rojas, leche, quesos; sin embargo, actualmente en productos de origen vegetal es en donde más comúnmente se encuentra, incluye jugos no pasteurizados, frutas y verduras crudas, especias y nueces (CDC, 2018).

La salmonellosis es una infección causada por la bacteria *Salmonella*. De acuerdo con los Centros de Control y Prevención de Enfermedades, causa un estimado de 1.4 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos y más de 400 muertes anualmente en los Estados Unidos. Puede causar gastroenteritis, fiebre entérica y septicemia. Se ha reportado presencia de *Salmonella* en alimentos fermentados como salami, salchichón, tempeh, y en alimentos lácteos fermentados (Casquete *et al.*, 2012).

El reporte de investigación del Programa Activo de Investigación de Enfermedades Transmitidas a través de los Alimentos del 2007, identifica a *Salmonella* como la infección bacteriana más común reportada (USDA, 2013).

4.7.2 Bacterias Gram-positivas

4.7.2.1 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus o *B. cereus* es una clase de bacterias productoras de toxinas, anaerobia facultativa. Estas toxinas pueden causar dos tipos de enfermedades: una

caracterizada por diarrea y la otra, denominada toxina emética, por causar náuseas y vómitos. Estas toxinas contaminan una variedad de productos alimenticios como carnes, huevos y productos de uso diario. Estas bacterias están presentes en los alimentos y pueden multiplicarse rápidamente a temperatura ambiente.

Las fuentes principales en donde se encuentra la bacteria principalmente es una variedad de alimentos, en especial el arroz y las sobras, además de las salsas, sopas y otros alimentos preparados que han estado en reposo a temperatura ambiente durante un tiempo considerable (Tallent *et al.*, 2012).

La presencia de *Bacillus cereus* en alimentos fermentados ha sido detectada e implicada en alimentos contaminados que contenían soya fermentada como ingrediente principal (Eom *et al.*, 2014).

4.7.2.2 *Listeria monocytogenes*

Se trata de una bacteria Gram-positiva, presenta movilidad mediante flagelos, anaerobio facultativo y es una de las principales causantes de muertes por enfermedades transmitidas en alimentos.

Se distinguen 13 serotipos, siendo el 1/2a, el 1/2b y el 4b los principales causantes de enfermedades en humanos y animales.

Presenta tolerancia a la sal del 20% y además presenta crecimiento a temperaturas de refrigeración, Sobrevive bien en suelo, agua, heces y alimentos. Es un microorganismo psicrótrofo y de los más resistentes al calor, por lo que crece en un amplio rango de temperaturas (entre -18°C y 45°C), en un amplio rango de pH (entre 3,3 y 9,6) (INSHT, 2016).

Listeria monocytogenes afecta en mayor medida a personas de los extremos de edad de vida, mujeres embarazadas y personas con enfermedades inmunocomprometidas.

Un informe reciente (2017) indica que los brotes de infecciones por *L. monocytogenes* en los años 90 estuvieron vinculados principalmente con

embutidos y salchichas. Ahora, los brotes de *Listeria* generalmente están vinculados a productos lácteos, fruta y verduras. Los investigadores han rastreado brotes recientes causados por el consumo de quesos blandos, apio, germinados, melón y helado (CDC, 2017).

4.7.2.3 Bacterias aisladas de cavidad bucal

Son un grupo de habitantes normal de la boca humana sana, especialmente de la placa dental.

La cavidad oral natural alberga una gran variedad de bacterias. *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) se encuentra entre las bacterias iniciadoras o pioneras de la formación de biopelículas orales anteriores a la fijación de los colonizadores secundarios y terciarios y, por tanto, de gran importancia en el desarrollo de enfermedades periodontales.

4.7.2.3.1 *Streptococcus sanguinis*

Streptococcus sanguinis forma parte de las bacterias de la cavidad oral y es uno de los colonizadores primario de biopelículas. Esta bacteria se encuentra en el grupo *sanguis* dentro del grupo *viridans*, aunque algunos investigadores lo consideran dentro del grupo *mitis* basándose en la secuencia del gen rRNA 16S, pero puede diferenciarse fácilmente desde el punto de vista fenotípico de ese grupo por sus reacciones positivas para arginina dihidrolasa e hidrolisis de esculina. Los estreptococos presentan como unidad de formación a los cocos, con dimensiones de 0.6-2 µm de diámetro, son Gram positivos y con frecuencia se agrupan en pares o cadenas medianas y largas. Son catalasa negativo (3% peróxido de hidrogeno).

Coloniza la cavidad bucal entre los 6 -12 meses de vida, después del inicio de la erupción dental y es el primer microorganismo que se instala en las superficies dentarias limpias. *S. sanguinis* es un colonizador y habitante normal del esmalte, su presencia se asocia con las biopelículas saludables, con la ausencia de caries. Presenta un mecanismo de competencia con *Streptococcus mutans*, siendo capaz

de inhibir la presencia de esta bacteria por la producción de peróxido de hidrógeno (Ramos *et al.*, 2016).

Justificación

El atole agrio es un alimento fermentado básicamente por bacterias lácticas, que están empezando a conocerse, por lo que es importante profundizar en su estudio. La principal diferencia entre el atole agrio y otros alimentos fermentados de maíz es el sustrato, que es un maíz joven, no maduro. Es importante estudiar su microbiota por varias razones: para ahondar en el conocimiento de su proceso de fermentación. Esto permitiría a largo plazo su producción en condiciones controladas inoculando el sustrato con cepas que lo fermenten de forma eficiente, de manera que predominen y produzcan las propiedades sensoriales esperadas y que inhiban el desarrollo de microorganismos indeseables. Por otra parte, la industria de alimentos fermentados requiere siempre de cepas con características especiales, como las que se encuentran en los alimentos fermentados para la conservación de otros alimentos.

5. Hipótesis

Ya que se cuenta con una colección de bacterias lácticas aisladas del atole agrio proveniente de Villahermosa Tabasco, su identificación bioquímica coincidirá con la identificación usando el método ARDRA.

Con el método ARDRA será posible diferenciar entre cepas de la misma especie.

Ya que se ha reportado que las BAL son capaces de producir bacteriocinas, las bacterias aisladas del atole agrio serán capaces de producir sustancias antimicrobianas posiblemente bacteriocinas que inhiban el crecimiento de bacterias patógenas causantes problemas en alimentos.

6. Objetivos

Objetivo general.

- Realizar la identificación de una colección de cepas de BAL aisladas del atole agrio proveniente de Villahermosa Tabasco aisladas y purificadas previamente, mediante 2 sistemas: API 50CH y ARDRA y se determinará la presencia de actividad antimicrobiana contra cepas de bacterias patógenas.

Objetivos particulares.

- Identificar especies de BAL aisladas previamente de la fermentación del atole agrio y de esta manera correlacionar los resultados con lo que ya se encuentra reportado.
- Determinar si existe similitud en los resultados obtenidos mediante la identificación de BAL por métodos fenotípicos y genotípicos.
- Evaluar la inhibición *in vitro* para determinar la presencia de actividad antimicrobiana de las BAL contra cepas de bacterias patógenas de importancia en alimentos y que podrían estar presentes en el atole agrio.

7. Material y metodología

Origen de la colección bacteriana

A partir de una muestra de atole agrio proveniente de Villahermosa Tabasco, al sureste de México, se recuperó una colección de 28 cepas aisladas y purificadas previamente realizadas en el proyecto “Aislamiento y caracterización de microorganismos con potencial probiótico de la fermentación del maíz de elote y dobla”. Tesis de Maestría en Ciencias Agroalimentarias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por Anita Hernández (2018) (tesis en revisión).

Para este trabajo de investigación se siguió la metodología representada en la Figura 3.

Metodología

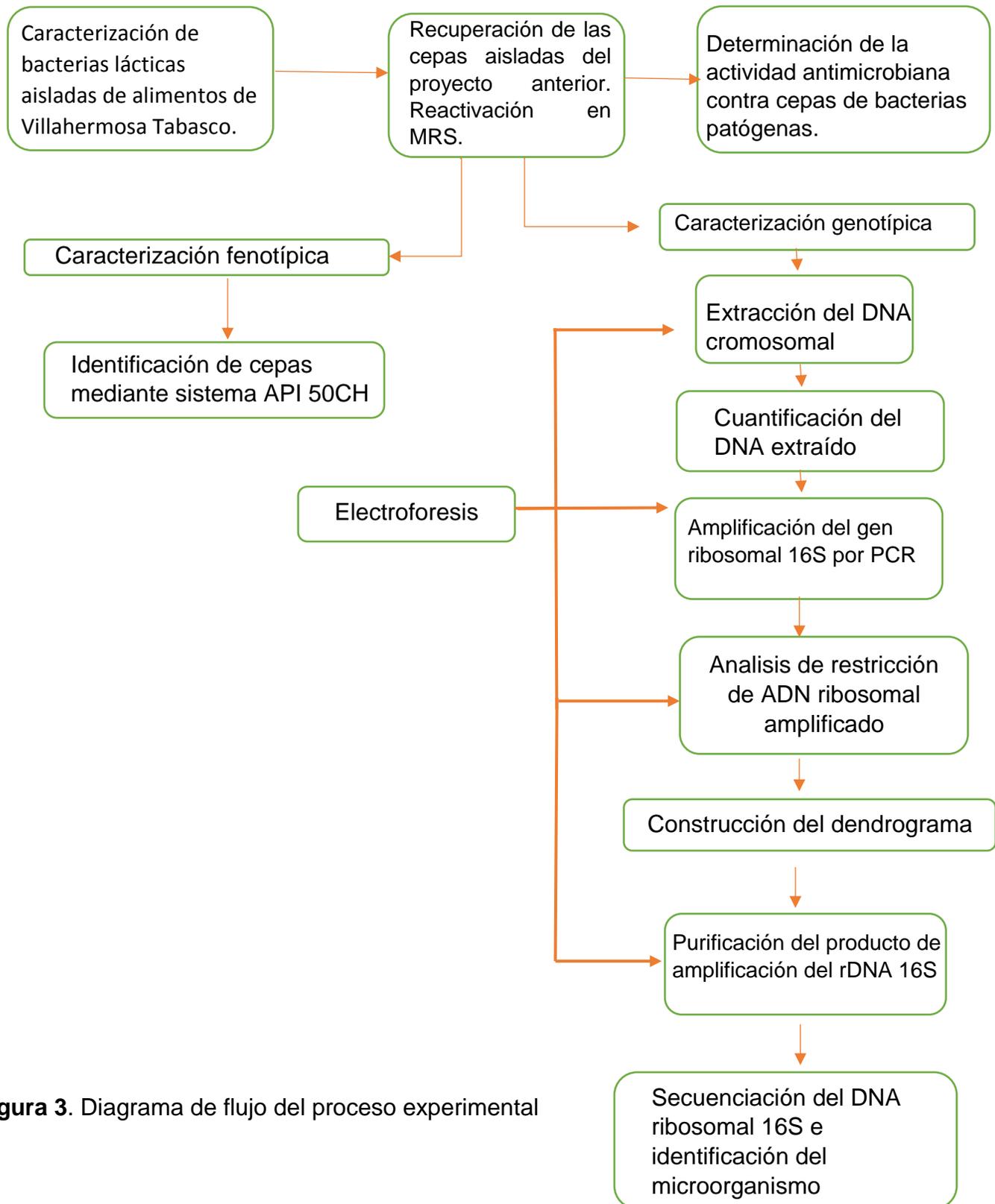


Figura 3. Diagrama de flujo del proceso experimental

7.1 Recuperación y reactivación de las cepas de BAL en MRS

Las veintiocho cepas se encontraban crioconservadas en glicerol (-70°C) con medio MRS (Difco). Para su reactivación se inocularon 50µL de cada una de las cepas en 5 mL de caldo MRS, y se incubaron a 37°C por 24 horas. Se verificó el crecimiento de las cepas mediante la observación de turbidez y la formación de un precipitado al fondo de los viales.

7.2 Caracterización fenotípica

A partir de los cultivos reactivados, se seleccionaron las 18 cepas de BAL más resistentes a la prueba de sales biliares, aisladas y purificadas previamente en el proyecto: “Aislamiento y caracterización de microorganismos con potencial probiótico de la fermentación del maíz de elote y dobla”. Tesis de maestría en ciencias agroalimentarias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por Anita Hernández Flores. En revisión. Tabla 3 del anexo 1. En 5mL de caldo MRS, se inocularon 50 µL de cada cultivo se incubó a 37°C por 24h; de los cultivos obtenidos se inocularon 100 µL en tubos con 10 mL de caldo MRS y se incubaron a 37°C por 24h, dichos cultivos se centrifugaron por 10 min a 10,000 rpm, 4°C y se lavaron las células con 10 mL de agua estéril, se descartó el sobrenadante. Se ajustó a un estándar de Mc Farland número dos y se inoculó en medio 50CHL (API BioMérieux), para el posterior llenado de los pozos, según las instrucciones del fabricante igualmente, se realizó la lectura de las tiras a las 24 y 48 h y mediante el software Api web se identificaron las cepas.

7.3 Determinación de la actividad antimicrobiana

Se determinó la actividad antimicrobiana de las cepas de BAL contra cepas de bacterias patógenas (*L. monocytogenes* CFQ 103, cepario Fac. Química, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Streptococcus sanguinis* sin clave, Fac. Medicina) tomando 50 µL de las cepas e inoculando en viales con 5mL de caldo BHI. A su vez se reactivaron las cepas de BAL inoculando 500 µL de cada una en 50 mL de caldo MRS. Se centrifugó y se colectó el

sobrenadante para liofilizarlo por 24h mediante la liofilizadora Labconco free zone plus 2.5 previamente el sobrenadante debía congelarse a -70°C aproximadamente. Al mismo tiempo se realizó la prueba de difusión en agar sobre placas con medio BHI tamponado y NO tamponado (Tabla 4 del anexo 2) con la inoculación de cepas patógenas en sobrecapas tamponadas y no tamponadas utilizando el método reportado por Tavera (2010), (Anexo 3). Para finalmente determinar si existe actividad antimicrobiana mediante la medición de los halos de inhibición y halos bacteriostáticos, en el primero se observa un halo traslúcido y el segundo un halo opaco.

7.4 Caracterización genotípica

7.4.1 Extracción de DNA cromosomal y verificación de su extracción y pureza mediante electroforesis en gel de agarosa.

Para realizar la extracción del DNA, se inoculó 100 μL de cada una de las cepas de BAL en 5 mL de caldo MRS y se incubó a 37°C por 24h. Se procedió a extraer el DNA usando el procedimiento reportado por Lawson y Falsen (2001) (Anexo 4). Se verificó la extracción y pureza del DNA mediante una electroforesis a 90 volts y 45 min en gel de agarosa al 1% usando como revelador bromuro de etidio a 20 ppm. Para capturar imágenes, se utilizó el equipo Chemidoc (Bio-rad).

7.4.2 Cuantificación del DNA cromosomal extraído.

Una vez que se extrajo el DNA se midió la absorbancia en el espectrofotómetro (Epoch, Biotek, USA) a una longitud de onda de 260 nm. Para calcular la concentración del DNA, se tomó en cuenta que cada unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA de doble cadena. La pureza se valoró midiendo la absorbancia a 280 y a 260 nm de la misma muestra para obtener el coeficiente $\lambda_{260}/\lambda_{280}$, que ha de ser cercano a 1.8 para posteriormente proseguir a la realización de la reacción en cadena de la polimerasa

7.4.3 Amplificación del gen ribosomal 16S por PCR.

En la Tabla 5 se presentan los reactivos utilizados para una mezcla de reacción de PCR para el gen ribosomal 16S. El templado se refiere al DNA cromosomal extraído, utilizando el par de primers: hacia adelante pH y hacia atrás pA para bacterias (Tabla 6) (Rodas *et al.*, 2003). La reacción de amplificación se realizó con la enzima Taq DNA polimerasa recombinante (Thermo Scientific) en un termociclador (BIOMETRA1, Thermoblock, USA) cuya programación se muestra en la Tabla 7 (Rodas *et al.*, 2003). La detección de los productos de PCR se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90 volts durante 45 min usando como revelador el bromuro de etidio a 20 ppm. Para capturar imágenes, se utilizó el equipo Chemidoc (Bio-rad).

Tabla 5. Mezcla de reacción de PCR.

Reactivo	Volumen (μ L)	Concentración
Buffer KCl	5	1x
MgCl ₂	5	1x
dNTP's	1	10mM
Cebador pA	1	20pM
Cebador pH	1	20pM
Agua	34	
Taq DNA polimerasa	1	1.0 U
Templado	2	

Tabla 6. Cebadores utilizados para amplificar el gen rRNA 16S en bacterias.

Cebador	Posición	Secuencia	Orientación
pH	1540–1521	5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3'	Hacia adelante

La detección de los fragmentos de la restricción del gen 16S ADN_r, se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 55 Volts durante 120 min usando como revelador bromuro de etidio a 20 ppm. Se cargaron 7.5 µL de muestra con 3 µL de buffer de carga con azul de bromocresol y se utilizó el marcador de peso molecular de 100-1500pb (Bio Labs). Para capturar imágenes, se utilizó el equipo Chemidoc (Bio-rad).

7.4.6 Construcción del dendrograma. Método ARDRA.

A partir de los patrones de bandeo generados en la digestión enzimática, se construyó un dendrograma usando el paquete de programas Phylip-3.695

Una vez obtenidos los perfiles de bandeo para cada una de las cepas, se elaboró la matriz de restricción. La matriz de restricción se utilizó para calcular la matriz de distancia de fragmentos de restricción con el programa Restdist.exe. La matriz de distancia de fragmentos de restricción se ingresó al programa Neighbor.exe, que mediante el algoritmo UPGMA construyó el dendrograma.

El dendrograma fue visualizado con el programa TreeViewX. (University of Washington, 2018).

7.4.7 Secuenciación e identificación del microorganismo

Se visualizaron 6 principales grupos en el dendrograma por lo que se seleccionó una cepa de cada uno de los grupos para su secuenciación.

Los fragmentos amplificados fueron secuenciados en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, para obtener las secuencias de las cepas utilizadas.

Posteriormente se analizaron en la base de datos del GenBank de National Center for Biological Information (NCBI), utilizando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) y su identidad se determinó de acuerdo con el porcentaje de identidad obtenido.

8. Resultados y discusión

8.1 Recuperación y reactivación de las cepas de BAL en MRS

Se verificó la viabilidad de todas las cepas de BAL de atole agrio provenientes de Villahermosa Tabasco en donde se observó un crecimiento rápido y profuso de las cepas lo que significó que se encontraban es estado viable para proceder a realizar la identificación de la colección además de realizar pruebas para determinar su actividad antimicrobiana.

8.2 Determinación de la actividad antimicrobiana (método de difusión en agar)

Se determinó la actividad antimicrobiana las cepas contra las bacterias patógenas *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Typhimurium* (Tabla 9).

Tabla 9. Pruebas de actividad antimicrobiana de cepas aisladas del atole agrio contra *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Typhimurium*.

Clave Dra. Gloria	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Salmonella Typhimurium</i>	
	Medio BHI tamponado	Medio BHI No tamponado	Medio BHI tamponado	Medio BHI No tamponado
1	(+) 1.3 cm efecto bacteriostático	(+) 2.1 cm diámetro halo de inhibición	(+) 1.5 cm efecto bacteriostático	(+) 1.9 cm diámetro halo de inhibición
2	(-)	(+) 2.1 cm diámetro halo de inhibición	(+)1.1 cm efecto bacteriostático	(+) 1.7 cm diámetro halo de inhibición
3	(-) efecto bacteriostático	(+)1.8 cm halo inhibición	(+)1.3cm efecto bacteriostático	(+)2.2 cm halo inhibición
4	(+)1.2cm efecto bacteriostático	(+)1.6 cm halo de inhibición	(-)	(+)2.6 cm halo de inhibición
5	(-)efecto bacteriostático	(+)3.0cm halo de inhibición	(+)1.2 cm efecto bacteriostático	(+)2.1cm halo de inhibición
6	(-)efecto bacteriostático	(+)2.5 cm halo de inhibición	(+)1.2cm efecto bacteriostático	(+)1.8 cm halo de inhibición
7	(+)1.7 cm efecto bacteriostático	(+)1.7 cm halo de inhibición	(-)	(+) efecto bacteriostático
10	(+)1.5cm efecto bacteriostático	(+) efecto bacteriostático	(-)	(-)
11	(+) efecto bacteriostático	(+)1.5 cm halo de inhibición	(-)	(-)

12	(+) 1.4 cm efecto bacteriostático	(+)2.0 cm halo de inhibición	(-)	(+)1.8 cm halo de inhibición
13	(+)1.6cm efecto bacteriostático	(+)1.1 cm efecto inhibitorio	(-)	(+)1.1cm efecto bacteriostático
14	(+)1.7 cm halo de inhibición	(+) 2.0 cm halo inhibición	(-)	(+) 1.1 cm efecto bacteriostático
16	(-) efecto bacteriostático	(-) efecto inhibición	(+) efecto bacteriostático	(+)1.1 cm efecto bacteriostático
17	(+) 1.8 cm efecto bacteriostático	(+) 3.0 cm halo de inhibición	(+) 1.8 cm halo inhibición	(+) 2.3 cm halo de inhibición
18	(+)1.6 cm efecto bacteriostático	(+)2.5 cm halo de inhibición	(+)1.4 cm halo inhibición	(+)2.0 cm halo de inhibición
20	(-) efecto bacteriostático	(+) 1.4 cm efecto bacteriostático	(-)	(+) efecto bacteriostático
21	(-)efecto bacteriostático	(+) 1.5 cm efecto bacteriostático	(-)	(+) efecto bacteriostático
22	(-) efecto bacteriostático	(-) efecto bacteriostático	(-)	(+) efecto bacteriostático
23	(-) efecto bacteriostático	(+) 1.6cm halo de inhibición	(-)	(+) 1.1 cm efecto bacteriostático
25	(-) efecto bacteriostático	(+)1.8 cm halo de inhibición	(-)	(+)1.1 cm efecto bacteriostático
27	(-) efecto bacteriostático	(+)1.2 cm efecto de inhibición	(-)	(+) 1.1 cm efecto bacteriostático
29	(-)	(+) presenta efecto bacteriostático	(-)	(-)
30	(-)	(+) 1.5 cm diámetro halo bacteriostático	(-)	(-)
31	(+) 1.4 cm diámetro halo bacteriostático	(+) 2.3cm diámetro halo inhibición	(+) efecto bacteriostático	(+) 2.0cm diámetro halo inhibición
I	(+)1.2 cm diámetro halo bacteriostático	(+) 1.7 cm diámetro halo de inhibición	(+) efecto bacteriostático	(+) 1.8 cm diámetro halo de inhibición
IV	(+) 1.2cm diámetro	(+) 2.0 cm diámetro	(-)	(+) 2.1 cm diámetro halo inhibición
X	(+)1.6 cm diámetro halo de inhibición	(+) 2.4 cm diámetro halo de inhibición	(+)1.7 cm diámetro halo de inhibición	(+) 2.3 cm diámetro halo de inhibición
19	(-)efecto bacteriostático	(+)1.7 cm halo de inhibición	(+) efecto bacteriostático	(+)1.4 cm efecto bacteriostático

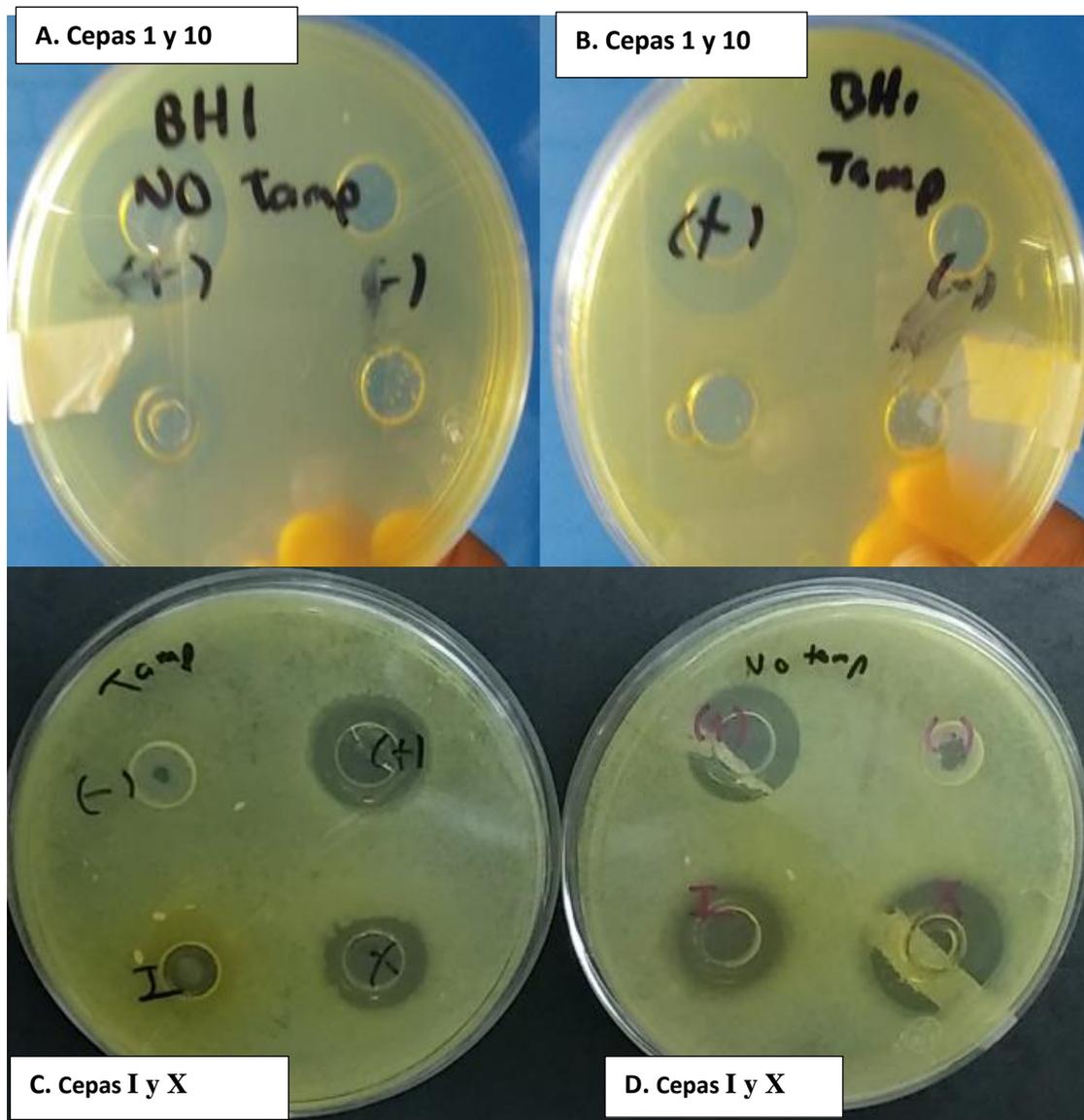


Figura 4. Halos de inhibición producidos por extractos de cepas de BAL, 1, 10, I y X en placas con medio BHI tamponado (imagen B y C) y no tamponado (imagen A y D) reveladas a las 24h, inoculadas con las cepas patógenas *Listeria monocytogenes* (imagen A y B) y *Salmonella Typhimurium* (imagen C y D).

Se observó que en la prueba de actividad antimicrobiana (posible presencia de bacteriocinas) mediante la prueba de difusión en agar, en el medio BHI no tamponado, el efecto de inhibición de crecimiento de la cepa patógena fue más evidente con respecto al obtenido en el medio BHI tamponado (Figura 4), en el cual el halo de inhibición fue mayor en la placa con medio BHI no tamponado en

comparación con el medio tamponado. En el caso de la cepa 11 contra *L. monocytogenes* y de acuerdo con lo reportado en la Tabla 9, en un medio tamponado se presentó un halo que presenta efecto bacteriostático mientras que en la NO tamponada hay un halo de inhibición de 1.5 cm. Esto puede atribuirse a diversos factores, de acuerdo con Guerra y Pastrana (2002), las principales variables que afectan la producción de bacteriocinas son la temperatura, el pH, la composición del medio de cultivo y la presencia de inductores (Guerra y Pastrana, 2002). La única variable que cambia de un medio y otro es el efecto del pH, debido a que se agregaron sales que produjeron un efecto amortiguador y al momento de agregar el extracto de las cepas (sobrenadante liofilizado), este no alteró el pH del medio, es decir, en el medio no tamponado al no existir sales con efecto amortiguador, se produjo una mayor inhibición debido a la acción de los ácidos orgánicos producidos por las BAL.

Las bacterias estudiadas son bacterias ácido lácticas y tienen como productos ácidos orgánicos, estos provocaron la acidificación del medio lo que al estar en contacto con las bacterias patógenas puede ser que produzca este efecto inhibitorio más notable que en el medio no tamponado.

La composición del medio de cultivo, en particular el tipo y las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno tienen un efecto marcado en la producción de bacteriocinas. En diferentes estudios se ha concluido que la glucosa es mejor fuente de carbono que la sacarosa o la fructosa para la producción de bacteriocinas como la nisina y pediocina AcH, ya que con estas dos últimas se puede presentar una disminución de hasta 2 veces la producción de la misma bacteriocina (Alquicira, 2006). Por eso el uso del medio MRS cuyo componente principal es la glucosa.

Se procedió a determinar la actividad antimicrobiana contra otras cepas patógenas además de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium como *Bacillus cereus* y de cavidad oral como *Streptococcus sanguinis*.

Tabla 10. Pruebas de actividad antimicrobiana de cepas aisladas del atole agrio contra *S. sanguinis* y *Bacillus cereus*.

Clave Dra. Gloria	<i>Streptococcus sanguinis</i>		<i>Bacillus cereus</i>	
	Medio BHI tamponado	Medio BHI No tamponado	Medio BHI tamponado	Medio BHI No tamponado
1	(+) 1.3 cm efecto bacteriostático	(+) 2.0 cm diámetro halo de inhibición	(+) 1.5 cm efecto bacteriostático	(+) 2.5 cm diámetro halo de inhibición
2	(+)1.2 cm halo inhibición	(+) 1.6 cm diámetro halo de inhibición	(+)1.2 cm halo inhibición	(+) 2.0 cm diámetro halo de inhibición
3	(+)1.5cm efecto bacteriostático	(+)2.6 cm halo inhibición	(+)1.5cm efecto bacteriostático	(+)2.4 cm halo inhibición
4	(+)1.5cm efecto bacteriostático	(+)2.9 cm halo de inhibición	(+)1.3cm efecto bacteriostático	(+)2.4 cm halo de inhibición
5	(+)2.1 cm halo inhibición	(+)3.1cm halo de inhibición	(+)2.0 cm halo inhibición	(+)3.0cm halo de inhibición
6	(+)1.8cm halo inhibición	(+)2.8 cm halo de inhibición	(+)1.8cm halo inhibición	(+)2.7 cm halo de inhibición
7	(+)1.9 cm halo inhibición	(+)1.6 cm halo de inhibición	(-)	(+)1.6 cm efecto bacteriostático
10	(+)1.8cm efecto bacteriostático	(+)1.5 cm halo inhibición	(-)	(+)1.5 cm efecto bacteriostático
11	(+)2.2cm halo inhibición	(+)1.6 cm halo de inhibición	(-)	(-)
12	(+) 2.1 cm efecto bacteriostático	(+)1.8 cm halo de inhibición	(+) 1.3 cm efecto bacteriostático	(+)1.5 cm halo de inhibición
13	(+)1.5cm halo inhibición	(+)2.0 cm halo inhibición	(-)	(+)1.7 cm halo inhibición
14	(+)1.7 cm halo de inhibición	(+) 2.1 cm halo inhibición	(+)1.2 cm efecto bacteriostático	(+) 1.9 cm halo inhibición
16	(+)1.2cm halo inhibición	(+)2.0 halo inhibición	(+)1.2cm efecto bacteriostático	(+)1.7 halo inhibición
17	(+) 2.2 cm halo inhibición	(+) 2.7 cm halo de inhibición	(+) 1.8 cm halo inhibición	(+) 2.7 cm halo de inhibición
18	(+)1.9 cm halo inhibición	(+)3.2 cm halo de inhibición	(+)2.0 cm halo inhibición	(+)2.4 cm halo de inhibición
20	(+) 1.3 cm efecto bacteriostático	(+) 2.1 cm efecto bacteriostático	(-)	(+) 1.3 cm halo inhibición
21	(+)1.5 cm efecto bacteriostático	(+) 2.3 cm efecto bacteriostático	(-)	(+) 1.5 cm halo inhibición
22	(+)1.0 cm efecto bacteriostático	(+)2.0 cm halo inhibición	(-)	(+)1.3 cm efecto bacteriostático
23	(+)2.1 cm halo inhibición	(+) 2.1 cm halo de inhibición	(-)	(+) 1.7 cm efecto bacteriostático
25	(+)1.5 cm halo inhibición	(+)1.7 cm halo de inhibición	(+)1.5 cm halo inhibición	(+)1.6 cm efecto bacteriostático
27	(+)1.9 cm halo inhibición	(+)2.0 cm efecto de inhibición	(+)1.9 cm halo inhibición	(+)1.6 cm efecto bacteriostático
29	(+) 1.5 cm halo inhibición	(+) 2.0 halo inhibición.	(+) 1.4 cm halo inhibición	(+) 1.6 halo inhibición.
30	(-)	(+) 1.8 cm halo inhibición	(-)	(+) 1.3 cm efecto bacteriostático

31	(+) 1.8 cm diámetro halo inhibición.	(+) 3.2cm diámetro halo inhibición	(+) 2.0 cm diámetro halo inhición.	(+) 2.1cm diámetro halo inhibición
I	(-)	(+) 2.4 cm diámetro halo de inhibición	(+)1.2 cm efecto bacteriostático	(+) 1.9 cm diámetro halo de inhibición
IV	(+) 1.7cm diámetro halo inhibición	(+) 3.0 cm diámetro halo inibición	(+) 1.7cm diámetro halo inhibición	(+) 2.5 cm diámetro halo inibición
X	(+)1.3 cm diámetro halo de inhibición	(+) 2.0 cm diámetro halo de inhibición	(+)2.1 cm diámetro halo de inhibición	(+) 2.6 cm diámetro halo de inhibición
19	(+)1.5 cm halo inhibición	(+)2.0 cm halo de inhibición	(+)1.0 cm efecto bacteriostático	(+)1.5 cm halo de inhibición

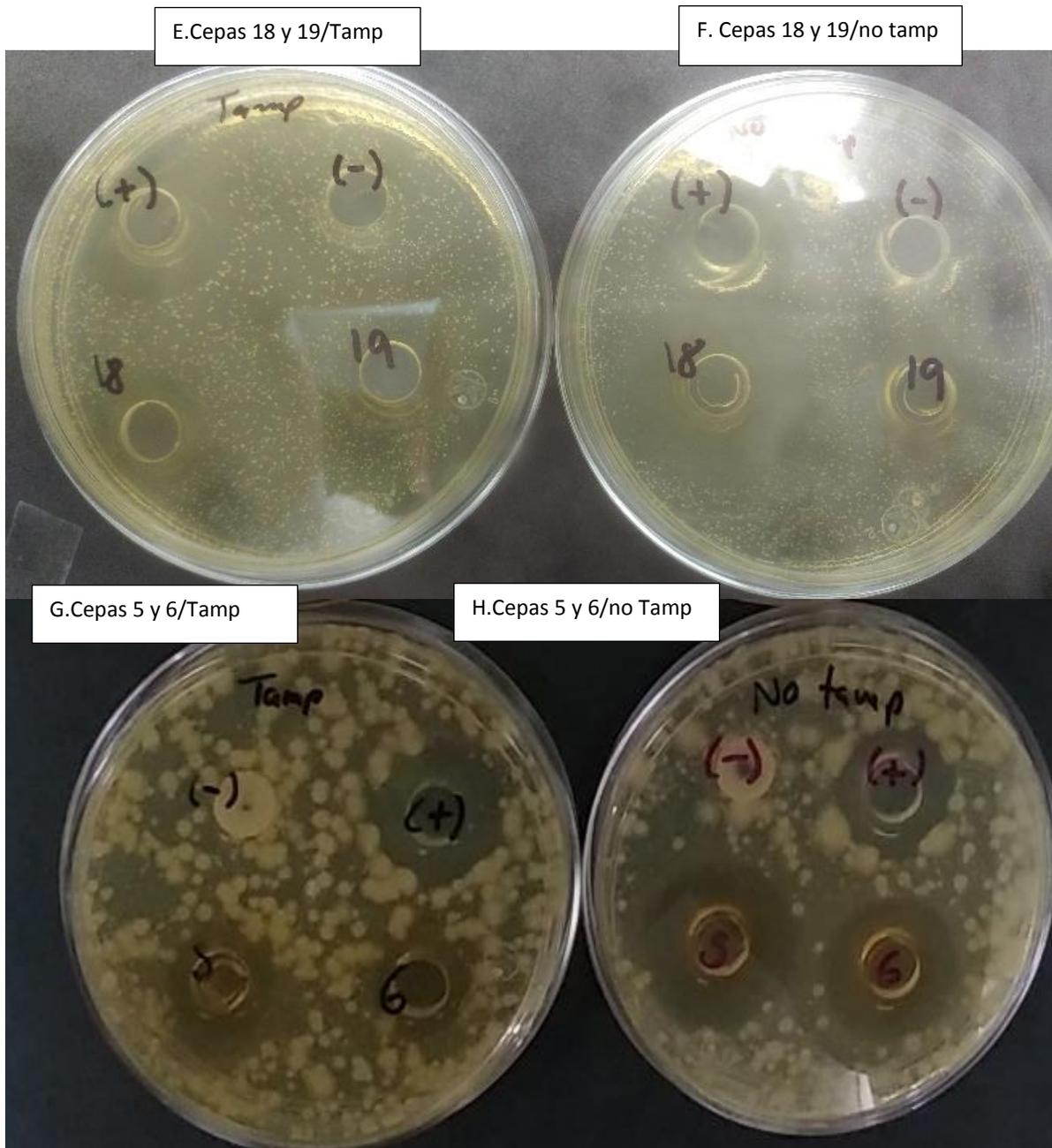


Figura 5. Halos de inhibición producidas por extractos de cepas, 18, 19, 5 y 6 en placas con medio BHI tamponado (imagen E y G) y no tamponado (imagen F y H) reveladas a las 24h, inoculadas con las cepas patógenas *S. sanguinis* (imagen E y F) y *Bacillus cereus* (imagen G y H).

Los resultados presentados en la Tabla 10 indicaron que la mayor actividad de inhibición contra *Streptococcus sanguinis*, fue para la cepa con la clave 18 cuyo halo de inhibición en medio NO tamponado fue mayor incluso que el control positivo que se utilizó (clorhexidina al 0.2%), mientras que la mayor actividad de inhibición fue de 3.0 cm diámetro contra *Bacillus cereus* se presentó en la cepa con la clave 5 en donde claramente se observa los halos de inhibición tanto en medio tamponado como en medio No tamponado (Figura 5). Estas pruebas se realizaron con medios amortiguados con el fin de tener la seguridad de que la inhibición fuera llevada a cabo por las posibles bacteriocinas.

Por lo tanto, se confirmó la producción de sustancias antimicrobianas en las muestras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 25, 27, 29, 31, IV, X y al obtener mayor inhibición en el medio NO tamponado, se plantea que la composición del medio de cultivo puede afectar en sus propiedades antimicrobianas. El medio es posiblemente un factor determinante para la producción de sustancias antimicrobianas (posible presencia de bacteriocinas).

La actividad antimicrobiana de las posibles bacteriocinas dependerá de qué clase de bacteriocina se trate, ya que de acuerdo con las clasificaciones hay bacteriocinas que requieren de alguna otra sustancia (péptidos) para aumentar su actividad (Klaenhamer, 1993), así como otras que solo tienen actividad frente a bacterias de la misma especie o género (Monroy *et al.*, 2009). Esta posible presencia de bacteriocinas y el hecho de que pueda inhibir bacterias patógenas Gram negativas como Gram positivas puede deberse a tres cosas: genera una bacteriocina diferente para cada cepa patógena que produzca su inhibición, generar más de una bacteriocina causando efecto inhibitorio en las cepas patógenas o que ambas cepas patógenas sean susceptibles a la misma bacteriocina (Tavera, 2010).

Caracterización fenotípica

8.3 Caracterización de BAL mediante sistema API 50CH

Para la caracterización de BAL aisladas del atole agrio mediante el sistema API 50CH, se eligieron a 18 cepas que presentaron una mayor resistencia a la concentración de sales biliares (Tabla 3 del anexo 1). Después de inocular las galerías con cada microorganismo, se leyeron los resultados (se tomó lectura) después de 48 h de incubación a 30°C en donde los pocillos con un color diferente al amarillo presentaron un resultado negativo (Figura 6). Con excepción del pocillo con el número 25, que contiene al carbohidrato esculina en el cual un resultado positivo (la presencia de un precipitado negro) se debe a la hidrólisis de la esculina, donde se obtienen los subproductos glucosa y esculetina. La esculetina se combina con iones de hierro presentes en el medio (provenientes del citrato férrico) formando finalmente un complejo de color negro (Lindell y Quinn, 1975).



Figura 6. Resultados de las pruebas de identificación de las cepas de BAL mediante sistema API 50CH.

De acuerdo con los resultados obtenidos al introducir los datos en el sistema API para la identificación de BAL, se identificaron las cepas como se reporta en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados de las cepas seleccionadas mediante identificación con sistema API 50CH a 48h.

CLAVE CEPA	TAXÓN IDENTIFICADO	% IDENTIFICACIÓN	MORFOLOGÍA
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	Bacilo G(+)
2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	Bacilo G(+)
3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.8	Bacilo G(+)
4	<i>Lactococcus lactis ssp</i>	80.5	Coco G(+)
5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	Bacilo G(+)
10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.6	Bacilo G(+)
11	<i>Lactococcus lactis ssp</i>	80.5	Coco G(+)
12	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	Bacilo G(+)
14	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99.2	Bacilo G(+)
17	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	Bacilo G(+)
18	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	Bacilo G(+)
20	<i>Lactococcus lactis</i>	99.8	Coco G(+)
21	<i>Lactobacillus pentosus</i>	98.6	Bacilo G(+)
23	<i>Lactobacillus plantarum</i>	59.1	Bacilo G(+)
30	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.9	Bacilo G(+)
31	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	Bacilo G(+)
IV	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	Bacilo G(+)
X	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	Bacilo G(+)

Los resultados indicaron la presencia de las BAL *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus pentosus* y *Leuconostoc mesenteroides*.

De las cepas seleccionadas para ser caracterizadas mediante el sistema API 50CH, se observó mayoritariamente la presencia de la bacteria *Lactobacillus plantarum*, debido a que ésta presenta mayor resistencia a sales biliares con respecto a otras cepas aisladas del atole agrio de acuerdo a las pruebas realizadas en el proyecto “Aislamiento y caracterización de microorganismos con potencial probiótico de la

fermentación del maíz de elote y dobla” (Tabla 3 del anexo 1), seguido de *Lactococcus lactis*. Coincidentemente, las cepas que tienen mayor resistencia a las sales biliares y que fueron identificadas como *Lactobacillus plantarum* por el sistema API 50CH, fueron las que presentaron mayor actividad antimicrobiana (posible presencia de bacteriocinas) tal como se reporta en las Tablas 9 y 10, en donde las cepas que presentaron un halo de inhibición mayor son las cepas: 5 para *Listeria monocytogenes*, 31 para *S. sanguinis* y 5 para *Bacillus cereus*. Por su parte la cepa 4, que inhibió a *Salmonella* Typhimurium correspondió a *Lactococcus lactis*, segunda cepa que se presentó en más ocasiones al realizar la identificación con el sistema API 50CH.

Recientemente, estudios han sugerido que *L. plantarum* es una de las principales BAL debido a sus propiedades probióticas distintivas, ya que puede tolerar ciertas condiciones ácidas y biliares, además de su actividad antagonista contra patógenos intestinales (Yadab *et al.*, 2016).

Además *L. plantarum* puede tomar ventaja de los metabolitos producidos por otros microorganismos como ácidos orgánicos, CO₂, acetaldehído, diacetilo, peróxido de hidrógeno, moléculas de bajo peso molecular como la reuterina y bacteriocinas, ácido benzoico, metilhidiatonina, mevalonolactona y ácidos grasos son otras moléculas de bajo peso molecular que servirán para potenciar su efecto de inhibición (Turchi *et al.*, 2017). Asimismo, teniendo en cuenta la diversidad de BAL presentes en el atole agrio y su resistencia frente a diferentes condiciones, se podría considerar que las cepas de *Lactobacillus plantarum* estudiadas podrían ser importantes dentro de la microbiota del atole agrio y, si se realizan otras pruebas como la adherencia al mucus intestinal, entre otras, se podría tomar en cuenta como un microorganismo con potencial probiótico (Cueto-Vigil *et al.*, 2010).

8.4 Caracterización genotípica

Extracción del DNA y verificación de su pureza mediante electroforesis.

La unidad funcional de la información genética es el gen, todos los microorganismos contienen genes, físicamente los genes están localizados en el cromosoma, que es el elemento genético principal de los procariontes. La extracción de DNA cromosomal de las células constituye el paso inicial en el proceso de una identificación genotípica, la técnica consiste en liberar el DNA de las estructuras celulares que lo rodean (Madigan *et al.*, 2009). El DNA cromosomal es la materia prima de las técnicas de biología molecular utilizadas.

Se realizó la extracción de DNA cromosomal como se describe en el Anexo 4. Para verificar la correcta y eficiente extracción del material genético, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.0%.

La electroforesis consiste en la separación de moléculas mediante la aplicación de un campo eléctrico, el grado en el que una molécula en particular se mueve depende de la carga neta que tiene, de su tamaño y de su forma. Las electroforesis normalmente se llevan a cabo en gel de agarosa debido a que tienen un tamaño de poro que permite el paso de las moléculas de DNA. Las muestras que se desean examinar son cargadas en el gel junto a un colorante de carga, y posteriormente es aplicado un campo eléctrico, los ácidos nucleicos migran a través del gel hacia el electrodo positivo a causa de los grupos fosfato cargados negativamente, como resultado las moléculas más pequeñas y aquellas que se encuentran súper enrolladas avanzan más rápido que las grandes y lineales (Birge, 2006).

En general se observó que las bandas presentaron intensidad y definición, lo que indica que el DNA extraído está en cantidad suficiente y se encuentra íntegro (figura 7). Se observó de manera satisfactoria la extracción de DNA de las cepas 1, 5, 7, 11, 12, 13, 16, 17 y 27 cargadas en los carriles señalados y se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se reveló y se identificaron bandas de DNA. Esta extracción de DNA será necesaria para la identificación de cada una de

las cepas de BAL mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S amplificado (ARDRA). En la Figura 8 del anexo 5 se muestran algunos de los geles realizados para confirmar la presencia de DNA cromosomal de cada una de las cepas de la colección de BAL aisladas del atole agrio.

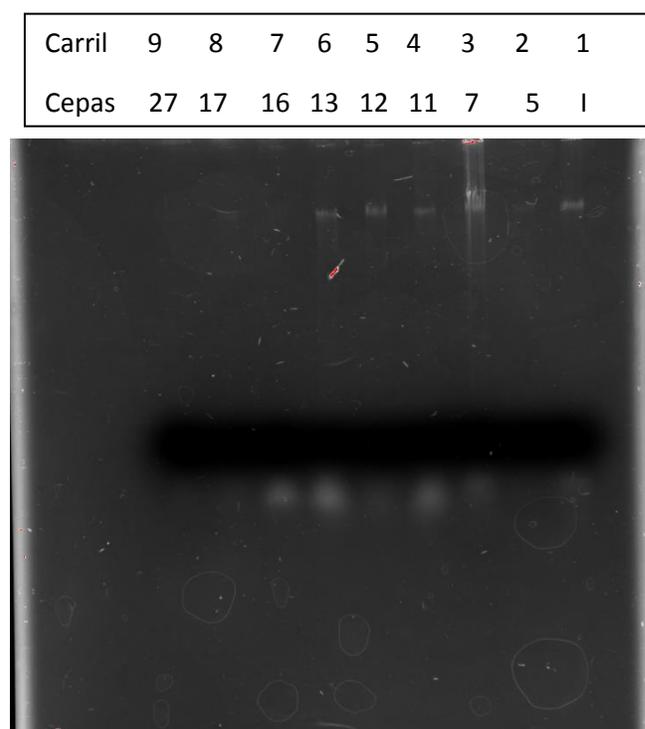


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de DNA de las cepas 1, 5, 7, 11, 12, 13, 16, 17 y 27 aisladas del atole agrio a 90 volts por 60 min.

Cuantificación del DNA ribosomal

Se realizó la cuantificación del DNA y se verificó la relación $\lambda_{260}/280$ valor que debe ser cercano a 1.8, para posteriormente proseguir a la realización de la reacción en cadena de la polimerasa. En la Tabla 12 del anexo 6 se encuentran los valores obtenidos posterior a la medición en el espectrofotómetro para cuantificar el DNA, donde se observó en gran mayoría valores entre 1.6-1.8, lo que significa que la absorción es mayoritariamente debida a ácidos nucleicos. Es importante esta medición debido a que los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta

debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de DNA. La absorción de UV de DNA es una característica de la molécula, que es usada eficientemente para determinar su concentración (IBT, 2017).

Este método proporciona una estimación simple y precisa de la concentración de DNA en una muestra, pero sólo si ésta se encuentra pura, sin contaminación significativa de proteínas o solventes orgánicos que absorben a longitudes de onda cercanas. Para evaluar la pureza de la muestra debe determinarse la proporción DO 260nm/DO 280nm. Si la relación es mayor a 1.6 puede estimarse que la muestra es lo bastante pura para confiar en la cuantificación espectrofotométrica (UNQ, 2010).

Amplificación del gen ribosomal 16S por PCR

En la Figura 9 se presenta la electroforesis realizada a los productos de la amplificación del rDNA 16S llamados amplicones de las cepas 30, 21, 1. A la altura de la banda correspondiente a un peso de 1.5kb o 1500 pb se observa la presencia de tres bandas definidas (Figura 9), resultantes de la reacción de PCR lo que demuestra una buena amplificación del gen ribosomal debido a que los primers utilizados, pA y pH permiten la amplificación de un fragmento de gen 16S de este peso molecular (Rodas *et al.*, 2003).

Uno de los usos potenciales más atractivos de la informática de secuencia de genes rRNA 16S es proporcionar identificación de género y especie para aislados que no se ajustan a ningún perfil bioquímico reconocido, para cepas que generan solo una identificación de "baja verosimilitud" o "aceptable" según sistemas comerciales. O para taxones que rara vez se asocian con enfermedades infecciosas humanas. Los resultados acumulados de un número limitado de estudios hasta la fecha sugieren que la secuenciación del gen rRNA 16S proporciona la identificación del género en la mayoría de los casos (> 90%) (Janda y Abbott, 2007).

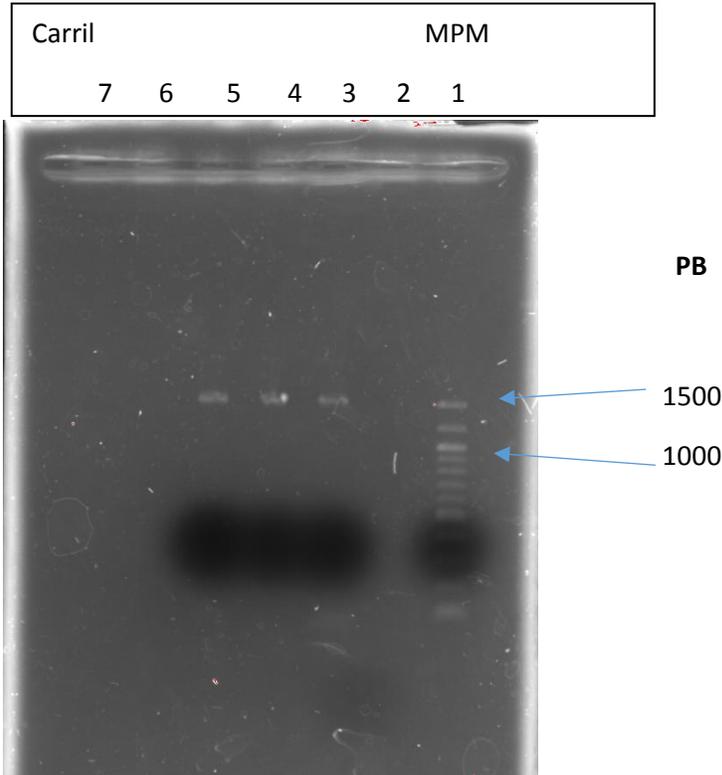


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con Marcador de peso molecular 100-1500pb (Bio Labs) para productos de PCR del gen rRNA 16S de las las cepas de BAL aisladas del atole agrio: Carril 1. Marcador PM (Bio Labs), Carril 3. Cepa 1, Carril 4. Cepa 21, Carril 5. Cepa 30.

En la Figura 10 del anexo 7 se muestran algunos de los geles realizados a los productos de amplificación del DNA de la colección de BAL aisladas del atole agrio.

Análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado (ARDRA)

Cada enzima de restricción es específica y reconoce una secuencia de DNA corta determinada, que se denomina sitio de restricción (Campbell y Reece, 2005), debido a que la enzima siempre corta en el mismo sitio, el patrón de bandeado generado va a ser distinto para secuencias de DNA diferentes (Madigan *et al.*, 2009). La enzima Hae III, reconoce la secuencia GGCC y lleva acabo el corte en GG↓CC (Voet, 2007). Mientras que la enzima Hinf I reconoce la secuencia GANTC y lleva acabo el corte en G↓ANTC.

Una vez terminada la digestión enzimática con ambas enzimas de restricción, se obtuvo el resultado mediante una electroforesis, en la cual se observó la identificación de perfiles de bandeo (ARDRA; Figuras 11, 12).

Se sabe que el gen rRNA 16S tiene un peso molecular aproximado de 1.5 kbp (Contreras *et al.*, 2010) y si se suman los pesos moleculares de las bandas observadas para cada una de las cepas se obtiene un peso aproximado de 1500 pb lo que corresponde con lo que se reporta en la literatura.

Se visualizaron ambos geles, cada uno con su enzima de restricción diferente y donde se obtuvo un bandeo más uniforme fue en el gel con la enzima de restricción Hae III, mientras que con la enzima Hinf I hubo ausencia de fragmentos en la corrida del gel y, además, 3 cepas no presentaron restricción. Por esta razón se eligió la enzima Hae III para realizar el experimento. Se obtuvo la matriz de ausencia y presencia de fragmentos presentada en la Tabla 13 del anexo 8. Con ésta se obtuvo la matriz de distancias usando el programa Restdist.exe y se construyó el dendrograma usando el programa Tree View (TreeViewX Version 0.5.0 by Roederic D.M , Uk). De acuerdo con el patrón de bandeo correspondiente de la enzima Hae III se observaron 18 perfiles diferentes de restricción, los cuales aportaron los datos suficientes para generar el dendrograma correspondiente. El perfil de restricción que se presentó con mayor frecuencia es el que agrupa a las cepas con la clave 3, 4, 5 y 18 y presentó bandas con pesos moleculares de 550, 450, 350 y 200 pb por lo que la suma de los pesos moleculares de las bandas nos da un total de 1.50 kbp. Lo que significa que podemos descartar la presencia de material genético ajeno al gen de interés (Figura 11).

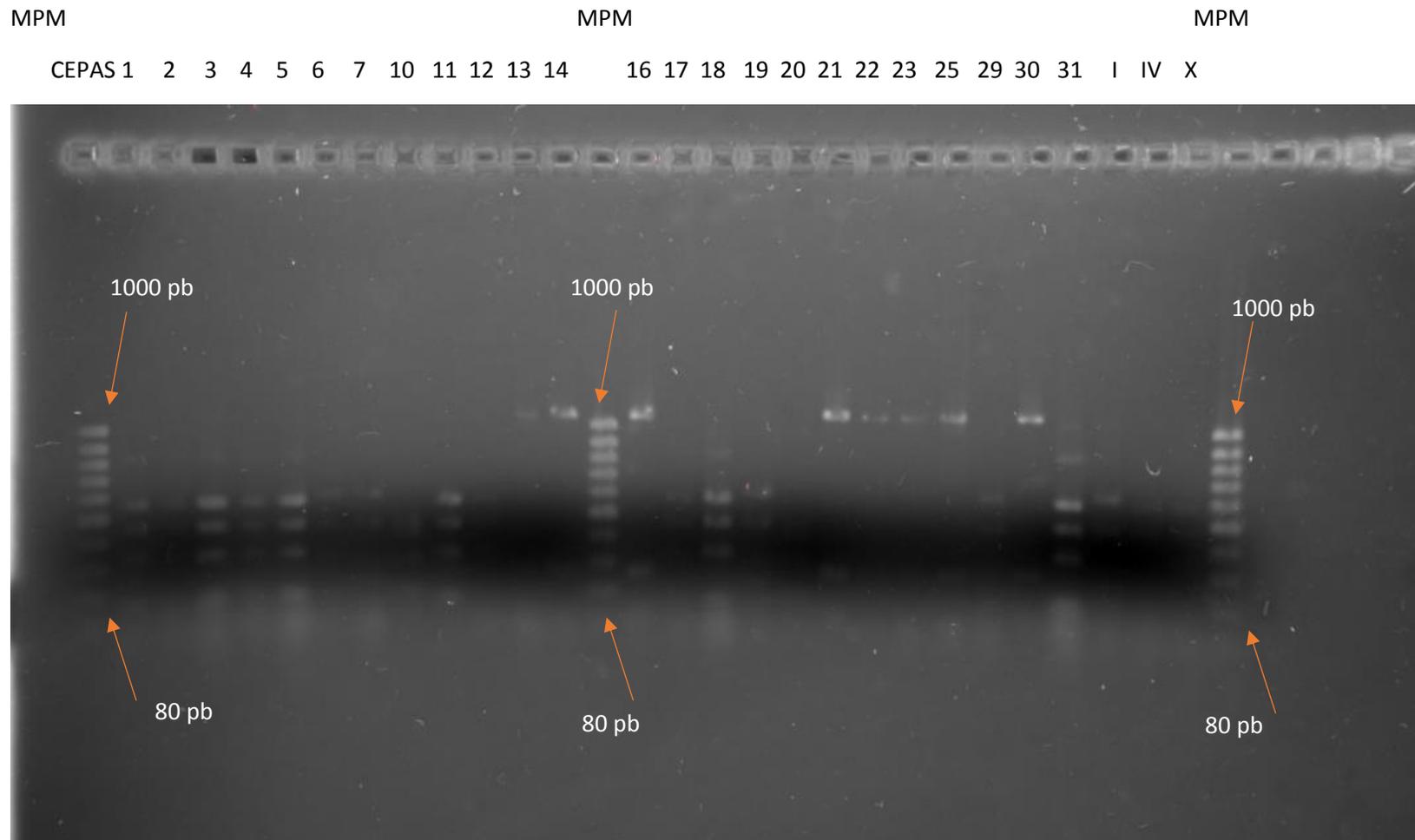


Figura 11. Electroforesis de la digestión enzimática de DNA ribosomal amplificado de la colección de cepas de BAL aisladas del atole agrio en gel de agarosa al 2.5% con marcador de peso molecular 80-1030 pb (Fermentas) y enzima de restricción Hae III.

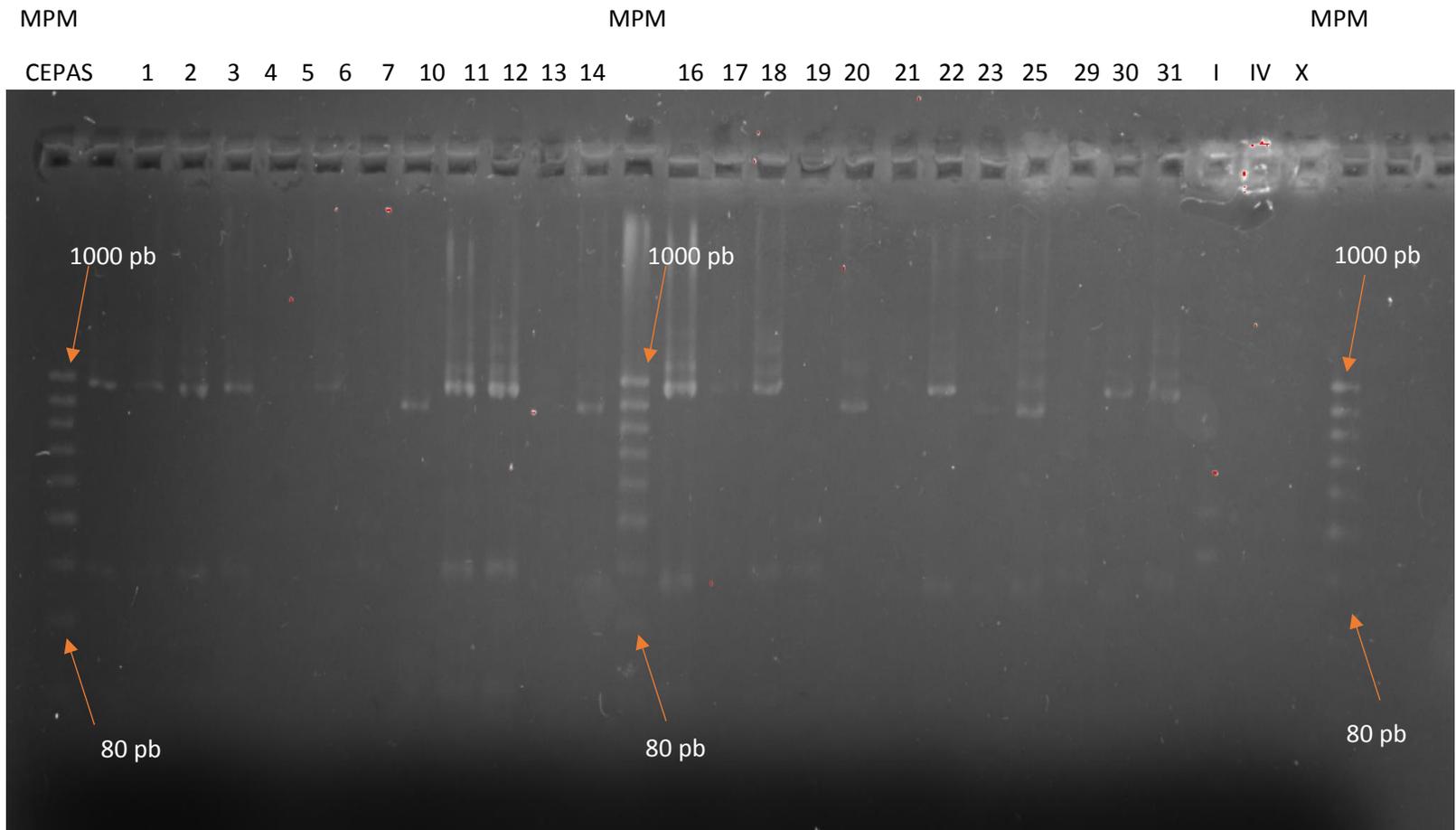


Figura 12. Electroforesis de la digestión enzimática de DNA ribosomal amplificado de la colección de cepas de BAL aisladas del atole agrio en gel de agarosa al 2.5% con marcador de peso molecular 80-1030 pb (Fermentas) y enzima de restricción Hinf I.

Dendrograma

Los árboles filogenéticos son reconstrucciones hipotéticas de la historia evolutiva. Representan conjuntos de organismos existentes (actualmente vivos) en las puntas de las ramas y puntos de ramificación que indican un ancestro común.

Un ancestro común para todos estos organismos es el punto de ramificación sobre la raíz del árbol, conocido como el ancestro común más reciente. Estos árboles pueden ser arreglos horizontales y verticales, o arreglos diagonales, (Bear *et al.*, 2010). Se recurrió al programa Tree View mediante el cual se obtuvo una imagen que nos reveló información acerca de cuan parecidas son unas cepas de otras, o si pertenecen a la misma ramificación lo que quiere decir que hay un ancestro en común. Una vez obtenido el dendrograma se visualizaron seis grupos principales como se observa en la Figura 13, por lo que se seleccionó una cepa de cada grupo (naranja, rojo, azul, café y verde). Con ayuda del software ApiWeb se determinaron BAL de diferentes especies como *Lactobacillus plantarum* (cepa 1), *Lactococcus lactis* (cepa 20), *Lactobacillus pentosus* (cepa 21), *Leuconostoc mesenteroides* (cepa 30) y *Lactobacillus fermentum* (cepa 14), se seleccionaron las mismas cepas para identificarlas mediante la comparación de secuencias y asimismo cotejar los resultados obtenidos por ambos métodos (API50CH y ARDRA).

Por último, se seleccionó la cepa 17 ya que al probar su actividad antimicrobiana en la prueba de difusión en agar contra *Salmonella* Tiphymurium y *Listeria monocytogenes* (ver Tabla 9), se obtuvieron halos de inhibición de gran tamaño lo que significa que posee una gran actividad antimicrobiana contra cepas que presentan mayor peligro a la salud en el consumo de alimentos.

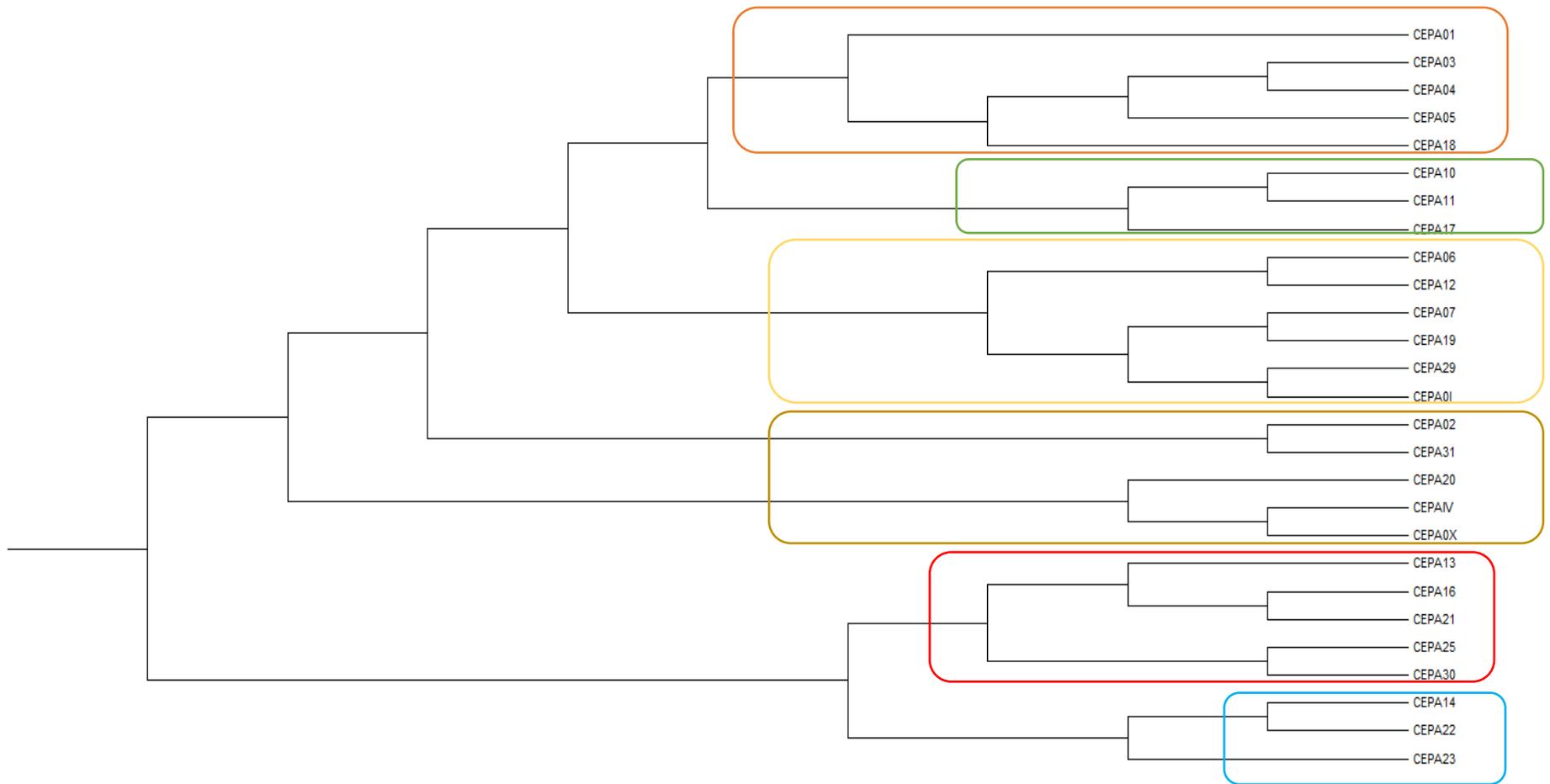


Figura 13. Dendograma elaborado con el paquete de programas Phylip-3.695. A partir de los perfiles de bandeo obtenidos para cada una de las cepas para elaborar la matriz de restricción y así calcular la matriz de distancia de fragmentos de restricción con el Programa Restdist.exe donde se ingresó al programa Neighbor.exe y mediante el algoritmo UPGMA se construyó el dendograma. Dendograma visualizado con el programa TreeView.

Secuenciación del DNAr 16S e identificación del microorganismo

Con base en los resultados obtenidos del dendograma, se realizó la secuenciación de 6 cepas diferentes que son las representantes de una ramificación diferente en el dendograma y las cepas caracterizadas con respecto al sistema API 50CH.

Primero se realizó la purificación de los productos de PCR con el kit comercial (MONTAGE life science), donde el ADN se adsorbe específicamente a membranas/esferas/partículas de sílica en presencia de ciertas sales y a un pH particular. Los contaminantes celulares son eliminados mediante diferentes pasos de lavado. El ADN es eluído en un buffer de baja salinidad o buffer de elución. Se utilizan sales caotrópicas para promover la desnaturalización de proteínas y la extracción del ADN. Este método puede ser incorporado en columnas de centrifugado (Dhaliwal, 2013).

Se realizó la electroforesis de la purificación de los productos rDNA 16S en donde se observan únicamente bandas correspondientes al DNAr 16S (Figura 14).

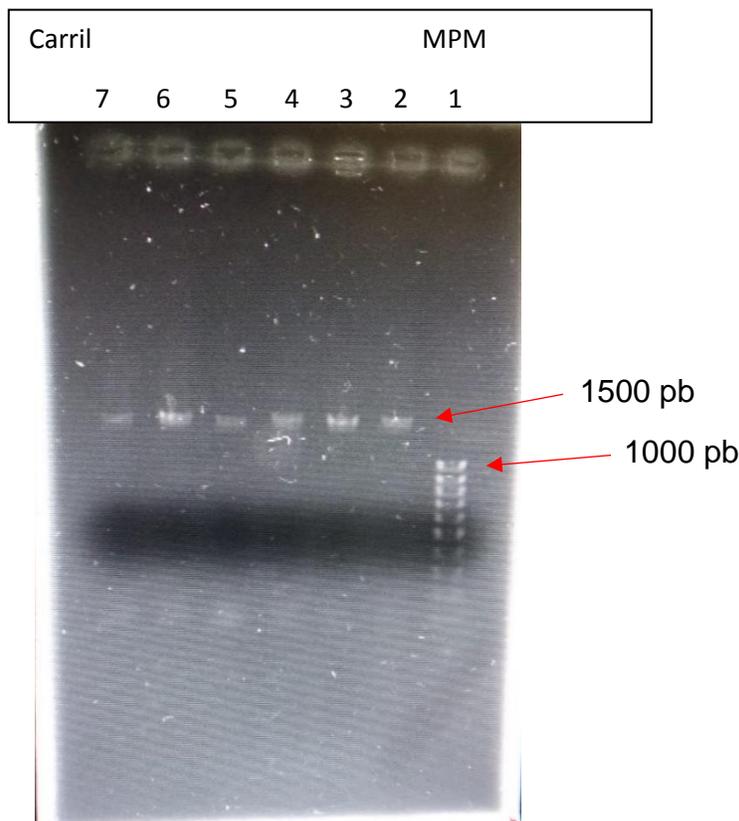


Figura 14. Electroforesis de la purificación (con kit comercial Montage life science) de las cepas a secuenciar del rDNA 16S en gel de agarosa al 1%. Carril 1. Marcador PM (Bio Labs), Carril 2. Cepa 1, Carril 3. Cepa 14, Carril 4. Cepa 17, Carril 5. Cepa 20, Carril 6. Cepa 21, Carril 7. Cepa 30.

En la Figura 14 se observan bandas de los productos purificados y con intensidad adecuada para la siguiente etapa.

Se analizaron las secuencias de las cepas de BAL mediante la base de datos de NCBI utilizando el programa BLAST. En la Tabla 14 se presenta la identidad de cada una de las cepas secuenciadas.

Tabla 14. Identidad de las cepas de BAL mediante el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S.

Cepa	Identidad	Identidad (%)	No. de acceso genbank
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	NR_115605.1
14	<i>Leuconostoc lactis</i>	99	NR_113255.1
17	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	NR_115605.1
20	<i>Lactococcus lactis</i>	99	NR_116443.1
21	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	97	NR_040814.1
30	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	97	NR_040814.1

Se observó que de las seis cepas de BAL identificadas mediante comparación de secuencias se lograron identificar tres géneros distintos: *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Dentro de éstos, se identificaron dos especies de *Leuconostoc*: *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Leuconostoc lactis*, una de *Lactobacillus*: *Lactobacillus plantarum*; mientras que de *Lactococcus* sólo se identificó a *Lactococcus lactis*.

Con base en la Tabla 14, dos de las cepas aisladas y secuenciadas del atole agrio con las que se trabajó, corresponden a *Lactobacillus plantarum* (cepa 1 y cepa 17). De acuerdo con Stellato *et al.* (2017) *Lactobacillus plantarum* presenta una actividad biológica importante debido a que prevalece desde el proceso

inicial hasta el final durante la fermentación del atole. Puede estar relacionado a una adaptación específica y a la competitividad con otras especies de BAL. (Stellato *et al.*, 2017). Presenta gran resistencia contra cepas de bacterias patógenas y en la actualidad es implementado en la industria de alimentos como probiótico (Zapata, 2009).

Con una identidad de 97% se identificó a *Leuconostoc pseudomesenteroides* (cepa 21 y cepa 30), ésta BAL pertenece al género *Leuconostoc* y suele confundirse con *Leuconostoc mesenteroides* ya que tienen gran similaridad en reacciones fisiológicas diferenciándose una de otra debido a la tolerancia de NaCl. *Leuconostoc mesenteroides* (tolerante a 6.5% NaCl) mientras que *Leuconostoc pseudomesenteroides*, (intolerante a 6.5% NaCl) (Ogier, 2008).

Por otro lado, *Leuconostoc lactis* (cepa 14), otra BAL que se identificó mediante el programa BLAST que arrojó una identidad del 99%, es la única especie del género *Leuconostoc* que, para su identificación bioquímica mediante la fermentación de carbohidratos, no hidroliza esculina y tampoco produce dextrano de la glucosa.

Bacterias del género *Leuconostoc* anteriormente han sido aisladas del atole agrio por Pérez-Cataluña *et al.* (2017), al inicio del proceso de fermentación del atole agrio tanto en fermentación líquida como en fermentación sólida. Se han encontrado, además, en otro tipo de alimentos fermentados, como el sauerkraut, kimchi (alimento fermentado a base de col), salsas fermentadas, vegetales y cereales fermentados, ya que su presencia en vegetales es muy común debido a que es su hábitat natural (Rodríguez, 2011). A estas bacterias se les conoce por iniciar la fermentación de muchos productos de origen vegetal, convirtiendo los azúcares en ácido láctico, ácido acético (que disminuyen el pH del medio, inhibiendo así el crecimiento de otros microorganismos, incluidos patógenos), etanol, CO₂ (que promueve el establecimiento de un ambiente anaeróbico que favorece el crecimiento de otro tipo de BAL necesarias para continuar la fermentación) y otros compuestos aromáticos que definen significativamente los sabores característicos finales del producto (Lu *et al.*, 2010).

Finalmente, de acuerdo a la Tabla 14 y con una identidad de 99% se identificó a *Lactococcus lactis* (cepa 20). Se trata de una BAL estrictamente homofermentativa, aislada por primera vez de plantas, ha estado presente durante siglos en la fermentación de alimentos como: queso, yogurt, sauerkraut y alimentos afines, es reconocida como GRAS por la FDA. En la actualidad es empleada por la industria alimenticia gracias al aroma y sabor que imparte a los alimentos. Esta bacteria produce ácido que inhibe a microorganismos indeseables y presenta actividad antimicrobiana. Estudios han asociado a esta bacteria con la producción de bacteriocinas (en específico de la nisina). Es también una bacteria con un alto potencial para la producción de compuestos aromáticos acetilados como: diacetilo, acetaldehído y acetato todos resultado de la fermentación (Song, 2017). De acuerdo con Pérez-Cataluña *et al.* (2017) bacterias del género *Lactococcus* aparecieron en la fermentación líquida pasadas 12 horas de iniciada la fermentación, reemplazando así a bacterias del género *Lactobacillus*.

Lo que concuerda con lo reportado en la literatura (Pérez- Cataluña *et al.*, 2017) donde se identificó a bacterias del género *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus* durante el proceso de fermentación líquida para la producción del atole agrio.

En la tabla 15 se muestran los resultados de la identificación de las mismas cepas por ambos métodos.

Tabla 15. Resultados de la identificación de bacterias lácticas aisladas del pozol mediante comparación de sistema API 50CH y método ARDRA.

CEPA	API 50CH		ARDRA	
	IDENTIDAD	% IDENTIFICACIÓN	IDENTIDAD	% IDENTIFICACIÓN
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
14	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99.2	<i>Leuconostoc lactis</i>	99
17	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
20	<i>Lactococcus lactis</i>	99.8	<i>Lactococcus lactis</i>	99
21	<i>Lactobacillus pentosus</i>	98.6	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	97
30	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.9	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	97

Respecto a los resultados obtenidos mediante sistema API 50CH y por el método ARDRA en la Tabla 15, existe cierta congruencia en los resultados obtenidos ya que en ambos experimentos se determinó la presencia de BAL del género *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*; sin embargo se observó que a las seis cepas a las que se le realizó la secuenciación solo cuatro coincidieron con el sistema API 50CH, debido a que bacterias del mismo género pueden presentar gran similitud en reacciones fisiológicas y bioquímicas (Ogier, 2008). Pero es a nivel molecular en donde se presenta una mayor especificidad para la identificación de una especie con otra del mismo género; sin embargo, para ambas metodologías no se debe dejar de lado las características morfológicas: celulares y coloniales.

9. CONCLUSIONES

- El análisis ARDRA de una colección de cepas ácido-lácticas aisladas del atole agrio proveniente de Villahermosa, Tabasco, permitió la tipificación e identificación de *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc lactis* y *Lactococcus lactis*.
- Se identificaron 18 cepas aisladas previamente del atole agrio proveniente de Villahermosa, Tabasco mediante el sistema API 50CH como: *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus pentosus* y *Leuconostoc mesenteroides*.
- La identificación de BAL por métodos fenotípicos y genotípicos funciona mejor conjuntamente que si se utiliza un solo método para caracterizar algún microorganismo, ya que uno lo hace a nivel bioquímico (API 50CH), mientras que el otro a nivel genético (ARDRA).
- Se detectó actividad antimicrobiana de las cepas 1, 3, 4, 5, 6, 17, 18, 31, I, IV y X contra las bacterias patógenas *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus*, *Streptococcus sanguinis*, siendo más evidente en el medio BHI no tamponado con respecto al medio tamponado. *Lactobacillus plantarum* (cepas: 1, 3, 5, 17, 18, 31, IV Y X) y *Lactococcus lactis* (cepa 4) fueron las que mayor inhibición mostraron frente a bacterias patógenas por su capacidad de producir sustancias antimicrobianas.

10. PERSPECTIVAS

- Debido a que algunas de las cepas caracterizadas tienen propiedades antimicrobianas al producir halos de inhibición, será necesario realizar pruebas correspondientes como tolerancia a jugo gástrico, ensayos de adherencia a mucus intestinal, pruebas de reto frente a patógenos, etc., para determinar si alguna de las BAL caracterizadas tiene la capacidad para poder denominarse como probiótico.
- Para la cepa identificada como *Leuconostoc pseudomesenteroides*, se propone secuenciar todo el genoma para obtener una identificación con un mayor porcentaje.
- Además de realizar la identificación por el método ARDRA rRNA 16S, se sugiere utilizar otros genes como rpoB o el 23S.
- De ser así, realizar un estudio a nivel bioquímico sobre la clase de bacteriocina de la que se trate debido a que hay bacteriocinas que requieren de alguna otra sustancia para aumentar su actividad.
- Conocer cuál es el medio más apto para poder realizar un estudio más detallado sobre péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) y su comportamiento frente a diversas variaciones en la composición del medio, además de la adición de sales, sería conveniente realizar una variación en el pH y la temperatura de incubación.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Agudelo, N., Torres-Taborda, M., Álvarez, C., Velez, L. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Vol 23, No 36 (2015), Revista Alimentos Hoy, 186-197.
2. Aislamiento y caracterización de microorganismos con potencial probiótico de la fermentación del maíz de elote y dobla. Tesis de maestría en ciencias agroalimentarias. Universidad Juárez Autónoma por Anita Hernández Flores. En revisión.
3. Alquicira, L. (2006). Determinación del mecanismo de Resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133 [Tesis MSc]. Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana.
4. Ampe, F.; Ben Omar, N.; Moizan, C.; Wachter, C. y Guyot, J.P. (1998) Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maize Dough, Demonstrates the Need for Cultivation-Independent Methods To Investigate Traditional Fermentations. Applied and Environmental Microbiology, 65 (12), 12 pp. 5464-5473.
5. Ángel, J., Cuervo, R., *et al.* (2009). Effect of salt concentration on the inhibition of *Leuconostoc mesenteroids* in a sugar mill in Valle del Cauca. Revista Científica Guillermo de Ockham. Vol. 7, No. 1. Enero -Junio de 2009, 13-18.
6. Arroyo P. (2008). La alimentación en la evolución del hombre: su relación con el riesgo de enfermedades crónico degenerativas. *Boletín del Hospital Infantil de México*. En prensa, Volumen 4, No. 4. Octubre-Diciembre, 8-9.
7. Battcock M. and Azam-Ali S. (1998) Chapter 1-2: Introduction, The benefits of fermenting fruits and vegetables. In: Fermented fruits and vegetables a global perspective. FAO Agricultural Services Bulletins. URL: <http://www.fao.org/docrep/x0560e/Cx0560e00.HTM> Consultado el 06.03.18.
8. Bear, R., Rintoul, D., Snyder, B., Smith-Caldas, M., Herren, C., Horne, Eva. (2016). *Principles of Biology*. Primera edición. United States New Prairie Press, Kansas State University Libraries.

9. BioMérieux. [En línea]. (2006). Api 50 CHL medium (actualizado Julio del 2011). Disponible en: https://www.media/15797/om_biomerieux_test-kits_ot-50410_package_insert-50410.pdf . [Último acceso: 2018 Noviembre 22].
10. Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J., Valdezate S., (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. A review: Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 29(8):601–608.
11. Campbell, A., Reece B. (2005). *Biología*. Séptima edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
12. Caplice E, Fitzgerald GF. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation International Journal of Food Microbiology. 50: 131-149.
13. Casquete, R., Benito, M. J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Aranda, E., & Córdoba, M. G. (2012). Microbiological quality of salchichon and chorizo, traditional Iberian dry-fermented sausages from two different industries, inoculated with autochthonous starter cultures. Food Control, 24(1-2), 191-198.
14. Centro para el control y prevención de Enfermedades. [En línea]. (2018). La Salmonella y los alimentos (actualizado junio del 2018). Disponible en: <https://www.cdc.gov/spanish/especialescdc/salmonella> [Último acceso: 2018 Agosto 5].
15. Contreras M, Costello EK, Hidalgo G, et al (2010) The bacterial microbiota in the oral mucosa of rural Amerindians. Microbiology 156:3282–3287.
16. Cristóbal, R.L. (2008). Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias [Tesis MSc]. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 42 pp.
17. Cueto-Vigil, M., Acuña-Monsalve. Y., Valenzuela-Riaño, J. (2010). Evaluación InVitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas asiladas de suero costeño. Actual Biol. 32 (93):129-138.
18. Dhaliwal, A. [En línea]. (2013). Revisión exhaustiva sobre kits de extracción y purificación de ADN citados en literatura.(actualizado mayo del 2018).

Disponible en: <http://www.labome.es/method/DNA-Extraction-and-Purification.html> [último acceso: Agosto 20 del 2018].

19. Díaz, G. y Wachter, C., (2003). Método para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev. Latinoamericana de Microbiología*, 45 (1-2), pp. 30-40.
20. Esquivel, A. (2012). Estudio de las enterobacterias presentes en el atole agrio de Villahermosa, Tabasco. *Tesis to get Food Chemist Degree*. UNAM 67-81.
21. Eom, JS., Lee, SY. (2014). *Bacillus subtilis* HJ18-4 from Traditional Fermented Soybean Food Inhibits *Bacillus cereus* Growth and Toxin-Related Genes. *Journal of Food Science*. Vol. 79. No. 11. 2279-2287.
22. Guerra, N., Pastrana, L. (2002). Modelling the influence of pH on the kinetics of both nisin and pediocin production and characterization of their functional properties. *Process Biochemistry*, 37(9): 1005-1015.
23. Hill, C. (1995). Bacteriocins: natural antimicrobials from microorganisms. En: *New Methods of Food preservation*. Springer US. p 22-39.
24. Instituto de Biotecnología UNAM. [En línea]. (2017). Cuantificación de Oligos y DNA. (Actualizado 30 de enero del 2017). Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/cuantificacion.html#top>. [Último acceso: 2018 agosto 10].
25. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. [En línea]. (2016). *Listeria monocytogenes* (actualizado 15 junio del 2016). Disponible en: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Listeria%20monocytogenes%202017.pdf>. [Último acceso: 2018 Agosto 5].
26. Janda, M., Abbott, S. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(9): 2761-2764.
27. Joerger, R. (2003). Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science*, 82(4): 640-647.
28. Jurado, R., Arenas, C., Doblas, A., Rivero, A y Torre J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine*. 10 (52): 3497-3501.

29. Klaenhammer, R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*. Vol. 12, No. 1-3, 39-85 pp.
30. Lahtinen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Von Wright. (2012). *Lactic Acid Bacteria, Microbiological and functional aspects*. 4th Edition. CRC Press: Taylor and Francis Group.
31. Lawson P., A. Falsen, E. Ohlén y M. D. Collins. (2001). *Aerococcus urinaehominis* sp. No., isolated from human urine. *J. Appl. Bacteriol.* 51, 683-686.
32. Lindell, S., Quinn, P. (1975). Use of bile-esculin agar for rapid differentiation of Enterobacteriaceae. *NCBI*, 1(5):440-3.
33. Lu, Z.; Alterman, E.; Bredit, F. y Kozyavkin, S. (2010). Sequence analysis of *Leuconostoc* bacteriophage 1-A4 isolated from an industrial vegetable fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 76, No. 6 , pp. 1955-1966.
34. Madigan. M.; Martinko, J.; Dunlap. P.; Clark. D. (2009). *Brock Biología de los microorganismos*. 12va edición. Madrid: Pearson Addison Wesley.
35. Martin, A. (2002). Capacidad antagonista frente a la *Listeria monocytogenes* de dos sustancias tipo Bacteriocina utilizadas en combinación con NaCl y CO₂ [Tesis]. Valdivia, Chile: Universidad Austral De Chile. 79 pp.
36. Marcos, E., Castillo, F.A., Dimitrov, S.T., Gombossy de Melo, B.D., De Souza, R.P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32: 134-142.
37. Monroy, M., Castro, T., Fernández, F. J., Mayorga, L. (2009). Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*, 73: 63-72.
38. Naghmouchia, K., Kheadr, E., Lacroix, C., Fliss, I. (2007). Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 24(7-8): 718-727.
39. Ogier, J. C.; Casalta, E.; Farrokh, C.; Sahihi, A. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology*. Vol 126, pp. 286-290.

40. Papagianni, M., Anastasiadou, S. (2009). Pediocins: The bacteriocins of pediococci. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories*, 8(3): 1-1
41. Pérez-Cataluña A., Elizaquível P., Carrasco P., Espinosa J., Reyes D., Wachter C, Aznar R. (2017). Diversity and dynamics of lactic acid bacteria in Atole agrio, a traditional maize-based fermented beverage from South-Eastern Mexico, analysed by high throughput sequencing and culturing. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 111, No.3. pp 385-399.
42. Prajapati J.B and B.M. Nair. 2003. The history of fermented foods. pp 1-25. In: Farnworth, E.R. (ed.). *Fermented Functional Foods*. CRC Press, Boca Raton, New York, London, Washington DC.
43. Ramos D., Brañez K. *Streptococcus sanguinis* y *actinomyces viscosus* bacterias pioneras en la formación del biofilm dental. (2016). *KIRU*.13(2): 179-184.
44. Rodas, A. M., Ferrer, S. & Pardo, I. (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst Appl Microbiol* 26, 412–422.
45. Rodríguez, C. (2011). Estudio sobre interacciones negativas de bacterias lácticas del pozol. Tesis para obtener el título de Química de Alimentos, UNAM, México.
46. Song AA-L, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microb Cell Factories*. Vol. 16. No. 55.
47. Steinkraus, K.H. (1996). *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. 2nd. Edition. Food science and technology New York : Marcel Dekker
48. Stellato G, Utter DR, Voorhis A, De Angelis M, Eren AM, Ercolini D. (2017). A few *Pseudomonas* oligotypes dominate in meat and dairy processing environment. *Front Microbiol* 8:264.
49. Tallent, M., Kotewicz, M., Bennet, W. (2012). Efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group. *Journal of AOAC International*. Vol. 95, No. 2. pp. 446-451.

50. Tamay, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en discapacidad. Vol. 2, No. 2, mayo-agosto 2013. pp 70-78.
51. Tavera, F. (2010), Producción de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol para la inhibición de bacterias patógenas. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química. UNAM. 105 páginas.
52. Turchi, B., Pedonese, F., Torracca, B., Fratini, F., Mancini, S., Galiero, A., Montalbano, B., Cerri, D. and Nuvoloni, R. (2017). *Lactobacillus plantarum* and *Streptococcus thermophilus* as starter cultures for a donkey milk fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 256, pp.54-61.
53. Tiedje, J. M., Asuming, S. (1999). Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*. 13:109-122.
54. United States Department of Agriculture. *Salmonella* preguntas y respuestas. [en línea]. (Actualizado el: 23 de noviembre de 2013). Disponible en: <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/informational/enespanol/hojasinformativas/enfermedades-por-alimentos/salmonella-preguntas-y-respuestas>. [Último acceso 5 agosto del 2018].
55. Universidad Nacional de Quilmes. (2010). Cuantificación de DNA y electroforesis en gel de agarosa. [En línea]. (actualizado marzo del 2010). Disponible en: <https://ibcmunq.files.wordpress.com/2010/03/tp5.pdf> [Último acceso: 2018 noviembre 23].
56. University of Washington [En línea]. (2018). Genetics. (Actualizado 1 de enero del 2018). Disponible en: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>. [Último acceso: 2018 noviembre 10].
57. Väkeväinen, K., Valderrama, A., Espinosa, J., Centurión, D., Rizo, J., ReyesDuarte, D., Díaz-Ruiz, G., von Wright, A., Elizaquível, P., Esquivel, K., Simontaival, A.-I., Aznar, R., Wachter, C., Plumed-Ferrer, C., Characterization of lactic acid bacteria recovered from atole agrio, a traditional Mexican fermented beverage, *LWT - Food Science and Technology* (2017)

58. Vázquez, S.M., Suárez, H., Zapata, B.S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1): 64-71.
59. Voet, D., Voet, J., Pratt, W. (2007). Fundamentos de bioquímica. Segunda edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
60. Wachter, C.; Cañas, A.; Cook, P.E.; Bárzana, E. y Owens, J.D. (1993) Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and biotechnology*. Vol.9, pp. 269-270
61. Wachter, Carmen *et al.* 2002 "Alimentos y bebidas fermentados tradicionales", en Mariano García-Garibay, Rodolfo Quintero y Agustín López-Munguía (coords.), *Biotecnología alimentaria*, Limusa, México, pp. 313-349.
62. Wachter, C. (2014) La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. *Revista Digital Universitaria* . Vol. 15, No. 8 pp, 1607
63. Yadav R, Puniya AK and Shukla P (2016) Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an Indigenous Fermented Beverage Raabadi. *Front. Microbiol.* 7:1683. doi: 10.3389/fmicb.2016.01683.
64. Zapata S., Muñoz J., Ruiz O., Montoya O., Gutiérrez A. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y su caracterización parcial de su bacteriocina. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. Vol 16. No. 1. pp. 75-82.

12. Anexos.

Anexo 1. **Tabla 3.** Pruebas realizadas a cepas de atole agrio aisladas y purificadas realizadas en el proyecto “Aislamiento y caracterización de microorganismos con potencial probiótico de la fermentación del maíz de elote y dobla”. Tesis de maestría en ciencias agroalimentarias. Universidad Juárez Autónoma por Anita Hernández Flores. En revisión.

Claves Anita	Clave Dra. Gloria	Sales biliares			Producción de hemólisis	
		4%	8%	12%	24h	72h
E0H081b1	1	+++	+++	+++	alfa	alfa
E0H082a5	2	+++	+++	+++	alfa	alfa
E0H082b4	3	+++	+++	+++	alfa	alfa
E0H082b5	4	+++	+++	+++	alfa	alfa
E0H083a1	5	+++	+++	+++	alfa	alfa
E0H083a2	6	+++	+	-	alfa	alfa
E02H082b1	7	++	-	-	alfa	alfa
E02H083b3	10	+++	+++	+++	gamma	gamma
E02H083db1	11	+++	+++	+++	alfa	alfa
E02H083dc2	12	+++	+++	+++	alfa	alfa
E04H083b5	13	+++	++	+	gamma	gamma
E04H083da2	14	+	++	++	gamma	gamma
E04H084da1	16	+	+	++	gamma	gamma
E04H084db2	17	+++	+++	+++	alfa	alfa
E06H085a1	18	+++	+++	+++	alfa	alfa
E06H086b2	20	+++	+++	+++	gamma	gamma
E08H085db1	21	+++	++	++	alfa	alfa
E08H086a1	22	+++	++	-	alfa	alfa
E08H086dc1	23	+++	++	++	alfa	alfa
E10H086a1	25	+++	-	-	alfa	alfa
E10H087da1	27	+++	-	-	gamma	gamma
E12H085a2	29	+++	+	-	gamma	ligeramente alfa
E12H086a3	30	+++	++	-	alfa	alfa
E12H085c2	31	+++	+++	+++	alfa	alfa
D0H302c3	I	++	+	-	gamma	gamma
D0H303db2	IV	+++	+++	+++	alfa	alfa
D6H305dc1	VII	-	-	-		
D12H305a1	X	+++	+	++	gamma	Alfa

Anexo 2. **Tabla 4.** Formulación de placas y sobrecapas de medio BHI para prueba de difusión en agar.

BHI-Amortiguado para 1L de formulación

PLACA	<u>SOBRECAPA</u>
• BHI caldo 37g	• BHI agar 15g
• Agar bacteriológico 17g	• Agar bacteriológico 8g
• Fosfato monobásico de sodio 4.3g	• Fosfato monobásico de sodio 4g
• Fosfato dibásico de sodio 10g	• Fosfato dibásico de sodio 10g
• Agua destilada 1000mL	• Agua destilada 1000mL

BHI-No amortiguado para 1L de formulación

PLACA	<u>SOBRECAPA</u>
• BHI caldo 37g	• BHI agar 15g
• Agar bacteriológico 17g	• Agar bacteriológico 8g
• Agua destilada 1000mL	• Agua destilada 1000mL

Anexo 3. Prueba de difusión en agar para capas y sobrecapas tamponadas y no tamponadas.

- Colocar torres de vidrio en placa.
- Fundir sobrecapa en baño maría.
- Inocular con 40µL de la dilución 10^{-2} según los microorganismos a probar y agitar.
- La sobrecapa inoculada se vierte sobre la placa y esperar a que solidifique para asegurar que los pozos queden bien definidos.
- Se retiran las torres de vidrio, y se coloca en cada pozo 80 µL del sobrenadante de cada cepa de BAL liofilizadas previamente.
- Incubar a 37°C por 24h y tomar lectura de los halos de inhibición y reportar el radio.

Anexo 4. Extracción de DNA cromosomal usando el procedimiento reportado por Lawson y Falsen (2001).

- Colocar un volumen de 1.5 mL de células del cultivo bacteriano en un tubo eppendorf, centrifugar a 10, 000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante y lavar con agua estéril. Repetir este paso 3 veces.
- Resuspender el pellet de células en el mismo tubo con 500 µL de buffer TES (10x).
- Adicionar 20µL (20µg/µL) de lisozima y agitar vigorosamente.
- Incubar en baño a 37°C por 15-60 min y verificar que en este lapso de tiempo se aumente la viscosidad. Nota: No sobrepasar 60 min.
- Adicionar 8µL de pronasa (20µg/µL). y 8µL de RNA'asa (20µg/µL).
- Agitar vigorosamente 5 segundos en el vortex.
- Incubar en un baño a 65°C por 1 h exacta.
- Adicionar 120µL de SDS (10%) y agitar.
- Regresar al baño a 65°C por 10 min más.
- Sacar los tubos del baño y esperar a que se enfríen por 10 minutos.
- Adicionar 60µL de fenol-cloroformo y agitar vigorosamente a mano hasta formar emulsión blanca.
- Centrifugar por 10 min a 14, 000 rpm a temperatura ambiente. se formarán 2 fases, con una interfase blanca. Extraer la parte de arriba con cuidado de evitar llevarse las impurezas.
- Repetir el paso anterior 2 veces.
- Agregar un volumen igual de etanol absoluto frío (4°C) aproximadamente 500µL y agitar suavemente invirtiendo el tubo, observando la formación de una gelatina.
- Centrifugar a 14,000 rpm por 10 min y a temperatura ambiente.
- Retirar el etanol con cuidado y dejar los tubos secar a T ambiente 24h.
- Hidratar el DNA añadiendo 30 µL de agua estéril e incubar a 37 °C durante 40 minutos en el termomix (Thermomixer R, Eppendorf, USA).
- El DNA se encuentra listo para usar en alguna otra metodología.

Anexo 5. **Figura 8.** Geles de electroforesis de extracción de DNA cromosomal de BAL aisladas del atole agrio.

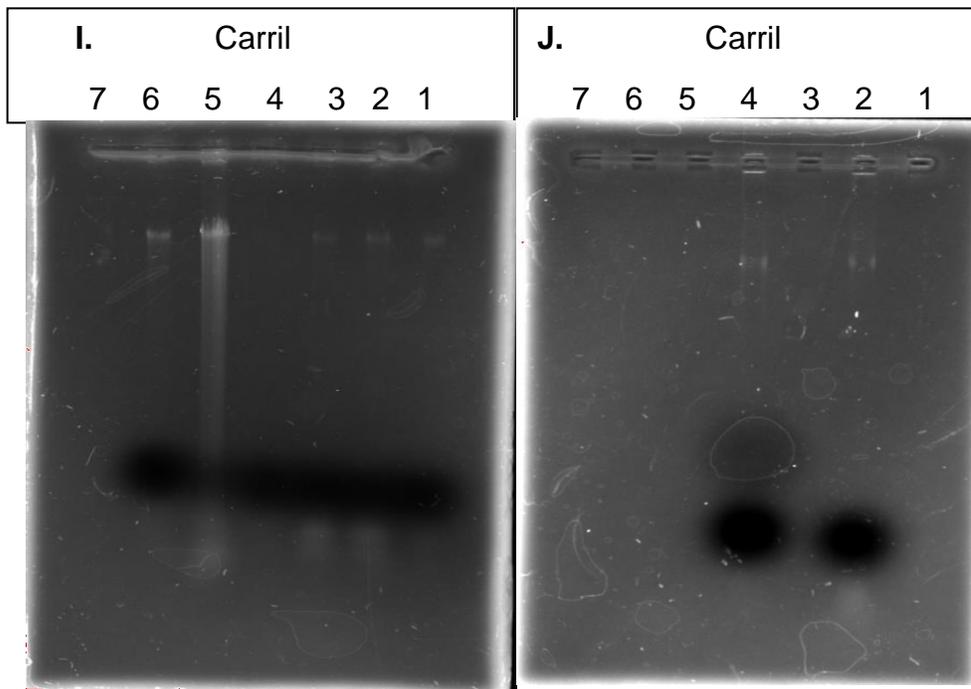


Figura 8. Imagen I. Electroforesis de la extracción de DNA cromosomal de cepas de BAL aisladas del atole agrio: Carril 1. Cepa 22, Carril 2. Cepa 23, Carril 3. Cepa 25, Carril 4. Cepa 27, Carril 5. Cepa I, Carril 6. Cepa X. Imagen J. Electroforesis de la extracción de DNA cromosomal de cepas de BAL aisladas del atole agrio: Carril 2. Cepa 29, Carril 4. Cepa IV.

Anexo 6. **Tabla 12.** Resultados obtenidos de la cuantificación de DNA cromosomal.

Clave de la cepa	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Ratio $\lambda 260/\lambda 280$
1	267.553	1.77
4	952.349	1.911
6	489.842	1.953
2	1796.78	1.865
3	2673.738	1.98
10	507.75	1.72
21	262.057	1.769
30	292.609	2.086
17	843.066	1.628
18	570.97	1.775
27	2370	1.624
I	3229.74	1.332
5	2777.8	1.636
7	2903.701	1.679
11	1492.1	1.703
12	134.30	2.047
13	3203.174	1.364
16	2760.24	1.753
14	1475.33	1.734
23	3509.6	1.068
29	3293.82	1.162
25	3267.22	1.12
X	3186.52	1.38
19	2923.842	1.134
20	3147.875	1.412
22	3540.28	1.06
IV	2967.369	1.16
31	3220.68	1.18

Anexo 7. **Figura 10.** Geles de electroforesis de productos de amplificación gen rRNA 16S del DNA de BAL aisladas del atole agrio.

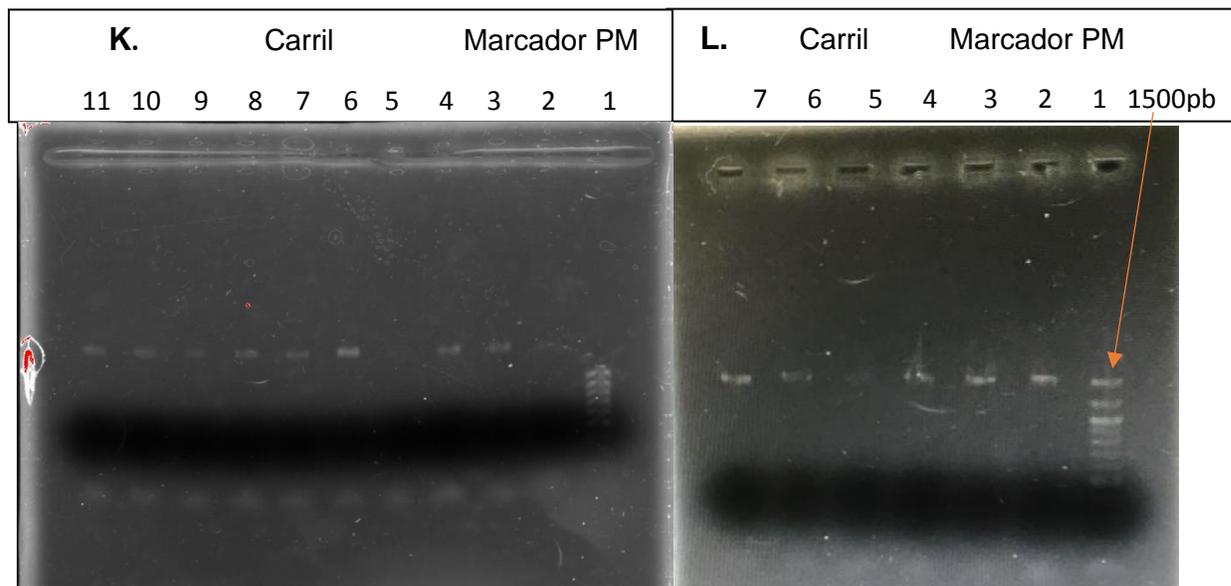


Figura 10. Imagen K. Electroforesis para productos de la amplificación del gen rRNA 16S de las cepas de BAL aisladas del atole agrio: Carril 1. Marcador PM (Bio Labs), Carril 2. Cepa 11, Carril 3. Cepa 12, Carril 4. Cepa 13, Carril 5. Cepa 16, Carril 6. Cepa 17, Carril 7. Cepa 25, Carril 8. Cepa 29, Carril 9. Cepa 31, Carril 10. Cepa IV, Carril 11. Cepa X. Imagen L. Electroforesis para productos de la amplificación del gen rRNA 16S de las cepas de BAL aisladas del atole agrio: Carril 1. Marcador PM (Bio Labs), Carril 2. Cepa 6, Carril 3. Cepa 10, Carril 4. Cepa 14, Carril 5. Cepa 18, Carril 6. Cepa 19, Carril 7. Cepa

Anexo 8. **Tabla 13.** Matriz de ausencia y presencia de fragmentos. Método ARDRA.

	27	10	1*
1	--++-++-++		
2	--+++-----		
3	--++-++-++		
4	--++-++-++		
5	--++-++-++		
6	---++-----		
7	---++-----		
10	---+---+---		
11	---+---+---		
12	---+---+---		
13	+-----+		
14	+-----+		
16	+-----++		
17	---+---+---		
18	--++-++-++		
19	---+---+---		
20	-----+---		
21	+-----++		
22	+-----+		
23	+-----+		
25	+-----+---		
29	---+---+---		
30	+-----+---		

*27 corresponde al número de muestras, 10 a los perfiles de restricción y 1 al número de enzimas de restricción.