



Educación
Secretaría de Educación Pública



TESIS

CON EL TEMA:

“Aislamiento y caracterización de las bacterias ácido lácticas durante la fermentación natural del proceso de producción de la lechuguilla.”

QUE PRESENTA:

BRENDA ELIZABETH ALVARADO MARQUEZ

ASESORA

MGDC. IVONNE GONZALEZ LEAL

REVISORES

MC. FRANCISCA MONSERRAT LUNA OLEA

DR. BENJAMIN HERNANDEZ MARQUEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. ABRIL, 2026.



Educación
Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico de Tlajomulco
Dirección
Subdirección Académica

Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, 24/Marzo/2026
No. DE OFICIO: D.SA/DEP/463/2026

ASUNTO: Autorización de impresión
definitiva y digitalización.

C. BRENDA ELIZABETH ALVARADO MARQUEZ
PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
P R E S E N T E

Dado que el Comité dictaminó como **APROBADA** su TITULACIÓN INTEGRAL: OPCIÓN I (TESIS), con el tema
"Aislamiento y caracterización de las bacterias ácido lácticas durante la fermentación natural del
proceso de producción de la lechuguilla." y determinó que da cumplimiento con los requisitos
establecidos, se le notifica que tiene la autorización para su impresión definitiva y digitalización.

Sin otro particular quedo de usted.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®

Educando para la sociedad Actual y los Retos del futuro



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

C. MARÍA ISABEL BECERRA RODRÍGUEZ
DIRECTORA DEL PLANTEL

**INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE TLAJOMULCO**
DIRECCION

C.c.p.- Coordinación Titulación. - Edificio

C.c.p.- ☒ Minutario. -

MIBR/IGL/HMGG/mjhc*



2026
año de
**Margarita
Maza**





Educación
Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico de Tlajomulco
Dirección
Subdirección Académica
Departamento de Ingenierías

Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, 24/Marzo/2026
No. DE OFICIO: D.SA/DING/032/2026

ASUNTO: Liberación de proyecto para
la titulación integral.

ME. ANDREA TORRES RICO
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
P R E S E N T E

Por este medio informo que ha sido liberado el siguiente proyecto para la titulación integral:

NOMBRE DEL ESTUDIANTE Y/O EGRESADO:	BRENDA ELIZABETH ALVARADO MARQUEZ
NO. DE CONTROL:	21940276
PRODUCTO:	OPCIÓN I (TESIS)
CARRERA:	INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
NOMBRE DEL PROYECTO:	"Aislamiento y caracterización de las bacterias ácido lácticas durante la fermentación natural del proceso de producción de la lechuguilla."

Agradezco de antemano su valioso apoyo en esta importante actividad para la formación profesional de nuestros egresados.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Educando para la sociedad Actual y los Retos del futuro®

MC. FABIOLA BEJARANO REBOLLEDO
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍAS



MGDC. IVONNE GONZALEZ LEAL
Nombre y firma del asesor

Monserat Luna O.
MC. FRANCISCA MONSERRAT LUNA
OLEA
Nombre y firma del revisor

DR. BENJAMIN HERNANDEZ
MARQUEZ
Nombre y firma del revisor

C.c.p.- Coordinación Titulación. - Edificio
C.c.p.- Minutario. -
FBR/mjhc*



2026
año de
Margarita
Maza



KM. 10 carretera a San Miguel Cuyutlán, Cto. Vicente Fernández Gómez C.P. 45640 Tlajomulco de Zúñiga, Jal.
Tel. 33 29 02 11 30 e-mail: plan_tlajomulco@tecnm.mx www.tlajomulco.tecnm.mx

Resumen

El agua de lechuguilla es una bebida tradicional mexicana obtenida mediante fermentación natural del *Agave maximiliana Baker* en la cual participa una microbiota compleja compuesta por bacterias ácido lácticas, levaduras y otros microorganismos. Este tipo de fermentación natural depende de la microbiota nativa presente en la materia prima y el ambiente lo que genera una diversidad microbiana y dificulta la identificación de grupos específicos.

El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar bacterias ácido lácticas presentes durante la fermentación natural del agua de lechuguilla. Para ello, se preparó el fermento y se monitorearon parámetros fisicoquímicos como pH, °Brix y azúcares reductores durante seis días. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas y siembra en medio de cultivo MRS con el fin de favorecer el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, seguido del aislamiento y caracterización fenotípica de las cepas obtenidas mediante tinción de Gram, observación microscópica y. Además, se realizó una segunda corrida experimental bajo atmósfera enriquecida con dióxido de carbono para evaluar su efecto en el crecimiento microbiano añadiendo la prueba de catalasa.

Los resultados mostraron una disminución del pH y de los azúcares reductores, lo que evidencia actividad microbiana durante la fermentación. En cuanto al aislamiento se observó el crecimiento de diversos tipos de colonias en medio MRS, incluyendo microorganismos con morfología compatible tanto con bacterias ácido lácticas como con levaduras y otras bacterias. Esto indica que, aunque el medio MRS es selectivo no es completamente específico para bacterias ácido lácticas en condiciones de fermentación natural. La segunda corrida experimental mostró una reducción en la diversidad microbiana y una mayor presencia de morfologías compatibles con bacterias ácido lácticas aunque no de manera exclusiva.

Se concluye que la fermentación natural del agua de lechuguilla presenta una microbiota compleja y dinámica en la que el aislamiento selectivo de bacterias ácido lácticas resulta limitado debido a la coexistencia de otros microorganismos. Asimismo, las condiciones de cultivo como la atmósfera enriquecida con dióxido de carbono, pueden influir en la selección microbiana, aunque no garantizan la obtención exclusiva de bacterias ácido lácticas. Estos resultados resaltan la necesidad de complementar los métodos fenotípicos con técnicas moleculares para una identificación más precisa.

Abstrac

Lechuguilla water is a traditional Mexican beverage obtained through the natural fermentation of Agave Maximiliana Baker, a process involving a complex microbiota composed of lactic acid bacteria, yeasts, and other microorganisms. This type of natural fermentation depends on the native microbiota present in the raw material and the environment, resulting in microbial diversity and making it difficult to identify specific groups.

The objective of this study was to isolate and characterize lactic acid bacteria present during the natural fermentation of lechuguilla water. To this end, the ferment was prepared, and physicochemical parameters such as pH, °Brix, and reducing sugars were monitored for six days. Subsequently, serial dilutions were performed and inoculated onto MRS culture medium to promote the growth of lactic acid bacteria. This was followed by the isolation and phenotypic characterization of the resulting strains using Gram staining and microscopic observation. Additionally, a second experimental run was conducted under a carbon dioxide-enriched atmosphere to evaluate its effect on microbial growth, adding the catalase test. The results showed a decrease in pH and reducing sugars, indicating microbial activity during fermentation. Regarding isolation, the growth of various colony types was observed on MRS medium, including microorganisms with morphologies compatible with both lactic acid bacteria and yeasts, as well as other bacteria. This indicates that, although MRS medium is selective, it is not completely specific for lactic acid bacteria under natural fermentation conditions. The second experimental run showed a reduction in microbial diversity and a greater presence of morphologies compatible with lactic acid bacteria, although not exclusively.

It is concluded that the natural fermentation of water from water hyacinth (*Agave* spp.) presents a complex and dynamic microbiota in which the selective isolation of lactic acid bacteria is limited due to the coexistence of other microorganisms. Furthermore, culture conditions such as a carbon dioxide-enriched atmosphere can influence microbial selection, although they do not guarantee the exclusive isolation of lactic acid bacteria. These results highlight the need to complement phenotypic methods with molecular techniques for more accurate identificat

Índice

I.	Introducción	7
II.	Marco Teórico	9
2.1	Procesos de fermentaciones natural y el papel de las bacterias ácido-lácticas	9
2.2	Agua Lechuguilla.....	11
2.3	Materia Prima.....	12
2.4	Generalidades De Las Bacterias Ácido Lácticas	12
2.5	Clasificación	14
2.5.1.	Homofermentativas.....	14
2.5.2.	Heterofermentativas	15
2.6	Taxonomía.....	16
2.6.1.	Lactococos	16
2.6.2.	Lactobacilos	17
2.6.3.	Streptococos	17
2.6.4.	Leuconostoc	18
2.6.5.	Pediococcus.....	18
2.6.6.	Aerococcus.....	19
2.6.7.	Carnobacterium.....	19
2.6.8.	Enterococcus	20
2.6.9.	Weissella.....	21
2.7	Características De Las Bacterias Lácticas	21
2.8	Capacidad Para Utilizar Diferentes Sustratos	22
2.9	Producción De Compuestos Aromáticos	23
2.10	Aplicación De Las BAL.....	24

2.10.1.	Conservación De Alimentos	24
2.10.2.	Probióticos	25
2.10.3.	Exopolisacáridos	25
2.11	Bioquímica Del Ácido Láctico	26
2.12	Atmosferas controladas con dióxido de carbono en bacterias lácticas	27
2.13	Medio de cultivo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe).....	28
2.14	Métodos De Identificación De Bacterias Ácido Lácticas	29
2.15	Identificación Fenotípica	29
2.15.1.	Tinción de Gram.	29
2.15.2.	Prueba de catalasa.	30
2.16	Identificación Molecular Mediante El Gen 16S rRNA.....	31
III.	Justificación	32
IV.	Hipótesis	33
V.	Objetivos	34
5.1	Objetivo General	34
5.2	Objetivos Específicos.....	34
5.2.1.	Cuantificación de características físico químicas . ¡Error! Marcador no definido.	
5.2.2.	Siembra de muestras heterogéneas de microorganismos en medios de cultivo selectivos para BAL..... ¡Error! Marcador no definido.	
5.2.3.	Aislar microorganismo de las muestras heterogéneas para realizar cultivos homogéneos en medio selectivo para BAL.	34
5.2.4.	Caracterización macro y microscópica de los aislados homogéneos.....	34
VI.	Materiales Y Métodos	35
6.1	Materia Prima.....	35
6.2	Preparación Del Fermento Agua Lechuguilla.....	35

6.3	Cuantificación de características físico químicas (pH, Brix, Azúcares reductores, UFC)	35
6.3.1.	pH.....	35
6.3.2.	° Brix.....	36
6.3.3.	Determinación De Azucars Reductores	36
6.3.4.	Unidades Formadoras De Colonias (UFC).....	37
6.4	Siembra de muestras heterogéneas de microorganismos en medios de cultivo selectivos para BAL.....	37
6.4.1.	Disoluciones Seriadas	37
6.4.2.	Siembra en medio de cultivo selectivo	38
6.5	Aislar microorganismo de las muestras heterogéneas para realizar cultivos homogéneos en medio selectivo para BAL.....	38
6.6	Caracterización macro y microscópica de los aislados homogéneos.....	38
6.7	Segunda corrida experimental.....	39
VII.	Resultados Y Discusión	40
7.1	Cuantificación de características físico químicas (pH, Brix, Azúcares reductores, UFC)	40
7.1.1.	pH.....	40
7.1.2.	Solidos solubles (°Brix).....	40
7.1.3.	Azúcares reductores	41
7.1.4.	Recuento Microbiológico (Unidades Formadoras De Colonias).....	42
7.2	Siembra de muestras heterogéneas de microorganismos en medios de cultivo selectivos para BAL.....	43
7.3	Aislar microorganismo de las muestras heterogéneas para realizar cultivos homogéneos en medio selectivo para BAL.....	43
7.4	Caracterización Macroscópica Y Microscópica De Las Cepas Aisladas	45

7.4.1.	Primera Corrida Experimental	45
7.4.2.	Segunda Corrida Experimental Con Dióxido De Carbono Al 5.5%.....	48
7.5	Prueba De Catalasa	51
VIII.	Conclusiones	53
IX.	Referencias.....	54

Índice De Figuras

Figura 1. Bebida tradicional de lechuguilla en presentación comercial	11
Figura 2. Agave Maximilina (Mezcología, 2018).....	12
Figura 3. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Ortiz Balderas 2006)	15
Figura 4. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Ortiz Balderas 2006).	16
Figura 5 Vista morfológica del cultivo de <i>Lactococcus</i> al microscopio (100x) después de la tinción de Gram (Azhar et al., 2017).	17
Figura 6 <i>Lactobacillus plantarum</i> bajo el microscopio (Abdulgawad, 2016).....	17
Figura 7. <i>Streptococcus</i> spp (Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo, 2022).....	18
Figura 8. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (Global Microbe Bank).	18
Figura 9. Tinción Gram de <i>Pediococcus pentosaceus</i> YF01 (Yang et al., 2024).....	19
Figura 10. <i>Aerococcus viridans</i> en tinción de Gram del cultivo (Medical Lab Notes, 2025).	19
Figura 11. Tinción de Gram de cultivo de <i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> . Observado con microscopio óptico a 100X (Muñoz-Sanza et al., 2019)	20
Figura 12. Tinción Gram del género <i>Enterococcus</i> (Fica & Dabanch, 2007)	20
Figura 13. Tinción Gram de <i>Weissella confusa</i> (Global Microbe Bank).....	21
Figura 14. Formas isométricas del ácido láctico (Fernández, 2022)	27
Figura 15. Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Fernández, 2022).	30
Figura 16. Potenciómetro digital	36
Figura 17. Refractómetro digital.....	36
Figura 18. Variación del pH durante la fermentación del agua lechuguilla.....	40
Figura 19. Variación de los sólidos solubles (°Brix) durante la fermentación del agua lechuguilla.	41
Figura 20. Variación de los azúcares reductores durante la fermentación del agua lechuguilla.	42
Figura 21. Desarrollo de colonias microbianas en medio de cultivo MRS tras la siembra inicial de la lechuguilla.....	43
Figura 22. Colonias aisladas obtenidas a partir de la siembra primaria de la bebida de lechuguilla en medio de cultivo MRS.	44

Índice De Tablas

Tabla 1. Características De Las Bacterias Ácido-Lácticas (Vinocunga-Pillajo, 2024).....	21
Tabla 2. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) durante la fermentación del agua lechuguilla.	42
Tabla 3. Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas aisladas del agua de lechuguilla durante la primera corrida experimental.	45
Tabla 4. Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas aisladas del agua de lechuguilla durante la segunda corrida experimental incubadas en atmosfera con 5.5% CO ₂	48
Tabla 5. Resultados de la prueba catalasa	51

I. Introducción

Los agaves en México representan un elemento fundamental de la cultura nacional. “Han sido aprovechados desde tiempos ancestrales y hoy en día se siguen utilizando en varias aplicaciones, la más conocida quizá, es la producción de bebidas alcohólicas destiladas o no destiladas” (Gschaedler et al., 2017). Además de su relevancia histórica, su aprovechamiento constituye una actividad de gran importancia económica, principalmente por la elaboración de bebidas de alto valor comercial como el tequila y el mezcal. Sin embargo, también existen fermentos tradicionales menos conocidos, como la lechuguilla, una bebida refrescante elaborada de forma artesanal en el sur del estado de Jalisco. Esta se obtiene a partir del *Agave Maximiliana Baker* y su producción involucra un proceso de fermentación natural también llamado espontáneo.

Durante la fermentación natural no es necesario utilizar cultivos iniciadores debido a que “los microorganismos fermentadores ya forman parte de la microflora natural presente en el alimento” (Voidarou, 2020, p. 5). En el presente trabajo, los términos fermentación natural y fermentación espontánea se emplean de la misma manera para describir procesos fermentativos en los que no se adicionan cultivos iniciadores y cuyo desarrollo depende de la microbiota nativa presente en las materias primas los utensilios y el entorno bajo condiciones favorables para el crecimiento microbiano. (Mudoor Soresh et al., 2023)

Algunas bebidas fermentadas tradicionales de distintas partes del mundo se producen a través de procesos fermentativos espontáneos o naturales. En estos casos, el cambio del sustrato depende del crecimiento de la microbiota nativa que se encuentra en las materias primas y en el ambiente. Las fermentaciones de este tipo se distinguen por la sucesión microbiana de varios grupos de microorganismos como las bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias acéticas. Estas tienen un impacto directo en las propiedades sensoriales del producto final y en la estabilidad microbiológica.

Por lo que la fermentación espontánea ha sido ampliamente estudiada en bebidas fermentadas de origen vegetal y frutal, como la sidra de manzana, el kombucha y otras bebidas tradicionales donde se ha demostrado que la microbiota autóctona desempeña un papel clave durante el proceso fermentativo.

Particularmente este estudio se enfocará en las bacterias ácido lácticas que están presentes durante la fermentación natural de la lechuguilla.

Las bacterias lácticas tienen una participación importante durante la fermentación debido a su producción de distintos compuestos los cuales le dan características sensoriales al producto final (Parra Huertas, 2010).

Estudiar las bacterias ácido lácticas presentes en el agua lechuguilla contribuye a la preservación de prácticas culturales ancestrales y a la optimización de procesos fermentativos para su potencial uso industrial o artesanal. Debido que hasta el momento los estudios se centran en su mayoría en distintas bebidas derivadas del agave en su mayoría alcohólicas por lo cual la información sobre la lechuguilla es muy limitada hasta el momento.

El objetivo de la presente investigación es el aislamiento y caracterización de las bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación natural del agua lechuguilla, con el fin de profundizar en su diversidad microbiana y ampliar el conocimiento científico de este tipo de bebida.

II. Marco Teórico

2.1 Procesos de fermentaciones natural y el papel de las bacterias ácido-lácticas

La fermentación alimentaria tradicional representa un patrimonio cultural extremadamente valioso en la mayoría de las regiones y alberga un enorme potencial genético de cepas valiosas, pero hasta ahora desconocidas (Tamang et al., 2016). Las bebidas fermentadas se obtienen mediante un proceso en el que el crecimiento microbiano es regulado y acompañado por transformaciones enzimáticas de los compuestos principales y secundarios presentes. En México existe una amplia diversidad de estas bebidas, estrechamente vinculadas con las tradiciones y la identidad cultural de cada región pues su consumo se remonta a la época prehispánica. La elaboración de las bebidas tradicionales suele darse a través de una fermentación espontánea o natural, determinada por la microbiota propia de la materia prima y por las condiciones ambientales que pueden favorecer o limitar el proceso además de influir en la acidez y el contenido de etanol del producto final. Este tipo de fermentación junto con la naturaleza de la materia prima y su tratamiento inicial propicia el desarrollo de una microbiota autóctona o nativa (Cerero-Calvo et al., 2022). Tal es el caso del tejuino la cual es una bebida tradicional fermentada donde ocurre una fermentación natural de maíz en el cual la microbiota autóctona impulsa el proceso fermentativo sin adición de cultivos iniciadores este estudio fue presentado en el Congreso de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB), donde se aisló e identificó la microbiota nativa de tejuino artesanal, encontrando bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus acidophilus* y *Leuconostoc mesenteroides*, así como levaduras la *Saccharomyces spp.* que participan de forma natural durante la fermentación de esta bebida tradicional (Flores et al., 2009).

Las fermentaciones de alimentos pueden proceder de forma espontánea a través de un proceso de reflujo o utilizando un cultivo iniciador definido, lo cual brinda la oportunidad de aislar cepas que poseen características industrialmente relevantes incluyendo la producción de sabores únicos. Incorporar estas cepas en fermentaciones mixtas puede mejorar el sabor de los productos resultantes además de permitir un mayor control del proceso. Estos sistemas de fermentación son bastante dinámicos y la sucesión microbiana a lo largo del tiempo es una característica común (Mudoor Soorash et al., 2023).

“Los grupos microbianos comúnmente aislados de las fermentaciones alimentarias espontáneas incluyen enterobacterias, bacterias de ácido láctico, bacterias de ácido acético, levaduras y mohos” (Mudoor Soresh et al., 2023).

“Las bacterias del ácido láctico (BAL) están ampliamente presentes en muchos alimentos y bebidas fermentadas” (Tamang et al., 2016).

Parra Huertas (2010) describe que las bacterias ácido-lácticas (BAL) contribuyen a la acidez y al desarrollo de aromas característicos en alimentos fermentados además de inhibir microorganismos indeseables. Estas bacterias crecen únicamente en medios complejos utilizan carbohidratos fermentables y alcoholes como fuentes de energía, produciendo principalmente ácido láctico, aunque también pueden generar compuestos adicionales como acetato, etanol y CO₂.

Diversos estudios han demostrado que las BAL desempeñan un papel fundamental para la fermentación de bebidas tradicionales. Como lo es en la elaboración del aguamiel y el pulque donde ocurre una fermentación ácida llevada a cabo por bacterias homofermentativas y heterofermentativas productoras de ácido. Se llevo a cabo un estudio Universidad Autónoma de Querétaro utilizando la secuenciación del gen ARNr 16S, donde lograron aislar 2 cepas en el aguamiel por otro lado en pulque se encontraron distintas variedades todas ellas grampositivas y catalasas negativas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Además, se evaluó su resistencia bajo condiciones simuladas del tracto gastrointestinal donde se tuvo una supervivencia entre 47.8 % y 89.2 %, por lo que se consideró su potencial uso como probióticos. (Morales et al., 2024).

En otro estudio se evaluó la microflora bacteriana asociada a los mostos de mezcal donde se vio que durante la elaboración del mezcal interviene la fermentación maloláctica la cual aporta muchas de las características organolépticas responsables de su perfil distintivo. La mayor parte de los fragmentos de ADN identificados en los mostos del mezcal correspondieron a bacterias ácido-lácticas, entre las cuales sobresalen especies como *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus composti*, *Lactobacillus parabuchneri* y *Lactobacillus plantarum*. (Narváez-Zapata et al., 2009).

2.2 Agua Lechuguilla

El agua de lechuguilla es una bebida tradicional mexicana típica del sur de Jalisco de carácter refrescante (Figura 1) con un bajo contenido alcohólico (menor al 1%). De acuerdo con diversos registros, su producción se concentra principalmente en municipios del sur de Jalisco, así como en los estados de Nayarit y Sinaloa. La fermentación natural de la lechuguilla se ve favorecida por un conjunto de condiciones fisicoquímicas y microbiológicas que permiten el desarrollo selectivo de la microbiota fermentadora. Durante el proceso fermentativo, la disminución del pH y la acumulación de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico y ácido acético, crean un ambiente ácido que favorece el crecimiento de bacterias acidófilas y levaduras al mismo tiempo que limita la proliferación de microorganismos no deseables (Gschaedler et al., 2017).



Figura 1. Bebida tradicional de lechuguilla en presentación comercial

Estudios realizados durante la elaboración de agua de lechuguilla han reportado valores de pH menores a 3 y concentraciones de ácidos orgánicos superiores al 1 % en los fermentos y filtrados, condiciones que coinciden con una mayor diversidad y actividad microbiana, particularmente de BAL y levaduras. Estas condiciones permiten la estabilización microbiológica del sistema fermentativo y contribuyen a la conservación del producto (Gschaedler et al., 2017).

Asimismo, la presencia constante de bacterias ácido lácticas, acéticas y propiónicas a lo largo del proceso fermentativo sugiere que el ambiente generado durante la fermentación natural favorece la permanencia de estos grupos microbianos. En particular, la posible producción de ácido

propiónico por bacterias propiónicas podría contribuir a la conservación del agua de lechuguilla sin necesidad de refrigeración durante periodos prolongados (Gschaedler et al., 2017).

2.3 Materia Prima

El Agave Maximiliana Baker, conocido como Maguey Lechuguilla (Figura 2) destaca en la flora de Jalisco por su resistencia y belleza. Su nombre honra al emperador Maximiliano I y al botánico John G. Baker, quien la describió científicamente en 1829. Esta planta de clima templado y húmedo originaria de las zonas montañosas de la sierra de Jalisco y Nayarit, es reconocida por sus hojas carnosas y espinas prominentes, que le otorgan una majestuosa apariencia (Tabares-Escamilla et al., 2024).



Figura 2. *Agave maximilina* (Mezcológica, 2018).

2.4 Generalidades De Las Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias lácticas constituyen a un grupo de microorganismos Gram positivos, tolerantes a ambientes ácidos comparten características morfológicas, metabólicas y fisiológicas similares debido a su estrecha relación filogenética. Se trata de bacterias no esporuladas e inmóviles, con formas que pueden variar entre cocos y bacilos, donde se lleva a cabo la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de los carbohidratos (Driener & Arredondo, 2016).

Las bacterias ácido lácticas son un grupo de bacterias fisiológicamente uniformes, de pared Gram positiva, no formadoras de esporas y con metabolismo fermentativo. Tradicionalmente han sido descritas como anaerobias facultativas, debido a que pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno y forman colonias en medios sólidos expuestos al aire (Parra Huertas, 2010). Sin embargo, estudios más recientes señalan que las bacterias ácido lácticas se consideran en realidad anaerobias aerotolerantes, ya que carecen de una cadena de transporte de electrones activa y, por lo tanto, no utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones en la obtención de energía (Feng & Wang, 2020).

La presencia de oxígeno puede provocar la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($HO\cdot$), los cuales pueden causar daño celular al afectar proteínas, ADN y lípidos, generando estrés oxidativo. Sin embargo las bacterias ácido lácticas pueden sobrevivir en ambientes aeróbicos gracias a mecanismos de defensa contra estas especies reactivas, lo que les permite crecer en presencia de oxígeno a pesar de tener un metabolismo fermentativo (Feng & Wang, 2020).

Si bien la mayoría de las especies de BAL se caracterizan por ser catalasas negativas, existen excepciones que muestran actividad catalasa positiva (Ortiz Balderas, 2006). Un ejemplo destacado es la cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 14431, la cual posee una pseudocatalasa de manganeso que le permite degradar el peróxido de hidrógeno de manera eficiente sin requerir un grupo hemo (Rochat et al., 2006). La prueba de catalasa se basa en la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno observándose la liberación de burbujas de oxígeno como resultado positivo. Debido a que la pseudocatalasa dependiente de manganeso también degrada el peróxido de hidrógeno algunas bacterias ácido lácticas pueden presentar resultados positivos en la prueba de catalasa aun cuando no poseen una catalasa verdadera dependiente de grupo hemo. Por esta razón en bacterias ácido lácticas la prueba de catalasa puede generar resultados falsos positivos.

Las BAL muestran una notable tolerancia a ambientes ácidos: algunas pueden crecer en medios con pH tan bajo como 3.2, otras en valores tan altos como 9.6, aunque la mayoría prospera en rangos entre pH 4 y 4.5. Esta capacidad les permite sobrevivir en entornos donde otras bacterias no lo logran, gracias a la acidez generada por los ácidos orgánicos (Ramírez Ramírez et al., 2011).

2.5 Clasificación

La clasificación de las bacterias ácido lácticas se determina principalmente por características como su morfología, el tipo de fermentación que realizan a partir de la glucosa, su capacidad de crecer a distintas temperaturas, la forma del ácido láctico que producen, así como su tolerancia a elevadas concentraciones de sal y a condiciones ácidas o alcalinas (Drider & Arredondo, 2016).

En 1920 Orla-Jensen estableció una clasificación de las bacterias ácido lácticas en dos grupos principales fundamentada en sus características bioquímicas: homofermentativas y heterofermentativas. Las heterofermentativas carecen de la enzima fructosa-difosfato-aldolasa, razón por la cual metabolizan los carbohidratos a través de la ruta de las pentosas fosfato/hexosas fosfato. En contraste, las homofermentativas generan aproximadamente dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. (Gorbeña & Sáenz, 2008).

2.5.1. Homofermentativas

Las bacterias homofermentativas pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *pediococcus*, *Enterococcus*, y *streotococcus* utilizan la ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) (Figura 3) donde convierten un mol de glucosa en dos moles de ácido láctico produciendo más del 85% de ácido láctico. Las bacterias de este grupo poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, pero no presentan fosfocetolasa. Entre ellas se incluyen los lactobacilos, caracterizados por su forma de bastones largos, ya sea aislados o en cadenas cortas, con propiedades termófilas, alta capacidad de acidificación y una marcada actividad caseolítica. También se encuentran los *Streptococcus*, de morfología esférica dispuesta en cadenas, que muestran una acidificación rápida, aunque con limitada actividad caseolítica (Parra Huertas 2012).

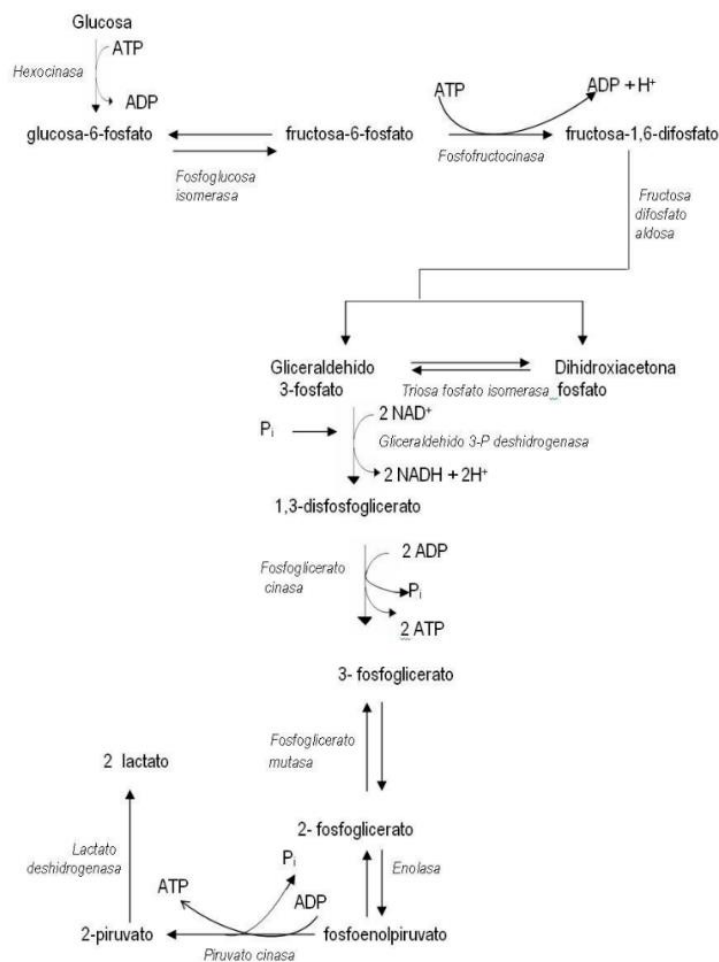


Figura 3. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Ortiz Balderas 2006)

2.5.2. Heterofermentativas

Las BAL heterofermentativas facultativas, como *Leuconostoc* y algunas especies de *Lactobacillus*, transforman las hexosas en ácido láctico mediante la vía EMP (Figura 4) además, metabolizan pentosas y frecuentemente gluconato gracias a la presencia de aldolasa y fosfocetolasa . En contraste, las BAL heterofermentativas obligadas carecen de la enzima fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, por lo que no emplean la vía EMP y degradan las hexosas a través de la ruta del fosfogluconato, generando ácido láctico junto con cantidades relevantes de etanol o ácido acético y dióxido de carbono (Buron-Moles et al., 2019).

Las BAL heterofermentativas producen solamente 50% de ácido láctico; fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂ 1 mol de ATP es generado por mol de glucosa (Parra Huertas 2012).

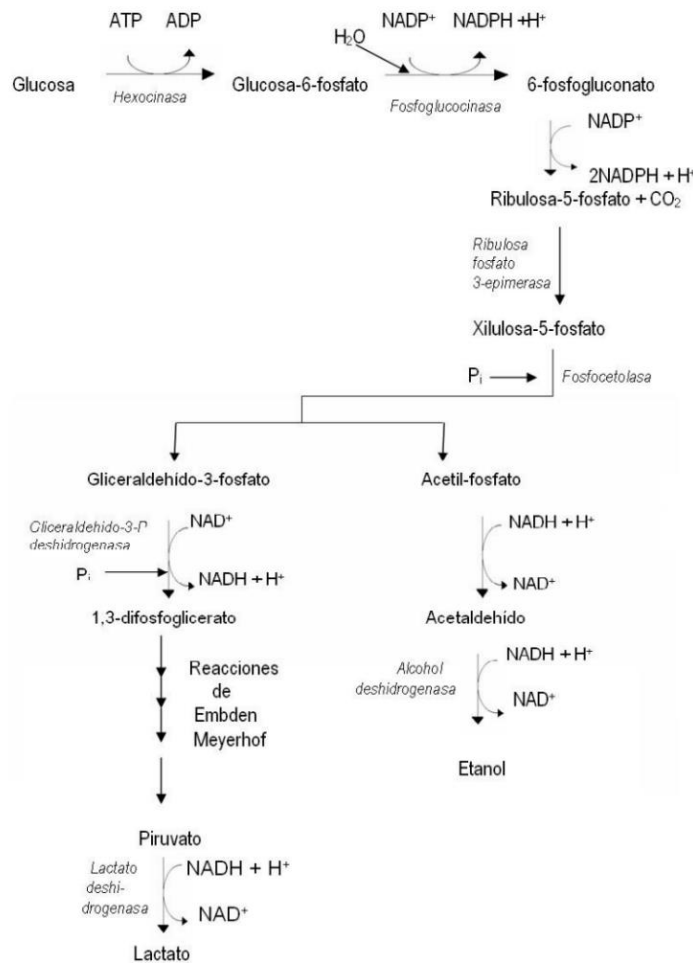


Figura 4. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Ortiz Balderas 2006).

2.6 Taxonomía

Las BAL forman parte del filo Firmicutes, el cual incluye cerca de veinte géneros. Entre los más representativos se encuentran *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Dentro de ellos, *Lactobacillus* siendo el género más numeroso. (Parra Huertas 2012 p.19)

2.6.1. Lactococos

Los *Lactococos* (Figura 5) son bacterias que tienen forma de coco, son Gram positivas y anaerobias. Estas bacterias tienen la capacidad de producir ácido L (+)-láctico al metabolizar la lactosa que

se encuentra en la leche cruda (Teuber, 1995). “Estas bacterias son termosensibles, no pueden crecer a concentraciones de NaCl de 6.5 % o cuando el pH es superior a 9.6” (Ibarra 2013).

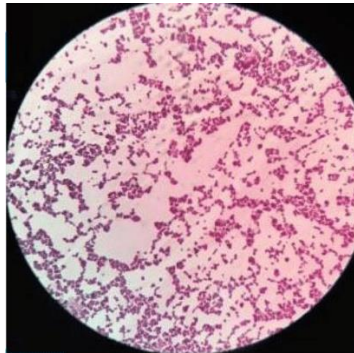


Figura 5 Vista morfológica del cultivo de *Lactococcus* al microscopio (100x) después de la tinción de Gram (Azhar *et al.*, 2017).

2.6.2. Lactobacilos

Los lactobacilos corresponden a bacterias Gram positivas, no esporuladas, con morfología bacilar o cocobacilar (Figura 6). En presencia de glucosa, pueden desarrollar un metabolismo homofermentativo, caracterizado por la producción superior al 85 % de ácido láctico, o bien un metabolismo heterofermentativo, en el que se generan ácido láctico, CO₂, etanol y/o ácido acético en cantidades similares (Hammes & Vogel, 1995).



Figura 6 *Lactobacillus plantarum* bajo el microscopio (Abdulgawad, 2016).

2.6.3. Estreptococos

Los *streptococos* constituyen un grupo de cocos grampositivos (Figura 7) inmóviles, carentes de esporas y negativos a la prueba de catalasa, se presentan en pares o cadenas. En cultivos envejecidos pueden perder su característica gran positiva. La mayoría de las especies se comportan como anaerobios facultativos, aunque algunas presentan un metabolismo estrictamente anaerobio.

Para su crecimiento óptimo suelen necesitar medios enriquecidos, como lo es el agar sangre (Patterson 1996).

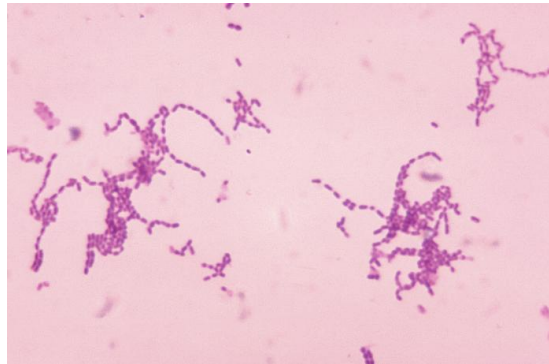


Figura 7. *Streptococcus spp* (Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo, 2022).

2.6.4. *Leuconostoc*

Las bacterias del género *Leuconostoc* son cocos mesófilos, grampositivos (Figura 8) catalasa-negativos, inmóviles, aerotolerantes y estrictamente heterofermentativos. Existe una diversidad morfológica, bioquímica y filogenética entre las 10 especies actualmente asignadas a este género (Holanda & Liu, 2011).

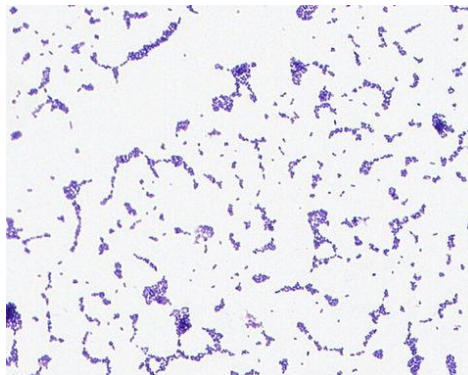


Figura 8. *Leuconostoc mesenteroides* (Global Microbe Bank).

2.6.5. *Pediococcus*

Género de bacterias homofermentativas, cocos Gram positivo (Figura 9) no esporulados, inmóviles, aerobio facultativo, catalasa negativa. Las células son esféricas, nunca alargadas, de 1 a 2 μm de diámetro, forman tétradas bajo condiciones favorables, algunas veces solo se observan en pares. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 40 °C (García 2012).

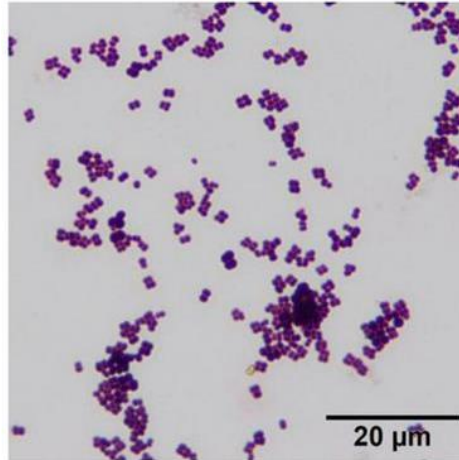


Figura 9. Tinción Gram de *Pediococcus pentosaceus* YF01 (Yang et al., 2024).

2.6.6. *Aerococcus*

Organismos grampositivos, microaerófilos y catalasa-negativos con forma de coco (Figura 10) presentes en el aire y el polvo. Los estudios filogenéticos muestran que *Aerococcus* forma un grupo compacto que comprende *Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella* e *Ignavigranum* dentro de la familia *Aerococcaceae* (Lawson 2014).

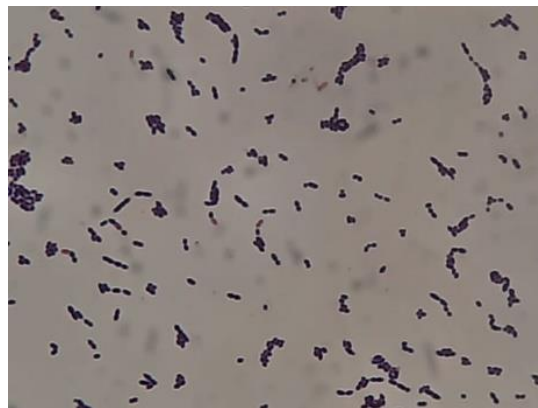


Figura 10. *Aerococcus viridans* en tinción de Gram del cultivo (Medical Lab Notes, 2025).

2.6.7. *Carnobacterium*

El género *Carnobacterium* (Figura 11) considerado el género tipo de la familia *Carnobacteriaceae*, fue establecido por Collins en 1987 a partir de la descripción de dos nuevos aislados. Este grupo reúne bacterias grampositivas, carentes de esporas y con metabolismo facultativamente anaerobio, cuya principal vía metabólica conduce a la producción de ácido láctico. Se han identificado especies de *Carnobacterium* en diversos ambientes fríos, lo que refleja

su fisiología psicrotolerante. Además, algunas de estas especies poseen aplicaciones relevantes en la industria alimentaria, ya que contribuyen a la bioconservación mediante la síntesis de compuestos antifúngicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, entre otros metabolitos (Pikuta & Hoover 2014).

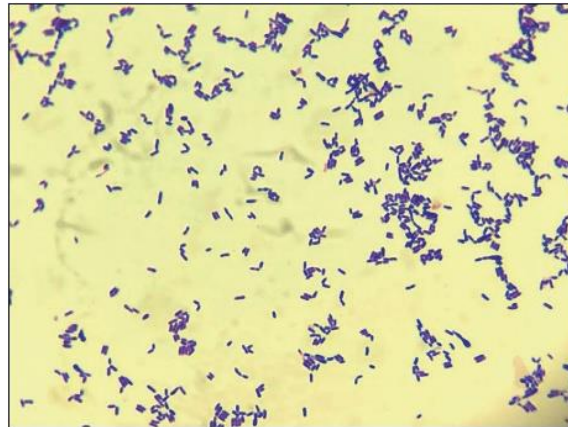


Figura 11. Tinción de Gram de cultivo de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Observado con microscopio óptico a 100X (Muñoz-Sanza et al., 2019)

2.6.8. Enterococcus

Este género está conformado por bacterias Gram positivas de morfología cocoide (Figura 12) agrupadas en pares o cadenas cortas, anaerobias facultativas y negativas frente a la catalasa (Medell et al., 2014).

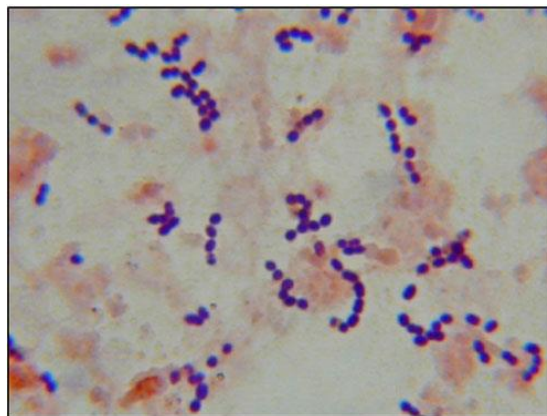


Figura 12. Tinción Gram del género *Enterococcus* (Fica & Dabanch, 2007)

2.6.9. *Weissella*

Son bacterias Gram positivas, carentes de catalasa, con morfología bacilar o cocoide (Figura 13). Se caracterizan por ser inmóviles y no formar esporas. Su metabolismo es de tipo heterofermentativo, generando principalmente ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y acetato como productos finales. Estas especies presentan un rango de crecimiento que abarca de 15 °C a 45 °C. El hábitat natural de las BAL comprende diversos nichos ecológicos ricos en nutrientes, entre ellos materiales vegetales, alimentos fermentados, el tracto gastrointestinal de animales, así como la piel y la leche (Fernández Fernández, 2022)

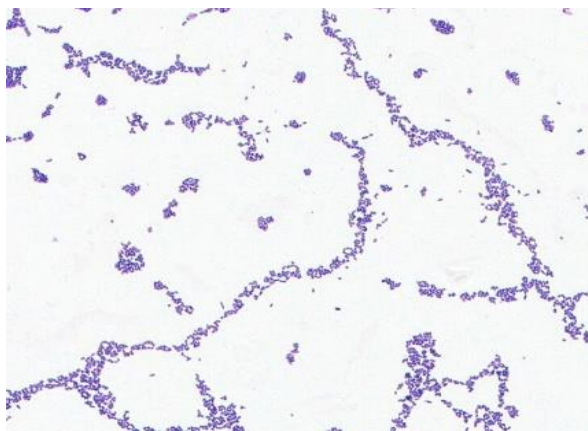


Figura 13. Tinción Gram de *Weissella confusa* (Global Microbe Bank)

2.7 Características De Las Bacterias Lácticas

Tabla 1. Características De Las Bacterias Ácido-Lácticas (Vinocunga-Pillajo, 2024).

Género	Familia	Morfología	Fermentación	Temperatura Óptima (°C)	pH Óptimo
<i>Lactobacillus</i> spp.	Lactobacillaceae	Bacilos Gram-positivos	Homofermentativa y heterofermentativa	30°C a 45°C	5.0 a 6.5
<i>Lactococcus</i> spp.	Streptococcaceae	Cocos Gram-positivos	Homofermentativa	10°C - 46°C	6.1 - 6.6
<i>Leuconostoc</i> spp.	Leuconostocaceae	Cocos Gram-positivos	Heterofermentativa	8°C - 44°C	4.4 - 9.4

Género	Familia	Morfología	Fermentación	Temperatura Óptima (°C)	pH Óptimo
<i>Streptococcus</i> spp.	Streptococcaceae	Cocos Gram-positivos	Homofermentativa	45°C - 50°C	6.3
<i>Pediococcus</i> spp.	Lactobacillaceae	Cocos Gram-positivos	Homofermentativa y heterofermentativa	hasta 65°C	6.0 a 6.5
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Bifidobacteriaceae	Bacilos Gram-positivos	Homofermentativa	36°C -42°C	6.5 -7.0
<i>Enterococcus</i> spp.	Enterococcaceae	Cocos Gram-positivos	Homofermentativa y heterofermentativa	10°C -45°C	Variable entre 4.5 - 9.6
<i>Weissella</i> spp.	Leuconostocaceae	Cocos Gram-positivos	Heterofermentativa	4°C -37°C	5.0 -7.0
<i>Carnobacterium</i> spp.	Carnobacteriaceae	Bacilos Gram-positivos	Homofermentativa	4°C -35°C	5.0 -7.5
<i>Tetragenococcus</i> spp.	Enterococcaceae	Cocos Gram-positivos	Homofermentativa y heterofermentativa	10°C -45°C	6.0 -7.5

2.8 Capacidad Para Utilizar Diferentes Sustratos

La capacidad adquirida por las BAL para metabolizar varios carbohidratos les proporcionó ventajas competitivas para colonizar numerosos ecosistemas. Esta variedad de sustratos utilizados aprovecha algunas vías metabólicas, que hacen que las BAL sean tan únicas y distintivas en términos de su potencial de fermentación (Buron-Moles et al. 2019).

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos que fermentan carbohidratos para generar ácido láctico y se emplean de manera extensa en la industria de alimentos fermentados. Estas bacterias poseen la capacidad de degradar macromoléculas presentes en los alimentos, incluyendo polisacáridos no digeribles, además de transformar compuestos responsables de sabores indeseables. La degradación de polisacáridos por parte de las bacterias ácido lácticas está mediada por diversas hidrolasas. En el contexto de los alimentos fermentados, este proceso no solo les

aporta energía a las bacterias, sino que también genera múltiples compuestos con efectos beneficiosos para el ser humano (Wang et al., 2021).

Buron-Moles et al. (2019) realizaron un estudio de asociación genotipo-fenotipo analizando los genomas de 56 cepas de bacterias del ácido láctico (BAL) para determinar su capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono siendo 49 sustratos de carbohidratos en monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, polioles y sales fuentes de carbono. Dicho estudio reveló que glucosa es la única que puede ser degradada por las 56 cepas de manera similar con unas pocas excepciones en cada clado filogenético las BAL estudiadas pueden metabolizar d- galactosa, d -fructosa y d -manosa.

Los disacáridos, carbohidratos compuestos por dos monosacáridos unidos por un enlace glucosídico, como la d- maltosa, la d- lactosa y la d -sacarosa son fuentes comunes de energía para las células bacterianas. Casi todas las cepas fueron capaces de fermentar la d -maltosa.

Los polisacáridos corresponden a carbohidratos formados por tres o más unidades de monosacáridos, organizados en polímeros lineales o ramificados, enlazados mediante uniones glucosídicas. El trisacárido D-melezitosa puede ser metabolizado por un número limitado de bacterias ácido lácticas, principalmente cepas de *Lactobacillus*.

Los polioles son alcoholes caracterizados por la presencia de tres o más grupos hidroxilo en su estructura. En cuanto a la fermentación del glicerol, esta capacidad se ha observado en determinadas cepas de bacterias ácido lácticas, específicamente *Lactobacillus uvarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus zeae*, *Lactobacillus composti*, *Lactobacillus dextrinicus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*.

Las sales utilizadas incluyeron gluconato de potasio, 2-cetogluconato de potasio y 5-cetogluconato de potasio. De estos compuestos, el gluconato de potasio fue el que mostró la mayor capacidad de ser metabolizado por los miembros de las bacterias ácido lácticas (BAL) en cada clado.

2.9 Producción De Compuestos Aromáticos

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos que generan compuestos como acetaldehído, diacetilo y diversos agentes de sabor. Este proceso ocurre a través de mecanismos de biosíntesis y actividad enzimática. La formación de estas sustancias aromáticas se produce principalmente en dos rutas metabólicas: la del ácido cítrico y la de los aminoácidos (Wang et al., 2021).

Las bacterias heterofermentativas transforman el ácido cítrico en productos aromatizantes como lo es la acetoina y diacitilo estos compuestos generan aroma y sabor en los productos obtenidos (Parras Huertas, 2010)

2.10 Aplicación De Las BAL

Las BAL son de suma importancia en la industria alimentaria debido a los productos que se pueden obtener a partir de su fermentación contribuyendo en la conservación de los alimentos y en la mejora de sus características sensoriales como el olor, sabor, textura aumentando su calidad nutritiva (Ramírez Ramírez et al., 2011).

2.10.1. Conservación De Alimentos

Las bacterias ácido lácticas desempeñan un papel fundamental en la conservación de alimentos fermentados debido a su capacidad de generar compuestos como el ácido láctico y otros ácidos orgánicos, los cuales disminuyen el pH del entorno y ejercen un efecto inhibitorio sobre bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. En este proceso, la forma no disociada del ácido láctico atraviesa con mayor facilidad la pared celular microbiana; una vez dentro, el pH más elevado del citoplasma favorece su disociación y la liberación de iones hidrógeno junto con el anión correspondiente. Esta interacción altera el metabolismo celular y limita el crecimiento de microorganismos indeseables, asegurando así la preservación y seguridad del producto fermentado (Ramírez Ramírez et al., 2011).

De acuerdo con Ibrahim et al. (2021), los mecanismos de inhibición de las BAL pueden clasificarse en tres categorías principales según su naturaleza química y su modo de acción:

1. **Bacteriocinas peptídicas o proteínicas:** las bacteriocinas producidas por las BAL cuentan con la clasificación GRAS (generalmente reconocidos como seguros) otorgada por la FDA; además, carecen de olor y color, lo que asegura que no alteren las propiedades organolépticas de los alimentos, son degradadas en el sistema digestivo por enzimas proteolíticas, lo que refuerza su seguridad de uso. Aunque son antimicrobianos potentes y prometedores la única bacteriocina BAL que ha sido aprobada para su uso en alimentos por la FDA es la nisina.
2. **Ácidos orgánicos:** Los ácidos orgánicos poseen actividad antimicrobiana, atribuida a las moléculas disociadas que se desprotonan al penetrar en las membranas celulares. En las BAL este efecto suele relacionarse con la presencia de dichos ácidos cuyo mecanismo podría

explicarse por la acción conjunta de los iones disociados y las formas no disociadas generando finalmente daño celular.

3. Moléculas pequeñas: Estas moléculas de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana, como el diacetilo, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la reuterina, son producidas por las BAL. Su acción bactericida se intensifica al combinarse con calor, y su efecto antimicrobiano se basa en la inactivación de enzimas esenciales, lo que provoca alteración de su función catalítica.

2.10.2. Probióticos

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedero. Dentro de este grupo, las bacterias ácido lácticas han sido ampliamente estudiadas debido a su uso tradicional en alimentos fermentados y a sus propiedades funcionales reportadas en diversos estudios (FAO/WHO, 2002).

Los probióticos ejercen sus efectos beneficiosos a través de distintos mecanismos que dependen de cada cepa. Entre ellos se incluyen el fortalecimiento de la barrera epitelial mediante el mantenimiento de las proteínas de las uniones estrechas y la estimulación de la producción de mucina por las células caliciformes. También favorecen la adhesión a la mucosa intestinal lo que dificulta la colonización de patógenos y promueven la exclusión competitiva de microorganismos dañinos gracias a la síntesis de sustancias antimicrobianas. Además, participan en la regulación del sistema inmunitario de la mucosa contribuyendo al equilibrio y protección del organismo (Lima de Jesús et al., 2022).

2.10.3. Exopolisacáridos

Según explican De Vuyst y Degeest (1999) los exopolisacáridos (EPS) microbianos son polisacáridos extracelulares que se asocian a la superficie celular en forma de cápsulas o secretan al entorno extracelular en forma de mucosidad encontrándose ampliamente presentes en las BAL. Los exopolisacáridos forman una capa protectora alrededor de las células, lo que les permite resistir condiciones ambientales desfavorables como la deshidratación, temperaturas extremas, acidez del medio, así como la acción de fagocitosis, macrófagos y antibióticos. En el caso de las bacterias ácido lácticas los EPS pueden encontrarse unidos a la superficie celular en forma capsular o liberarse al medio de cultivo. Según su composición química, se clasifican en homopolisacáridos constituidos por un único tipo de monosacárido, y heteropolisacáridos formados por dos o más

tipos de monosacáridos. Entre los EPS más empleados a nivel comercial destaca la goma xantana, ampliamente utilizada por sus propiedades funcionales (Ventura-Canseco et al., 2023).

En los últimos años, los exopolisacáridos han adquirido relevancia por sus destacadas propiedades fisicoquímicas y sus funciones probióticas. Diversas bacterias ácido lácticas, entre ellas *Streptococcus thermophilus*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactocaseibacillus casei* y *Lactiplantibacillus plantarum*, son capaces de sintetizar distintos tipos de exopolisacáridos. Estos compuestos no solo participan en los procesos de adhesión bacteriana, sino que también confieren características adicionales a los alimentos fermentados (Wang et al., 2021).

Los exopolisacáridos se han empleado de manera habitual como agentes naturales y seguros para espesar, emulsionar o estabilizar alimentos, contribuyendo a mejorar su textura. Además de estas funciones tecnológicas, los EPS presentan diversas propiedades biológicas de interés, entre ellas actividades antioxidantes, anticancerígenas, inmunomoduladoras, antibacterianas, hipoglucemiantes, antihipertensivas y reductoras del colesterol. También favorecen la colonización de probióticos en el intestino del huésped, lo que potencia sus efectos benéficos en la salud (Xu et al., 2019).

2.11 Bioquímica Del Ácido Láctico

El ácido láctico, también denominado ácido 2-hidroxipropanoico, está formado por dos grupos funcionales: un alcohol y un carboxilo. Esta estructura origina un carbono asimétrico responsable de su actividad óptica. A partir de ello, se distinguen dos isómeros enantiómeros: D(-) y L(+) (Figura 14) además de una forma racémica compuesta por proporciones equimolares de ambos. El isómero D(-) resulta desfavorable para el metabolismo humano, pues puede provocar acidosis y pérdida de calcio. En contraste, el isómero L(+) ha sido reconocido por la FDA como una sustancia GRAS, lo que avala su uso seguro como aditivo en alimentos (García, Arrázola & Durango, 2010).

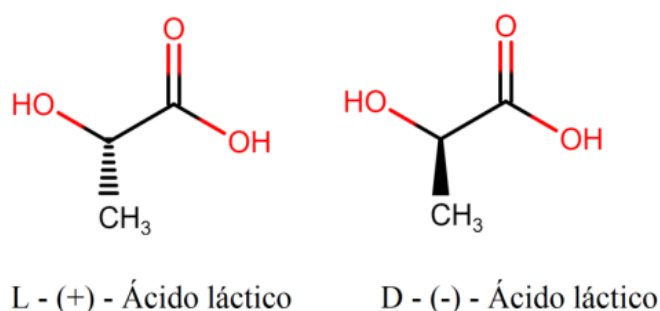


Figura 14. Formas isométricas del ácido láctico (Fernández, 2022)

El ácido láctico se emplea ampliamente en la elaboración de productos como bebidas y alimentos fermentados. Su función como agente acidificante es fundamental en la conservación de alimentos y en la mejora de sus características organolépticas. Su principal aplicación radica en la capacidad de reducir el pH del producto final, lo que inhibe o elimina el desarrollo de microorganismos no deseados, contribuyendo así a la seguridad y estabilidad del alimento (Gorbeña & Sáenz, 2008).

La producción del ácido láctico se lleva a cabo mediante fermentación microbiana obteniendo isómeros puros, o bien, mediante síntesis química obteniendo mezclas racémicas de ácido D- y Láctico (Fernández, 2022).

Las BAL siguen dos rutas para la producción del ácido lácticos una de ellas es ruta homofermentativa, es la que genera ácido láctico como único producto al final de la degradación de los carbohidratos y la otra es la ruta heterofermentativa donde se produce el etanol y CO₂ en cantidades equimolares al ácido láctico sintetizado (Gorbeña & Sáenz, 2008).

El ácido láctico se emplea ampliamente en la elaboración de productos como bebidas y alimentos fermentados. Su función como agente acidificante es fundamental en la conservación de alimentos y en la mejora de sus características organolépticas. Su principal aplicación radica en la capacidad de reducir el pH del producto final, lo que inhibe o elimina el desarrollo de microorganismos no deseados, contribuyendo así a la seguridad y estabilidad del alimento (Gorbeña & Sáenz, 2008).

2.12 Atmosferas controladas con dióxido de carbono en bacterias lácticas

La composición de la atmósfera gaseosa constituye un factor ambiental determinante para el crecimiento y aislamiento de microorganismos. Además de los nutrientes y las condiciones fisicoquímicas del medio de cultivo, factores como la disponibilidad de oxígeno y la concentración

de dióxido de carbono influyen directamente en el metabolismo, la actividad enzimática y la velocidad de crecimiento bacteriano. Diversos estudios han demostrado que ciertos microorganismos no son capaces de desarrollarse adecuadamente bajo aire atmosférico convencional, por lo que requieren atmósferas modificadas para su proliferación.

En este sentido, Ueda et al. (2008) demostraron que el aislamiento de diversas bacterias ambientales solo fue posible cuando los cultivos se incubaron bajo atmósferas enriquecidas con dióxido de carbono. Los autores observaron que el crecimiento de estos microorganismos dependía estrictamente de la presencia de niveles elevados de CO₂.

Las condiciones alcalinas ofrecen un entorno favorable para el desarrollo de microorganismos cuya supervivencia depende de altos niveles de dióxido de carbono. Se ha demostrado que la necesidad de una atmósfera rica en CO₂ corresponde al fenotipo de mutantes *knockout* de la enzima anhidrasa carbónica responsable de catalizar la interconversión entre CO₂ y bicarbonato, en especies como *Ralstonia eutropha*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* y *Saccharomyces cerevisiae*. Dichos mutantes son incapaces de crecer en aire ambiente, pero sí lo hacen bajo condiciones con abundante CO₂.

La anhidrasa carbónica parece desempeñar un papel esencial en la captación de bicarbonato en microorganismos no fototróficos. Las cepas que conservan esta enzima pueden obtener suficiente bicarbonato a partir del CO₂ atmosférico mediante conversión catalítica, suministrándolo a enzimas dependientes de bicarbonato como el fosfoenolpiruvato carboxilasa y la acetil-CoA carboxilasa. De este modo, logran crecer incluso en aire con bajas concentraciones de CO₂ (0,035%). En contraste, las cepas que carecen de anhidrasa carbónica requieren un aporte externo elevado de bicarbonato para iniciar su crecimiento; por ello, no prosperan en aire ambiente, pero sí en atmósferas enriquecidas en CO₂, aprovechando el bicarbonato generado para mantener su equilibrio metabólico. Lo que evidencia que la modificación de la atmósfera puede ser un factor crítico para revelar y aislar poblaciones microbianas que permanecen latentes bajo condiciones atmosféricas normales. (Ueda et al., 2008).

2.13 Medio de cultivo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe)

El agar MRS es un medio diseñado para cuantificar bacterias lácticas fue creado en 1960 por de Man, Rogosa y Sharpe para el cultivo y conteo de especies de *Lactobacillus* provenientes de distintas fuentes, como alternativa al agar de jugo de tomate. Su composición nutritiva proviene de hidrolizados enzimáticos de caseína, carne y extractos de levadura, junto con glucosa como

fuelle energética. El crecimiento bacteriano se ve favorecido por el monooleato de polioxietilsorbitano y por sales de magnesio y manganeso. La selectividad frente a estreptococos y hongos se logra mediante citrato de amonio y acetato de sodio. A pH ácido, el citrato de amonio permite el desarrollo de lactobacilos mientras inhibe otros microorganismos (Rodin SRL).

Sin embargo, las levaduras comparten requerimientos nutricionales y tolerancia a la acidez con las BAL, es común observar un crecimiento de ambos grupos en este medio. Investigaciones recientes (Park et al., 2022) señalan que para lograr un aislamiento exclusivo de bacterias lácticas y evitar la competencia con la microbiota fúngica, es necesaria la suplementación del agar con agentes antifúngicos como la cicloheximida, ya que otros inhibidores comerciales pueden presentar una eficacia menor.

2.14 Métodos De Identificación De Bacterias Ácido Lácticas

La identificación de bacterias ácido-lácticas (BAL) es un paso clave para describir la comunidad microbiana presente en fermentaciones. Tradicionalmente, la identificación se realizaba mediante criterios fenotípicos; sin embargo, en la actualidad se emplean principalmente métodos basados en secuencias de ADN. La secuenciación del gen 16S rRNA es la técnica más utilizada, aunque en casos específicos se recurre a la secuenciación de genes constitutivos. De manera creciente, la comparación de secuencias genómicas completas se ha consolidado como una estrategia común para lograr una identificación más precisa (Endo et al., 2019).

2.15 Identificación Fenotípica

Los métodos fenotípicos son pruebas tradicionales que proporcionan una primera clasificación de los microorganismos basándose en rasgos observables:

2.15.1. Tinción de Gram.

Hans Christian Gram (1853–1938) fue un bacteriólogo danés reconocido por haber desarrollado el método de tinción bacteriana que posteriormente llevaría su nombre. La tinción de Gram constituye una técnica diferencial ampliamente utilizada en microbiología, ya que permite distinguir de manera rápida las bacterias según sus características morfológicas y estructurales. El procedimiento consiste en teñir inicialmente todas las bacterias con cristal violeta o violeta de genciana, seguido de un proceso de decoloración con alcohol-acetona. En este paso, las bacterias

Gram negativas pierden la coloración, mientras que las Gram positivas la retienen. Finalmente, se aplica un colorante de contraste, como fucsina o safranina, lo que permite observar a las bacterias Gram positivas con tonalidades azul-violáceas y a las Gram negativas en colores rojizos o rosados (Mora X 2012).

El fundamento de esta técnica se basa en las particularidades estructurales de la pared celular bacteriana. En las bacterias Gram positivas, la pared celular es gruesa (20–80 nm) y está formada principalmente por múltiples capas de peptidoglicano, que constituyen entre el 80 y 90% de su composición. Además, contiene ácido teicoico y otros polímeros que confieren impermeabilidad, lo que les permite resistir el proceso de decoloración. A diferencia de las Gram negativas, estas bacterias carecen de membrana externa. En contraste, las bacterias Gram negativas poseen una pared celular más delgada, con una capa de peptidoglicano de aproximadamente 2 nm que representa solo entre el 10 y 20% de la pared, acompañada de una membrana externa compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos (Figura 15) (Fernández , 2022).

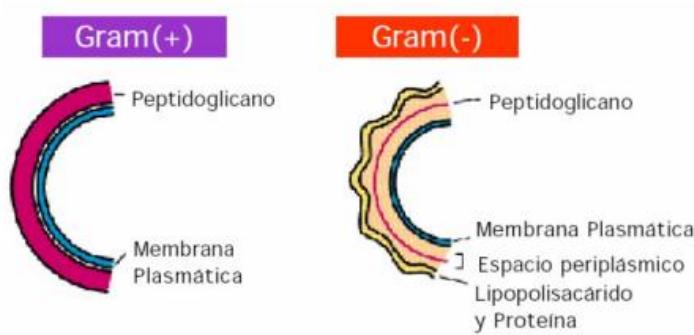


Figura 15. Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Fernández, 2022).

2.15.2. Prueba de catalasa.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un subproducto del metabolismo celular en numerosos organismos vivos y cumple, entre otras funciones, un papel protector frente a microorganismos patógenos, especialmente de tipo anaerobio. Sin embargo, debido a su toxicidad, debe transformarse rápidamente en compuestos menos dañinos. La enzima catalasa cataliza la descomposición del H_2O_2 en agua y oxígeno. Este compuesto es el resultado final del metabolismo aeróbico de los carbohidratos y, en caso de acumularse, resulta perjudicial para las bacterias. La

mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas producen catalasa (Lozano, Ramírez, & Duarte, 2022).

La prueba de catalasa puede realizarse en lámina o en tubo. En el primer caso, se coloca una o dos gotas de H_2O_2 al 3% sobre un portaobjetos, se emulsiona una colonia bacteriana con un palillo estéril y se mezcla suavemente. En el método en tubo, se requiere previamente la siembra del microorganismo en agar nutritivo en “pico de flauta”; una vez obtenidas las colonias, se añaden dos o tres gotas de H_2O_2 al 3%. En ambos procedimientos, la producción de burbujas dentro del primer minuto indica la actividad de la enzima catalasa (Lozano, Ramírez, & Duarte, 2022).

2.16 Identificación Molecular Mediante El Gen 16S rRNA

La identificación molecular basada en el análisis del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S (16S rRNA) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos por lo tanto ha permitido la identificación y clasificación de microorganismos como las bacterias cuya identificación por otros métodos resulta difícil o demasiado lenta. La amplificación del gen, seguida de su secuenciación, se realiza a partir del ADN obtenido de un cultivo bacteriano puro (del Rosario Rodicio & del Carmen Mendoza, 2004).

III. Justificación

La lechuguilla es una bebida tradicional en la que ocurre una fermentación natural la cual depende del microbiota presente en el ambiente y la materia prima (*Agave maximiliana*). A pesar de tratarse de una bebida con relevancia cultural existe información limitada sobre su composición microbiana durante su proceso de fermentación.

El estudio y caracterización de los microorganismos presentes en fermentaciones tradicionales resulta fundamental para comprender su proceso fermentativo, así como sentar las bases para contribuir en la mejora del control y estandarización del proceso.

En este contexto la presente investigación busca aportar información sobre el microbiota presente en la lechuguilla mediante técnicas de aislamiento y caracterización fenotípica. Contribuyendo al conocimiento científico de bebidas fermentadas artesanales poco estudiadas.

IV. Hipótesis

La fermentación natural de la lechuguilla presenta una microbiota compleja, en la que coexisten diversos grupos microbianos. Entre ellos las bacterias ácido lácticas las cuales destacan como uno de los principales participantes durante el proceso fermentativo; por lo tanto, es posible su caracterización fenotípica mediante el uso de un medio de cultivo selectivo.

V. Objetivos

5.1 Objetivo General

Aislar y caracterizar las bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación natural del agua lechuguilla.

5.2 Objetivos Específicos

5.2.1. Determinar y analizar los parámetros fisicoquímicos asociados al proceso de fermentación natural del agua lechuguilla.

5.2.2. Evaluar la presencia de BAL en muestras heterogéneas de fermentación mediante el uso de un medio de cultivo selectivo.

5.2.3. Obtener y purificar aislamientos de las BAL a partir de muestras heterogéneas en medio de cultivo selectivo.

5.2.4. Caracterizar fenotípicamente los aislamientos obtenidos mediante análisis macroscópicos y microscópicos.

VI. Materiales Y Métodos

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Usos Múltiples perteneciente al Instituto Tecnológico de Tlajomulco, ubicado en Km. 10 carretera Tlajomulco-San Miguel Cuyutlán, Cto. Metropolitano Sur, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México, con el objetivo de aislar y caracterizar bacterias ácido-lácticas durante la fermentación natural del agua de lechuguilla. A continuación, se describen los materiales utilizados y la metodología empleada para la obtención, fermentación, aislamiento de las bacterias lácticas presentes.

6.1 Materia Prima

Se utilizó *Agave maximilana Baker* obtenido del municipio de Mascota Jalisco. La piña del agave fue cortada y lavada posteriormente fue almacenada en refrigeración hasta su uso para la preparación del fermento.

6.2 Preparación Del Fermento Agua Lechuguilla

Para la elaboración del fermento de agua lechuguilla se elaboraron dos replicas experimentales a las que llamaremos muestra 1 y 2 en las cuales se adicionaron 150 g de piña de agave Maximiliana Baker, junto 7.5 g de sacarosa por litro de agua como fuente adicional de carbohidratos. Las muestras se dejaron fermentar de manera natural durante 6 días manteniendo una temperatura óptima de 38°C.

6.3 Cuantificación de características físico químicas (pH, Brix, Azúcares reductores, UFC)

6.3.1. pH

La determinación del pH se realizó utilizando un potenciómetro digital (Figura 16) previamente calibrado. Las mediciones se realizaron directamente sobre las muestras del fermento cada 24 h, realizándose por triplicado durante seis días consecutivos.

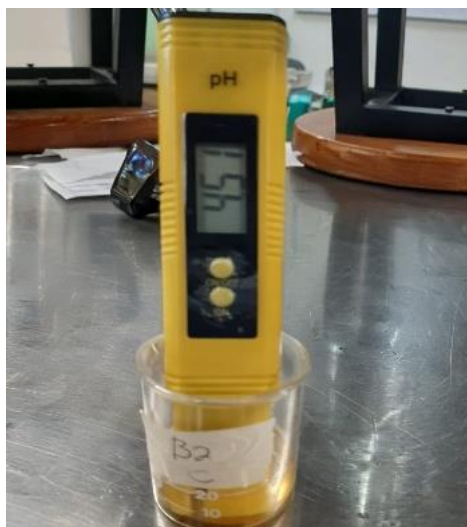


Figura 16. Potenciómetro digital

6.3.2. ° Brix

La medición de sólidos solubles (° Brix) se realizó utilizando un refractómetro digital (ATAGO), (Figura 17) con compensación automática de temperatura en un rango de 10 a 100 °C y un rango de medición de 0,0 a 93,0% ° Brix. El equipo fue calibrado con agua destilada antes de cada serie de mediciones. Las determinaciones se realizaron directamente sobre las muestras del fermento por triplicado durante el periodo de fermentación cada 24h.



Figura 17. Refractómetro digital.

6.3.3. Determinación De Azúcares Reductores

La cuantificación de azúcares reductores se realizó mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para ello, se preparó el reactivo DNS el cual estuvo compuesto por

tartrato de sodio y potasio (19.96 % p/v), hidróxido de sodio (NaOH) (1.226% v/v), ácido 3,5-dinitrosalicílico (0.687% p/v) y fenol (1.28 % p/v).

Para la medición de las muestras se mezclaron 30 µL del fermento con 100 µL del reactivo DNS previamente preparado. Posteriormente la mezcla se incubó a 95 °C durante 5 min con el fin de permitir el desarrollo de color. Una vez concluida la incubación, las muestras se transfirieron a una microplaca y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 550 nm.

La cuantificación de los azúcares reductores se realizó mediante una curva de calibración utilizando glucosa (Wöhler) como estándar, en concentraciones de 5,10, 15, 20 y 25 mM. Las soluciones patrón se prepararon en buffer McIlvaine pH 5.0, compuesto por el ácido cítrico 0.1 M y fosfato disódico 0.2 M, en un volumen final de 30 µL. A cada estándar se le adicionaron 100 µL del reactivo DNS y la mezcla se incubó a 95°C durante 5 min. La absorbancia se registró a 55° nm utilizando un lector de microplacas i.Mark (Ramada et al., 2010).

6.3.4. Unidades Formadoras De Colonias (UFC)

El recuento bacteriano se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, considerando solo las placas que tenían de 25 a 250 colonias.

Para cada día de conteo se analizaron las dos muestras experimentales 1 y 2 donde se realizó una siembra por duplicado por ello se calculó el promedio de las colonias, posteriormente se determinó la concentración microbiana aplicando la siguiente formula:

$$\text{UFC}=(\text{número de colonias})(\text{inverso del factor de disolución})(\text{ml de muestra})$$

Los resultados se expresaron como Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL).

6.4 Siembra de muestras heterogéneas de microorganismos en medios de cultivo selectivos para BAL.

6.4.1. Disoluciones Seriadas

Para la siembra de las BAL presentes en el agua lechuguilla, se llevaron a cabo disoluciones seriadas de las dos muestras realizadas, se preparó una solución madre a partir de las muestras del fermento, de la cual se tomaron 10ml. A partir de esta solución madre se transfirió 1 mL a un tubo que contenía 9mL de solución peptona, obteniéndose así la primera dilución. Este procedimiento se repitió de manera sucesiva hasta completar seis tubos de dilución.

Las diluciones obtenidas se incubaron a 28°C durante 24h. El procedimiento de diluciones seriadas se inició después de las primeras 24h de fermentación y se repitió diariamente durante el periodo de fermentación.

6.4.2. Siembra en medio de cultivo selectivo

La siembra de las BAL se realizó utilizando medio de cultivo selectivo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) (Merck Millipore, Alemania), preparado de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La siembra se llevó a cabo a partir de las diluciones obtenidas previamente, empleando el método de extensión de placa. Para ello se tomaron 50 µL de los tubos de 10^{-6} se sembraron por duplicado sobre placas con medio MRS de ambas muestras 1 y 2.

Las placas se incubaron a 28 °C durante 48h donde se realizó el monitoreo del crecimiento microbiano y el registro fotográfico de las placas, con el fin de observar el desarrollo y las características macroscópicas de las colonias.

6.5 Aislar microorganismo de las muestras heterogéneas para realizar cultivos homogéneos en medio selectivo para BAL.

Una vez obtenidas las colonias en el agar MRS se llevó a cabo el proceso de purificación para obtener cultivos homogéneos. Se seleccionaron aquellas colonias que presentaron morfología distinta considerando las características macroscópicas. Cada colonia seleccionada fue tomada con asa bacteriológica estéril y resembrada mediante la técnica de estriado en nuevas placas con el agar MRS manteniendo el mismo medio selectivo.

Las placas fueron incubadas bajo las mismas condiciones previamente establecidas. Posteriormente se revisó que las colonias tuvieran una uniformidad morfológica y se repitió la resiembra hasta observar un crecimiento homogéneo.

6.6 Caracterización macro y microscópica de los aislados homogéneos.

La identificación fenotípica de los aislamientos se realizó mediante evaluación de características microscópicas y macroscópicas. Las colonias seleccionadas se analizaron considerando su morfología macroscópica, tamaño, forma, borde, elevación, color y textura. Por otro lado, para la identificación microscópica se llevó a cabo la tinción de Gram con el fin de determinar si correspondían a bacterias Gram positivas o Gram negativas.

6.7 Segunda corrida experimental

El experimento se llevó a cabo en dos corridas experimentales independientes, manteniendo las mismas condiciones generales de fermentación, muestreo, dilución y aislamiento.

En la segunda corrida experimental la incubación de las bacterias aisladas se realizó bajo una atmosfera modificada con dióxido de carbono (CO₂) al 5.5% con el fin de favorecer el crecimiento de bacterias ácido-lácticas. En esta segunda corrida se incluyó la prueba de catalasa para la caracterización de los aislamientos obtenidos.

VII. Resultados Y Discusión

7.1 Cuantificación de características físico químicas (pH, Brix, Azúcares reductores, UFC)

El proceso de fermentación natural del agua lechuguilla fue monitoreado durante un periodo de 6 días mediante la evaluación de parámetros fisicoquímicos como, lo fue el pH, °Brix, azúcares reductores y UFC con el objetivo de observar los cambios asociados a la actividad microbiana a lo largo de este tiempo de fermentación.

7.1.1. pH

Durante el periodo de la fermentación se observó una variación de pH con respecto a los demás tiempos y este se da entre las primeras 24 horas y 96 horas pasando de un valor inicial de 4.9 a 4.2. Esta disminución de pH es debido a la producción de ácidos orgánicos resultado de los microorganismos fermentadores presentes. Posteriormente el pH se mantuvo estable hasta el final de la fermentación en las 144 horas con valores cercanos a 4.3 (Figura 18)

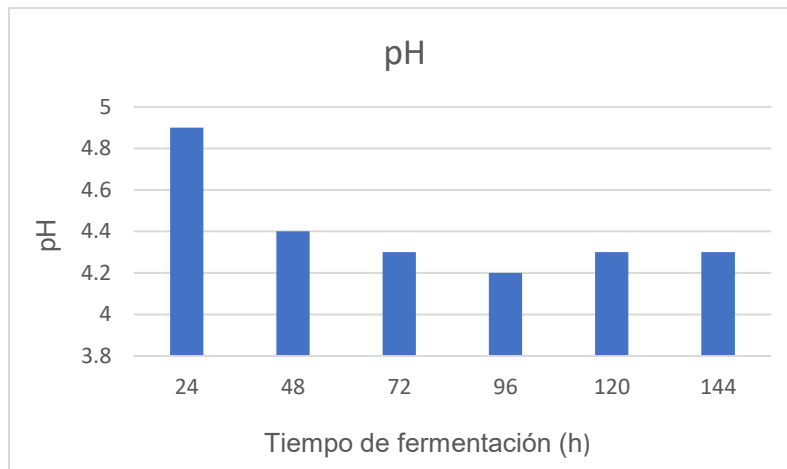


Figura 18. Variación del pH durante la fermentación del agua lechuguilla.

Esta disminución se debe a la producción de ácidos orgánicos derivados de la actividad metabólica de los microorganismos fermentadores. La estabilización observada hacia el final del proceso fermentativo sugiere el agotamiento de los sustratos fermentables y llegar a una fase estacionaria.

7.1.2. Sólidos solubles (°Brix)

Los sólidos solubles (°Brix) mostraron una reducción notable durante las primeras 48h de fermentación disminuyendo de 2.1 a 0.9 °Brix. Este comportamiento sugiere el consumo de compuestos solubles principalmente azúcares fermentables por parte de la microbiota fermentadora presente los cuales fueron transformados en otros compuestos, una vez que estos se

agotaron quedaron únicamente los sólidos solubles que no pueden ser metabolizados por los microorganismos.

Se observó un ligero incremento a las 72 h (1.1 °Brix) seguido de una estabilización de 0.9 °Brix hasta el final del proceso (Figura 19). Debido a que se trata de una fermentación natural no se tiene un control de los microorganismos presentes este incremento podría atribuirse a que los microorganismos liberaron compuestos metabólicos que influyen en la lectura del refractómetro.

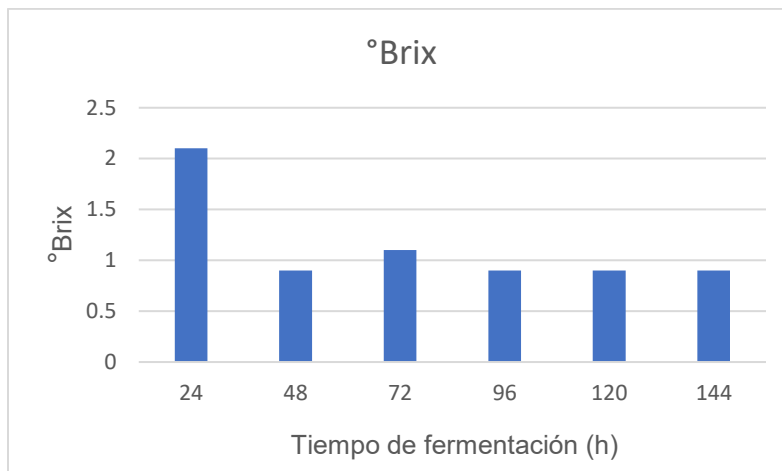


Figura 19. Variación de los sólidos solubles (°Brix) durante la fermentación del agua lechuguilla.

7.1.3. Azúcares reductores

La concentración de azúcares reductores presento una disminución gradual a lo largo de la fermentación pasando de 2.1 a 1.2 al termino de proceso (144h) (Figura 20). Estos resultados confirman la actividad microbiana la cual utilizo los carbohidratos fermentables como principal fuente de energía para su crecimiento y desarrollo. A partir de las 120h los valores se mantuvieron estables lo que sugiere que la etapa de fermentación a terminado debido a que los microorganismos dejaron de metabolizar los azucars disponibles.

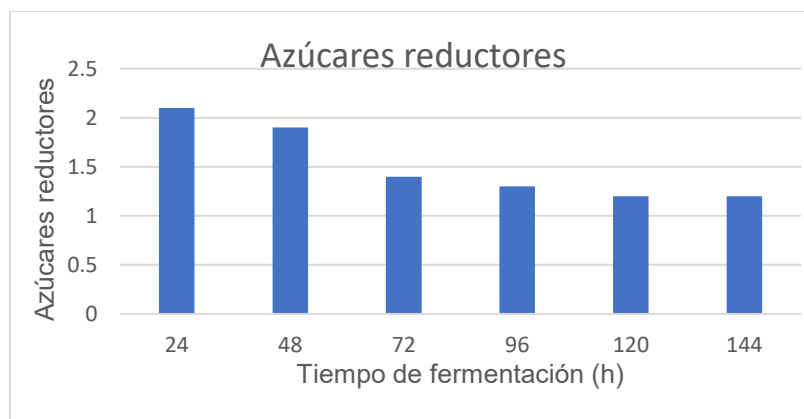


Figura 20. Variación de los azúcares reductores durante la fermentación del agua lechuguilla.

7.1.4. Recuento Microbiológico (Unidades Formadoras De Colonias)

En ambas muestras se observó un comportamiento similar donde se tuvo recuentos bajos durante los primeros días 1 y 2 seguido de un incremento progresivo en la concentración de colonias a partir del día 3. Los valores máximos de UFC/mL se registraron entre los días 4 y 6 alcanzando concentraciones de 10^9 UFC/mL.

Aunque se presentaron diferencias en el número de colonias entre las dos muestras la tendencia general de crecimiento fue consistente. Los resultados se presentan en la Tabla 2

Tabla 2. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) durante la fermentación del agua lechuguilla.

Día	Muestra	Promedio de colonias	UFC/mL
1	1	6	1.2×10^8
1	2	34	6.8×10^8
2	1	4.5	9.0×10^7
2	2	19.5	3.9×10^8
3	1	6	1.2×10^8
3	2	28.5	5.7×10^8
4	1	175	3.5×10^9
4	2	231.5	4.6×10^9
5	1	198.5	4.0×10^9
5	2	105	2.1×10^9
6	1	97	1.9×10^9
6	2	182	3.6×10^9

Nota. Los valores corresponden a las dos muestras experimentales independientes. El conteo de unidades se realizó tras 48h de incubación.

7.2 Siembra de muestras heterogéneas de microorganismos en medios de cultivo selectivos para BAL.

Las muestras heterogéneas obtenidas de la lechuguilla fueron sembradas en medio Agar MRS para favorecer su crecimiento.

Durante la primera corrida experimental se observó un gran crecimiento en las placas, evidenciando colonias con morfología variables (Figura 21). Macroscópicamente se identificaron colonias de color blanco cremoso, con superficie lisa y brillante.



Figura 21. Desarrollo de colonias microbianas en medio de cultivo MRS tras la siembra inicial de la lechuguilla.

7.3 Aislar microorganismo de las muestras heterogéneas para realizar cultivos homogéneos en medio selectivo para BAL.

A partir del crecimiento observado en el medio MRS se procedió a realizar el aislamiento de colonias individuales mediante resiembra por estriado para obtener cultivos homogéneos (Figura 22)

En la primera corrida experimental se lograron aislar un total de 12 cepas a las cuales se les asignó la clave alfanumérica ITTJBALX para su identificación y seguimiento. Sin embargo, la caracterización indicó que algunas cepas tenían morfología más compatible con levaduras.

En la segunda corrida experimental bajo las condiciones de CO₂ al 5.5% se aislaron 6 cepas donde se observó mayor presencia de morfología bacilar más compatibles con las BAL.

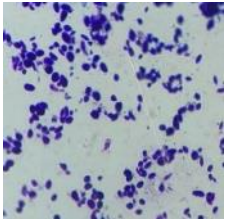
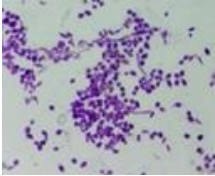
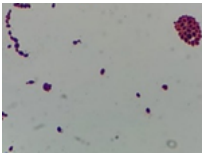


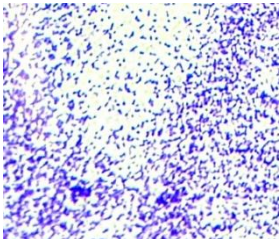
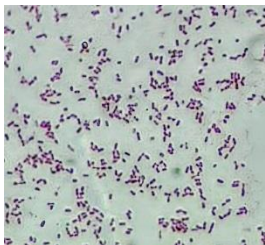
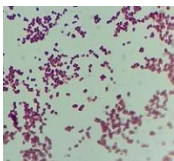
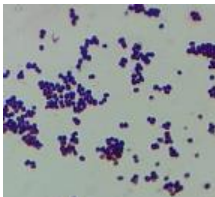
Figura 22. Colonias aisladas obtenidas a partir de la siembra primaria de la bebida de lechuguilla en medio de cultivo MRS.

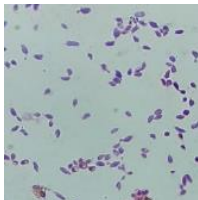
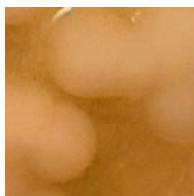
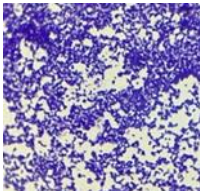
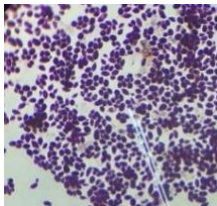
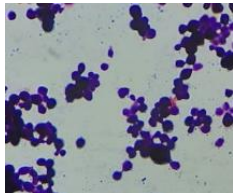
7.4 Caracterización Macroscópica Y Microscópica De Las Cepas Aisladas

7.4.1. Primera Corrida Experimental

Tabla 3. Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas aisladas del agua de lechuguilla durante la primera corrida experimental.

Cepa	Morfología Microscópica	Morfología Macroscópica
ITTJBALD1	Célula ovalada Gram positiva más compatible con levadura 	Colonia circular de superficie lisa y brillante con elevación convexa 
ITTJBALD2	Células ovaladas a elipsoidales de gran tamaño parecida a levadura 	Colonia brillante de color amarillo claro de forma circular irregular, con margen entero y elevación convexa 
ITTJBALD3.1	Células con forma esférica u ovoide, su forma y tamaño sugieren que se trata de levaduras 	Colonia blanco cremoso de forma circular con textura lisa brillante y margen entero con elevación convexa 

Cepa	Morfología Microscópica	Morfología Macroscópica
ITTJBALD3.2	Bacilos Gram positivos agrupados entre si 	Colonia blanco cremoso de forma circular, bordes enteros y elevación convexa 
ITTJBALD4.1	Bacilos Gramnegativos cortos dispersos de forma individual o en pares 	Colonias amarillo claro circulares, opacas de superficie lisa y borde regular con elevación convexa 
ITTJBALD4.2	Cocos Gram positivos algunos se encuentran en racimos grandes agrupados y otros de forma individual 	Colonias circulares de color blanco cremoso, con superficie lisa y borde entero, elevación convexa 
ITTJBALD4.3	Cocos Grampositivos en cadenas cortas 	Colonias color beige oscuro de forma circular con bordes definidos y elevación convexa 

Cepa	Morfología Microscópica	Morfología Macroscópica
ITTJBALD4.4	Células ovaladas o elipsoidales grandes en etapa de gemación por lo cual pertenecen algún genero de levadura	Colonias de forma circular y opacas con tono blanco su superficie es lisa, borde regular y elevación convexa
		
ITTJBALD4.5	Cocos Grampositivos con racimos densos y agrupados	Colonia de crecimiento circular con borde irregular tiene una elevación convexa de superficie rugosa y un color entre blanco amarillento opaco
		
ITTJBALD5.1	Células Gram positivas de tamaño grande con forma ovalada más compatible con levaduras	Colonia circulares de color blanco translucido con superficie lisa y brillante, presentan elevación convexa y bordes enteros.
		
ITTJBALD6	Cocos Gram positivos	Colonia beige oscuro de forma circular, con pliegues en el centro
		

Nota. Las observaciones microscópicas se realizaron mediante tinción de Gram a 100× con aceite de inmersión.

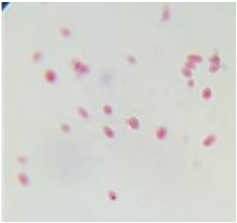
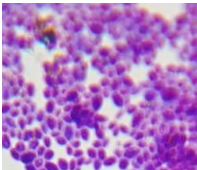
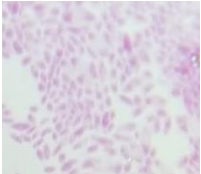
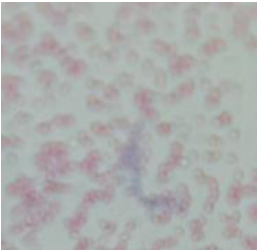
En la primera corrida experimental se obtuvieron 12 aislamientos microbianos en total; sin embargo, solo las cepas ITTJBALD3.2, ITTJBALD4.1, ITTJBALD4.2, ITTJBALD4.3 y ITTJBALD4.5 coincidieron con la identificación fenotípica de bacterias ácido-lácticas. El resto de los aislamientos correspondieron a otros microorganismos lo que indica que, a pesar del uso de un medio selectivo MRS el cual favorece el crecimiento de bacterias ácido lácticas no impide completamente el desarrollo de otros microorganismos presentes en la fermentación lo que resalta la importancia de realizar una identificación complementaria para asegurar la correcta caracterización de las BAL.

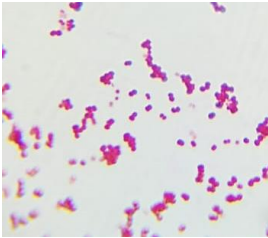
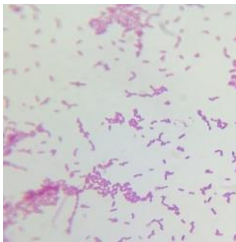
7.4.2. Segunda Corrida Experimental Con Dióxido De Carbono Al 5.5%

Con base en los resultados obtenidos en la primera corrida experimental al realizar la segunda corrida se ajustaron las condiciones de incubación con el fin de favorecer el crecimiento de bacterias ácido-lácticas. Para ello, se empleó una atmósfera de dióxido de carbono al 5.5 % manteniendo el uso de medio agar MRS.

Esta condición influyó en el desarrollo y las características morfológicas de los microorganismos aislados a partir del agua de lechuguilla donde se aislaron 6 cepas distintas Tabla 4.

Tabla 4. Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas aisladas del agua de lechuguilla durante la segunda corrida experimental incubadas en atmosfera con 5.5% CO₂.

Cepa	Morfología Microscópica	Morfología Macroscópica
ITTJBALD1	Coco bacilos Gram negativos 	Colonia de forma ovalada con elevación convexa de color blanco cremoso, con superficie lisa y brillante 
ITTJBALD2	Células ovoides de gran tamaño compatible con levaduras 	Colonia blanco brillante de forma circular con bordes enteros y elevacion convexa 
ITTJBALD3	Celulas ovaladas de gran tamaño 	Colonia blanco translucido de forma ovalada y elevacion convexa 
ITTJBALD4	Cocos Gram negativos 	Colonia de forma circular con bordes bien definidos, su elevación es convexa y superficie lisa brillante de color blanco 

Cepa	Morfología Microscópica	Morfología Macroscópica
ITTJBALD4	Cocos Gram positivos agrupados en cadenas y parejas	Colonia de forma circular y bordes definidos con superficie lisa y brillante, además que tiene una elevación convexa su color es blanco con un ligero centro más denso y opaco
		
ITTJBALD5	Bacilos Gram positivos	Colonia circular con bordes definidos elevación plana y color blanco opaco con textura lisa.
		

Nota. Las observaciones microscópicas se realizaron mediante tinción de Gram a 100× con aceite de inmersión.

En la segunda corrida experimental se modificaron las condiciones de incubación mediante una atmósfera enriquecida con CO₂ al 5.5% con el objetivo de favorecer el crecimiento de bacterias ácido lácticas. En esta etapa se aislaron un total de 6 cepas sin embargo únicamente las cepas ITTJBALD4 e ITTJBALD5 presentaron características fenotípicas compatibles con bacterias ácido lácticas.

Estos resultados indican que a pesar de modificar las condiciones de la atmósfera para favorecer su crecimiento el aislamiento de bacterias ácido lácticas continuó siendo complicado, ya que solo dos cepas compartieron características fenotípicas similares a este grupo microbiano. Esto puede

atribuirse a la presencia de una microbiota diversa en la fermentación de la lechuguilla, donde otros microorganismos pueden crecer incluso bajo condiciones que favorecen a las BAL.

Lo anterior sugiere que el aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de fermentaciones naturales puede ser complejo.

7.5 Prueba De Catalasa

Con el fin de complementar la identificación fenotípica de las cepas aisladas se realizó la prueba de catalasa a los microorganismos obtenidos en la segunda corrida experimental. Los resultados se presentan en la Tabla 5 donde se indica la reacción ocurrida para cada cepa.

Tabla 5. Resultados de la prueba catalasa

Cepa	Reacción Catalasa
ITTJBALD1	Positiva
ITTJBALD2	Positiva
ITTJBALD3	Negativa
ITTJBALD4	Positiva
ITTJBALD4	Positiva
ITTJBALD5	Negativa

La prueba de catalasa mostro que la mayoría de las cepas presentaron reacción positiva por lo que podría deberse a las coexistencias de diferentes grupos bacterianos.

Sin embargo, es importante señalar que se han reportado que algunas BAL pueden presentar actividad pseudocatalasa bajo determinadas condiciones por ello la presencia de la reacción

positiva no permite descartar de manera definitiva que alguna cepa aislada se trate de algún género pertenecientes a las BAL.

VIII. Conclusiones

La fermentación natural del agua de lechuguilla presentó cambios fisicoquímicos característicos de un proceso fermentativo como la disminución del pH y de los azúcares reductores lo que indica la actividad de una microbiota fermentativa presente durante el proceso. Esto confirma que el agua de lechuguilla es un sistema de fermentación espontánea con una comunidad microbiana activa y dinámica.

El aislamiento de bacterias ácido lácticas en medio MRS resultó limitado ya que, aunque este medio es considerado selectivo se observó el crecimiento de otros microorganismos como levaduras y bacterias Gram negativas. Esto demuestra que en fermentaciones espontáneas la microbiota presente es compleja y que el medio MRS no es completamente selectivo bajo estas condiciones lo que dificulta la obtención de cultivos puros de bacterias ácido lácticas. A pesar de que se intentó favorecer el crecimiento de las BAL mediante condiciones como la incubación en atmósfera enriquecida con dióxido de carbono al 5.5% no se logró el aislamiento predominante de este grupo microbiano lo que sugiere que otros microorganismos presentes en la fermentación pueden competir por los nutrientes y crecer en el medio de cultivo.

Con base en los resultados obtenidos la hipótesis planteada se cumple parcialmente, ya que se confirmó que la fermentación natural de la lechuguilla presenta una microbiota compleja donde coexisten distintos grupos microbianos incluyendo bacterias ácido lácticas. Sin embargo, la caracterización fenotípica utilizando un medio de cultivo selectivo como el MRS fue limitada debido al crecimiento de levaduras y bacterias Gram negativas lo que dificultó el aislamiento puro de bacterias ácido lácticas.

Por lo tanto, se concluye que las bacterias ácido lácticas están presentes en la fermentación del agua de lechuguilla, pero su aislamiento en cultivo puro resulta difícil debido a la presencia de microorganismos competitivos. Para futuros estudios se recomienda el uso de medios de cultivo más selectivos o la adición de antibióticos que limiten el crecimiento de levaduras y bacterias Gram negativas para así poder mejorar el aislamiento de bacterias ácido lácticas. Asimismo, se recomienda complementar el aislamiento microbiológico con técnicas de identificación molecular para obtener una caracterización más precisa de la microbiota presente en la fermentación.

IX. Referencias

- Abdulgawad, I. A. I. (2016). Fermentation of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) wastes using *Lactobacillus plantarum* for the production of lactic acid and fertilizer. *International Journal of Waste Resources*, 6(4), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2252-5211.1000253>
- Azhar, N. S., Zin, N. H. M., & Hamid, T. H. T. A. (2017). *Lactococcus lactis* strain A5 producing nisin-like bacteriocin active against gram positive and negative bacteria. *Tropical Life Sciences Research*, 28(2), 107–118. <https://doi.org/10.21315/tlsr2017.28.2.8>
- Buron-Moles, G., Chailyan, A., Dolejs, I., Forster, J., & Mikš, M. H. (2019). Uncovering carbohydrate metabolism through a genotype–phenotype association study of 56 lactic acid bacteria genomes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(7), 3135–3152. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09701-6>
- Cerero-Calvo, C., Sánchez-Medina, M. A., Pérez-Santiago, A. D., Matías-Pérez, D., & García-Montalvo, I. A. (2022). Probióticos presentes en bebidas fermentadas mexicanas. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 25.
- De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 153–177. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00395.x>
- del Rosario Rodicio, M., & del Carmen Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245. <https://doi.org/10.1157/13060812>
- Drider, D., & Arredondo, V. M. R. (2016). *Bacterias ácido lácticas*. Alpha Editorial.
- Endo, A., Tanizawa, Y., & Arita, M. (2019). Isolation and identification of lactic acid bacteria from environmental samples. *Methods in Molecular Biology*, 1887, 3–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8907-2_1
- Fernández, S. (2022). Caracterización de bacterias ácido lácticas (BAL) para la producción de ácido láctico (AL) a escala de planta piloto [Trabajo final de grado]. Universidad de Costa Rica.
- Feng, T., & Wang, J. (2020). Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut Microbes*, 12(1), 1801944. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1801944>
- Fica, A., & Dabanch, J. (2007). Infecciones por el género *Leuconostoc*. *Revista Chilena de Infectología*, 24(3), 231–235. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182007000300010>

- Flores, S. G., Pacheco, J. R. S., Miranda, A. C., Reyes, M. T., Blanco, M. E. G., & Uscanga, B. R. A. (2009). Aislamiento e identificación de microorganismos nativos en la fermentación de tejuino artesanal.
- Frisby Morales, A., Córdova Yáñez, A., & Medina Ortiz, F. A. (2018). Diversificación en el uso del agave del bacanora: oportunidad económica para Sonora.
- García García, J. H. (2012). Detección molecular de *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Pectinatus* spp. y *Megasphaera* spp. en el proceso de elaboración de la cerveza [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León].
- García, C. A., Arrázola, G. S., & Durango, A. M. (2010). Producción de ácido láctico por vía biotecnológica: Revisión de literatura. *Temas Agrarios*, 15(1), 68–82.
- Gorbeña, J. C. R., & Sáenz, T. A. (2008). Bacterias ácido lácticas: Biopreservante de los alimentos. *Biotempo*, 8, 54–64.
- Global Microbe Bank. (s. f.). *Weissella confusa* (GMB0753). Recuperado el 2 de marzo de 2026, de <https://www.gmbank.org/product-page/gmb0753>
- Gschaedler, A. C., Mora, A. G., Ramos, S. M. C., Vázquez, G. D., & Valdez, J. G. (2017). Panorama del aprovechamiento de los agaves en México. Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves.
- Hammes, W. P., & Vogel, R. F. (1995). The genus *Lactobacillus*. En *The genera of lactic acid bacteria* (pp. 19–54). Springer.
- Holanda, R., & Liu, S.-Q. (2011). Lactic Acid Bacteria: *Leuconostoc* spp. En J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2.^a ed., Vol. 3, pp. 151–155). Academic Press.
- Ibrahim, S. A., Ayivi, R. D., Zimmerman, T., Siddiqui, S. A., Altemimi, A. B., Fidan, H., Esatbeyoglu, T., & Bakhshayesh, R. V. (2021). Lactic acid bacteria as antimicrobial agents: Food safety and microbial food spoilage prevention. *Foods*, 10(12), 3131.
- Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. (2022, 6 de abril). *Streptococcus* spp. Agentes biológicos. BaseBIO.
- Juárez Aviña, M. E. (2022). Caracterización molecular de levaduras nativas presentes en la fermentación artesanal del destilado de agave para la elaboración de raicilla [Tesis].
- Lawson, P. A. (2014). The genus *Aerococcus*. En *Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy* (pp. 81–90). Wiley.
- Lifeder. (2022, 21 de abril). *Leuconostoc*.

- Lima de Jesús, L. C., Fernando da Silva, C., de Assis Glória, R., dos Santos Freitas, A., Ferrary Américo, M., da Silva Fernández, L. J., Munis Campos, G., Camargos Gomes, G., Viegas Santos, R. C., de Oliveira Carvalho, R. D., Barh, D., & Azevedo, V. (2022). Bebidas a base de bacterias lácticas para la promoción de la salud del tracto gastrointestinal (Cap. 26). En *Microbioma, inmunidad, salud digestiva y nutrición* (pp. 373–385). Academic Press.
- Lozano, L. C., Ramírez, L. C. C., & Duarte, S. Q. (2022). Catálisis, enzimas y pruebas rápidas. *Revista NOVA*, 20(39), 121–150.
- Medell, M., Hart, M., & Batista, M. L. (2014). Sensibilidad antimicrobiana in vitro en aislamientos de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* obtenidos de pacientes hospitalizados. *Biomédica*, 34, 50–57.
- Medical Lab Notes. (2025, 8 de abril). *Aerococcus viridans*: Introduction, morphology...
- Mezcológia. (2018, 14 de junio). *Agave maximiliana*.
- Mora, X. (2012). Diferenciando bacterias Gram positivas y Gram negativas. *Selecciones Avícolas*, 25–27.
- Morales, J. M. V., Hernández, M. V., Espinoza, A. D., & Cruz, D. M. A. (2024). Aguamiel y pulque: Más que bebidas tradicionales.
- Mudoor Soorash, M., Willing, B. P., & Bourrie, B. C. T. (2023). Opportunities and challenges of understanding community assembly in spontaneous food fermentation. *Foods*, 12(3), 673.
- Muñoz-Sanza, M., Casas-García, A. J., & Romero-Gómez, M. P. (2019). Bacteriemia por *Aerococcus viridans* asociada a endocarditis. *Revista Chilena de Infectología*, 36(6), 763–766.
- Narváez-Zapata, J. A., Rodríguez-Luna, I. C., Mariscal-Lucero, S., Larralde-Corona, C. P., & Rojas-Herrera, R. (s. f.). Microflora bacteriana asociada a los mostos de mezcal.
- Ortiz Balderas, M. (2006). Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas... [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo].
- Park, S. H., Itoh, K., & Fujisawa, T. (2014). Selective isolation and enumeration of lactic acid bacteria using modified MRS medium. *Journal of Microbiological Methods*, 96, 119–125.
- Parra Huertas, R. A. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93–105.
- Parra Huertas, R. A. (2012). Importancia terapéutica y estabilizantes-edulcorantes en la tecnología del yogurt.

- Patterson, M. J. (1996). *Streptococcus*. En *Microbiología médica* (4.^a ed.).
- Pikuta, E. V., & Hoover, R. B. (2014). The genus *Carnobacterium*. En *Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy* (pp. 109–123). Wiley.
- Ramada, M. H. S., Cardoso Lopes, F. A., Ulhoa, C. J., & Silva, R. N. (2010). Optimized microplate β -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. *Journal of Microbiological Methods*, 81(1), 6–10.
- Ramírez Ramírez, J. C., Rosas Ulloa, P. E., Velázquez González, M. Y., Ulloa, J. A., & Arce Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. CONACYT.
- Rochat, T., Gratadoux, J. J., Gruss, A., Corthier, G., Maguin, E., Langella, P., & van de Guchte, M. (2006). Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5143–5149.
- Tabares-Escamilla, L. F., Jaramillo-Flores, M. E., Meza-Canales, I. D., & Anguiano-Sevilla, L. A. (2024). *Agave maximiliana* Baker: El tesoro escondido en el corazón de Jalisco. *Traslación: Moviendo Ciencia*, 1(1), 32–36.
- Tapia, J. A. A. (2018). Composición, estructura y dinámica de la microbiota durante la fermentación de jugo de agave para la producción de tequila.
- Teuber, M. (1995). The genus *Lactococcus*. En *The genera of lactic acid bacteria* (pp. 173–234). Springer.
- Ueda, K., Tagami, Y., Kamihara, Y., Shiratori, H., Takano, H., & Beppu, T. (2008). Isolation of bacteria whose growth is dependent on high levels of CO₂. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14), 4535–4538.
- Vinocunga-Pillajo, R. D. (2024). Caracterización de las bacterias ácido lácticas y sus aplicaciones en la industria alimentaria. *Revista PRISMA Amazónico*, 1(1), 1–12.
- Voidarou, C., Antoniadou, M., Rozos, G., Tzora, A., Skoufos, I., Varzakas, T., & Bezirtzoglou, E. (2020). Fermented foods: Microbiology, biochemistry, possible health benefits, and public health issues. *Foods*, 10(1), 69.
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Yi, H., & Geng, X. (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 647464.

Xu, Y., Cui, Y., Yue, F. F., Liu, L., Shan, Y., Liu, B., Yuanzhou, & Lü, X. (2019). Exopolisacáridos producidos por bacterias lácticas y bifidobacterias: Estructuras, funciones fisicoquímicas y aplicaciones en la industria alimentaria. *Food Hydrocolloids*, 94, 475–499.