



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS**

Presentada para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

Por

**Diana Catalina Castro Rodríguez**

**Química**

TITULO DE LA TESIS

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA DE LAS CEPAS DE BACTERIAS  
LÁCTICAS AISLADAS DE *Agave salmiana* sp.**

Dirigida por

**Dr. Jorge Yáñez Fernández**

**Dr. Enrique Duran Páramo**

México, D.F. Diciembre de 2013

## Declaración de originalidad

Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa, excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.



Dr. Enrique Durán Páramo  
Nombre y firma del director



Diana Catalina Castro Rodríguez  
Nombre y firma del alumno

Vo. Bo.



Dr. Jorge Yañez Fernández  
Nombre y firma del director



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F. el día 21 del mes de noviembre del año 2013, la que suscribe Química Diana Catalina Castro Rodríguez alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos, con número de registro A120371, adscrita a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Jorge Yáñez Fernández y Dr. Enrique Durán Páramo y cede los derechos del trabajo titulado “Estudio de la capacidad probiótica de las cepas aisladas del *Agave salmiana* spp.”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [castrodiana182@gmail.com](mailto:castrodiana182@gmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
Diana Catalina Castro Rodríguez  
Nombre y firma

## RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el potencial probiótico de un consorcio bacteriano de *Leuconostoc mesenteroides*, aislado del aguamiel de *Agave salmiana*. El consorcio fue sometido a varias pruebas *in vitro* las cuales demostraron su actividad como bacteria probiótica. Se realizaron pruebas de resistencia en medio ácido (pH 2) y sales biliares (0.5% p/v) (condiciones gastrointestinales *in vitro*), se evaluó la actividad antimicrobiana, la resistencia a antibióticos y la adhesión a la mucosa intestinal en ratas macho blancas cepa Wistar de 3 meses de edad. Otra característica que se determinó en el consorcio bacteriano, fue el efecto de fructosa, sacarosa y glucosa en su crecimiento así como de inulina. También fueron empleados como sustratos el aguamiel de *Agave salmiana* y la miel de *Agave tequilana*. Como cepa control se empleó *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL-B-734.

*Leuconostoc mesenteroides* mostró su mejor crecimiento en presencia de inulina grado alimentario (0.200 Log UFC/mL/h), mientras que *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* lo consiguió con miel de *Agave salmiana* (0.231 Log UFC/mL/h). Por otro lado *Leuconostoc mesenteroides* presentó una viabilidad de 17.6% y 5.5% mayor respecto a *Lactobacillus delbrueckii* cuando fue tratado a pH 2 y 0.5% p/v de sales biliares, respectivamente. En cuanto a la adhesión a la mucosa intestinal, *Leuconostoc* presentó 2% de adhesión mayor a la obtenida por *Lactobacillus delbrueckii*. Con respecto a la actividad antimicrobiana se observó mayor inhibición al crecimiento de *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes* cuando se empleó *Leuconostoc mesenteroides*. Este consorcio presentó mejor resistencia a los antibióticos comparado con la cepa control.

Los resultados obtenidos, mostraron que el consorcio bacteriano de *Leuconostoc mesenteroides* presentó potencial probiótico.

## ABSTRACT

In this study evaluated the probiotic potential of a consortium of *Leuconostoc mesenteroides* strain isolated from the mead of *Agave salmiana*. The consortium was subjected to several *in vitro* tests which demonstrated its activity as probiotic bacteria. We have evaluated: resistance to acidic conditions (pH 2) and, bile salts (0.5%), adherence to the intestinal mucosa, antibiotic resistance and antimicrobial activity. Another studies evaluated in the consortium was the effect of fructose, sucrose, inulin and, glucose in its growth. Were also used as substrates the mead of *Agave salmiana* and, honey *Agave tequilana*, using *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL-B-734 as control strain.

*Leuconostoc mesenteroides* showed better growth in the presence of inulin food grade (0.200 log CFU/ml/h), while *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* got it with mead of *Agave salmiana* (0.231 log CFU/mL/h). Moreover we show that the consortium *Leuconostoc mesenteroides* resisted the gastrointestinal conditions (17.6%) and intestinal bile salts (5.5%), showing higher viability percentages than the control strain. The consortium *Leuconostoc mesenteroides* also present 15.5% adherence, which was 2% higher than that of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL-B-734. The consortium *Leuconostoc mesenteroides* showed the highest antimicrobial activity against growth of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*, and the best antibiotic resistance was with dicloxacillin and pefloxacin.

For the reasons above mentioned it can be proposed the consortium *Leuconostoc mesenteroides* is a potential probiotic.



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 12 horas del día 26 del mes de Noviembre del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La UPIBI-IPN para examinar la tesis titulada:

**Estudio de la capacidad probiótica de cepas de bacterias lácticas aisladas de *Agave salmiana* sp**

Presentada por el alumno:

<b>Castro</b>	<b>Rodríguez</b>	<b>Diana Catalina</b>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
		Con registro:							
		<table border="1"> <tr> <td>A</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>0</td> <td>3</td> <td>7</td> <td>1</td> </tr> </table>	A	1	2	0	3	7	1
A	1	2	0	3	7	1			

aspirante de:

**Maestra en Ciencias en Bioprocesos**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

 Dr. Jorge Yañez Fernández		 Dr. Enrique Durán Páramo
 Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo	<b>INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL</b> <b>UNIDAD PROFESIONAL</b> <b>INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA</b>	 Dr. Gustavo Valencia del Toro
 M. en C. María Carmen Fernández	<b>SECCIÓN DE ESTUDIOS DE</b> <b>POSGRADO E INVESTIGACION</b>	

### PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo

## DEDICATORIA

*A Dios por ser mi guía y mi fortaleza, por darme la sabiduría para desarrollar correctamente cada una de las etapas de mi vida, a mi mamá Elsa María, mi papá Nicolás, mis hermanos Daniel y Marcela, a mi sobrinito David, que me acompañaron en la distancia durante todo el desarrollo de este proyecto y me brindaron su amor y confianza y a mi novio César por el apoyo incondicional.*

*“Pon en manos del Señor todas tus obras, y tus proyectos se cumplirán”*

*Proverbios 16:3 NVI.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto Politécnico Nacional y a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología UPIBI, por permitirme llevar a cabo el desarrollo de este proyecto.

Al CONACyT por la beca otorgada para el cumplimiento de mis estudios de Maestría y la beca mixta para la realización de una estancia. #Becario: 435894.

A mi director y amigo el doctor Jorge Yáñez Fernández por su apoyo incondicional, por los conocimientos que me brindo y por permitirme formar parte de su grupo de investigación. Así mismo, a los miembros del comité tutorial por sus valiosos aportes en la realización de esta tesis: Dr. Enrique Duran, Dra. Karina Cruz, Dr. Gustavo Valencia y M. en C. María Carmen Fernández.

A los compañeros del Laboratorio de Biotecnología Alimentaria de la UPIBI, mi más sincero agradecimiento por las horas compartidas conmigo durante estos dos años.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron desinteresadamente en la realización de este proyecto.

## ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1. Bacterias ácido lácticas (BAL)	3
1.1.1. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4
1.2. Probióticos	6
1.3. Prebióticos	11
1.4. La microflora intestinal	12
1.5. Efecto de los probióticos y prebióticos en el organismo humano	14
1.6. Agaves de México	14
1.6.1. <i>Agave tequilana</i>	15
1.6.2. <i>Agave salmiana</i>	15
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo general	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. METODOLOGÍA	18
4.1. Materiales	19
4.2. Microorganismos	20
4.3. Métodos	21
4.3.1. Activación y mantenimiento de los microorganismos empleados	21
4.3.2. Caracterización de los carbohidratos por HPLC	21
4.3.3. Estudio de la cinética de crecimiento del consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> en diferentes sustratos	21
4.3.4. Evaluación de la resistencia del consorcio <i>Leuconostoc</i>	

<i>mesenteroides</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> a pH 2	22
4.3.5. Resistencia del consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> a las sales biliares	23
4.3.6. Técnica de adhesión de células del consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	23
4.3.7. Actividad antimicrobiana del consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	26
4.3.8. Resistencia a antibióticos del consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	26
4.3.9. Determinación de la velocidad máxima de crecimiento bacteriano	27
4.3.10. Preparación del tejido para observar las bacterias adheridas en la mucosa intestinal por la técnica de microscopia electrónica de barrido	27
4.3.11. Análisis estadístico	28
<b>5. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>29</b>
5.1. Análisis primera etapa: sustratos evaluados en el crecimiento del consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	29
5.1.1. Identificación de carbohidratos por HPLC	29
5.1.2. Estudio de la cinética de crecimiento del consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> en diferentes fuentes de sustratos	30
5.2. Análisis segunda etapa: Evaluación probiótica del consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y cepa testigo <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	39

5.2.1. Evaluación de la resistencia de cepas a pH 2 y sales biliares (0.5% p/v)	39
5.2.2. Adhesión de células bacterianas en tejido	42
5.2.3. Actividad antimicrobiana	46
5.2.4. Resistencia a antibióticos	49
6. CONCLUSIONES	52
7. PARTICIPACIÓN EN EVENTOS	54
8. BIBLIOGRAFÍA	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Fermentación heteroláctica (Tomada de Parra, 2010)	6
Figura 2: Metabolismo general de <i>Leuconostoc</i>	7
Figura 3: Etapa 1: Sustratos evaluados en el crecimiento del consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y cepa testigo <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	18
Figura 4: Etapa 2: Evaluación probiótica del consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y cepa testigo <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	19
Figura 5: Morfología colonial: (A) <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> : (B) consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	20
Figura 6: Intestino delgado de rata con buffer PBS	24
Figura 7: Cultivo de células de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y del consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i> en intestino delgado	25
Figura 8: Cinéticas de crecimiento del consorcio bacteriano <i>Leuconostoc mesenteroides</i> con diferentes fuentes de carbono a una concentración de 20g/L	30
Figura 9: Disminución de pH en el medio con diferentes azúcares para el consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	33
Figura 10: Producción de lactato por el consumo de diferentes sustratos en el consorcio bacteriano <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	34
Figura 11: Cinéticas de crecimiento de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> con diferentes fuentes de carbono a una concentración de 20g/L	35
Figura 12: Disminución de pH en el medio con diferentes azúcares para <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	37
Figura 13: Producción de lactato empleando diferentes fuentes de carbono por la cepa testigo <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	38

<b>Figura 14: Tinción de Gram a la mucosa intestinal. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (A); consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (B)</b>	<b>43</b>
<b>Figura 15: Imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM) (A) <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> libres a 5µm a 5000x y (B) <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> adheridas a la mucosa intestinal a 5µm a 4000x</b>	<b>44</b>
<b>Figura 16: Imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM) (A) Consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i> libres a 1µm a 15000x y (B) Consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i> adheridas a la mucosa intestinal a 1µm a 15000x</b>	<b>45</b>
<b>Figura 17: Halos de inhibición de las diferentes cepas patógenas</b>	<b>48</b>
<b>Figura 18: Halos de inhibición de los diferentes antibióticos</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Principales bacterias lácticas y sus aplicaciones (Ramírez <i>et al.</i> , 2011)	5
Tabla 2: Cepas de bacterias lácticas empleadas como probióticos	8
Tabla 3: Microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal humano	13
Tabla 4: Composición del medio MRS para las cinéticas (Man y Rogosa, 1960)	22
Tabla 5: Tiempos de retención de los diferentes sustratos empleados en las cinéticas de crecimiento de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y del consorcio bacteriano <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	29
Tabla 6: Velocidades de crecimiento del consorcio bacteriano <i>Leuconostoc mesenteroides</i> con los diferentes sustratos	32
Tabla 7: Velocidades de crecimiento de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> con los diferentes sustratos	36
Tabla 8: Viabilidad del consorcio bacteriano <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> a pH 2 y sales biliares 0.5% p/v	40
Tabla 9: Adhesión del consorcio bacteriano <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> en mucosa intestinal	42
Tabla 10: Inhibición de patógenos por el consorcio bacteriano <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	47
Tabla 11: Resistencia del consorcio bacteriano <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y la cepa control <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> a diferentes antibióticos	51

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años los microorganismos como las bacterias lácticas probióticas han sido tema de diversos estudios, encaminados a mejorar el estado de vida del ser humano y a su vez junto con los prebióticos son considerados ingredientes importantes de los llamados alimentos funcionales, los cuales además de aportar los nutrientes recomendados ejercen efectos beneficiosos sobre una o más funciones del organismo, fomentando la salud y reduciendo el riesgo de enfermedad (Douglas, 2008).

Los prebióticos son ingredientes no digeribles por enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo humano, que estimulan el crecimiento o la actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon. Los probióticos son microorganismos vivos que al ser agregados como suplemento en la dieta, favorecen el desarrollo de la flora microbiana en el intestino. Por otra parte los simbióticos combinan en sus formulaciones la unión de prebióticos y probióticos, lo que permite potenciar los beneficios de esa unión (Guarner, *et al.*, 2009). Estas nuevas alternativas actúan en la flora del colon, ecosistema donde muchas especies distintas participan de ciclos vitales interrelacionados o interdependientes, en un ámbito de gran biodiversidad (Correia, *et al.*, 2012). La flora del colon consume sustratos no digeribles de la dieta y del moco producido por el epitelio intestinal, como resultado de esta actividad se recupera energía metabólica, sustratos absorbibles y se produce la proliferación de la población de microorganismos (Geier, *et al.*, 2007).

Los probióticos han despertado un gran interés en la salud del hombre, por lo que se consideran suplementos alimentarios microbianos entre los géneros más destacadas dentro de este grupo de microorganismos, se encuentran los *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococos* (Guarner, *et al.*, 2009), caracterizándose por ser bacterias ácido lácticas. Actualmente estas bacterias son aisladas de sistemas lácteos fermentados y heces fecales de infantes, fuentes consideradas de origen animal.

En los últimos años se ha buscado bacterias de fuentes vegetales que puedan ser potencialmente consideradas probióticas. Uno de los estudios más recientes con respecto a este tema se realizó en Grecia en el 2013 por Anthoula *et al.* En éste se midió el potencial probiótico de bacterias ácido lácticas a partir de aceitunas fermentadas, resultando el género *Lactobacillus* con el mejor potencial probiótico.

En este trabajo se pretendió evaluar el potencial probiótico de un consorcio bacteriano aislado de una fuente vegetal, como es el caso del aguamiel proveniente de maguey pulquero, manso o de montaña (*Agave salmiana* spp.). El maguey es una planta de origen mexicano cuyo principal producto es el pulque, pero se ha empleado para otros usos en la agricultura y en la medicina, ya que tanto el aguamiel como el pulque contienen propiedades alimenticias, debido a la cantidad de azúcares, aminoácidos esenciales y vitaminas que se encuentran presentes. Sus propiedades curativas son muchas, presentando diferentes formas de preparación y de aplicación, por estas razones el maguey es de gran importancia (Cortés y Basurto, 2007). El consorcio bacteriano aislado del aguamiel se caracterizó como *Leuconostoc mesenteroides* y se evaluó por medio de pruebas *in vitro*.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Bacterias ácido lácticas (BAL).

Estas bacterias son consideradas en su mayoría probióticas, entre sus principales características destacan que son cocos o bacilos Gram positivo; no esporulados; no móviles; anaeróbicos; microaerófilicos o aerotolerantes; prueba a la oxidasa, catalasa y bencidina negativas; carecen de citocromos; no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico (Klein *et al.*, 1998; Ramírez *et al.*, 2011). Son microorganismos no patógenos, que tienen diversas aplicaciones, dentro de las cuales está la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales para obtener productos como el yogurt, quesos, encurtidos, embutidos, ensilados y son de gran utilidad en la producción de vinos y cerveza. Las BAL además de llevar a cabo procesos de fermentación útiles en la producción de alimentos, también mejoran las características sensoriales como el sabor, olor y textura y aumentan la calidad nutritiva de los alimentos (Ramírez *et al.*, 2011).

Autores como Bengmark, (1998); Fuller, (1989); Goldin and Gorbach (1980) han demostrado la importancia de las BAL contenidas en alimentos fermentados y productos probióticos, en mejorar la salud humana, protegiendo el sistema humano del ataque de bacterias patógenos y la formación de tumores, debido a que poseen la capacidad de incrementar la respuesta inmune (Goldin and Gorbach, 1980; Isolauri, 1994; Kimura *et al.*, 1997; Majamaa *et al.*, 1995). Géneros como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus thermophilus* son incluidos en este grupo (Guarner, *et al.*, 2009).

La clasificación de las BAL en diferentes géneros, se debe a la morfología presentada por la bacteria, el modo de fermentación (homofermentadoras o heterofermentadoras), el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina (Parra, 2010).

Según el producto final de su fermentación las bacterias BAL pueden ser: homofermentadoras poseen la enzima aldosa y producen ácido láctico por la fermentación de la glucosa empleando la vía glucólisis, entre las que se encuentran: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pedicococcus*, *Vagococcus* y algunas *Lactobacillus*; y heterofermentadoras quienes convierten hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconato-fosfocetolosa, produciendo ácido láctico, acetato, etanol y CO<sub>2</sub>, las especies que pertenecen a este grupo están: *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunas *Lactobacillus* (Ramírez *et al.*, 2011). En la Tabla 1 se observan las principales BAL y sus aplicaciones.

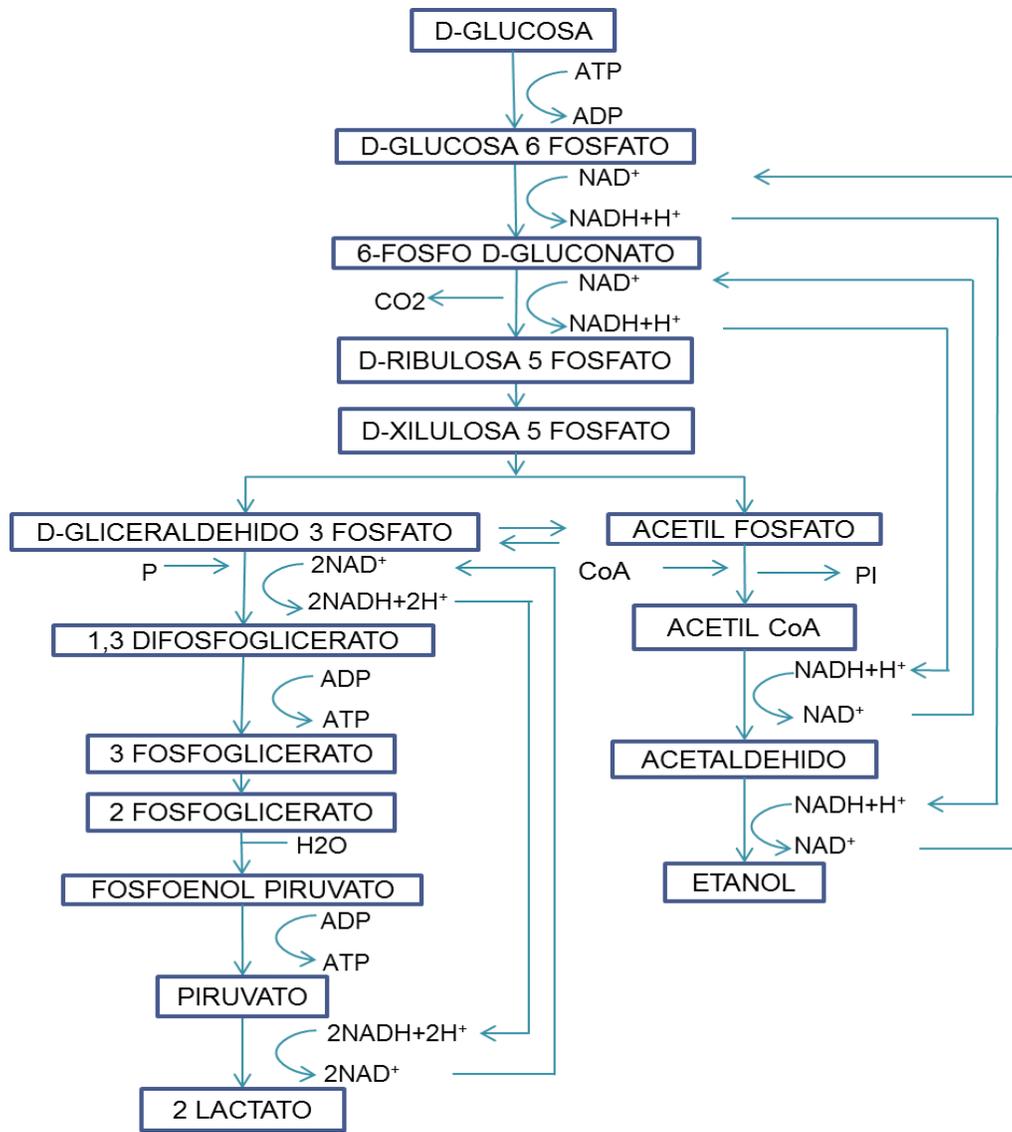
#### **1.1.1. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Leuconostoc mesenteroides*.**

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como *Leuconostoc mesenteroides*, son bacterias ácido lácticas empleadas en la obtención de bebidas fermentadas, en el caso de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se emplea para la elaboración de yogurt, la cual contribuye con el desarrollo de ácido láctico, que mejora las propiedades de sabor y textura de esta bebida láctea fermentada. Además de la importancia de esta bacteria por su aplicación en los procesos de producción de alimentos lácteos fermentados, se ha evidenciado que posee actividad probiótica ya que produce bacteriocinas que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas, estimulando al sistema inmune para contrarrestar diferentes desordenes del tracto gastrointestinal (Guglielmotti *et al.*, 2007).

*Leuconostoc mesenteroides* es importante a nivel económico debido a la fermentación del aguamiel para la obtención del pulque; la producción de CO<sub>2</sub> en quesos; producción *in situ* de dextrano, polisacárido empleado en la industria clínica o como un auxiliar biológico en la industria del aceite y empleado en alimentos funcionales (Hemme y Scheunemann, 2004). En ambas bacterias se considera como ruta metabólica la fermentación heteroláctica o conocida también como ruta fosfocetolasa (Figura 1).

**Tabla 1.** Principales bacterias lácticas y sus aplicaciones (Ramírez *et al.*, 2011).

GÉNERO	PRINCIPALES ESPECIES Y APLICACIONES
<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> : Mantequilla, queso, yogurt. <i>S. thermophilus</i> : Yogurt, queso.
<i>Pediococcus</i>	<i>P. cerevisiae</i> : Cerveza, carne procesada. <i>P. halophilus</i> : Salsa de soya.
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. citrovorum</i> : Alimentos fermentados, producción de dextrán.
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. bulgaricus</i> : Yogurt, bebidas fermentadas a base de leche. <i>L. helveticus</i> : Queso, yogurt, bebidas a base de leche fermentada. <i>L. acidophilus</i> : Yogurt, bebidas a base de leche fermentada. <i>L. casei</i> : Quesos, leche refinada, bebidas a base de leche fermentada. <i>L. plantarum</i> : Diversos alimentos fermentados, ensilajes. <i>L. fermenti</i> , <i>L. brevis</i> : Productos fermentados.
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. adolescents</i> : Leche fermentada, fuente de intestino de infantes y adultos. <i>B. thermophilum</i> , <i>B. pseudolongum</i> : Leche fermentada, fuente de intestino de animales.



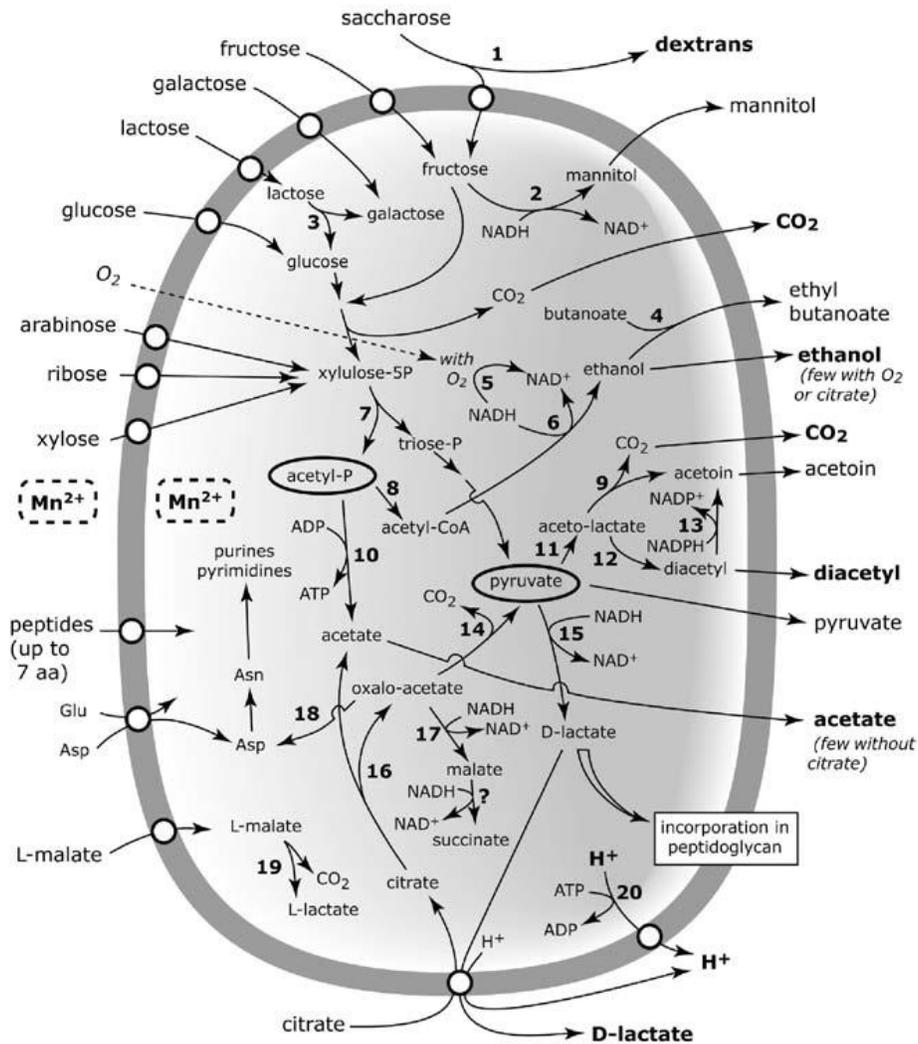
**Figura 1.** Fermentación heteroláctica (tomada de Parra, 2010).

En la Figura 2 se observa el metabolismo del género *Leuconostoc* aislado del aguamiel de *Agave salmiana*, bacteria de estudio en este trabajo.

## 1.2. Probióticos

Debido al interés de la población en mejorar su calidad de vida y erradicar problemas o desordenes gastrointestinales, la industria de alimentos en los últimos años ha puesto en el mercado los alimentos funcionales que tienen entre sus

ingredientes principales a microorganismos como los probióticos. Japón fue el primer país en introducir en el etiquetado de sus productos el término de “alimento funcional” a finales de la década de 1980, y en estos momentos sus productos representan el 50% del mercado (Stanton *et al.*, 2001).



**Figura 2.** Metabolismo general de *Leuconostoc*. Los principales productos formados se indican en negrita. Los números se refieren a enzimas involucradas o pasos: (1) dextransacarasa; (2) manitol-deshidrogenasa; (3)  $\beta$ -galactosidasa; (4) esterasa; (5) NADH oxidasa; (6) alcohol deshidrogenasa; (7) fosfoacetolasa; (8) fosfotransacetilasa, (9)  $\alpha$ -acetolactato descarboxilasa; (10) acetato quinasa; (11)  $\alpha$ -acetolactato sintasa; (12) formación no enzimática; (13) diacetyl reductasa; (14) oxaloacetato descarboxilasa; (15) lactato deshidrogenasa; (16) citrato liasa; (17) malato deshidrogenasa; (18) formación de aspartato; (19) enzima maloláctica; (20) ATPasa. Tomado de Hemme, 2004.

El término probiótico se empleó por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwel, quienes definen a los probióticos como microorganismos que estimulan el

crecimiento de otros microorganismos. En 1989 Roy Fuller los definió como microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ofrecen beneficios en la salud del huésped. Por otra parte, los probióticos son definidos por la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) en 2002 como microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ( $10^6$ - $10^9$ UFC/mL) ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped. En la Tabla 2 se presentan algunos ejemplos de cepas de bacterias lácticas empleadas como probióticos en productos comerciales.

**Tabla 2.** Cepas de bacterias lácticas empleadas como probióticos en productos comerciales (Guías prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología 2008).

MICROORGANISMO	MARCA	FABRICANTE
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173010	Activia	Danone/Dannon
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12		Chr. Hansen
<i>Bifidobacterium breve</i>	Bifiene	Yakult
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Align	Procter y Gamble
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)	Howaru™ Bifido	Danisco
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536		Morinaga Milk Industry
<i>Enterococcus</i> LAB SF 68	Bioflorin	Cerbios-Pharma
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Mutaflor	Ardeypharm
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM		Danisco
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Actimel, DanActive	Danone/Dannon
<i>Lactobacillus casei</i> CRL431		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus casei</i> F19	Cultura	Arla Foods
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult	Yakult
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (Lj1)	LC1	Nestlé
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	Norrmejeri er	

<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	GoodBelly, ProViva	NextFoods Probi
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATTC 55730	Retueri	BioGaia Biologics
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG)	Vifit y otros	Valio
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21	Verum	Norrmejerier
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>boulardii</i> ) lio	DiarSafe, Ultralevure y otros	Wren Laboratories, Biocodex, y otros
<b>Mezcla de bacterias lácticas presentes en productos comerciales</b>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 y <i>Lactobacillus casei</i> Lbc80r	Bio K+	Bio K+ International
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 y <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14	FemDophil us	Chr. Hansen
VSL#3 (mezcla de 1 cepa de <i>Streptococcus thermophilus</i> , cuatro <i>Lactobacillus spp</i> y tres cepas de <i>Bifidobacterium spp</i> )	VSL#3	Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CUL60 y <i>Bifidobacterium bifidum</i> CUL 20		
<i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> R0011	A'Biotica y otros	Institut Rosell
<i>Bacillus clausii</i> cepas O/C, NR, SIN, y T	Enteroger mina	Sanofi-Aventis

Para que una bacteria sea considerada microorganismo probiótico deben de cumplir ciertos requisitos, entre los que se encuentran (Kailasaphaty and Chin, 2000):

1. Ser de origen humano.
2. Presentar estabilidad al contacto con bilis, ácido, enzimas y oxígeno.
3. Tener la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal.
4. Producir sustancias antimicrobianas.

Las bifidobacterias son habitantes normales en el tracto intestinal, generalmente se encuentran en cantidades superiores a  $10^{10}$  UFC por cada gramo de contenido

intestinal comprendiendo cerca del 25% de la microflora (Hopkins *et al.*, 1998). El género *Bifidobacterium* se caracteriza generalmente por ser bacterias Gram positivas, existen alrededor de 30 especies entre las cuales 10 se aislaron de fuentes humanas (caries dental, heces fecales y vagina), 17 del tracto intestinal de rumiantes, 2 de agua de desecho y 1 de leche fermentada (Gomes y Malcata, 1999).

Los lactobacilos son bacterias Gram positivas, anaerobios y estrictamente fermentativos. En la actualidad se conocen 56 especies del género *Lactobacillus* distribuidas en varios nichos ecológicos como son el tracto intestinal y el tracto genital y constituyen parte importante de la microflora endógena del humano. Su distribución se ve afectada por varios factores ambientales, los cuales incluyen pH, disponibilidad de oxígeno, nivel de sustratos específicos, presencia de secreciones e interacción bacteriana (Gomes y Malcata, 1999).

Los probióticos ejercen su efecto benéfico en el ser humano, principalmente a través de los siguientes mecanismos (Guarner, *et al.*, 2009):

- Producción de sustancias antimicrobianas: ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas. Estos compuestos reducen el número de células patógenas viables, afectando el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas.
- Disminución del pH intestinal favoreciendo el crecimiento de microorganismos no patógenos.
- Aumento de la resistencia a la colonización, por competir con patógenos para unirse a los sitios de adhesión en la superficie del epitelio gastrointestinal.
- Competición por nutrientes.
- Estimulación de la respuesta inmune, protege contra la enfermedad intestinal, estimulando la producción de IgA (Inmunoglobulina A), activando

macrófagos e incrementando la concentración del IFN-gamma (interferón gamma).

Autores como Christensen y colaboradores (2002) consideran que los probióticos influyen en el sistema inmune por la capacidad que tienen para modificar la expresión de citosinas (moléculas similares a las hormonas que regulan respuestas inmunológicas). Mercenier *et al.*, (2003), mencionan que las bacterias probióticas tienen la facultad de incrementar la producción de inmunoglobulinas (IgA), la proliferación de linfocitos intraepiteliales y regulación del balance de células T-helper 1 y T-helper 2.

### **1.3. Prebióticos.**

Los prebióticos son sustancias no digeribles que brindan un efecto benéfico al huésped, estimulando selectivamente el crecimiento favorable o la actividad de un número limitado de bacterias (Simmering y Blaut, 2001), son ingredientes de gran interés por los beneficios positivos que ejercen en la composición de la microflora intestinal. Varios estudios han mostrado que estos compuestos son capaces de promover el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos en el colon, debido a que superan las condiciones del tracto intestinal sin ser hidrolizados (Kneifel *et al.*, 2000).

Los prebióticos se caracterizan por (Fooks *et al.*, 1999):

1. No ser hidrolizados ni absorbidos en la parte superior del tracto intestinal.
2. Son fermentados selectivamente por bacterias potencialmente benéficas en el colon.
3. Alteran la composición de la microflora intestinal para una composición más saludable.
4. Inducen efectos que son benéficos para la salud del huésped.

Los compuestos considerados como prebióticos comúnmente son (Douglas, 2008):

- Disacáridos.
- Oligosacáridos (galactooligosacáridos y fructooligosacáridos).
- Polisacáridos.

Los disacáridos son carbohidratos que constan de dos unidades de monosacáridos que se liberan al ser sometidos a hidrólisis. La lactulosa y el lactinol son derivados de la lactosa y son fermentados rápidamente por la microflora del colon, disminuyen las poblaciones de *Clostridium*, coliformes y *Eubacterium*, e incrementan el número de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Rycroft *et al.*, 2001).

Los oligosacáridos son glicósidos, que se encuentran en los alimentos como mezclas que contienen oligosacáridos de diferentes grados de polimerización, son solubles en agua y ligeramente dulces (Crittenden and Playne, 1996). Estos compuestos una vez que han sido ingeridos y llegan al colon, son hidrolizados a pequeños oligómeros o monómeros que son metabolizados por las bacterias de la flora intestinal y empleados como fuente de energía para su crecimiento, produciendo a su vez gases como H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y ácidos orgánicos pequeños (Delzenne and Roberfroid, 1994). Por lo anterior la ingestión de estos compuestos permite la multiplicación de algunas bacterias benéficas para el ser humano, como son las bifidobacterias y los lactobacilos. Los polisacáridos son biomoléculas formadas por la unión de una gran cantidad de monosacáridos, se encuentran entre los glúcidos y cumplen funciones diversas, sobre todo de reservas energéticas y estructurales.

#### **1.4. La microflora intestinal.**

La microflora intestinal es un ecosistema de diferentes tipos de microorganismos, que se encuentran a lo largo del tubo digestivo, la población bacteriana es

diferente en las distintas partes del tracto digestivo, debido a las condiciones de pH y por la presencia de grandes o pequeñas cantidades de oxígeno.

Los microorganismos en el organismo humano cumplen funciones importantes tales como (Upadrasta *et al.*, 2011):

1. Almacenamiento de energía, absorción de nutrientes de difícil acceso y síntesis de vitaminas.
2. Regeneración de células epiteliales.
3. Permite el desarrollo del sistema intestinal inmune (innato y adaptativo).
4. Protección al huésped de la colonización de microorganismos patógenos.

En la Tabla 3 se muestran los diferentes microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal humano y los metabolitos producidos durante la fermentación.

**Tabla 3.** Microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal humano (Rodríguez, 2009).

<b>GÉNEROS</b>	<b>OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA</b>	<b>PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN</b>
<i>Bacteroides</i>	Bacilo Gram negativo	A, P, S
<i>Eubacterium</i>	Bacilo Gram positivo	A, B, L
<i>Bifidobacterium</i>	Bacilo Gram positivo	A, L, F, E
<i>Clostridium</i>	Bacilo Gram positivo	A, P, B, L, E
<i>Lactobacillus</i>	Bacilo Gram positivo	L
<i>Ruminococcus</i>	Coco Gram positivo	A
<i>Peptostreptococcus</i>	Coco Gram positivo	A, L
<i>Peptococcus</i>	Coco Gram positivo	A, B, L
<i>Metanobrevibacter</i>	Cocobacilo Gram positivo	C
<i>Desulfovibrio</i>	Bacilo Gram negativo	A
<i>Propionobacterium</i>	Bacilo Gram positivo	A, P
<i>Actinomyces</i>	Bacilo Gram positivo	A, L, S
<i>Streptococcus</i>	Coco Gram positivo	L, A
<i>Fusobacterium</i>	Bacilo Gram negativo	B, A, L
<i>Escherichia</i>	Bacilo Gram negativo	Mezcla de ácidos

A: acetato; P: propionato; B: butirato; L: lactato; S: succinato; F: formiato; E: etanol; C: metano.

### **1.5. Efecto de los probióticos y prebióticos en el organismo humano.**

Los probióticos afectan el ecosistema intestinal estimulando los mecanismos inmunitarios de la mucosa y estimulando los mecanismos no inmunitarios a través de un antagonismo/competencia con los patógenos potenciales. Los prebióticos afectan las bacterias intestinales aumentando el número de bacterias anaerobias beneficiosas y disminuyendo la población de microorganismos potencialmente patógenos (Holzapfel *et al.*, 2001). Con lo descrito anteriormente, se considera que estos fenómenos ocurridos por los probióticos disminuyen la incidencia y gravedad de la diarrea y reducen el riesgo de cáncer de colon. La interacción entre la flora bacteriana y el huésped puede optimizarse mediante la intervención de los probióticos o prebióticos ( Saad *et al.*, 2013).

### **1.6. Agaves de México.**

Los agaves o magueyes, son considerados uno de los recursos naturales de mayor importancia en lo económico, social y agroecológico en México, se han aprovechado durante siglos como fuentes de alimento, bebida, medicina, combustible, ornato, fibras duras extraídas de las hojas (ixtle), abono, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas, entre otros usos (García Mendoza, 2007). Los Agaves poseen la capacidad de adaptarse a los ambientes más hostiles, precisamente porque en estos ambientes es donde se desarrollan y multiplican fácilmente, proporcionando una productividad más alta. Como fuentes importantes de carbohidratos se encuentran los agaves, con porcentajes del 75%, identificándose azúcares como glucosa, dextrina, almidón e inulina como el azúcar en mayor cantidad un 24% (Arrazola 1969), comparando estos valores con otras fuentes vegetales como carpintero, bermejo, los cuales contienen inulina entre un 15-20%, sin embargo, se emplea como principal fuente de extracción de inulina, la achicoria (Mancilla y López, 2006).

### **1.6.1. *Agave tequilana*.**

El *Agave tequilana* weber, es una planta de agave importante económicamente para Jalisco, México, debido a que produce el ingrediente primordial para la elaboración del tequila, bebida alcohólica obtenida de la fermentación y destilación del jugo, comúnmente llamado agave azul. Otra característica de este tipo de agave, es el contenido de azúcares en forma de fructanos, como la inulina, haciendo importante para ser considerado como un alimento prebiótico que genere el crecimiento de bacterias benéficas para la salud del ser humano (Waleckx *et al.*, 2008; Espinosa y Urias, 2012).

### **1.6.2. *Agave salmiana*.**

El *Agave salmiana* o maguey pulquero, manso o de montaña, es una planta de la familia Agavaceae. Se caracteriza principalmente por la elaboración del pulque (bebida alcohólica) a partir del aguamiel. El aguamiel es un líquido transparente viscoso, obtenido después de 6 meses de realizado el proceso de castrado del agave. Sus componentes son: agua, sacarosa, glucosa, fructosa, gomas, proteínas, minerales, vitaminas, azúcares tales como xilosa, galactosa, arabinosa y polifruktanos como la inulina (García, *et al.*, 2010; Pinos *et al.*, 2009).

## 2. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años las enfermedades gastrointestinales han aumentado considerablemente, perjudicando la salud del ser humano, las más comunes son la intolerancia a la lactosa, infecciones intestinales y problemas en el colon. Actualmente se han desarrollado productos alimenticios, cuyo interés es disminuir considerablemente tales enfermedades, entre los productos más comunes se encuentra el yogurt, elaborado a partir de la bacteria ácido láctica *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* microorganismo extraído de fuentes de origen animal, de gran interés debido a su efecto probiótico.

Es conocido de comunicaciones orales que el agua miel fresco (sin algún tratamiento de conservación) da beneficios a la salud de quien lo consume, asociado a esto se puede encontrar que como tal, posee una importante fuente de microorganismos que potencialmente pueden estar actuando como probióticos. Debido a esto surge la necesidad de obtener probióticos a partir de fuentes vegetales no convencionales, particularmente de fuentes autóctonas como es el caso del agua miel proveniente de maguey pulquero, manso o de montaña (*Agave salmiana* sp.). Por lo que en el presente estudio, se evaluó el potencial probiótico de un consorcio formado por cuatro cepas del genero *Leuconostoc mesenteroides* aisladas del agua miel de *Agave salmiana* sp.

### **3. OBJETIVOS.**

#### **3.1. Objetivo general.**

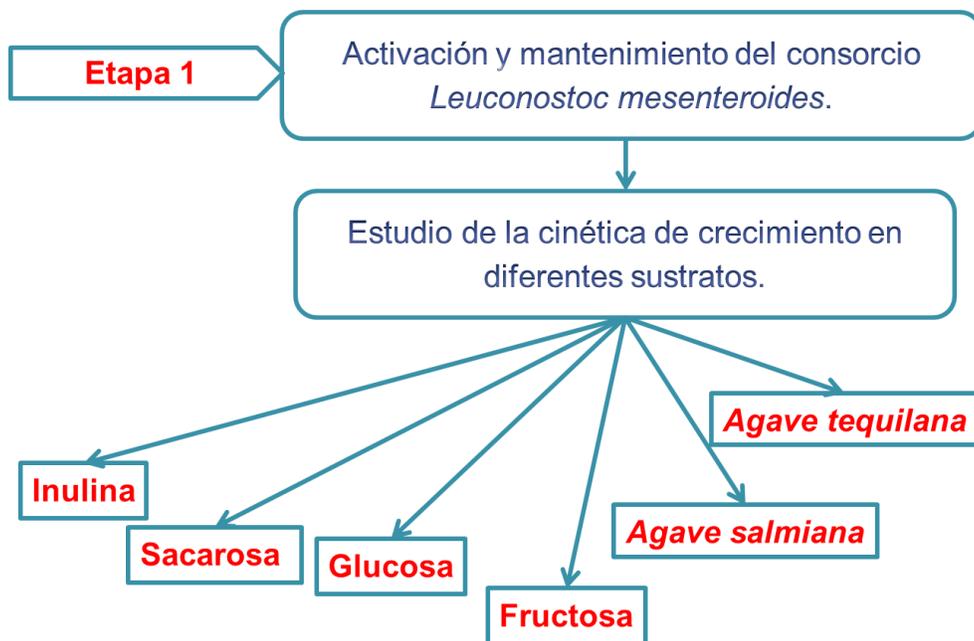
Evaluar la capacidad probiótica *in vitro* de un consorcio microbiano del género *Leuconostoc* aislado del aguamiel de *Agave salmiana* spp.

#### **3.2. Objetivos específicos.**

- Caracterizar el crecimiento del consorcio microbiano *Leuconostoc mesenteroides* y de la cepa control (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL-B-734) en diferentes sustratos.
- Determinar la resistencia del consorcio aislado y la cepa control (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL-B-734) por medio de pruebas de tolerancia a pH y sales biliares.
- Evaluar la adhesión del consorcio aislado y la cepa control (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL-B-734) en intestino de rata.
- Determinar la actividad antimicrobiana del consorcio aislado y la cepa control (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL-B-734).
- Determinar la resistencia a antibióticos del consorcio aislado y la cepa control (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL-B-734).

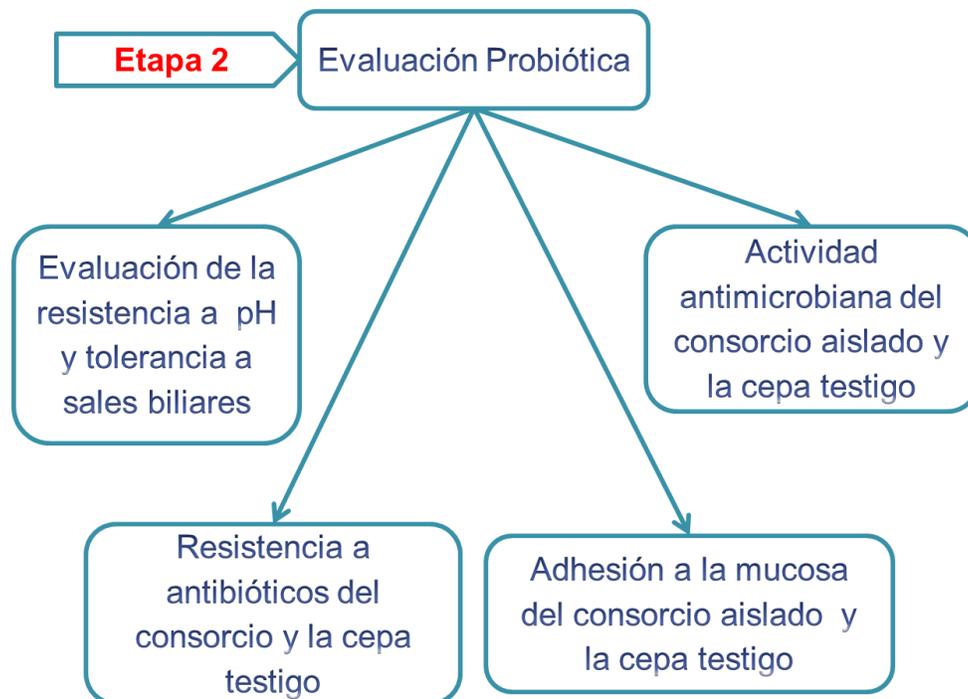
#### 4. METODOLOGÍA.

Para cumplir con el objetivo general se plantearon dos etapas en las que se dividió el trabajo a desarrollar, en la primera etapa (Figura 3) se evaluó el crecimiento tanto del consorcio como de la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL-B-734 en diferentes sustratos como fuentes de carbono, determinando con cada uno la velocidad de crecimiento, el consumo de sustrato y la disminución de pH en el medio por la generación de ácidos orgánicos producidos por la degradación de los sustratos.



**Figura 3.** Etapa 1: Sustratos evaluados en el crecimiento del consorcio de *Leuconostoc mesenteroides* y cepa testigo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

En la segunda etapa (Figura 4) se evaluó el potencial probiótico del consorcio tomando como referencia a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL-B-734.



**Figura 4.** Etapa 2: Evaluación probiótica del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y cepa testigo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

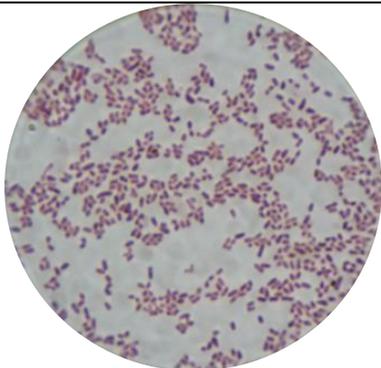
#### 4.1. Materiales.

- Medio de cultivo MRS de marca Fluka Analytical de Biochemika.
- Substratos:
  - Agua miel, obtenido de maguey pulquero, manso o de montaña (*Agave Salmiana*), proveniente del municipio de Nopaltepec Estado de México.
  - Miel de *Agave tequilana webe* de PACAR, S.A de C.V. México.
- Placas de Petri con agar MRS estériles.
- Pipetas y puntas de 0.1-1, 1-5 mL.
- Solución de HCl 6N
- Solución de NaOH 0.1N
- Solución salina de 0.85% p/p
- Bilis hepática Oxgall 0.5% (p/v)
- Buffer PBS

## 4.2. Microorganismos.

- Consorcio bacteriano aislado de maguey pulquero, manso o de montaña (*Agave Salmiana*), identificado como *Leuconostoc mesenteroides* spp.
- Cepa control: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL-B-734.
- Bacterias patógenas: *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Listeria monocytogenes*.

Todas las cepas se mantuvieron en placas Petri con medio MRS sólido en refrigeración a 8°C. En la Figura 5 se observa la descripción de la morfología colonia tanto del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* como de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL-B-734

(A)		(B)	
			
<b>Tamaño:</b> 1 a 2 mm <b>Color:</b> blanco <b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Gram:</b> positivo <b>Bacilos</b>	<b>Elevación:</b> convexa <b>Superficie:</b> lisa <b>Aspecto:</b> húmedo <b>Consistencia:</b> suave (butirosa)	<b>Tamaño:</b> 1 a 2 mm <b>Color:</b> transparente <b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Gram:</b> positivo <b>Cocos</b>	<b>Elevación:</b> elevada <b>Superficie:</b> lisa <b>Aspecto:</b> húmedo <b>Consistencia:</b> suave (butirosa)

**Figura 5.** Morfología colonial: (A) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL-B-734; (B) Consorcio *Leuconostoc mesenteroides*

### **4.3. Métodos**

#### **4.3.1. Activación y mantenimiento de los microorganismos empleados.**

El consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* se resembró cada 10 días a 30°C y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cada 20 días a 37°C, ambas bacterias en medio MRS. Los microorganismos se preservaron en congelación a -60°C empleando como agente crioprotector el glicerol a 25%.

#### **4.3.2. Caracterización de los carbohidratos por HPLC.**

Para la caracterización de las materias primas se empleó la técnica HPLC, utilizándose una columna  $\mu$ Bondapak<sup>TM</sup> NH<sub>2</sub> (3.9 x 300 mm) con flujo de 0.4mL/min y como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-agua (90:10), inyectando de cada muestra 20 $\mu$ L, se utilizó el detector de índice de refracción modelo 410 integrado a un equipo de cómputo (OptiPlex 466/Le, Dell), el control del equipo, la adquisición y el procesamiento de información se realizaron por medio del software Empower 2 (Waters).

#### **4.3.3. Estudio de la cinética de crecimiento del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en diferentes sustratos.**

Se realizaron cinéticas de crecimiento bacteriano para la cepa control y el consorcio, evaluando como fuentes de carbono: glucosa, sacarosa, fructosa, inulina, aguamiel de *Agave salmiana* y miel de *Agave tequilana*. Las cinéticas tuvieron una duración de 12 horas, se tomaron muestras cada 90 minutos, para la determinación de UFC/ml se utilizó el método de conteo en placa por extensión con varilla; disminución de pH y producción de ácido láctico (titulación con NaOH 0.1N). En la Tabla 4 se presenta la composición del medio MRS empleado para

las cinéticas, donde la fuente de carbono fue reemplazada por los diferentes azúcares nombrados anteriormente.

**Tabla 4.** Composición del medio MRS para las cinéticas (Man y Rogosa, 1960).

REACTIVOS	CANTIDAD (g/L)
<b>Fuente de carbono:</b> glucosa; sacarosa; fructosa; inulina; aguamiel de <i>Agave salmiana</i> ; miel de <i>Agave tequilana</i>	20
Peptona de caseína	10
Extracto de carne	8
Extracto de levadura	4
Acetato de sodio	5
Citrato de amonio	2
Fosfato ácido dipotásico	2
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2
Sulfato de manganeso	0.05
Agua destilada	1L
Tween 80	1mL

**Nota:** Para preparar medio sólido se agregan 12g de agar bacteriológico.

#### 4.3.4. Evaluación de la resistencia del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a pH 2.

El consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* se cultivó en caldo MRS a pH 6.5 a 30°C durante 24h. Posteriormente, del cultivo se tomaron 5mL para inocular un matraz con 50mL de caldo MRS y pH ajustado a 2 con HCl 6N (procedimiento modificado de Rondón *et al.*, 2008). Se incubó a 37°C por 3h con el fin de conservar condiciones estomacales, el experimento se realizó por triplicado. Antes de la incubación y al término de ésta (3h), se realizó determinación de viabilidad por extensión en placa, incubando las placas a 30°C durante 24h. La tolerancia a pH ácido se estimó al comparar el número de bacterias viables en agar MRS en el tiempo cero (0h) y al término del tratamiento en medio ácido (3h). El porcentaje de viabilidad se calculó como la tasa de supervivencia relativa (%TSR) empleando la ecuación 1 (Anthoula *et al.*, 2013).

$$\% \text{TSR pH} = \frac{[(\log \text{UFC}/\text{mL})_{\text{MRS pH } 6.5} - (\log \text{UFC}/\text{mL})_{\text{MRS pH } 2.0}]}{(\log \text{UFC}/\text{mL})_{\text{MRS pH } 6.5}} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Esta prueba se realizó también para la cepa control, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cambiando la temperatura de incubación de 30°C a 37°C.

#### **4.3.5. Resistencia del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a las sales biliares.**

El consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* se cultivó en caldo MRS a pH 6,5 a 30°C durante 24h. Posteriormente, del cultivo se tomaron 5mL para inocular 50ml de caldo MRS con bilis hepática Oxgall 0.5% (p/v) contenidos en un matraz (procedimiento modificado de Rondón *et al.*, 2008). Se incubó a 37°C por 4h con el fin de conservar condiciones intestinales, el experimento se realizó por triplicado. Antes de la incubación y al término de ésta (4h), se realizó determinación de viabilidad por extensión en placa, incubando a 30°C durante 24h. La tolerancia a sales biliares se estimó al comparar el número de bacterias viables en agar MRS en el tiempo cero (0h) y al término del tratamiento en medio con sales biliares (4h). El porcentaje de viabilidad se calculó como la tasa de supervivencia relativa (%TSR) empleando la ecuación 2 (Anthoula *et al.*, 2013).

$$\% \text{TSR} = \frac{[(\log \text{UFC}/\text{mL})_{\text{MRS sin sales}} - (\log \text{UFC}/\text{mL})_{\text{MRS+sales}}]}{(\log \text{UFC}/\text{mL})_{\text{MRS sin sales}}} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Esta prueba se realizó también para la cepa control, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cambiando la temperatura de incubación de 30°C a 37°C.

#### **4.3.6. Técnica de adhesión de células del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en tejido animal.**

Para evaluar la adhesión de las células del consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se utilizó intestino delgado extraído de rata blanca macho de 3 meses de edad de la cepa Wistar. El desarrollo de la técnica incluyó tres etapas: 1) preparación del cultivo bacteriano; 2) disección y preparación del tejido; y 3) cultivo de células del consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en el tejido (Cruz, 2010).

En la preparación del cultivo bacteriano, se inocularon de cada cepa 4 colonias en un matraz con 80mL de medio MRS, incubándose durante 24h a 37°C y 30°C en el caso de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y el consorcio *Leuconostoc mesenteroides*, respectivamente. Posteriormente se rotularon 3 matraces estériles con caldo MRS para cada cepa (dos duplicados y un testigo), a los cuales se les adicionaron 5mL del cultivo respectivamente.

En la preparación del tejido, se extrajo el intestino delgado y luego se abrió a lo largo para dejar expuesta la parte interna (mucosa), después se lavó 3 veces con buffer PBS a 10°C para eliminar restos del bolo alimenticio. Posteriormente el tejido se cortó en secciones de 3x1 cm, mismos que fueron colocados en caja Petri con buffer PBS estéril a 10°C.



**Figura 6.** Intestino delgado de rata con buffer PBS

Después de tener el tejido preparado (descrito anteriormente), se prosiguió a colocar 3 secciones del intestino delgado en cada uno de los matraces anteriormente descritos y se incubaron a 37°C durante 2 horas.



**Figura 7.** Cultivo de células de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* en intestino delgado.

Se tomó una muestra de 1mL del medio cada hora para determinar viabilidad por conteo en placa, al término de 2 horas de incubación se retiraron las secciones del tejido y se lavaron 3 veces con buffer PBS. Después con ayuda de una espátula estéril se raspo el tejido para desprender la mucosa y se adicionó a un tubo con solución salina de 0.85% estéril. A partir del cual se realizaron diluciones y se sembraron en placa para determinar la cantidad de bacterias adheridas a la mucosa. A cada tejido se hicieron tinciones de Gram para ver en microscopio las células adheridas. Como control negativo (testigo) se incubaron tres secciones del intestino en un matraz con caldo MRS libre de células.

La adhesión se expresó en porcentaje, calculándolo como la relación entre las bacterias que se adhirieron en el tejido y las bacterias inoculadas inicialmente, ecuación 3 (Anthoula *et al.*, 2013).

$$\% \text{ Ad} = \frac{[(\log\text{UFC/mL})_{\text{inoculo inicial}} - (\log\text{UFC/mL})_{\text{Adheridas a la mucosa}}]}{(\log\text{UFC/mL})_{\text{inoculo inicial}}} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

El procedimiento descrito anteriormente se realizó por triplicado.

#### **4.3.7. Actividad antimicrobiana del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.**

Para evaluar la acción inhibidora del consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, se incubaron cada una de estas bacterias en caldo MRS a 30°C y a 37°C respectivamente durante 24 horas. Posteriormente en placas con agar Mueller Hinton se sembraron las bacterias patógenas (*Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Listeria monocytogenes*) a una concentración de 0.5 McFarland (equivalente a  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL).

Sobre cada placa que contenía la bacteria patógena a evaluar se colocaron cilindros de 0.85cm de diámetro estériles, para depositar 150µL tanto de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como el consorcio *Leuconostoc mesenteroides*, incubando a 37°C durante 24 horas. La activación antimicrobiana se observó con la formación de halos de inhibición alrededor de los cilindros. Este procedimiento se realizó por triplicado.

#### **4.3.8. Resistencia a antibióticos del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.**

Para evaluar la resistencia a antibióticos se incubaron cada una de las bacterias (consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) en caldo MRS a 30°C y a 37°C respectivamente durante 24h. Después se sembraron en placas con agar MRS a una concentración de  $10^6$  UFC/mL, sobre cada placa se adicionó un multidisco de antibióticos marca Bio-RAD y se incubaron durante 24 horas en las condiciones que faciliten el crecimiento de consorcio *Leuconostoc mesenteroides* (30°C) y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (37°C).

La resistencia a antibióticos se observó con la formación de halos de inhibición alrededor de los discos. Este procedimiento se realizó por triplicado. Los resultados se interpretaron como sensibles (S) o resistentes (R).

#### **4.3.9. Determinación de la velocidad máxima de crecimiento bacteriano.**

La velocidad máxima de crecimiento del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, en los diferentes medios de crecimiento fueron evaluados por medio del software DMFit (2009). La interpretación de los parámetros se realizó con el modelo de Baranyi y Roberts (1994) a través de la edición web de la modelización dinámica (DM), sistema en línea utilizado por Instituto of Food Research (Instituto de Investigación Alimentaria) para modelar la variación del logaritmo del número de células bacterianas de un cultivo en función del tiempo (Márquez *et al.*, 2007).

#### **4.3.10. Preparación del tejido para observar las bacterias adheridas en la mucosa intestinal por la técnica de microscopía electrónica de barrido.**

El procedimiento empleado en la preparación del tejido para su observación en SEM, se llevó a cabo en seis pasos:

1. Fijación primaria: Se preservó la estructura del tejido vivo, evitando los procesos autolíticos. Se realizó con glutaraldehído ( $C_5H_8O_2$ ) por 12h a temperatura ambiente, reaccionando con las proteínas.
2. Lavado: Se realizó con buffer de fosfatos, con el fin de mantener el pH fisiológico (7.2 a 7.4) del tejido.
3. Fijación secundaria: Se empleó tetróxido de osmio ( $OsO_4$ ) por 2h a temperatura ambiente, reaccionando principalmente con los lípidos.

4. Deshidratación: La deshidratación se empleó para eliminar el agua en el tejido, comenzando con una concentración de etanol al 10% por 15min, siguiendo con 20%, 30% y así sucesivamente hasta llegar al 100% de etanol.
5. Secado: Se secó por punto crítico con CO<sub>2</sub>
6. Recubrimiento: El tejido se cubrió por “sputtering” de oro para obtener las mejores condiciones de imagen.
7. Observación: Después de preparada la muestra se realizó la observación de las imágenes por SEM.

#### **4.3.11. Análisis estadístico.**

Los experimentos se realizaron por triplicado y se utilizó el programa SPSS 20.0 para el análisis estadístico de los resultados, se realizó análisis de Anova de un factor, prueba de Duncan, Tukey y la prueba t para muestras independientes para detectar si hubo diferencias significativas con un nivel de significancia de 5%.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1. Análisis primera etapa: Sustratos evaluados en el crecimiento del consorcio de *Leuconostoc mesenteroides* y cepa testigo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

#### 5.1.1. Identificación de carbohidratos por HPLC.

Los resultados de identificación cualitativa obtenidos por HPLC, para cada uno de los sustratos empleados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Tiempos de retención de los diferentes sustratos empleados en las cinéticas de crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y del consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides*.

Azúcar	Tiempo de retención (min)
Fructosa	16.655
Glucosa	18.957
Sacarosa	30.261
Inulina grado alimentario	Inulina: 16.331
	Fructosa-Glucosa: 18.317-19.250
	Sacarosa: 28.604
Miel AT	Inulina: 16.623
	Glucosa: 18.679
Agua AS	Inulina: 16.613
	Sacarosa: 28.990

Los resultados obtenidos muestran en ambos agaves la presencia de inulina, diferenciándose cada sustrato por la presencia de carbohidratos más simples, en el caso del aguamiel la presencia de sacarosa (disacárido formado por glucosa y fructosa) y en la miel la glucosa en forma libre.

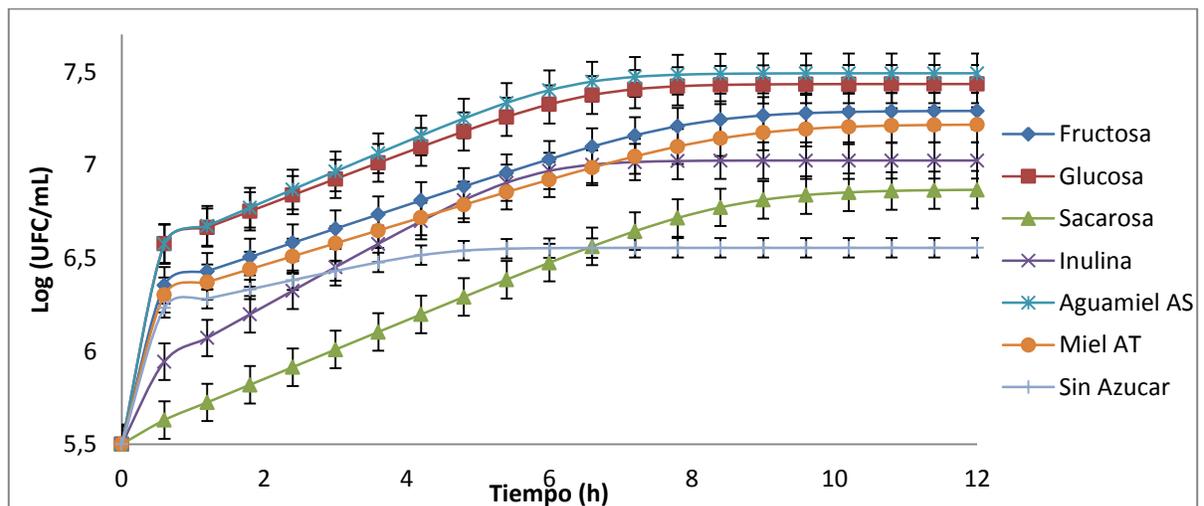
En los agaves la presencia de fructanos se debe principalmente a la adaptación bioquímica y fisiológica a los bajos niveles de CO<sub>2</sub> y a la escasa disponibilidad de

agua por lo que los sintetizan para soportar la sequía (García, 2007). La inulina grado alimentario empleada en este trabajo está compuesta por una mezcla de carbohidratos: inulina, sacarosa, fructosa y glucosa.

Los resultados de identificación mostraron que los sustratos contenían fructo-oligosacáridos, los cuales son generados por la hidrólisis de inulina, siendo aprovechados y metabolizados por las bacterias lácticas para incrementar su crecimiento (Ramírez, 2009).

### 5.1.2. Estudio de la cinéticas de crecimiento del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en diferentes fuentes de sustratos.

Se evaluó el crecimiento del consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* en medio MRS, cambiando la fuente de carbono del medio por: sacarosa, inulina, fructosa, aguamiel de *Agave salmiana* (AS) y miel de *Agave tequilana* (AT), en una concentración de 20 g/L. Las cinéticas obtenidas se observan en la Figura 8.



**Figura 8.** Cinéticas de crecimiento del consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* con diferentes fuentes de carbono a una concentración de 20g/L.

Nota: n=3, existió diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) cuando se empleó la miel de *Agave tequilana* y la fructosa, generando un crecimiento más lento comparado con las otras fuentes de carbono.

El crecimiento del consorcio de *Leuconostoc mesenteroides* en diferentes sustratos fue analizado por la prueba ANOVA de un factor y se encontró diferencias significativas ( $F=3.613$ ;  $p=0.037$ ) al emplear como fuente de carbono miel de *Agave tequilana* y fructosa, con las otras fuentes de carbono (inulina, aguamiel de *Agave salmiana*, glucosa, sacarosa) no se presentaron diferencias significativas ( $F=2.993$ ;  $p=0.056$ ).

El testigo en el que se evaluó el crecimiento en el medio MRS sin azúcar como control negativo, se observó que después de 2 horas el microorganismo no presentó crecimiento, entrando a una fase estacionaria inmediatamente.

Se presentó mayor crecimiento de los microorganismos cuando la fuente de carbono utilizada fue glucosa, y respecto a los azúcares complejos como son la sacarosa e inulina, *Leuconostoc mesenteroides* presentó mayor crecimiento al emplear como fuente de carbono la inulina, debido a que tiene en el medio mayor fuente de azúcares para su consumo comparado con sacarosa. En cuanto al consumo de sacarosa *Leuconostoc* prefiere generar el polisacárido dextrano y el monosacárido fructosa, por lo que su crecimiento es más lento, debido a que el microorganismo consumirá fructosa a la medida que este la genere (Chung y Day, 2002).

Por otro lado, al comparar los sustratos extraídos de los diferentes agaves se observó que el microorganismo tiene preferencia por su medio nativo, es decir, por el aguamiel de *Agave salmiana*, en el que se genera mayor crecimiento poblacional en comparación con la miel de *Agave tequilana*, esto se debe principalmente a la presencia de azúcares complejos como la inulina y la sacarosa, que le brindan con el tiempo monosacáridos (glucosa, fructosa) que puede degradar y consumir con mayor facilidad.

En la Tabla 6 se observa también que la velocidad de crecimiento para el consorcio de *Leuconostoc mesenteroides* es mayor con inulina grado alimentario,

seguido de sacarosa, glucosa, aguamiel de *Agave salmiana*, finalmente fructosa y miel de *Agave tequilana*.

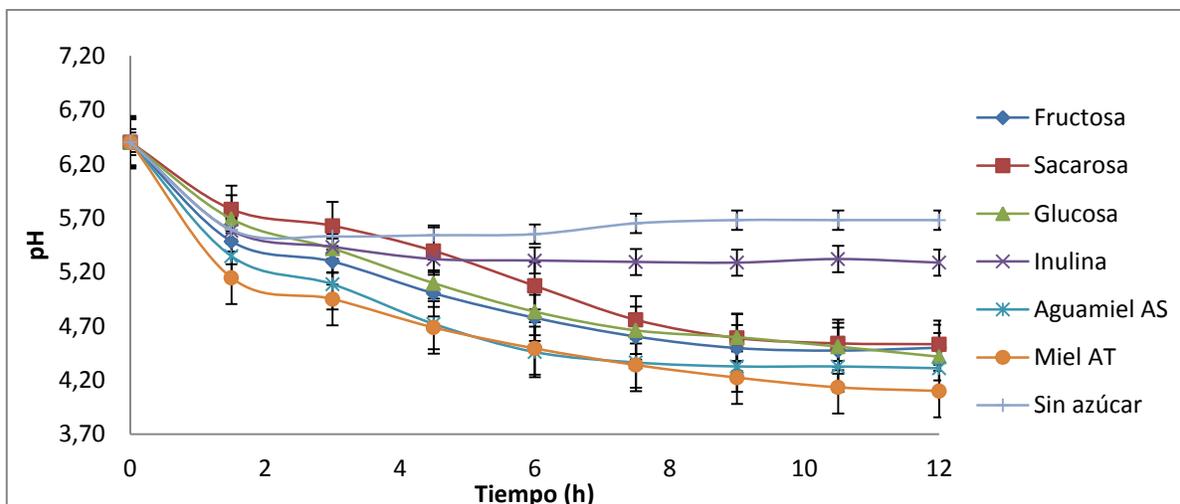
**Tabla 6.** Velocidades de crecimiento del consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* con los diferentes sustratos.

Fuente de carbono para el consorcio <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Velocidad (Log UFC/mL/h)
Aguamiel de <i>Agave salmiana</i>	0.181 ± 0.024
Miel de <i>Agave tequilana</i>	0.111 ± 0.004
Fructosa	0.155 ± 0.033
Inulina grado alimentario	0.200 ± 0.010
Sacarosa	0.194 ± 0.056
Glucosa	0.191 ± 0.044
Sin fuente de carbono	0.083 ± 0.002

Nota: Los valores presentados son el promedio de 3 repeticiones ± D.E.

El consorcio *Leuconostoc mesenteroides* presentó preferencia por la inulina, considerada como producto prebiótico que estimula un crecimiento óptimo, ayudando a reducir las enfermedades gastrointestinales (Gibson, 2004). En cuanto a los agaves se observó preferencia por el aguamiel de *Agave salmiana*, atribuyéndose este comportamiento a la inulina encontrada en este sustrato. En el 2009, Ramírez evaluó el efecto prebiótico de la inulina de *Agave salmiana* en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* reportando una velocidad específica de 1.697 UFC/mL/h menor a la encontrado en este trabajo.

Respecto a la disminución de pH y producción de ácido láctico debido al consumo de diferentes sustratos por el consorcio *Leuconostoc mesenteroides*, los resultados se observan en la Figura 9.



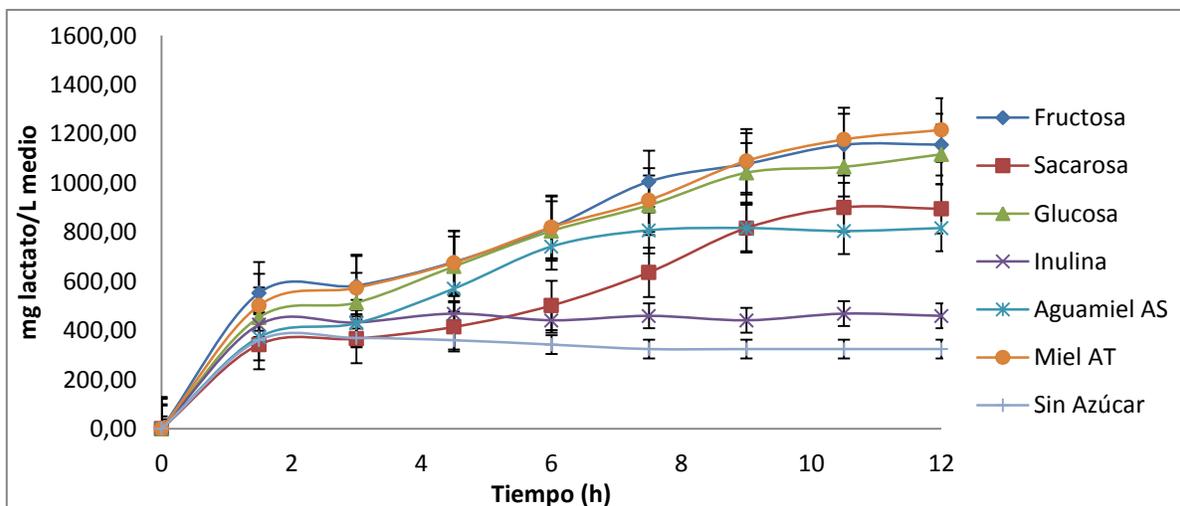
**Figura 9.** Disminución de pH en el medio con diferentes azúcares para el consorcio *Leuconostoc mesenteroides*.

Nota: n=3, existió diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) cuando se empleó la inulina, siendo la reducción de pH de 6.4 a 5.3

Al realizar el análisis de ANOVA de un factor se encontró diferencia significativa ( $F=3.074$ ;  $p=0.023$ ) en la reducción de pH al emplear la inulina, cuya disminución fue de 6.4 a 5.3 inferior a lo que se obtuvo con las otras fuentes de carbono.

La disminución de pH en las bacterias probióticas es causada por la generación de ácidos grasos de cadena corta (propiónico, butírico, acético y láctico), los cuales inhiben el crecimiento de bacterias patógenas (Correia *et al.*, 2012). Al observar el comportamiento de *Leuconostoc mesenteroides* sobre los sustratos obtenidos de los agaves se presenta una significativa reducción del pH en un intervalo de 6.4 a 4.10.

En cuanto a los ácidos grasos de cadena corta causantes de esta disminución de pH se determinó la producción de ácido láctico (Figura 10), observándose mayor cantidad cuando se emplea fructosa, miel de *Agave tequilana* y glucosa como sustratos. Según el metabolismo general de *Leuconostoc* (Hemme y Foucaud, 2004), este ácido se produce por la presencia de azúcares como fructosa y glucosa que se degradan a xilulosa, la cual se deshidrata en piruvato para finalmente formar el ácido D-láctico.



**Figura 10.** Producción de lactato por el consumo de diferentes sustratos en el consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides*.

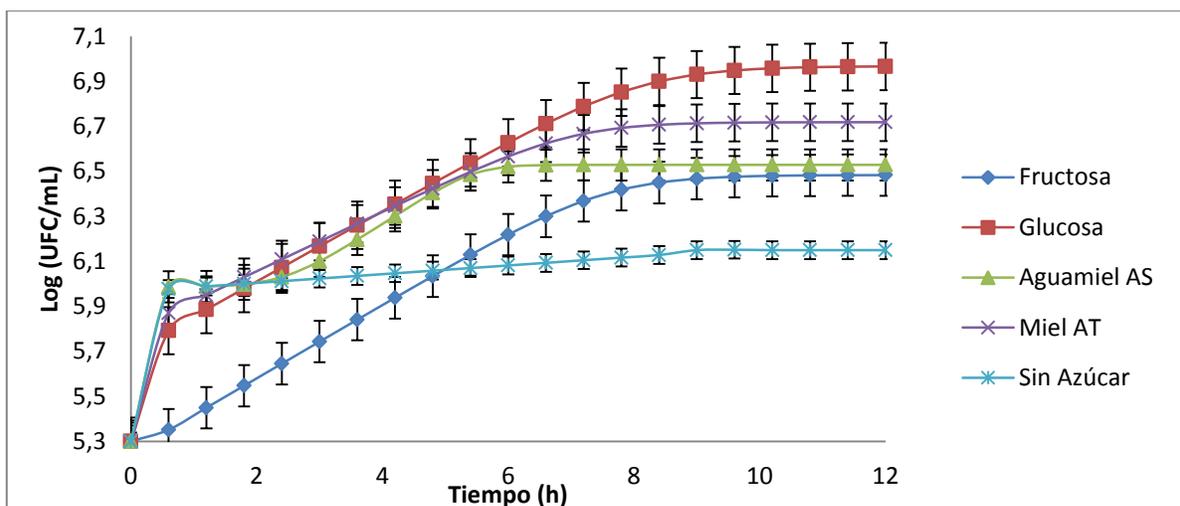
Nota: n=3, existió diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) cuando se empleó la inulina en la producción de lactato siendo menor su rendimiento.

Con el análisis de ANOVA de un factor se encontró diferencia significativa ( $F=19.242$ ;  $p=0.000$ ) cuando se empleó la inulina en la producción de ácido láctico. El rendimiento relativo de la inulina fue de 37.7% respecto a la miel de *Agave tequilana* (100%).

La producción de lactato a partir de *Leuconostoc* a una temperatura de 30°C y sin agitación fue de 122mg/100mL, dato similar al reportado por Sánchez (2005), quien trabajo con excesos de glucosa en el medio, llegando a reportar concentraciones de ácido láctico de 680mg/100mL.

En la Figura 11 se observa las cinéticas de crecimiento para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, realizándose un control negativo, cuyo comportamiento muestra la necesidad de la fuente de carbono para generar el crecimiento de bacterias ácido lácticas. Las curvas indican que el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fue favorable en el medio estándar de referencia MRS (con glucosa como fuente de carbono), en comparación con el medio empleando fructosa como fuente de carbono. En cuanto a los sustratos extraídos de los diferentes agaves no se observó ninguna diferencia significativa.

Sin embargo, al comparar las velocidades de crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Tabla 7), se observó que las máximas velocidades de crecimiento se obtuvieron cuando se utilizaron como sustratos aguamiel de *Agave salmiana* y miel de *Agave tequilana*. Estos resultados muestran que la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tiene mayor afinidad por el aguamiel que por la miel de *Agave tequilana*, pudiendo ser atribuido este comportamiento al incremento que hay en fructo-oligosacaridos en el aguamiel, lo cual, produce un aumento en el crecimiento bacteriano, resultados que coinciden con los obtenidos por Miñana (2007), quien genera el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos al aumentar la concentración de inulina en el medio.



**Figura 11.** Cinéticas de crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* con diferentes fuentes de carbono a una concentración de 20g/L.

Nota: n=3, existió diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) cuando se empleó el aguamiel de *Agave salmiana*, generando el mejor crecimiento comparado con las otras fuentes de carbono.

Al realizar la prueba de ANOVA de un factor se encontró diferencias significativas ( $F=25.815$ ;  $p=0.000$ ) en el crecimiento de la bacteria al emplear como fuente de carbono el aguamiel de *Agave salmiana*, mientras que con las otras fuentes de carbono (miel de *Agave tequilana*, glucosa, fructosa) no se presentaron diferencias significativas ( $p=0.110$ ).

**Tabla 7.** Velocidades de crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* con los diferentes sustratos.

<b>Fuente de carbono para <i>Lactobacillus delbrueckii</i></b>	<b>Velocidad (Log UFC/mL/h)</b>
Aguamiel de <i>Agave salmiana</i>	0.231 ± 0.045
Miel de <i>Agave tequilana</i>	0.134 ± 0.012
Fructosa	0.155 ± 0.046
Glucosa	0.111 ± 0.039
Sin fuente de carbono	0.019 ± 0.001

Nota: Los valores presentados son el promedio de 3 repeticiones ± D.E.

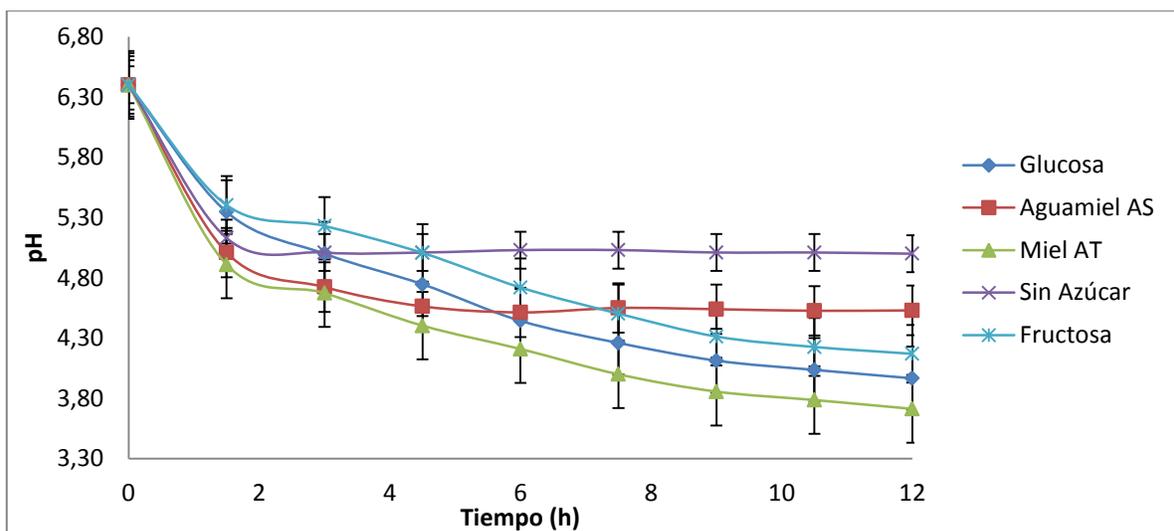
Rendón (2009), quien evaluó el efecto prebiótico de los fructanos presentes en una especie de *Agave* a diferentes concentraciones, encontró que a mayor concentración, mayor crecimiento microbiano. Existiendo una relación directamente proporcional, del incremento de la velocidad de crecimiento microbiano conforme aumenta la concentración de fructanos.

En estudios realizados por Urias *et al.*, (2004), Escalante *et al.*, (2006) y Donkor *et al.*, (2007), se demostró que empleando sustratos como glucosa e inulina el crecimiento de bacterias ácido lácticas fue significativo, respecto al crecimiento obtenido con glucosa y fructosa. Comportamiento similar se observó en las cinéticas realizadas en este trabajo, donde *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* presentó menor velocidad de crecimiento cuando se emplea glucosa sola en el medio, lo que permite inferir que el efecto prebiótico ocurre cuando los monosacáridos, fructosa y glucosa se encuentran unidos por enlaces β-2-1 formando oligosacáridos como la inulina, la cual es hidrolizada por la enzima β-fructofuranosidasa en sus azúcares simples, para ser metabolizada por la bacteria (Rossi *et al.*, 2005).

Otros parámetros evaluados durante las cinéticas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, fueron la disminución de pH y la producción de ácido láctico. En la Figura 12, se puede observar el comportamiento del pH del medio para las diferentes fuentes de carbono, el cual es similar al obtenido para los diferentes

sustratos y el consorcio *Leuconostoc*. Esto puede relacionarse debido a que en términos generales es una característica de todas las bacterias ácido lácticas, la generación de ácidos grasos de cadena corta como ácido propiónico, butírico, acético y láctico (Correia *et al.*, 2012).

La disminución de pH en el medio al emplear *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es mayor cuando en el medio está presente la miel de *Agave tequilana* donde el pH disminuye de 6.4 a 3.71. Esta disminución de pH, se debe a productos metabólicos, los cuales ejercen una acción antagónica contra otros organismos, evitando el crecimiento de patógenos (Figuroa, 2007).



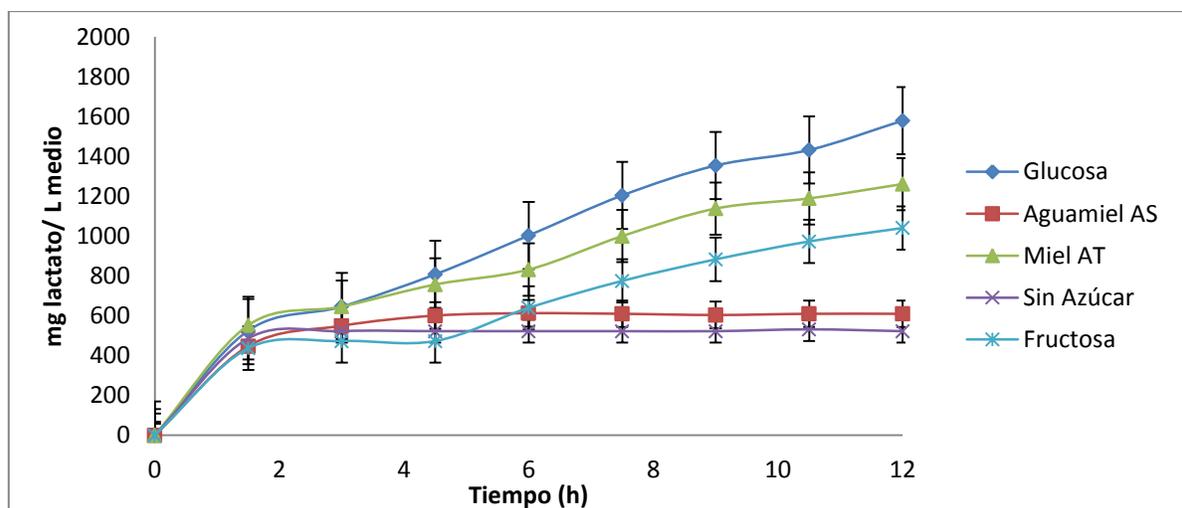
**Figura 12.** Disminución de pH en el medio con diferentes azúcares para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Nota: n=3, existió diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) cuando se empleó la miel de *Agave tequilana*, siendo la reducción de pH de 6.4 a 3.71

El análisis de ANOVA respecto a la reducción de pH se encontró diferencias significativas ( $F=384.803$ ;  $p=0.000$ ) al emplear la miel de *Agave tequilana*, siendo este comportamiento superior al obtenido por las otras fuentes de carbono (glucosa, fructosa, aguamiel).

Entre los productos metabólicos se tiene el ácido láctico, formado por la fermentación de glucosa. En la Figura 13 se reporta la producción de este

metabolito, obteniéndose mayor rendimiento cuando el microorganismo consume glucosa (100%) y miel de *Agave tequilana* (80%). En el ANOVA de un factor se encontró diferencia significativa ( $F=1149.607$ ;  $p=0.000$ ) cuando se empleó el aguamiel de *Agave salmiana* en la producción de lactato. El rendimiento relativo del aguamiel respecto a la glucosa fue de solo 38%.



**Figura 13.** Producción de lactato empleando diferentes fuentes de carbono por la cepa testigo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Nota:  $n=3$ , existió diferencia significativa ( $p<0.05$ ) cuando se empleó el aguamiel de *Agave salmiana* en la producción de lactato siendo menor su rendimiento.

La producción de ácido láctico a partir de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se ve afectada por la concentración de los carbohidratos en el medio. Al respecto Costa *et al.*, (2008) reportan que al emplear un medio que contiene glucosa, fructosa, extracto de levadura al 1% (p/v) y minerales (K, Mg y Mn) durante la evaluación de la producción de los isómeros de ácido láctico a partir de cepas de *Lactobacillus* aisladas de una fermentación alcohólica, la producción de los isómeros de ácido láctico fue mayor cuando la muestra fue enriquecida por azúcares precursores de piruvato, a partir del cual se obtiene el ácido láctico. Escobar *et al.*, (2010) evaluaron la producción de ácido láctico, enriqueciendo el suero de leche de vacuno con diferentes cantidades de glucosa empleando como máximo 5%, encontrando que la producción del metabolito tuvo una relación directamente proporcional con la concentración de glucosa.

Resultados similares fueron obtenidos en este trabajo, observándose una diferencia significativa ( $p=0.000$ ), cuando es empleado como sustrato la miel de *Agave tequilana* (1261 mg/L) comparada con el aguamiel de *Agave salmiana* (609 mg/L). Esta diferencia se debe principalmente a los monosacáridos encontrados en cada agave (analizados por HPLC, sección 4.1.1), observándose la presencia de glucosa únicamente en la miel de *Agave tequilana* y no en el aguamiel de *Agave salmiana*, comprobándose de esta manera que la glucosa aumenta la producción del ácido láctico, análisis demostrado también en los estudios reportados por Escobar *et al.*, (2010), Zhang *et al.*, (2007) y Ding *et al.*, (2006).

## **5.2. Análisis segunda etapa: Evaluación probiótica del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y la cepa testigo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.**

### **5.2.1. Evaluación de la resistencia de cepas a pH 2 y sales biliares (0.5% p/v).**

Se evaluó la resistencia del consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* en condiciones tanto estomacales como intestinales *in vitro*, los resultados fueron comparados con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, cepa considerada en este trabajo como testigo, debido a que en algunas ocasiones es considerada probiótica. En la Tabla 8, se presenta la viabilidad tanto del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* como la bacteria control *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, expresada como la tasa de supervivencia relativa (%TSR), tratadas a pH 2 y 0.5% (p/v) sales biliares. Se observó que el consorcio *Leuconostoc mesenteroides* tiene una TSR 17.6 % mayor respecto a la cepa control y en sales biliares una TSR 5.6% mayor con respecto a la cepa control.

Por medio de la prueba t, se obtuvieron diferencias significativas tanto para el pH ( $t=4.9$ ;  $p=0.008$ ) como para las sales biliares ( $t=9.9$ ;  $p=0.001$ ). Siendo en ambos

casos el consorcio *Leuconostoc mesenteroides* el que presentó mejor resistencia a pH 2 y sales biliarias (Tabla 8).

**Tabla 8.** Viabilidad del consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a pH 2 y sales biliarias 0.5%.

Bacteria	%TSR	
	pH 2	Sales biliarias (0.5% p/v)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	56.540 ± 5.730	8.060 ± 0.790
Consortio <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	74.160 ± 2.420	13.640 ± 0.550

Nota: Los valores presentados son el promedio de 3 repeticiones ± D.E.

Los resultados obtenidos en este trabajo presentan diferencias respecto a los reportados por Anthoula *et al.*, 2013, quienes evaluaron el potencial probiótico de 71 cepas de bacterias ácido lácticas (17 *Leuconostoc mesenteroides*, 1 *Leuconostoc pseudomesenteroides*, 13 *Lactobacillus plantarum*, 37 *Lb. pentosus*, 1 *Lb. paraplantarum* y 2 *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*) aisladas de aceitunas fermentadas, empleando como bacterias control *Lactobacillus rhamnosus* CG., y *Lb. casei* Shirota, quienes concluyeron que el género *Lactobacillus* presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a las condiciones gastrointestinales que fueron sometidas, cuyos resultados de viabilidad fueron de 64-98% a un pH 2.5 evaluado después de 3h y 88-100% para sales biliarias (0.5% p/v) después de 4h.

En los resultados obtenidos en este trabajo, el consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a las condiciones gastrointestinales a las que fue evaluado, con valores en viabilidad de 74.160% a un pH 2 evaluado después de 3h y 13.40% en 0.5% p/v de sales biliarias después de 4h. Estos valores fueron superiores a los de la bacteria control con 17.620% a pH 2 y 5.580% en 0.5% p/v de sales biliarias.

En otro estudio realizado en el 2012 por Cueto y Aragón, quienes evaluaron la tolerancia de 53 cepas del género *Lactobacillus* aisladas del suero costeño a pH 2 y 0.3% de sales biliares ambos evaluados después de 2h, obtuvieron valores de 19.10% - 55.68% TSR para pH 2 y 46.24% - 64.77% para sales biliares (0.3%). Los valores obtenidos por estos autores en cuanto a pH son inferiores en 55% a los obtenidos por el consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y por la cepa control *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Por el contrario los resultados de sales biliares de los autores Cueto y Aragón son mayores aproximadamente en 40% con los reportados para el consorcio *Leuconostoc* y la cepa control *Lactobacillus delbrueckii*.

De acuerdo con otros estudios, tanto la tolerancia a sales biliares como la viabilidad a bajo pH, son uno de los criterios más importantes para seleccionar una bacteria como un potencial probiótico (Nguyen, *et al.*, 2007; Kim y Austin, 2008). Cebeci y Gurakan (2003) determinaron que *Lactobacillus plantarum* bacteria probiótica sobrevive a pH 4 y a 0.3% de sales biliares. Nguyen *et al.*, (2007) reportaron crecimiento de *Lactobacillus plantarum* PH04 en un rango de 0 a 0.4% de sales biliares y viabilidad a pH entre 6 y 10. Kamaledin *et al.*, (2012), aislaron una cepa de *Leuconostoc mesenteroides* del intestino de una especie de pez cabeza de serpiente (*Channa striatus*), encontrando cambios significativos ( $p < 0.5$ ) en la velocidad de crecimiento de pH 2 a 8, la cual no presentó ninguna actividad y viabilidad a pH 2 después de 2 h, pero a pH 3 a 8 su viabilidad y crecimiento mejora. En cuanto a la tolerancia a sales biliares, presenta viabilidad a 0.15% y 0.3% de concentración de sales biliares. Comparando estos resultados con los hallados por el consorcio *Leuconostoc mesenteroides* se confirma que esta bacteria puede sobrevivir a las condiciones gastrointestinales y por lo tanto considerarse como un potencial probiótico.

### 5.2.2. Adhesión de células bacterianas en tejido.

Los resultados obtenidos respecto a la adhesión del consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se muestran en la Tabla 9. Con la finalidad de observar estas bacterias adheridas al intestino de la rata se realizó una tinción de Gram de la mucosa intestinal después de 2 horas de incubación (Figura 14), observándose una coloración violeta, el cual indicó la presencia de las bacterias *Lactobacillus delbrueckii* y *Leuconostoc mesenteroides*.

**Tabla 9.** Adhesión del consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en mucosa intestinal.

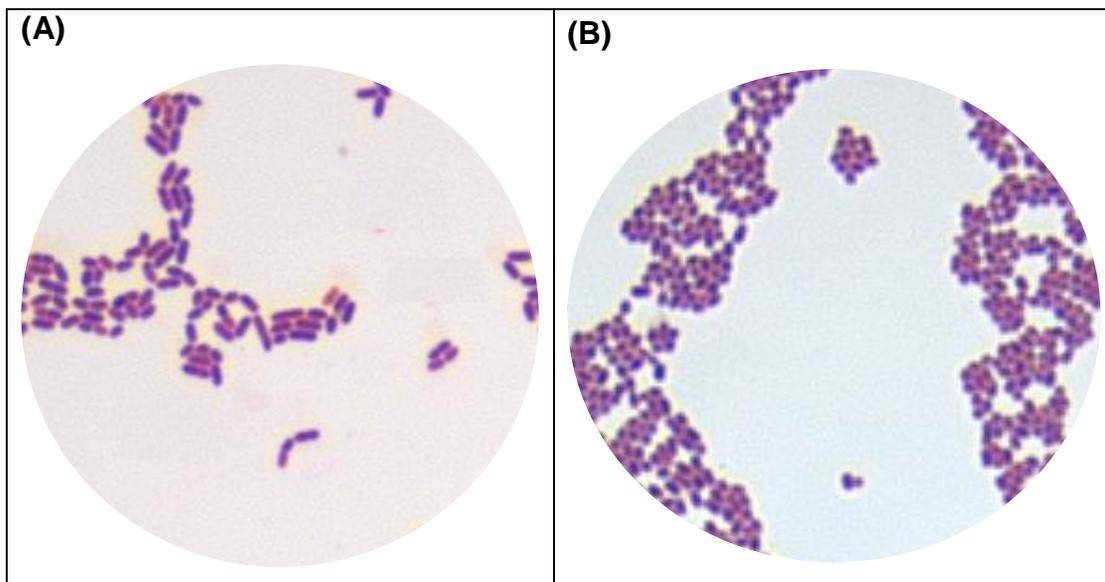
<b><i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> %Adhesión</b>	<b>Consorcio <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> %Adhesión</b>
13.950 ± 2.786	15.553 ± 1.355

Nota: Los valores presentados son el promedio de 3 repeticiones ± D.E.

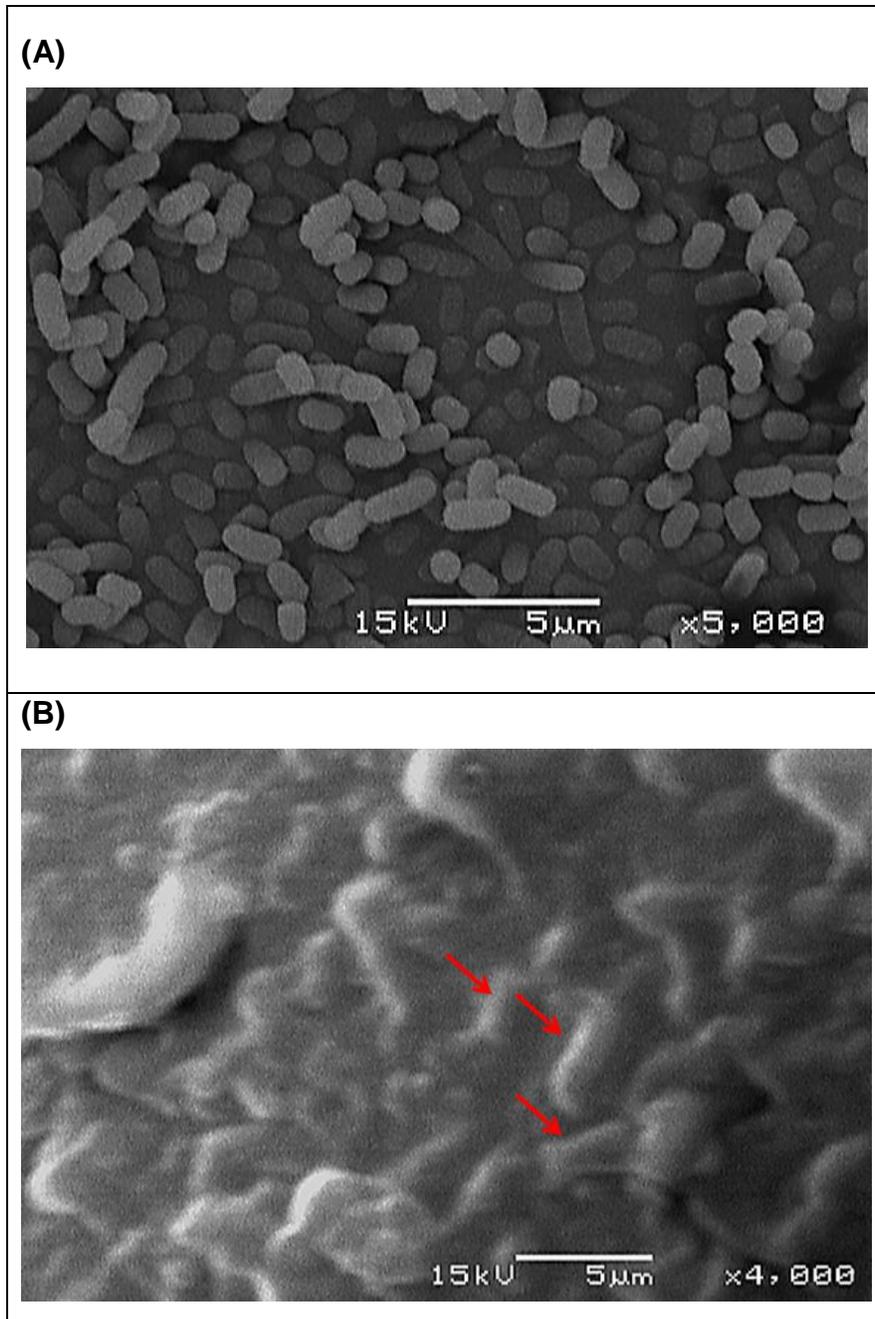
La adhesión de microorganismos puede ser afectada por múltiples mecanismos, como puede ser la interacción de la superficie de la estructura y las condiciones ambientales (Ferrarini *et al.*, 2003). De esta manera, los resultados obtenidos muestran una buena capacidad de adherencia a las paredes intestinales de las ratas, particularmente respecto a una bacteria comercial como lo es *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Según Collado y colaboradores (2010) la adhesión de bacterias está basada en fuerzas electrostáticas y de van der Waals entre la célula y la superficie de la mucosa, explicada por la teoría DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek). En la Figura 15 y 16 se observan las imágenes por microscopía electrónica de barrido donde se comprueba esta propiedad de adherirse a la mucosa.

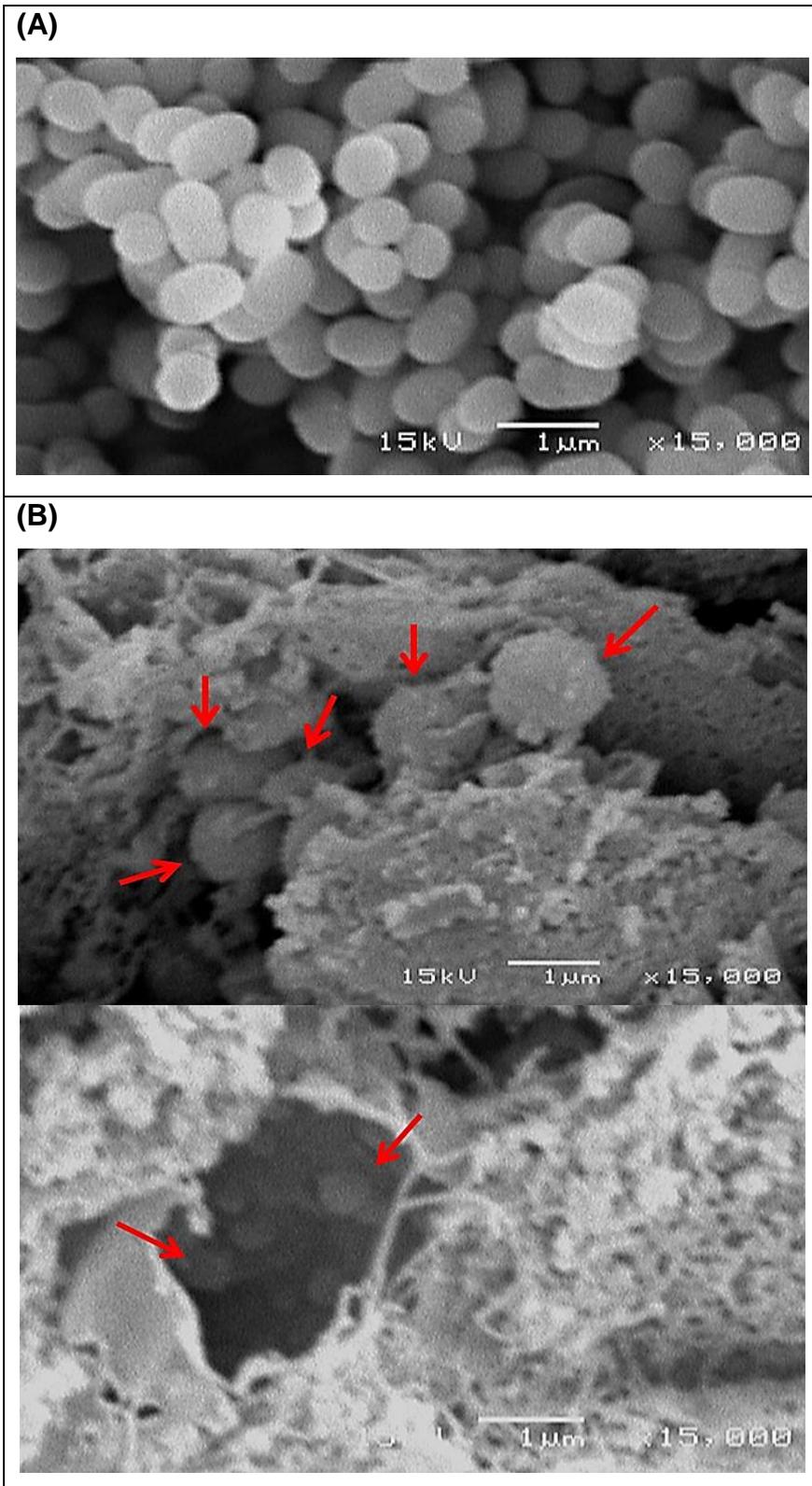
Los resultados de adhesión analizados por una prueba t, no mostraron diferencias significativas ( $t=0.642$ ;  $p=0.544$ ) para la adhesión en la mucosa intestinal. Tanto en la bacteria control como en la bacteria estudiada se obtienen resultados similares, resaltando que la capacidad de adhesión a las células epiteliales es un parámetro para ser consideradas como probióticas (Collado *et al.*, 2007). Los porcentajes de adhesión del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y la cepa control *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, son similares a los obtenidos por Izquierdo y colaboradores (2009). Quienes emplearon la proteómica para explicar la adhesión de tres cepas de *Lactobacillus plantarum* a la mucosa, reportando valores de adhesión de 1.4% a 15.9%. Un modelo preparado de mucina de porcina comercial fue usado para medir la adhesión, observándose la formación de varias proteínas, encargadas de llevar a cabo la adhesión, como son: deshidrogenasa gliceraldehido-3-fosfato; cisteína aminopeptidasa; deshidrogenasa D-lactato y S-ribosilhomocisteinasa.



**Figura 14.** Tinción de Gram a la mucosa intestinal, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (A); Consorcio *Leuconostoc mesenteroides* (B).



**Figura 15.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) **(A)** *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* libres a 5µm a 5000x y **(B)** *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* adheridas a la mucosa intestinal a 5µm a 4000x.



**Figura 16.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) **(A)** Consorcio *Leuconostoc mesenteroides* libres a 1 $\mu$ m a 15000x y **(B)** Consorcio *Leuconostoc mesenteroides* adheridas a la mucosa intestinal a 1 $\mu$ m a 15000x.

Por otra parte Cruz (2010), reportó adhesión a la mucosa intestinal de células de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 74% cuando las células están inmobilizadas y un 3% en células libres, resultados similares fueron obtenidos en este trabajo para células libres. En otros estudios en los que se evaluó la propiedad de adhesión, se trabajó con células carcinomas del colon humano (Caco-2), obteniéndose porcentajes de adhesión del 30 al 60% (Anthoula *et al.*, 2013), siendo superiores a los obtenidos cuando solo se emplea la mucosa intestinal. Estos resultados se diferencian uno del otro principalmente por el modelo *in vitro* utilizado. La línea celular Caco-2, son enterocitos maduros que no producen mucina y no contienen un sistema complejo de sustancias, facilitando la adhesión de las bacterias (Pignata *et al.*, 1994). Sin embargo, el tejido de mucosa intestinal se encuentra compuesto de células epiteliales que secretan mucina, la cual es una mezcla compleja de glicoproteínas que conforman la mucosa. Adicionalmente lípidos, proteínas libres, inmunoglobulinas y sales están presentes en el gel de la mucosa, dificultando la adhesión de las bacterias (Bermúdez *et al.*, 2012) y representa un modelo más real para la prueba de adhesión, encontrándose la microbiota común del intestino.

### **5.2.3. Actividad antimicrobiana.**

Para evaluar la actividad antimicrobiana se emplearon bacterias causantes de las enfermedades gastrointestinales del hombre, como son la *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. En la Tabla 10 se muestran las cepas patógenas empleadas en la evaluación de la actividad antimicrobiana, observándose que el consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* y la cepa control *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* inhibieron el crecimiento de estas bacterias patógenas. Los halos de inhibición se encontraron en un rango de 0.667 a 2.667 cm para el consorcio y 1.300 a 1.867 cm para la cepa control. Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.003$ ) en las inhibiciones de crecimiento de patógenos respecto al consorcio *Leuconostoc*

*mesenteroides*, siendo mejor su actividad antimicrobiana comparada con la cepa control.

De acuerdo con la prueba de ANOVA de un factor el consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y la cepa control (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) presentaron diferencias significativas ( $F=186.187$ ;  $p=0.000$ ) respecto al tamaño del halo de inhibición frente a las 6 bacterias patógenas (*Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Listeria monocytogenes*).

**Tabla 10.** Inhibición de patógenos por el consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

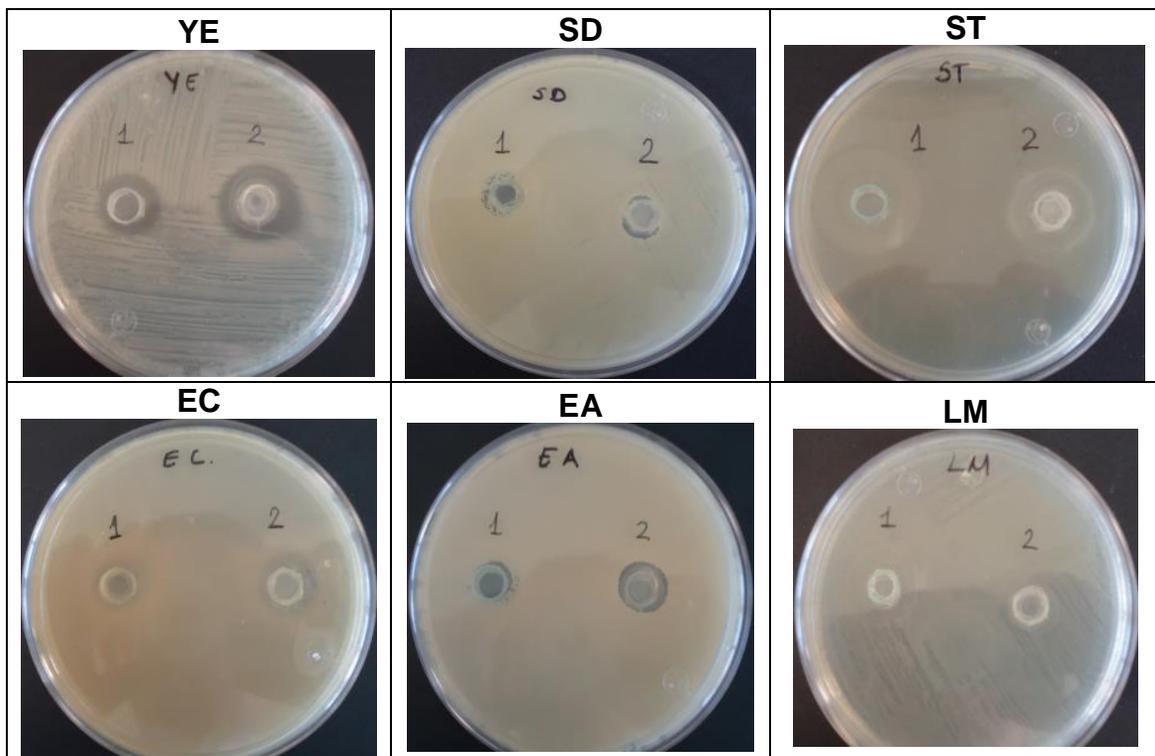
Bacteria	Inhibición del Consorcio <i>Leuconostoc</i> (cm)	Inhibición de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (cm)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1.433 ± 0.115	1.867 ± 0.115
<i>Shigella dysenteriae</i>	0.667 ± 0.058	1.333 ± 0.351
<i>Salmonella typhimurium</i>	2.667 ± 0.115	1.600 ± 0.200
<i>Escherichia coli</i>	1.200 ± 0.000	1.433 ± 0.058
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1.100 ± 0.100	1.300 ± 0.100
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.823 ± 0.136	NI

Nota: Los valores presentados son el promedio de 3 repeticiones ± D.E

En la Figura 17 se observan las inhibiciones presentes en las placas alrededor de los cilindros.

Estos resultados de inhibición son mejores que los reportados por Guglielmotti y colaboradores en el 2007, quienes evaluaron la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* frente a bacterias patógenas Gram negativas como *Salmonella sp.* y *E. coli* con diámetros de inhibición de 0.470 a 1.060 cm, y para bacterias patógenas Gram positivas como *S. aureus* y *L. monocytogenes* de 0.980 a 1.630 cm.

La inhibición al crecimiento de patógenos es causada por la disminución del pH en el medio, debido a los ácidos orgánicos producidos (especialmente ácido láctico y ácido acético) por éstas bacterias (consorcio y cepa control) (Tejero *et al.*, 2012; Marianelli *et al.*, 2010). La capacidad para producir diferentes compuestos antimicrobianos puede ser una de las características principales para la exclusión competitiva efectiva de la supervivencia de patógenos en el intestino y la expresión de un efecto probiótico para la bacteria no patógena (Ouwehand y Salminen, 1998; Tejero *et al.*, 2012).



**Figura 17.** Halos de inhibición de las diferentes cepas patógenas. Consorcio *Leuconostoc mesenteroides* (1); *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (2); *Yersinia enterocolitica* (YE); *Shigella dysenteriae* (SD); *Salmonella typhimurium* (ST); *Escherichia coli* (EC); *Enterobacter agglomerans* (EA); *Listeria monocytogenes* (LM).

Las condiciones ácidas en el estómago pueden incluso mejorar la actividad de estos compuestos antimicrobianos (Gänzle *et al.*, 1999). Además, estas características probióticas en parte pueden estar basadas en la producción de concentraciones pertinentes de ácido láctico en el medio, que en combinación con

un detergente tal como sales biliares, inhibe el crecimiento de las bacterias Gram-negativos patógenos (Begley *et al.*, 2005).

#### **5.2.4. Resistencia a antibióticos.**

En la Tabla 11 se presentan los resultados de la resistencia de las bacterias estudiadas respecto a diferentes antibióticos. Durante este ensayo, se observó la resistencia del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y la cepa control *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a los diferentes grupos de antibióticos: inhibidores de la pared celular, como son: penicilina, dicloxacilina y ampicilina; inhibidores de la síntesis de proteínas (tetracilina, gentamicina, eritromicina, cefalotina, cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima) e inhibidores de la síntesis del DNA y RNA (pefloxacina y trimetaprim). Tanto para el consorcio *Leuconostoc mesenteroides* como *Lactobacillus delbrueckii* se observó resistencia a la penicilina (6.25 µg), a la dicloxacilina (1 µg), a la pefloxacina (5 µg). La concentración de ambas bacterias fue de 10<sup>6</sup> UFC/mL, incubadas durante 24 horas a 30°C para el consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y 37°C para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, sin embargo, el consorcio resistió a la ceftazidima comportamiento no observado con la cepa control. Esta diferencia puede ser debida principalmente a los métodos de resistencias que codifican las bacterias en el plásmido a cierto antibiótico (Courvalin, 2006).

Las enzimas β-lactamasas son las encargadas de dar resistencia a las bacterias frente al antibiótico ceftazidima, las cuales se encuentran codificadas por los genes CTX-M-2, CTX-M-3 y ampC (Kimura *et al.*, 2007; Eumkeb *et al.*, 2013). Con lo anterior se induce la posible presencia de alguno de estas genes en el consorcio *Leuconostoc mesenteroides*, causando la resistencia a la ceftazidima. Sin embargo, esto debe ser comprobado estudiando el genoma del consorcio *Leuconostoc mesenteroides*.

En el trabajo realizado por Anthoula y colaboradores en el 2013, se evaluó la resistencia a antibióticos de varias cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, encontrándose resistencia a los antibióticos inhibidores de la pared celular, comportamiento semejante al obtenido por las bacterias empleadas en este trabajo. Generalmente las bacterias Gram positivas desarrollan una resistencia transmisible mediada por plásmidos (Pérez, 1998), que puede pasar de una bacteria a otra. Emplean un mecanismo de inactivación del antibiótico por enzimas, en el caso de bacterias ácido lácticas Gram positivas (consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) producen  $\beta$ -lactamasas (Hummel *et al.*, 2007).

En la Figura 18 se presentan las imágenes de los multidiscos con los halos formados alrededor de cada antibiótico. Estos resultados coinciden con los aportados en el trabajo de Rodríguez en el 2009, en el que se destacan que las cepas de *Lactobacillus* son sensibles a la mayoría de antibióticos de elección en terapéutica humana y veterinaria, ante procesos cuyo agente etiológico sean bacterias Gram positivas, esta sensibilidad se debe principalmente a que carecen de genes resistentes a los antibióticos pertenecientes a la familia del anillo  $\beta$ -lactámico como: erm (A), erm (B), vat (E), cat-TC (Mayrhofer *et al.*, 2010). Este comportamiento fue observado también con el género *Leuconostoc mesenteroides*.

**Tabla 11.** Resistencia del consorcio *Leuconostoc mesenteroides* y la cepa control *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a diferentes antibióticos.

Antibióticos		Inhibición del Consorcio <i>Leuconostoc</i>	Inhibición de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Dicloxacilina	1µg	R	R
Eritromicina	15µg	S	S
Gentamicina	10µg	S	S
Pefloxacina	5µg	R	R
Tetracilina	30µg	S	S
Trimetoprim	25µg	S	S
Ampicilina	10µg	S	S
Penicilina	6,25µg	R	R
Cefalotina	30µg	S	S
Cefotaxima	30µg	S	S
Ceftazidima	30µg	R	S
Cefuroxima	30µg	S	S

R: resistente; S: sensible.



**Figura 18.** Halos de inhibición de los diferentes antibióticos. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lac); Consorcio *Leuconostoc mesenteroides* (Leu); Cefalotina (1); Ceftazidima (2); Eritromicina (3); Ampicilina (4); Tetracilina (5); Trimetoprim (6); Cefotaxima (7); Gentamicina (8); Cefuroxima (9); Pefloxacina (10); Dicloxacilina (11); Penicilina (12).

## 6. CONCLUSIONES

- Las velocidades de crecimiento alcanzadas con el aguamiel de *Agave salmiana*, inulina grado alimentario, sacarosa y glucosa, 0.181; 0.200; 0.194; 0.191 Log UFC/mL/h, respectivamente, no presentaron diferencias significativas ( $F=2.993$ ;  $p=0.056$ ) con respecto a las otras fuentes de carbono (fructosa y miel de *Agave tequilana*). Considerando a estos sustratos (*Agave salmiana*, inulina, sacarosa y glucosa) prebióticos.
- Para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* el aguamiel de *Agave salmiana* (0.231 Log UFC/mL/h) con diferencias significativas ( $F=25.815$ ;  $p=0.000$ ), presentó la mejor velocidad con respecto a las otras fuentes de carbono (glucosa, fructosa, miel de *Agave tequilana*). Siendo el aguamiel de *Agave salmiana* un sustrato prebiótico para esta bacteria.
- La viabilidad a las condiciones gastrointestinales fue significativamente alta en el consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* con un porcentaje de tasa de supervivencia relativa de 74.16% a pH 2 y 13.04% a 0.5% (p/v) de sales biliares.
- Se encontró que el porcentaje de adhesión a la mucosa intestinal para ambas bacterias ácido lácticas es semejante, 13.950% para *Lactobacillus delbrueckii* y 15.553% para el consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides*. No existió diferencia significativa ( $t=0.642$ ;  $p=0.544$ ).
- De acuerdo con la prueba de ANOVA de un factor el consorcio *Leuconostoc mesenteroides* como la cepa control (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) presentaron diferencias significativas ( $F=186.187$ ;  $p=0.000$ ). en la actividad antimicrobiana entre las 6 bacterias patógenas (*Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Listeria monocytogenes*)

- El consorcio bacteriano *Leuconostoc mesenteroides* resistió a los diferentes antibióticos suministrados para el control de infecciones como es el caso de Penicilina.
- Los datos obtenidos por el consorcio *Leuconostoc mesenteroides* en todas las pruebas *in vitro*, mostraron buen comportamiento comparado con el de la cepa control (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), demostrando de esta manera un potencial probiótico.

## **7. PARTICIPACIÓN EN EVENTOS**

1. Poster en la doceava conferencia internacional sobre ciencia y tecnología de los alimentos, en la Habana, Cuba del 13 al 17 de mayo.
2. Poster en el sexto simposio internacional de probióticos, en el Distrito Federal, México del 18 al 19 de abril.
3. Poster en el X Encuentro participación de la mujer en la ciencia, en León, Guanajuato del 15 al 17 de mayo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Anthoula A., Zoumpopoulou G., Karatzas K., Tsakalidou E., Nychas G., Panagou E., Tassou C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiology*. 33: 282-291.

Arrazola D. (1969). Estudio del contenido de Azúcares en la piña de Agave tequilana. Tesis de licenciatura. Facultad de Química Universidad Autónoma de Puebla. México. 4-5.

Baranyi, J. and Roberts, T.A. (1994): A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 277-294.

Begley, M., Gahan, C.G., Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 625-651.

Bengmark S. (1998). Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut.* 42(1): 2-7.

Bermudez-Brito M., Plaza-Díaz J., Muñoz-Quezada S., Gómez-Llorente C., Gil Angela. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Nutrition and Metabolism.* 61: 160-174.

Cebeci A., and Gürakan C. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology.* 20: 511-518.

Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ. (2002). Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *The Journal of Immunology.* 168(1): 171-178.

Chung C-H, Day DF. (2002). Glucopoligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* B-742 (ATCC 13146): A potential prebiotic. *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology*. 29: 196-199.

Collado M.C., Gueimonde M., y Salminen S. (2010). Probiotics in Adhesion of Pathogens: Mechanisms of Action. *Elsevier. Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*. Chapter 23: 353-370.

Collado M.C., Merihuato J., Salminen S. (2007). Development of new probiotics by strain combinations: is it possible to improve the adhesion to intestinal mucus?. *Journal of Dairy Science*. 90 (6): 2710-2716.

Correia M., Liboredo J., Consoli M. (2012). The role of probiotics in gastrointestinal surgery. *Nutrition* 28: 230–234.

Cortés L., y Basurto P. (2007). Jardín Botánico de Biología. Universidad Autónoma de México. GELA Grupo Etnobotánica Latinoamericano.

Costa V., Basso T., Angeloni L., and Marilla L., (2008). Production of acetic acid, ethanol and optical isomers of lactic acid by *Lactobacillus* strains isolated from industrial ethanol fermentations. *Ciencia y Agrotecnología*. 32: 503-509.

Courvalin, Patrice. (2006). Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics. *Digestive and Liver Disease*. 38 (2): S261-S265.

Crittenden R. and Playne M. (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Food Science and Technology*, 7: 353-361.

Cruz, K. (2010). Determinación de la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*. Tesis

(Doctorado en Bioprocesos). Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. Departamento de BioprocesosUPIBI-IPN. 1-122.

Cueto Clementina y Aragón Stephania. (2012). Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol *in vitro*. *Scientia Agropecuaria*. 1: 45-50.

Delzenne N. and Roberfroid M. (1994). Physiological effects of non-digestible Oligosaccharides. *Food Science and Technology*, 27: 1-6.

Ding, S. y Tan, T. (2006). L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry* 41 (6): 1451-1454.

Donkor, O., Henriksson, A., Singh, T., Vasiljevic, T., & Shah, N. (2007). ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17(11): 1321-1331.

Douglas L., Sanders M. (2008). Probiotics and Prebiotics in Dietetics Practice. Perspectives in Practice. RESEARCH. *The American Dietetic Association*, 510-521.

Escalante, R., Hernández, S., & Jiménez, R. (2006). Efecto del almidón resistente tipo II de malanga en bacterias probióticas y patógenas. Memorias de la Semana de Divulgación y Video Científico. Tabasco: 298-303.

Escobar L., Rojas C., Giraldo G y Padilla L. (2010). Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno. *Revista Investigación Universidad de Quindío*. 20: 42-49.

Espinosa-Andrews H., Urias-Silvas J. (2012). Thermal properties of agave fructans (*Agave tequilana* Weber var. Azul). *Carbohydrate Polymers*. 87: 2671-2676.

FAO/WHO. (2002). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.

Ferrarini V., Del Re B., Pasini L., Parini C., Biavati B., Sgorbati B. (2003). Construction of a genomic library in *Bifidobacterium longum* B2. *Annals of Microbiology*. 53 (4): 505-510.

Figuroa G., (2007). Efecto de prebióticos en el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota y *Escherichia coli* en un sistema de simulación del tracto intestinal. Tesis (Maestría en Biotecnología). Iztapalapa. Universidad Autónoma Metropolitana 1-77.

Fooks J., Fuller R. and Gibson R. (1999). Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal* 9: 53-61.

Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66(5): 365-378.

Gänzle, M., Weber, S., Hammes, W. (1999). Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.* 46: 207-217.

García Mendoza, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*. 87: 14-23.

García Herrera, E., Méndez Gallegos, S., & Talavera Magaña, D. (2010). El género *Agave* SPP. en México: Principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 5: 109-129.

Geier M., Butler R., Howarth G. (2007). Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. Review. *International Journal of Food Microbiology*. 115: 1–11.

Gibson G. (2004). Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition Supplements*. 1: 25-31.

Goldin BR and Gorbach SL. (1980). Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 64(2): 263-265.

Gomes M and Malcata F. (1999). *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*. 10: 139-157.

Guarner F., Khan A., Garisch J and *et al.* (2009). World Gastroenterology Organisation practice guidelines: Probiotics and prebiotics. *Arab Journal of Gastroenterology*. 10: 33–42.

Guglielmotti D., Briggiler M., Golowczyk M., Reinheimer J., Quiberoni A. (2007). Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *International Dairy Journal*. 17: 916-925.

Hemme D., Foucaud-Scheunemann C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*. 14: 467-494.

Holzapfel W., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J.Clin. Nutr.* 73: 365S-373S.

Hopkins J. M., Cumming H. J., Macfarlane G. T. (1998). Inter.-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. *Journal of Applied Microbiology*. 85: 381-386.

Hummel A., Hertel C., Holzapfel W., Franz C. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (3): 730-739.

Isolauri E., Kaila M., Mykkanen H., Ling W., Salminen S. (1994). Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. *Dig. Dis. Sci.* 39: 2595-2600.

Izquierdo E., Horvatovich P., Marchioni E., Aoude-Werner D., Sanz Y., Ennahar S. (2009). 2-DE and MS analysis of key proteins in the adhesion of *Lactobacillus plantarum*, a first step toward early selection of probiotics based on bacterial biomarkers. *Electrophoresis*. 30: 949-956.

Kailasapathy K. and Chin J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology and Cell Biology*. 78: 80-88.

Kamaleddin S., Daud H., Mohammad F., Roos C., and Ideris A. (2012). Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*). *African Journal of Biotechnology*. 11 (16): 3810-3816.

Kim D., and Austin B. (2008). Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Letters in Applied Microbiology*. 47: 141-147.

Kimura K., McCartney A., McConnell M., Tannock G. (1997). Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological response of their human host to the predominant strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3394-3398.

Kimura S., Ishii Y., Tateda K., Yamaguchi K. (2007). Predictive analysis of ceftazidime hydrolysis in CTX-M-type  $\beta$ -lactamase family members with a mutational substitution at position 167. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 29: 326-331.

Klein G., Pack A., Bonaparte C. Reuter G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International of food Microbiology.* 41: 103-125.

Kneifel W, Rajal A and Kulbe D. (2000). *In vitro* growth behavior of probiotic bacteria in culture media with carbohydrates of prebiotic importance. *Microbial Ecology in Health Disease.* 12: 27-34.

Lilly D.M. y Stillwell R.H. (1965). Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science.* 147: 747-748.

Majamaa H., Isolauri E., Saalinen M., Vesikari T. (1995). Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 20: 333-338.

Man, J. C. and Rogosa, M. E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. *J. Appl. Bact.* 23(1), 130-135.

Mancilla-Margalli N., and López M. (2006). Water soluble carbohydrates and fructan structure patterns from agave and dasyliirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 54: 7832-7840.

Marianelli C., Cifani N., Pasquali P. (2010). Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Research in Microbiology*. 161: 673-680.

Márquez G., Karen P., Carrascal A., Bernardo C., Clavijo D. y Balkis Q. (2007). Determinación cuantitativa de proteasas de bacterias psicotrópicas aisladas de leche cruda. *Red de revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*. 5(7):14-24.

Mayrhofer S., Van A., Mair C., Huys G., Aarts H., Kneifel W., Domig K. (2010). Antibiotic susceptibility of members of the *Lactobacillus acidophilus* group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants. *International Journal of Food Microbiology*. 144: 81-87.

Mercenier A., Pavan S., Pot B. (2003). Probiotic as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr. Pharm. Des.* 8: 99-110.

Miñana, V. (2007). Oligosacáridos en nutrición infantil: fórmula infantil, alimentación complementaria y del adolescente. *Acta pediátrica*. 65: 175-179.

Nguyen T., Kang J., Lee M. (2007). Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal of Food Microbiology*. 113: 358-361.

Ouwehand, A.C., Salminen, S. (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int. Dairy J.* 8: 749-758.

Parra Ricardo. (2010). Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 8: 93-105.

Pérez Daza. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf. Ter. Sist. Nac. Salud.* 22: 57-67.

Pinos-Rodríguez J.M., Zamudio M., González S.S., Mendoza G.D., Bárcena R., Ortega M.E., Miranda L.A. (2009). Effects of maturity and ensiling of *Agave salmiana* on nutritional quality for lambs. *Animal Feed Science and Technology.* 152: 298-306.

Pignata S., Maggini L., Zarrilli R. (1994). The enterocyte-like differentiation of the Caco-2 tumor cell line strongly correlates with responsiveness to cAMP and activation of kinase A pathway. *Cell Growth Differ.* 5(9): 967-973.

Ramírez J., Rosas P., Velázquez M., Ulloa J. y Romero F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente* 2: 1-16.

Ramírez, A. (2009). Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel de Maguey (*Agave salmiana*) en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Tesis (Maestría en Ciencias en Bioprocesos). Instituto Politécnico Nacional (IPN). 1-89.

Rendón Huerta, J. (2009). Fructanos de Maguey: Efecto prebiótico y metabólico. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

Rodríguez M. (2009). Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis (Doctorado en Biociencias). Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Genética y Microbiología. 1-197.

Rondón A., Samaniego L., Bocourt R., Rodríguez S., Milián G., Ranilla M., Laurencio M., Pérez M. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial

de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. Procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Ciencia y Tecnología alimentaria*. 6: 56-63.

Rossi Maddalena, Corradini Claudio, Amaretti Alberto, Nicolini Marcello, Pompei Anna, Zanoni Simona and Matteuzzi Diego. (2005). Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by Bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and environmental Microbiology*. 71(10): 6150-6158.

Rycroft C., Rastall R. and Gibson G. (2001). The role of prebiotics in human gut microbiology. Prebiotic oligosaccharides. *Focus on Biotechnology, SpringerLink*. 411-428.

Saad N., Delattre C., Urdaci M., Schmitter J., Bressollier P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Food Science and Technology*. 50: 1-16.

Sánchez Jorge. (2005). Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: Actividad metabólica y producción de exopolisacáridos. Tesis (Doctorado en Microbiología). Universidad de Oviedo, Departamento de Biología Funcional.

Simmering R., Blaut M. (2001). Pro- and prebiotics- the tasty guardian angels?. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 55(1): 19-28.

Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P.B., Ross, R.P. 2001. Market potential for probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 476-483.

Tejero-Sariñena S., Barlow J., Costabile A., Gibson G., Rowland I. (2012). *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*. 18: 530-538.

Upadrasta A., Stanton C., Hill C., Filtzgerald G. and Ross R. (2011). Improving the stress tolerance of probiotic cultures: Recent trends and Future directions. *Food Microbiology and Food Safety*. 17: 395-438.

Urías, S., & López, M. (2004). Efecto prebiótico de los fructanos de agave. Memorias 1er Encuentro Participación de la mujer en la ciencia. León Guanajuato. 9-12.

Waleckx E., Gschaedler A., Colonna-Ceccaldi B., Monsan P. (2008). Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. *Food Chemistry*. 108: 40-48.

Zhang, Z., Jin, B. y Kelly, J. (2007). Production of lactic acid and byproducts from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23 (2): 229-236.