



Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio

SEP TecNM

**DIVISIÓN DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS**

OPCIÓN

“Tesis”

Proyecto

**“Identificación de microorganismos aislados en dos
variedades de ciruela (criolla y mango) en salmuera”**

Que para obtener el título de:

Ingeniero en Industrias Alimentarias

Presenta

Vivian Castelan Balbuena

160712003

Acatlán de Osorio, Pue., Septiembre de 2025



Educación
Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio
Organismo Público Descentralizado del Gobierno del Estado de Puebla

ASUNTO: Aprobación de Trabajo de Titulación.

Acatlán de Osorio, Pue., a 25 de Agosto de 2025.

I.I.A. ELEODORO GABILÁN LINARES
JEFE DE DIVISIÓN DE LA CARRERA DE
INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
P R E S E N T E.

Por este medio hago de su conocimiento que el documento bajo el esquema, **OPCIÓN: TESIS**, que lleva por nombre **"IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS AISLADOS EN DOS VARIEDADES DE CIRUELA (CRIOLLA Y MANGO) EN SALMUERA"**, que presenta la candidata a Titulación: **C. VIVIAN CASTELAN BALBUENA**, con número de control **160712003** de la carrera de Ingeniería en Industrias Alimentarias, fue revisada y aprobada para su impresión por la comisión revisora conformada por: Presidente **LA GABRIELA FORTUNATA LARA RUIZ**, Secretario **DRA. ANA MARÍA SIFUENTES RINCÓN**, vocal **I.I.A. CARLOS EDDY MARTÍNEZ FUENTES**.

Sin más por el momento, quedo de usted.

A T E N T A M E N T E

"CONOCIMIENTO COMO GUÍA DEL DESARROLLO"

ING. GABRIELA FORTUNATA LARA RUIZ
PRESIDENTA DE ACADEMIA DE LA CARRERA
DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Vo. Bo.

LA GABRIELA FORTUNATA LARA
RUIZ.

Vo. Bo.

DRA. ANA MARIA SIFUENTES
RINCÓN

Vo. Bo.

I.I.A. CARLOS EDDY
MARTINEZ FUENTES

c e p - Archivo



2025
Año de
La Mujer
Indígena

CARRETERA ACATLÁN-SAN JUAN IXCAQUIXTLA K.M. 5.5. UNIDAD
TECNOLÓGICA ACATLÁN DE OSORIO PUEBLA, C.P. 74949
Tels. (953) 53.41877 y 78 correo: direccion.general@itsao.edu.mx

Pag. web: www.itsao.edu.mx



AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por guiarme en cada paso y poner en mi vida las oportunidades necesarias para el logro de dicho éxito.

Al **Centro de Biotecnología Genómica Instituto Politécnico Nacional**, Reynosa Tamaulipas por haberme otorgado los medios necesarios para la realización de dicha investigación.

Al **M.C. Víctor I. Pacheco Contreras** gracias, por el apoyo incondicional, la orientación y enseñanza a lo largo de esta ardua trayectoria.

A la **Dra. Ana María Sifuentes Rincón**, por su paciencia y por haberme otorgado los medios necesarios para llevar a cabo el proceso y cumplimiento de la tesis.

A la **I. A. Gabriela Fortunata Lara Ruiz** por sus enseñanzas, consejos y guía para la realización de dicho trabajo.

A la comisión Revisora de tesis a la **Dra. Ana M. Sifuentes Rincón, Ing. Gabriela Fortunata Lara Ruiz y el I.I.A. Carlos Eddy Martínez Fuentes**. Por su incomparable apoyo y seguimiento de esta tesis.

A cada **Docente del Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio** por sus consejos, su cariño y el conocimiento compartido.

A mis entrañables amigos **Juan de la Paz Juárez, Florentina Villanueva Cantú, Luis Eduardo Sosa Reyes, Rafael Pérez Escamilla, Otis y Angelito** por su acompañamiento, orientación a nuestra poca o amplia trayectoria de vida, pero por sobre todo por estar presentes.

A mis **hermanas, hermanos, cuñados y cuñadas** por su apoyo y cariño.

A toda mi **familia** que es parte de este gran logro para mí.

A todos “Gracias”

DEDICATORIAS

A **Dios** Por guiarme y cuidarme en cada paso de vida, por ser mi fuerza para continuar y no desistir en un camino tan estrecho que ha sido este proceso, brindarme sabiduría, paciencia, protegerme, guiarme y por poner a cada persona indicada para lograr llegar a la culminación de este trabajo.

A mi mamá **Paz Balbuena Bello** por darme la vida, por su amor incondicional y por ser mi ejemplo de vida.

A mi Papá **Cirilo Castelán Herrera** por darme la vida, por acompañarme en cada pequeño o gran logro, me has enseñado a lo largo de la vida que eres tú y has sido tú, mi apoyo incondicional, me muestras día con día que no debemos detenernos más que para impulsarnos a ser mejores cada día. Eres mi mejor ejemplo a seguir. Te amo.

A mi abuelita **Isabel Bello Ortiz** por ser como mi segunda madre y haber forjado mi formación en tus valores, principios, guía y amor brindados.

A mi abuelito **Mario Balbuena Navarrete** por su cariño paciencia y guía.

A mis tíos **Juan Carlos Balbuena Bello** y **Guadalupe González Estévez** por su confianza, acompañamiento, cariño y no dejarme sola en este proceso.

A mi compañero de vida **Ismael Salas López** por tu impulso, apoyo incondicional y amor brindado.

A mi gran ángel mi pequeña Hija **Peyton Isabella Salas Castelán** por ser mi mayor sostén y motivación para continuar en cada momento de mi vida. Te amo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIAS.....	V
ÍNDICE.....	VI
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
I.INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos específicos	3
2.3 Hipótesis	3
III. REVISION DE LITERATURA	4
3.1 El género <i>Spondias</i>	4
3.1.1 <i>Spondias p</i>	5
3.1.2 Fruto	5
3.1.3 <i>Spondias purpurea mombin L.</i>	6
3.1.4 Fruto	7
3.2 Importancia del aislamiento de bacterias a partir de frutos	8
3.3 Potencial biotecnológico de los frutos de <i>Spondia</i>	9

3.4 Técnicas moleculares para la identificación de microorganismos.....	10
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1 Localización del lugar experimental	14
4.2 Origen del material biológico	14
4.3 Caracterización fisicoquímica de ciruelas verdes en salmueras	15
4.3.1 Determinación de pH	15
4.4 Caracterización microbiológica	15
4.4.1 Siembra	15
4.5 Identificación de aislados por pruebas bioquímicas	16
4.5.1 Tinción de Gram.....	16
4.6 Identificación molecular	17
4.6.1 Extracción del ADN	17
4.6.2 Cuantificación del ADN.....	18
4.6.3 Amplificación del gen 16s ribosomal.....	20
4.6.4.- Obtención de clonas de los productos de PCR	22
V.- RESULTADOS Y DISCUCIONES.....	24
5.1 Caracterización Fisicoquímica.....	24
5.1.1 Determinación de PH	24
5.2 Caracterización Morfológica de las Bacterias ácido lácticas.....	26
5.3 Caracterización Microscópica de Bacterias Acido lácticas	27

5.4 Identificación de BAL mediante pruebas moleculares	28
5.4.1 Secuenciación de los productos de PCR	29
VI. CONCLUSIONES	34
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA	35
VIII. ANEXOS	39

LISTA DE TABLAS

Tabla1. Elaboración de solución stock a una concentración final de 5 (ng/μl) a un volumen final de 25 μl.....	19
Tabla 2. Condiciones óptimas del PCR: Baja concentración de ADN, alto volumen de iniciadores y el programa TD60.	21
Tabla 3. Caracterización morfológica de microorganismos aislados de ciruela mango en salmuera.....	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fruto maduro de Spondias Monbin	7
Figura 3. Valores de pH de frutos de ciruela Mango-Criolla y aceitunas en estado fenológico verde y procesados de tipo salmuera.	25
Figura 4. Bacterias Gram positivas aisladas del fruto de ciruela Mango.	27
Figura 5. Amplificación de la región rRNA 16S de los de aislados de ciruela Mango y Criolla procesada en estado verde.	28
Figura 6. Identificación molecular de los aislamientos obtenidos de ciruela criolla. Se muestran los resultados de identidad de la secuencia nucleotídica obtenida, de acuerdo con los resultados del programa Blast la especie identificada corresponde a <i>Stapylococcus hominis</i>	30
Figura 7. Identificación molecular de los aislamientos obtenidos de ciruela Mango. Se muestran los resultados de identidad de la secuencia nucleotídica obtenida, de acuerdo con los resultados del programa Blast la especie identificada corresponde a <i>Escherichia coli</i> .31	
Figura 8. Identificación molecular de los aislamientos obtenidos de ciruela Mango. Se muestran los resultados de identidad de la secuencia nucleotídica obtenida, de acuerdo con los resultados del programa Blast la especie identificada corresponde a <i>Bacillus megaterium</i>	32

LISTA DE SÍMBOLOS Y/O ABREVIATURAS

BAL	Bacterias ácido lácticas
ADN	Ácido dextrorribonucleico
PCR	Reacción en la Cadena de la Polimerasa
°C	Grados centígrados
µl	Micro litro
ml	Mililitro
%	Porcentaje
pH	Potencial hidrógeno
rpm	Revoluciones por Minuto
dNTP^s	Desoxirribonucleicos Trifosfatos
F[`]	Forward
R[`]	Reverse
LB	Luria Bertani
PDA	Agar Papa Dextrosa
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
UFCs	unidades formadoras de colonias
ADNr	ácido desoxirribonucleico ribosomal

RESUMEN

El amplio potencial biotecnológico de los microorganismos en la industria alimentaria para mejorar el sabor, olor, textura incluso para prolongar la vida de anaquel de los productos alimenticios, ha fomentado el interés para su identificación y aislamiento. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue identificar molecularmente microorganismos aislados en dos variedades de ciruela (*Spondias spp*) criolla y mango en salmuera. Muestras del líquido de salmuera de los dos tipos de ciruelas en estado fenológico verde, fueron inoculadas en medios LB y PDA mediante la técnica vertido en placa y fueron incubadas a 36°C por 72 horas. Con las colonias obtenidas de cada muestra, se formó un *pool* de microorganismos a partir del cual se aisló ADN genómico. Para la identificación molecular de los cultivos, se construyeron bibliotecas de los productos de amplificación obtenidos por PCR a partir de la región 16S ribosomal y utilizando el sistema StrataClone PCR Cloning™. Para la selección de las clonas diferenciales se realizó un tamizaje con enzimas de restricción de alta frecuencia de corte y las clonas con patrones diferentes fueron sometidas a secuenciación. La secuenciación de la región 16S ribosomal permitió la identificación a nivel género y especie de los aislados. El alineamiento con las secuencias en el programa BLAST del NCBI reveló que los microorganismos en ciruela criolla verde en salmuera corresponden a *Staphylococcus hominis* mientras que en ciruelas mango en salmuera fueron *Escherichia coli* y *Bacillus megaterium*, siendo este último de mayor interés por ser empleado ampliamente para la producción de proteínas recombinantes. Los resultados sugieren que de la ciruela mango en estado fenológico verde en salmuera son una fuente para el aislamiento de bacterias con potencial biotecnológico para la industria agroalimentaria.

Palabras clave: Ciruela, gen 16s, potencial biotecnológico, identificación molecular.

ABSTRACT

The biotechnological potential of microorganisms in the food industry to improve the taste, odor, and texture of food products, and to extend their shelf life, increases the interest in their identification and isolation. For this reason, the objective of this study was the molecular identification of microorganisms isolated from two varieties of creole plum (*Spondias spp*) and mango in brine. Samples of the brine liquid from the two types of plums in the green phenological stage were inoculated in LB and PDA media using the pour plate technique and incubated at 36°C for 72 hours. With the colonies obtained from each sample, a pool of microorganisms was formed from which genomic DNA was isolated. For the molecular identification, libraries of the PCR products obtained from the 16S ribosomal region were constructed using the StrataClone PCR Cloning™ system. For the selection of differential clones, screening was performed with high-frequency restriction enzymes, and clones with different patterns were sequenced. Sequencing of the 16S ribosomal region allowed the identification of the isolates at the genus and species level. Alignment with sequences in the NCBI BLAST program revealed that the microorganisms in green creole plums in brine correspond to *Staphylococcus hominis*, while in mango plums in brine they were *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium*, the latter being of greater interest because it is widely used for the production of recombinant proteins. The results suggest that green ciruelas mango in brine are a source for the isolation of lactic acid bacteria with biotechnological potential for the food industry.

Keywords: Plum, 16s gene, biotechnological potential, molecular identification

I. INTRODUCCIÓN

El fruto de ciruela (*Spondias purpurea*, *spondias monbi*), es un árbol que alcanza hasta los 20 metros de altura y el tronco 50 centímetros de diámetro su fruto se consume en estado verde, semiduro y maduro. Se distribuyen en México Michoacán, Chiapas, Yucatán, Guerrero, en el centro de México en los estados de Oaxaca y Puebla. El uso principal de este fruto, es para el auto consumo y acompañamiento de platillos regionales en estado fresco. Es conocido como jocote mexicano, es un fruto de temporada, que se vende en mercados locales de la región. Su producción se registra principalmente en los meses de febrero-mayo en el caso de *Spondias purpurea* y *Spondias mombi* en los meses diciembre- enero, sin embargo, para cada región esto depende del clima y suelo.

La producción de dicho fruto es poco conocida y muy baja a gran escala, a pesar de su introducción comercial. Generalmente crece en huertos de traspatio y se desarrolla en lugares silvestres. Actualmente en la industria de alimentos se estudian las propiedades de diversos frutos y vegetales, que favorezcan la mejora de las propiedades organolépticas y sensoriales de los alimentos, donde los microorganismos presentes en estos juegan un papel fundamental. Los alimentos evolucionan de acuerdo a la necesidad humana y dentro de ello la producción de microorganismos. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos de gran interés en la industria alimentaria, estas se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza, la fermentación de estos microorganismos genera la producción de ácido láctico este mayormente utilizado en la industria láctea, así como también las BAL, contribuyen en la producción de cerveza, vino y carnes como el curado de pescado y embutidos. Las BAL

además de ser utilizadas como probióticos, mejoran las propiedades sensoriales de los alimentos como el sabor, olor, textura y enriquecen su valor nutricional. Los probióticos son organismos vivos que en combinación con otros microorganismos consumidos en cantidades adecuadas mejoran la salud.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos que han sido utilizadas durante décadas por la industria alimentaria, debido a que confieren características sensoriales y reológicas. Las BAL tienen la capacidad de conservar a los productos debido a su producción de bacteriocinas. Éstas son activas frente a diferentes patógenos y estables a diferentes pH y temperaturas, por lo que se ha considerado el uso en su forma libre, ya que su aplicación puede evitar la contaminación por patógenos en productos alimenticios (Heredia et al., 2017).

Estudios en salmuera de aceitunas de mesa en estado verde, han encontrado la presencia de bacterias ácido lácticas (BAL) que afectan los atributos sensoriales. Debido a la importancia de las bacterias ácido lácticas en la industria alimentaria para la mejora del sabor, olor, textura (características organolépticas), propiedades nutritivas e higiénicas de los alimentos procesados y con la amplia producción de ciruela criolla y ciruela mango en México y la región mixteca poblana, el objetivo del presente trabajo fue aislar, caracterizar e identificar microorganismos presentes en salmueras de ciruela criolla (*Spondias purpurea*) y ciruela mango (*Spondias monbi*) de la región mixteca poblana).

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

Aislar, caracterizar e identificar microorganismos obtenidos de dos variedades de ciruelas (criolla y mango) en salmuera.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar fisicoquímicamente ciruelas en salmuera.
2. Caracterizar por tinción de Gram (pruebas diferenciales) microorganismos aislados en ciruelas en salmuera.
3. Identificar molecularmente los microorganismos aislados en ciruelas en salmuera mediante la amplificación 16S.

2.3 Hipótesis

Ciruelas verdes en salmuera presentan características idóneas para desarrollo de microorganismos con potencial biotecnológico (Gram positivas).

III. REVISION DE LITERATURA

3.1 El género *Spondias*

Las ciruelas (*Spondias spp.*) son originarias de América tropical, el pacífico y algunos países asiáticos. *Spondias purpurea* L. y *Spondias mombin* son las dos especies nativas de México que presentan ventajas adaptativas, nutrimentales y etnobotánicas. Actualmente se reconoce como las especies más importantes de las ciruelas mexicanas; no obstante que ambas se encuentran subutilizadas y el conocimiento de sus beneficios es local (Arce-Romero et al., 2017).

La distribución de *S. purpurea* en México determina que los estados donde más se ha recolectado esta especie son Yucatán, Jalisco, Oaxaca y Veracruz. De acuerdo con (Álvarez-Vargas et al., 2017) indican que en México *S. purpurea* se distribuye predominantemente en la vertiente del océano Pacífico, centro de Veracruz y Península de Yucatán

En México se produce ciruela en 21 estados, concentrada en Puebla (3,554 ha), Chiapas (2,327 ha) y Sinaloa (1,510 ha) que en conjunto alcanzan una producción de (7,391.5 ha), lo que constituye el 61% del total de la superficie cosechada en el país (Cruz y Rodríguez, 2012).

De acuerdo con (Ramírez Hernández et al., 2008) a pesar su potencial para la exportación, la producción de *S. purpurea* ha tenido poco éxito económico, y regularmente los árboles de crecen en huertos familiares de pequeña extensión. En la actualidad los frutos se cosechan en poblaciones cultivadas y silvestres en diferentes regiones tropicales y subtropicales y además

de consumirse en fresco, las ciruelas también se emplean para elaborar mermeladas y bebidas, deshidratadas.

Se ha propuesto que es necesaria la implementación de programas tendentes a mejorar, diversificar y conservar el germoplasma de esta especie debido al potencial económico que la producción de este fruto puede representar para las comunidades (Arce-Romero et al., 2017).

3.1.1 *Spondias p*

Se ha caracterizado a *S. purpurea* como parte de la vegetación secundaria de selvas medianas subcaducifolias y caducifolias asociadas con clima cálido seco con intervalo de temperaturas promedio anuales de 20 a 29 °C y precipitación anual de 500 a 1,600 mm, presentando una temporada seca de cinco a ocho meses, aunque cabe destacar es susceptible a heladas, también destaca su gran adaptación a suelos someros y de difícil drenaje (Arce-Romero et al., 2017).

3.1.2 Fruto

Los frutos de la ciruela mexicana son drupas oblongas, redondas u ovoides; de tamaños y masas diversas que fluctúan entre 2 y 5 cm y entre 4 y 33 g respectivamente, con epicarpio liso a semiliso, delgado y de coloración roja, amarilla, café rojiza, anaranjada o morada al madurar, con endocarpio grueso y fibroso y mesocarpio de sabor y aroma agradables. El fruto maduro de la ciruela mexicana proporciona alta densidad calórica, vitamina C y moderada proporción de minerales como potasio y calcio, así como compuestos antioxidantes como fenoles y carotenoides (Alia et al., 2012).

En México se distribuye a lo largo de la costa occidental de Sonora a Chiapas, y al sur del país en Yucatán y Quintana Roo y es un componente del estrato dominante de la selva baja caducifolia (Avitia, 1996).

Las ciruelas se recolectaban de poblaciones silvestres en tiempos prehispánicos, y formaron parte de la dieta de los indígenas que poblaron las regiones tropicales de Veracruz (Díaz del Castillo, 1996). Además de consumirse en fresco, las ciruelas también se emplean para elaborar diversos productos como: mermeladas, bebidas, deshidratados entre otros (Lorenzo Bautista 1977, Challenger 1998).

El rendimiento varía de 0.15 ton ha⁻¹, en árboles jóvenes (5 años de edad) a 1.5-3.0 ton ha⁻¹ en árboles adultos (30-50 años), aunque se registraron plantaciones adultas con rendimientos de hasta 5.0 ton ha⁻¹ (Ramírez et al., 2008).

3.1.3 Spondias purpurea mombin L.

S. mombin se asocia con vegetación secundaria de selvas altas y selvas medianas perennifolias, con temperaturas medias anuales de 16 a 34 °C y precipitación de 800 a 3,000 mm (Comisión Nacional Forestal [CONAFOR], 2012; con Carlowitz, Wolf, & Kemperman, 1991). Presenta distribución en clima cálido húmedo en altitudes de hasta 1,200 msnm (Pennington & Sarukhán, 1998).

3.1.4 Fruto

La fruta es una drupa carnosa de color amarillo, naranja, amarillo-verde, de aproximadamente 2 a 2.5 cm de grueso y de 3 a 4 cm de largo y que contiene una pepita de cerca de 2.5 cm de largo con semillas múltiples.



Figura 1. Fruto maduro de Spondias Monbin.

Fuente: Elaboración Propia

El fruto es comestible en estado fresco verde o maduro, y el jugo extraído del fruto es utilizado para preparar helados, bebidas refrescantes y mermeladas.

De acuerdo con (Chavelas 1998) Su distribución por el Océano Pacífico es en: Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas y por el Océano Atlántico en Tamaulipas, Veracruz, San Luis Potosí, Puebla, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo.

3.2 Importancia del aislamiento de bacterias a partir de frutos

En las últimas décadas, el patrón de consumo de productos alimenticios ha cambiado considerablemente debido a la creciente conciencia de la necesidad de incluir alimentos saludables en la dieta. En este sentido, la industria alimentaria ha dirigido su atención hacia la producción de alimentos con propiedades funcionales que proporcionen efectos beneficiosos para la salud, además de sus efectos nutritivos básicos (Pereira et al, 2022).

Las frutas se han estudiado ampliamente como una fuente alternativa viable para el aislamiento de estos microorganismos. En estudios *in vitro*, estos aislados de BAL presentaron buenos resultados para futuros estudios *in vivo* con el fin de verificar sus efectos beneficiosos para la salud (Pereira Barbosa, et al, 2022).

El uso de microorganismos en la industria biotecnológica ha sido de gran interés debido a que contribuyen significativamente en las propiedades sensoriales y al gradiente de acidez en alimentos fermentados.

Las bacterias endófitas de frutos tienen un gran potencial biotecnológico en diversos campos, desde la agricultura y la medicina hasta la industria alimentaria, diversos estudios de los microorganismos endófitos se han orientado sobre la producción de estos compuestos y su potencial uso en la biotecnología (Morath et al., 2012).

Las actinobacterias son microorganismos que participan activamente en la descomposición de la materia orgánica de los suelos. La importancia de estas bacterias radica en que algunas especies producen metabolitos bioactivos, es interesante el potencial biotecnológico que

presentan las actinobacterias nativas de México en el desarrollo de nuevos productos que sean empleados para el control biológico (Evangelista et al., 2017).

3.3 Potencial biotecnológico de los frutos de *Spondia*

Los frutos de *Spondias spp* pueden contener una variedad de microorganismos, incluyendo bacterias y hongos. Se han identificado bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, junto con el hongo *Candida albicans*. Estos microorganismos pueden estar presentes en la superficie del fruto o en la pulpa.

Siendo el de mayor interés *Bacillus Subtilis*, del género *bacillus*, resaltando por su potencial biotecnológico para la industria alimentaria.

La fruta de ciruela mexicana posee una amplia diversidad de colores del epicarpio verde, amarillo, naranja, rojo o púrpura; (Alia et al., 2012) y se consume madura o inmadura, aunque con mayor preferencia cuando ha alcanzado sus máximas características de calidad organoléptica, ya que aporta altas cantidades de carbohidratos, vitamina C y minerales como K y Ca (Koziol y Macía, 1998), además de cantidades importantes de antioxidantes como fenoles y carotenoides (Solórzano et al., 2015).

3.4 Técnicas moleculares para la identificación de microorganismos

El aislamiento e identificación de bacterias y microorganismos es crucial en diversos campos, como la microbiología médica, agrícola e industrial. Los métodos convencionales de identificación basados en el aislamiento microbiológico clásico y la caracterización fenotípica mediante pruebas bioquímicas además de laboriosos en muchos casos se caracterizan por ser menos precisos.

En la actualidad, los métodos moleculares ofrecen mejores estrategias para identificar y caracterizar microorganismos y bacterias (Figura 2). El desarrollo de técnicas moleculares ha incrementado la capacidad para identificar especies bacterianas en muestras dependientes e independientes del cultivo. La mayoría de estas técnicas solo son capaces de identificar cepas bacterianas individuales o pequeños grupos de organismos a la vez. Sin embargo, aunque aumentan la precisión en la identificación estos métodos también presentan debilidades y deficiencias que limitan su aplicación (Dariush Gholami, et al 2019).

En los últimos años, se han desarrollado diversas técnicas para identificar y caracterizar genomas bacterianos, siendo a la fecha la más utilizada la identificación basada en la secuenciación del gen 16S ribosomal.

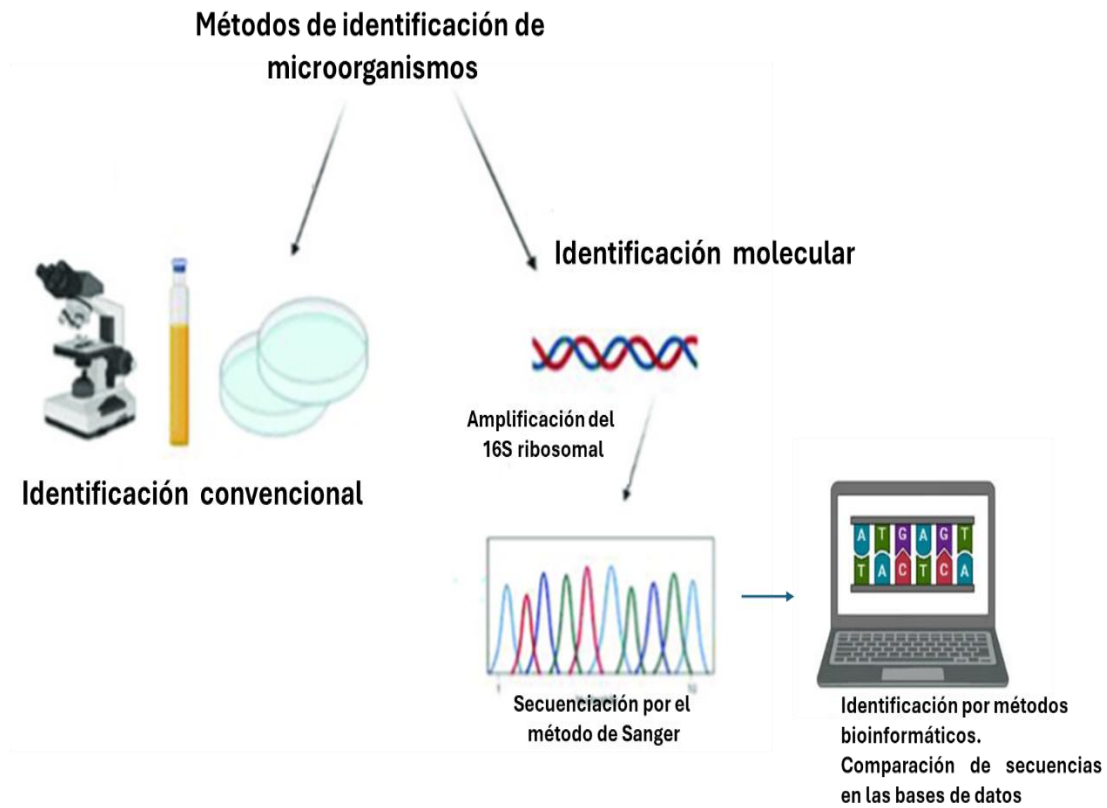


Figura 2. Se muestran las dos técnicas de identificación de microorganismos más utilizadas.

3.4.1 Análisis PCR del ADNr 16S

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction) Es una técnica rápida, sensible y bastante simple para amplificar el DNA, utilizando oligonucleótidos como cebadores, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y una DNA *Taq* polimerasa termoestable. para amplificar ácidos nucleicos. La PCR tiene por objetivo distinguir y cuantificar con precisión secuencias de ácidos nucleicos específicas en una muestra, monitoreando su amplificación a través de la detección de fluorescencia, ya que el aumento en la fluorescencia es proporcional a la acumulación del producto. Esta técnica tiene diversos campos de aplicación (ciencias básicas, biotecnología, medicina, etc. (Chien et. Al 1976). En el área microbiológica ha tenido una amplia aplicación para la identificación y clasificación taxonómica de microorganismos.

El análisis de secuenciación del ácido desoxirribonucleico ribosomal (ADNr) 16S es un método estándar para la identificación directa de poblaciones microbianas. En este método, el ADN extraído de la muestra ambiental se utiliza como templado para el ADNr 16S, amplificado mediante PCR utilizando iniciadores universales.

La mezcla de fragmentos de PCR obtenidos al amplificar el ADNr 16S de diferentes células de las muestras analizadas se puede analizar mediante diferentes estrategias antes de la secuenciación, por ejemplo, se puede clonar y posteriormente secuenciar individualmente cada clona. Las secuencias obtenidas se analizan y se realizan afiliaciones taxonómicas mediante alineamientos bioinformáticos con bases de datos de secuencias.

La identificación y caracterización de comunidades microbianas con base a la amplificación del ADNr 16S, ha permitido la identificación de muchos microorganismos con potencial biotecnológico a partir de diferentes fuentes, lo que ha permitido expandir el conocimiento sobre los patrones de biodiversidad bacteriana (Sogin et al., 2006). Sin embargo, esta técnica se ve limitada cuando existen especies bacterianas estrechamente relacionadas, la resolución del ADNr 16S es limitada (Poretsky et al., 2014).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del lugar experimental

La caracterización molecular se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional ubicado en la ciudad de Reynosa, Tamaulipas, localizado en Boulevard del Maestro s/n esq. Elías Piña, colonia Narciso Mendoza.

4.2 Origen del material biológico

El monitoreo y colecta de los frutos se realizó en la comunidad la palma, municipio de Acatlán de Osorio, estado de Puebla, México; situada geográficamente en las coordenadas de latitud 18° 21' 30'' y longitud -98.048611 Oeste con respecto al meridiano de Greenwich y 1260 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 24°C. Se recolectaron frutos de ciruelas verdes, (color verde) y cocidos tipo salmueras, estos últimos fueron elaborados en el Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio. Las muestras fueron recolectadas asépticamente, empaquetadas en cajas de cartón limpias, trasladadas y almacenadas a temperatura de refrigeración (4°C) hasta su procesamiento en el Laboratorio de frutas y hortalizas del Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio.

4.3 Caracterización fisicoquímica de ciruelas verdes en salmueras

4.3.1 Determinación de pH

Con un Potenciómetro se midió el pH para ambas variedades de ciruela, donde se tomaron tres muestras de cada variedad a analizar.

4.4 Caracterización microbiológica

Para la caracterización microbiológica las placas fueron sembradas y colocadas en la incubadora a una temperatura de 37°C por 28 horas y el crecimiento fue expresado en unidades formadoras de colonias (UFCs). Para observarlas se utilizó un microscopio.

4.4.1 Siembra

Se realizaron dos siembras por triplicado en cajas Petri de 90x15 mm para ciruelas criolla y mango en salmuera. La primera siembra se realizó mediante la técnica vertido en placa, la cual consiste en depositar 0.1 ml de la muestra en el centro de la placa y por capilaridad con una varilla de vidrio en forma de “L” se distribuye alrededor de la placa con medio de cultivo solido Luria Bertani LB y Agar Papa Dextrosa. Las muestras sembradas fueron incubadas a 37°C por 72 horas, una vez desarrollado el crecimiento bacteriano se realizó la segunda siembra mediante la técnica de estría simple por triplicado, la cual consiste en tomar la UFC de interés con un asa bacteriológica y realizar una estría simple de 7 puntos en una placa nueva con medio de cultivo solido Luria Bertani LB y Agar Papa Dextrosa. Las muestras sembradas fueron incubadas a 37°C por 72 horas.

4.5 Identificación de aislados por pruebas bioquímicas

4.5.1 Tinción de Gram

La tinción de Gram se realizó de acuerdo al método de coloración diferencial en frotis utilizando el Kit de colorantes SIGMA Aldrich®. En un portaobjetos limpio se colocó una gota de agua destilada, posteriormente la muestra del cultivo puro a analizar con la ayuda de un asa bacteriológica, se mezcló con la gota de agua, se dejó secar y se fijó a la flama. Después se cubrió con la solución de cristal violeta durante 1 minuto, se eliminó el colorante a chorro de agua, posteriormente se aplicó la solución de yodo por 1 min, se eliminó la solución a chorro de agua. Con el portaobjetos inclinado, se agregó gota a gota la solución de alcohol-cetona durante 30-40 seg, y se lavó a chorro de agua. Finalmente se cubrió con Safranina (Color de contraste) durante 1 min, se eliminó el colorante a chorro de agua y se observó la muestra en el microscopio.

4.6 Identificación molecular

4.6.1 Extracción del ADN

La extracción de ADN a partir de cultivos bacterianos se realizó siguiendo el protocolo estandarizado de un estuche comercial de purificación Wizard® Genomic ADN purification kit (Cat# A1120, Promega). Se colocó 50 µl H₂O M.Q, 60 µl de lizosima, 480 µl de 50mM EDTA en tubos eppendorf de 1.5 ml, se incubó a 37°C por 30 min y se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 2 minutos posteriormente se descartó el sobrenadante por decantación. A la pastilla de células, se agregó 600 µL de solución de lisis (nuclei lysis solution) y se resuspendieron suavemente por inversión. Se incubó a 80°C por 5 minutos para lisar los nucleótidos en el termomixer. Se enfrió a temperatura ambiente, posteriormente se agregó 3 µL de solución de RNasa, se mezcló por inversión y se incubó a 37°C por 15 minutos. Se agregó 200 µl de solución de precipitación de proteínas y se mezcló al vortex, por 20 segundos vigorosamente. Las muestras fueron incubadas en hielo por 5 minutos, se centrifugó a 14,000 r.p.m durante 3 minutos y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo que contenía 600 µl de isopropanol y se mezcló por inversión, se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante por decantación, a la pastilla se le agregaron 600 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 14,000 r.p.m durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante por aspersion con una pipeta. La pastilla se dejó secar y finalmente el ADN fue rehidratado con 50 µl de solución de rehidratación.

4.6.2 Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN se realizó mediante la visualización de un gel de agarosa al 1.2 % peso/volumen, utilizando como estándar de referencia concentraciones conocidas de la bacteriófaga lambda (10,25, 50, ng). Se tomaron 5 µl de ADN de ciruela mango y 5 µl de ciruela criolla y mezclando con 5 µl d Sybr gold (SYBR® GOLD Nucleic Acid Gel Stain, Augen, OR. USA). Las muestras se separaron por electroforesis aplicando un voltaje de 77 a 100 volts por 60 min aproximadamente. La visualización y cuantificación de las muestras se realizó en el fotodocumentador Kodak Digital Science mediante al programa Gel Imagen de Kodak Digital Science 3.0.2.

Tabla 1.

Elaboración de solución stock a una concentración final de 5 (ng/μl) a un volumen final de 25 μl.

Cultivo	Concentración de ADN (ng)	Volumen de ADN depositado (μl)	Concentración de ADN (ng/μl)	Concentración final (ng/μl)	Volumen final (μl)	Volumen para 50 ng/μl	
						Volumen de ADN (μl)	Volumen de H ₂ O miliQ (μl)
1	156.6	5	7.98	5	20	2.61	22.39
2	143.9	5	8.68	5	20	14.06	10.94

Fuente: Elaboración propia.

4.6.3 Amplificación del gen 16s ribosomal

La PCR fue utilizada para amplificar regiones utilizadas para identificar a nivel de especie los aislados obtenidos del fruto de la salmuera de ciruela. Para la región 16r ribosomal de bacterias se utilizaron los oligonucleótidos universales descritos por James *et al.* (2010); 27F (5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') y 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl. La optimización de la PCR se realizó por el método de los cuatro experimentos. La condición óptima de la PCR se describe en el siguiente cuadro. El programa de amplificación consistió de 1 ciclo de desnaturalización por 95° C por 2 min, 30 ciclos de 95° C por 30 seg, 55° C por 30 seg y 72° C por 1:30 min. Finalmente se agrega un ciclo final de extensión a 72°C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5 % mezclando 5 µl del producto de PCR con 3 µl de SyberGold™ 10X, grabando la imagen en el programa Kodak digital Science™, el gel se corrió en una cámara de electroforesis a 90 V por 45 min aproximadamente.

Tabla 2.

Condiciones óptimas del PCR: Baja concentración de ADN, alto volumen de iniciadores y el programa TD60.

Reactivos	Stock	Conc. Final	Vol Final	Vol/Reacción	Vol/Mix
Buffer	5	1	15	3	9
MgCl₂	25	2	15	1.2	3.6
dNTP^s	10	0.2	15	0.3	0.9
Primer F¹	5	0.1	15	0.3	0.9
Primer R¹	5	0.1	15	0.3	0.9
Taq	5	0.1	15	0.3	0.9
ADN				1	3
Suma				6.4	19.2
Agua				8.6	25.8
Vol. Total				15	45
No. Muestras	3				

Fuente: Elaboración propia.

4.6.4.- Obtención de clonas de los productos de PCR

Utilizando el producto de PCR se hizo la clonación del mismo en el vector Strataclone siguiendo las indicaciones de la casa comercial, luego de la ligación se llevó a cabo la transformación siguiendo los siguientes pasos:

Centrifugar el tubo de la reacción de ligación y mantenerlo en hielo. Posteriormente descongelar sobre hielo un tubo de células competentes por cada ligación/ transformación. Para tomar con una pipeta 2 µl de cada reacción de ligación y colocarla en el tubo de las células. Mezclar suavemente e incubar la reacción en hielo por 20 min. Y dar un choque térmico a 42 °C por aproximadamente 45/50 seg. No mezclar ni agitar, al pasar tiempo del choque térmico, colocar en hielo por 2 min.

Adicionar 250µl de medio LB (a temperatura ambiente) a cada tubo e Incubar los tubos a 37 °C/ 1 h a 225 rpm. Agregar 50 µl de X-Gal (80 mg/ml) y 20 µl de IPTG (0.1 M) a cada tubo de transformación, mezclar suavemente. Marcar placas de agar LB conteniendo 100 mg/ml de ampicilina. Sembrar en dos placas 5 y 100µl de células transformadas. Una vez que el líquido se haya absorbido, enseguida colocar las placas invertidas a 37 °C al menos por 18 hrs.

Las clonas recombinantes obtenidas fueron sometidas a secuenciación.

4.6.5 Secuenciación y análisis de los productos de PCR obtenidos

En esta etapa se emplea la secuenciación cíclica, en una reacción similar a la de amplificación, que utiliza un único iniciador por reacción y terminadores marcados con fluorocromos adecuados, que interrumpirán la síntesis de manera aleatoria, y facilitarán la detección posterior de los fragmentos interrumpidos. La disponibilidad de secuenciadores automáticos facilita enormemente la etapa de detección. El número de bases generadas por un secuenciador automático es de 500 a 900, dependiendo del capilar utilizado en la electroforesis. Aunque la secuenciación de una cadena del amplicón puede conducir a una correcta identificación, la calidad de la secuencia será óptima cuando la comparación de ambas cadenas se utiliza para la corrección de errores (Rodicio y Mendoza, 2004).

Los productos de PCR obtenidos del ADN de los aislados fueron secuenciados en secuenciador ABI Prism 3131 (Applied Biosystem Model 3130 EE. UU.). Utilizando el oligonucleótido 27F(5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'). Secuencias homólogas fueron examinadas en el programa BLAST comparando secuencias obtenidas con la base de datos de secuencias de la región 16S ribosomal de bacterias y arqueas del National Center for Biotechnology Information (NCBI)

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome.

V.- RESULTADOS Y DISCUCIONES

5.1 Caracterización Fisicoquímica

5.1.1 Determinación de PH

La determinación de pH en la salmuera de las ciruelas criolla y mango se realizó con pHmetro marca Conductronic PC 18 el cual mostro diferencia significativa para cada variedad en estado fenológico verde. El mayor pH se observó para el caso de la solución de salmuera de ciruela mango (pH 2.67) y el menor para ciruela criolla (Figura 2). De acuerdo con Quintana et al., (1997) el único proceso espontáneo típicamente láctico es el de aceitunas verdes estilo español sin embrago sus condicionantes son la concentración de sal, variedad, temperatura, azúcares disponibles entre otros, siendo este un análisis físico, químico y microbiano. Los valores de pH en comparación con aceitunas de mesa en estado verde con ciruela mango y criolla en salmuera son realmente variables esto debido a la acidez natural del fruto.

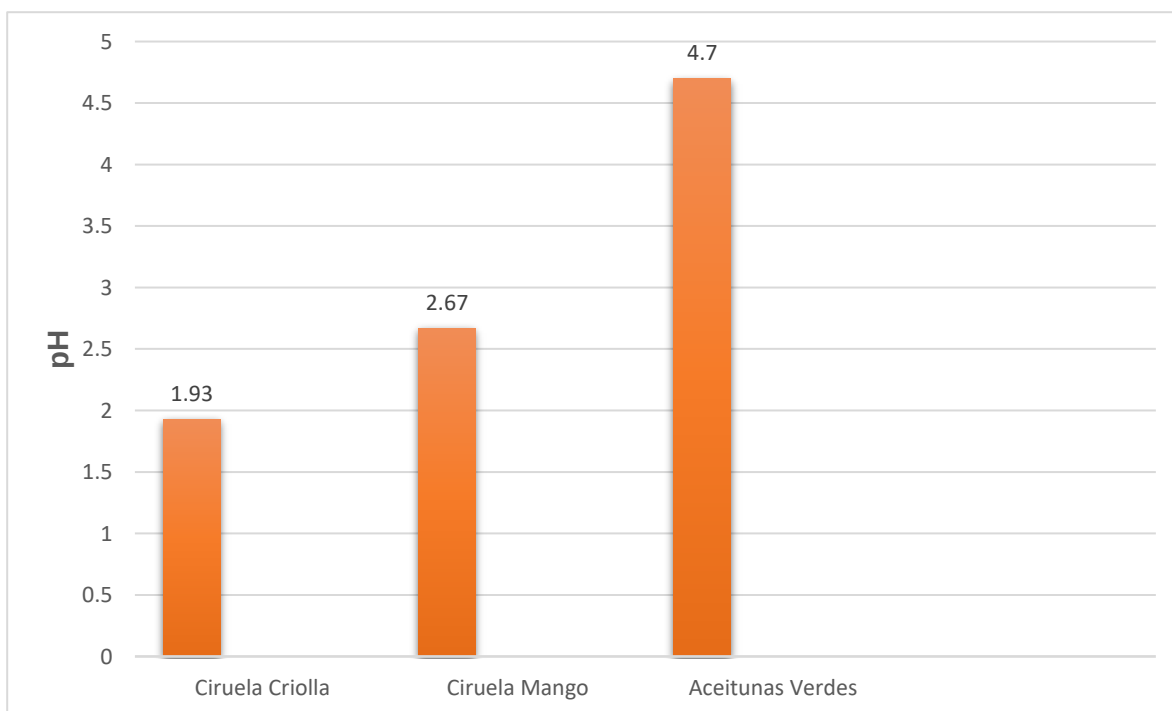


Figura 3. Valores de pH de frutos de ciruela Mango-Criolla y aceitunas en estado fenológico verde y procesados de tipo salmuera.

Fuente: Elaboración propia.

5.2 Caracterización Morfológica de las Bacterias ácido lácticas

Se aislaron 3 UFC de muestra de salmuera de ciruela criolla y ciruela mango de acuerdo a forma, borde, y elevación, característico de bacteria ácido lácticos. En muestras de fruto procesado de ciruela criolla no se observó crecimiento de microorganismos de interés. Los 3 aislamientos presentaron aspecto circular, convexa, elevada y puntiforme, morfológicamente la mayoría de los aislados se pudieran agrupar globalmente dentro del género *Bacillus*, ya que siendo bacterias Gram positivas, con crecimiento abundante y el color característico de las colonias obtenidas, se pueden agrupar dentro de este género, Según (Donate-Correa et al. 2004).

Tabla 3.
Caracterización morfológica de microorganismos aislados de ciruela mango en salmuera.

Muestra	Cepa	Elevación	Borde	Forma	Textura	Color
Mango	M1	Convexa	Entero	Puntiforme	Lisa	Violeta
Mango	M2	Convexa	Entero	Puntiforme	Lisa	Violeta
Mango	M3	Convexa	Entero	Puntiforme	Lisa	Violeta

Fuente: Elaboración propia.

5.3 Caracterización Microscópica de Bacterias Acido lácticas

La caracterización microscópica por tinción de Gram llevo a cabo la identificación de *Bacillus* Gram positivos (Figura), en estado verde de ciruela mango procesada de tipo salmuera.

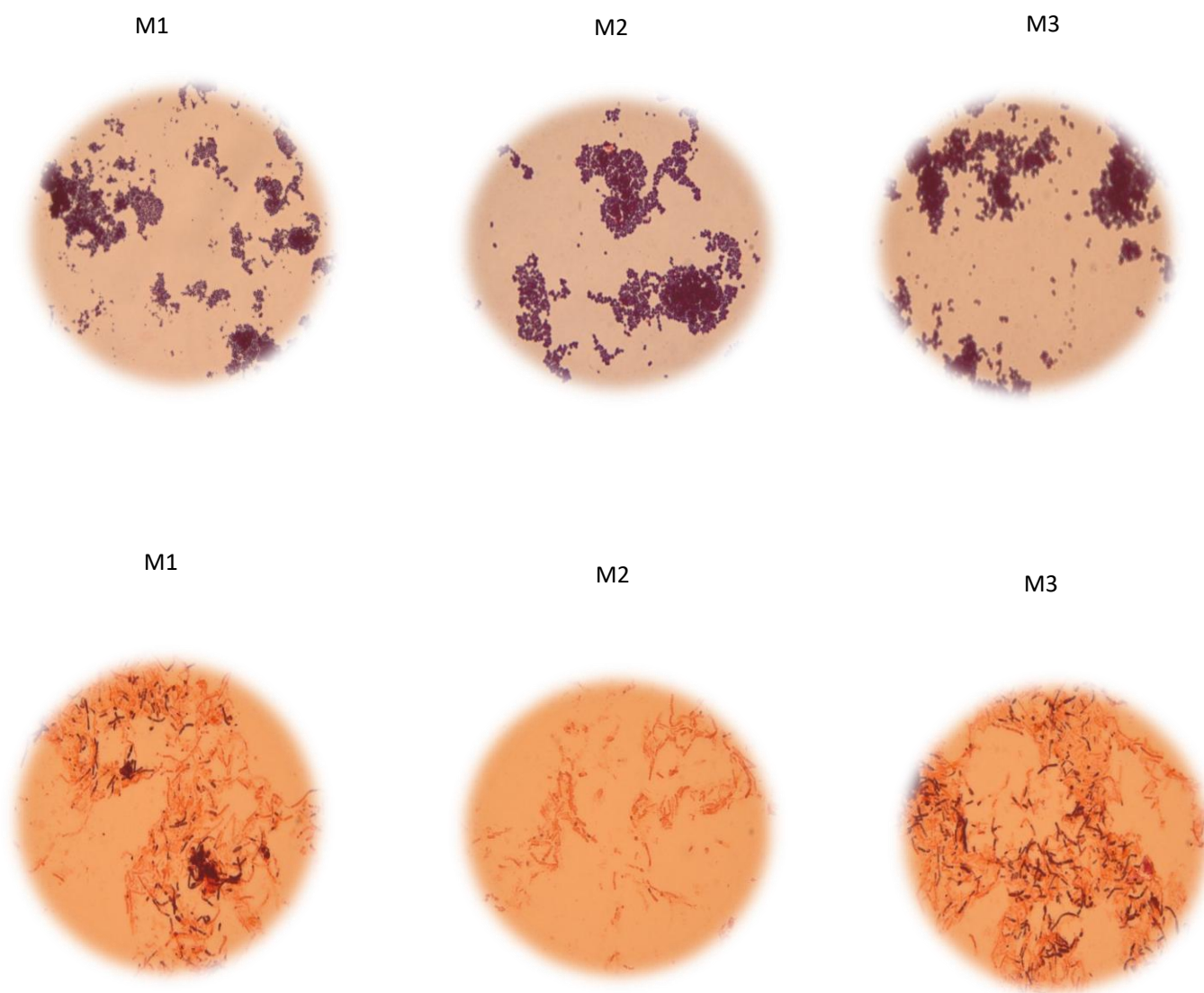


Figura 4. Bacterias Gram positivas aisladas del fruto de ciruela Mango.

Fuente: Elaboración propia.

5.4 Identificación de BAL mediante pruebas moleculares

Para identificar los aislados Gram positivos, después de la extracción y cuantificación de ADN, se amplificó la región 16s ribosomal por PCR (Figura) y secuenciado. Los resultados moleculares indicaron la identificación de *Bacillus Subtilis* para el de ciruela Mango en estado verde procesada.

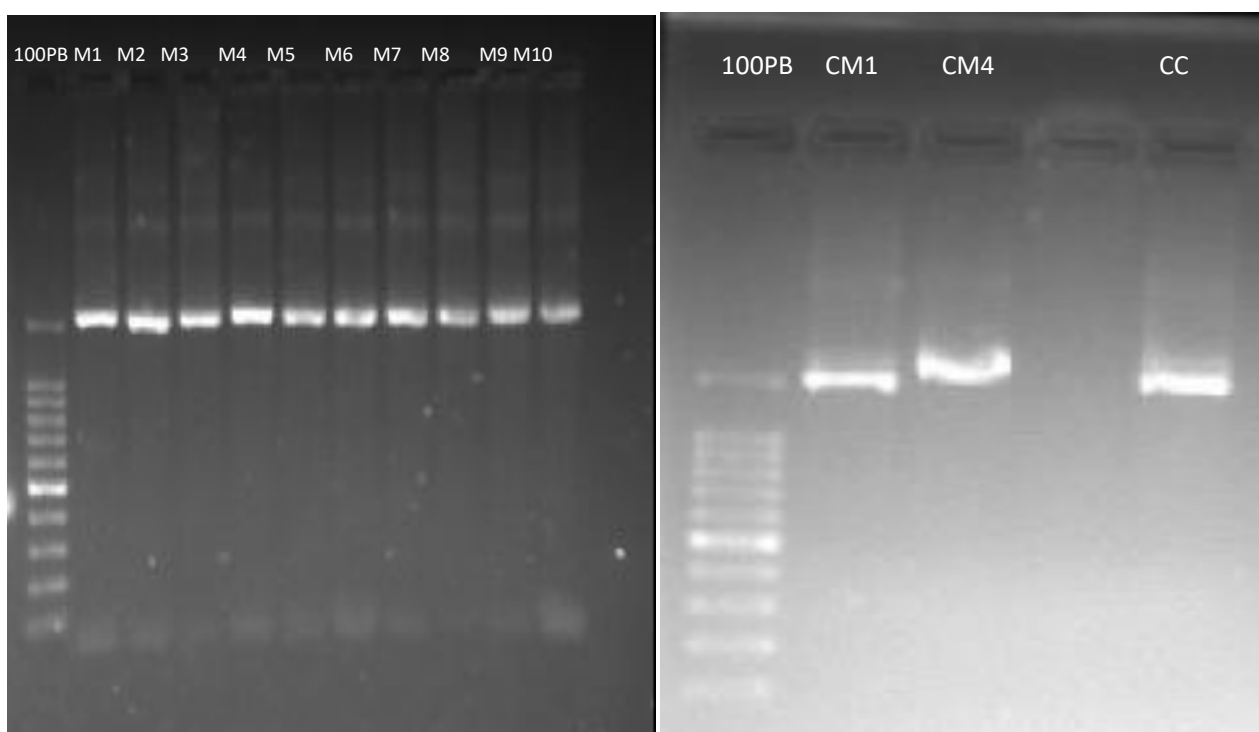


Figura 5. Amplificación de la región rRNA 16S de los de aislados de ciruela Mango y Criolla procesada en estado verde.

Fuente: Elaboración propia.

5.4.1 Secuenciación de los productos de PCR

Una vez secuenciados por el método de Sanger, las secuenciadas obtenidas fueron comparadas en bases de datos públicos como Genbank del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) en el cual se llevó a cabo la comparación de secuencias y la identificación de los microorganismos a nivel especie y género (Poggi et al., 2009).

El alineamiento con las secuencias en el programa BLAST del NCBI reveló que los microorganismos en ciruela criolla verde en salmuera corresponden a *Staphylococcus hominis* (Figura 6) mientras que en ciruelas mango en salmuera fueron *Escherichia coli* y *Bacillus megaterium* (Figuras 7 y 8), siendo este último de mayor interés por ser empleado ampliamente para la producción de proteínas recombinantes.

RID

PG8D61JP015

Search expires on 08-31 03:04 am

Download All

Program

BLASTN

Citation

Database

nr

See details

Query ID

lcl|Query_52221

Description

None

Molecule type

dna

Query Length

1019

Other reports

Distance tree of results

MSA viewer

Organism

only top 20 will appear

exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

+ Add organism

Percent Identity

to

E value

to

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Manage Columns

Show

100

select all

100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒	Staphylococcus sp. CS21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1652	1652	98%	0.0	95.98%	KR780376.1
☒	Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus strain ALK519 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1652	1652	98%	0.0	95.98%	KC456583.1
☒	Bacterium NIAE-zLP675 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1650	1650	98%	0.0	95.97%	JQ607523.1
☒	Uncultured bacterium clone nbw856d10c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1650	1650	97%	0.0	96.15%	GQ028597.1
☒	Staphylococcus sp. strain N2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1648	1648	98%	0.0	95.88%	MK757916.1
☒	Staphylococcus hominis strain PbT3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1648	1648	98%	0.0	95.88%	KT717627.1
☒	Staphylococcus hominis strain PbT1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1648	1648	98%	0.0	95.88%	KT717625.1
☒	Staphylococcus hominis strain XAAS x9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1646	1646	98%	0.0	95.88%	MN187275.1
☒	Staphylococcus hominis strain BMBLM2 16S ribosomal RNA (16s ribosomal) gene, partial sequence	1646	1646	98%	0.0	95.88%	MG996843.1
☒	Staphylococcus hominis strain OA244 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1646	1646	98%	0.0	95.88%	KY622854.1
☒	Staphylococcus hominis subsp. hominis strain BERC9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1646	1646	98%	0.0	95.88%	KX510094.1

Figura 6. Identificación molecular de los aislamientos obtenidos de ciruela criolla. Se muestran los resultados de identidad de la secuencia nucleotídica obtenida, de acuerdo con los resultados del programa Blast la especie identificada corresponde a *Staphylococcus hominis*.

Fuente: Elaboración propia.

ast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi

Query Length 943

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) ?

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Manage Columns Show 100 ?

☒ select all 100 sequences selected

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒	Bacillus megaterium strain Ni2_3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1609	1609	99%	0.0	97.33%	MH762122.1
☒	Bacillus megaterium strain F4-2-27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1609	1609	99%	0.0	97.33%	MN190174.1
☒	Bacillus megaterium strain F4-2-27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1609	1609	99%	0.0	97.33%	KX350034.1
☒	Bacillus megaterium strain zjz1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1609	1609	99%	0.0	97.33%	KF658192.1
☒	Bacillus sp. MB108 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1609	1609	98%	0.0	97.43%	AB536937.1
☒	Bacillus megaterium strain FK4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97.43%	MK318804.1
☒	Bacterium strain BS0569 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97.43%	MK823757.1
☒	Bacillus megaterium strain S14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97.43%	MG709235.1
☒	Bacillus ginsengisoli strain G5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97.43%	MG709219.1
☒	Bacillus megaterium strain N4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97.43%	MG709207.1
☒	Bacillus megaterium strain B21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97.43%	MG709189.1
☒	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain y6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97.43%	MK120435.1
☒	Bacillus megaterium strain RTM 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97.43%	MK014286.1
☒	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain 201705CJIKOP-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97.43%	MG309321.1
☒	Bacillus megaterium strain G6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97.43%	MH814574.1
☒	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain HBUMD16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97.43%	MF285787.1
☒	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain LQ26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97.43%	MG025786.1
☒	Bacillus megaterium strain MGB3071 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97.43%	MH261080.1
☒	Bacillus megaterium strain TSA18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97.43%	MH187627.1

Figura 7. Identificación molecular de los aislamientos obtenidos de ciruela Mango. Se muestran los resultados de identidad de la secuencia nucleotídica obtenida, de acuerdo con los resultados del programa Blast la especie identificada corresponde a *Escherichia coli*.

Fuente: Elaboración propia.

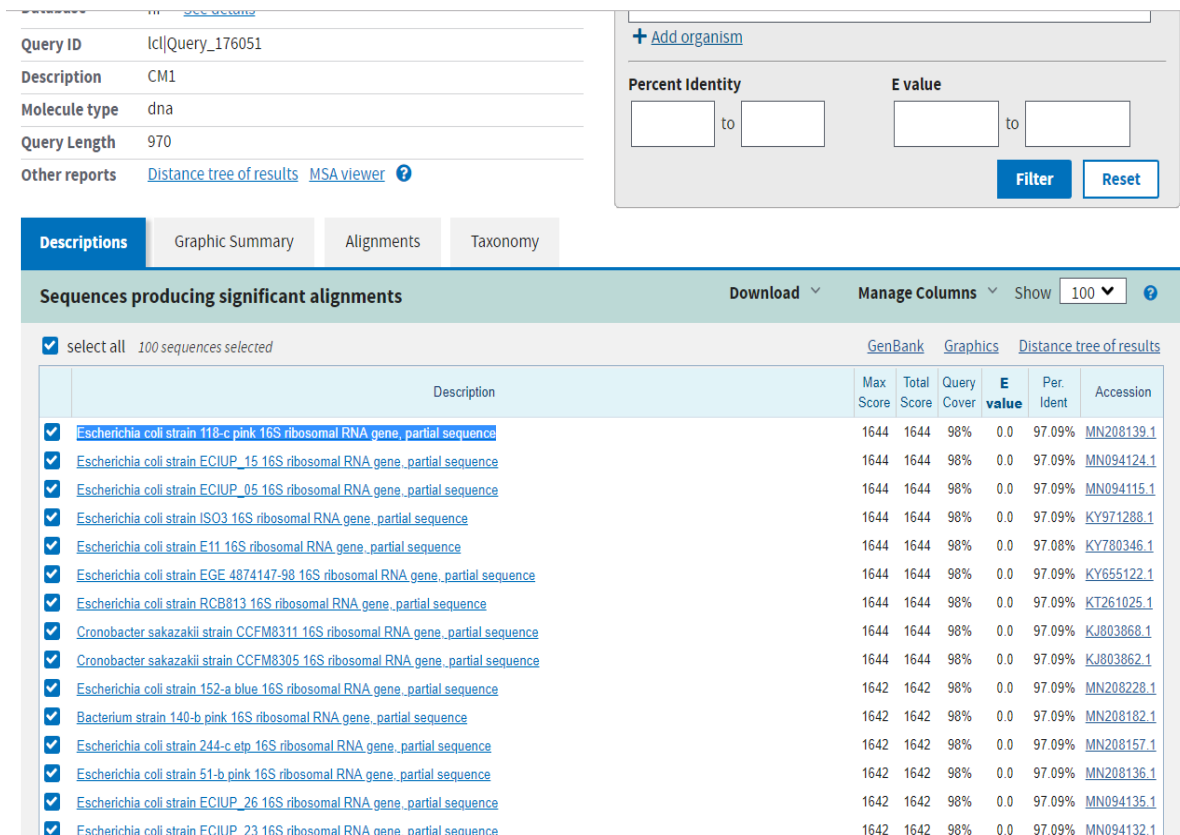


Figura 8. Identificación molecular de los aislamientos obtenidos de ciruela Mango. Se muestran los resultados de identidad de la secuencia nucleotídica obtenida, de acuerdo con los resultados del programa Blast la especie identificada corresponde a *Bacillus megaterium*.

Fuente: Elaboración propia.

La ciruela mexicana mejor conocida como “jocote mexicano “(Duarte-Paull, 2015) posee características similares a las aceitunas en salmuera, no es muy conocida a pesar de ello su interés industrial y biotecnológico es alto. En variedades de aceitunas de mesa u oliva (*Olea Europea Sateva*) han sido precursoras de bacterias ácido lácticas con potencial biotecnológico. Al colocar las aceitunas enteras en salmuera, esta se convierte en un adecuado medio de cultivo, donde se desarrolla la fermentación láctica. En dicho estudio en la segunda fase de fermentación de la salmuera encontraron presencia de bacterias lácticas del género *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y *Enterococcus* (Fernández et al, 1985). De tal manera que coincide con los estudios realizados por (López et al, 2006) con valores mayoritarios en especies de *Bacillus*. Las especies del género *Bacillus* secretan muchos metabolitos secundarios, incluyendo antibióticos y antifúngicos. La gran diversidad y la variabilidad genética de las especies de *Bacillus*, hace que este microorganismo genere una gran cantidad de metabolitos de diferente estructura química con variadas aplicaciones en el ambiente, la agricultura y la biotecnología industrial. A diferencia de lo reportado por (Fernández et al, 1985) y (López et al, 2006) en el presente estudio fue aislado en ciruela mango procesada. *Bacillus megaterium* es una bacteria Gram positiva aerobia, conocida por su gran tamaño y su producción de esporas, ha sido aprovechada para la realización de estudios morfológicos, tales como la biosíntesis de la pared celular y la membrana citoplasmática, la esporulación, estructura de las esporas y la organización celular, la partición de ADN y la localización de proteínas. También se ha caracterizado por ser ubicua y presentar altos niveles de resistencia intrínseca a condiciones hostiles, incluyendo altas concentraciones de salinidad y exposición a metales (Bell et al, 2015).

VI. CONCLUSIONES

Los frutos han mostrado ser una fuente importante para el aislamiento de microorganismos de interés biotecnológico, en particular las ciruelas del género *Spondias* en estado fenológico verde en salmuera permitieron comprobar que también son una fuente para el aislamiento de bacterias con potencial biotecnológico para la industria agroalimentaria.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

- Arce-Romero AR, Monterroso-Rivas AI, Gómez-Díaz JD, Cruz-León A (2017) Mexican plums (*Spondias* spp.): their current distribution and potencial distribution under climate change scenarios for México. *Revista Chapingo Hortalizas* 23: 5-19.
- Alia TI, Astudillo MYI, Núñez CCA, Valdez ALA, Bautista BS, García VE, Ariza FR, Rivera CF (2012) Caracterización de frutos de ciruela mexicana (*Spondias purpurea* L.) del sur de México. *Fitotec. Mex.* 35 (5): 21-26.
- Álvarez-Vargas J. E., Alia T, I., Chávez F. S.H., Colinas L. M.T., Nieto A. D., Rivera C.F., Aguilar P.L.A., (2017). Ciruelas Mexicanas (*Spondias Purpurea* L) De Clima Húmedo Y Seco: Calidad, Metabolitos Funcionales Y Actividad Antioxidante. *Interciencia*, 42(10), 653-660.
- Avitia, G.E. (1996). Anatomía prebiótica y postcigótica en relación al aborto de óvulos y semillas en *Spondias purpurea* L. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 118 p.
- Bell, A., Tortolo, K., (2015). Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de Caña de Azúcar . 22-26.
- Chien, A., Edgar, D.B., AND. Trela, J.M. (1976). Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile *Thermus aquaticus*. *J. of Bacteriology*. 127, 3, 1550-1557.
- Cruz L. A., A. Pita D., y B. Rodríguez H. (2012). *Jocotes, jobos abales o ciruelas mexicanas*. Universidad Autónoma Chapingo. México. 123 p.

- Chavelas, J. (1988). *Spondias mombin* L. Árboles útiles de la parte Tropical de América del Norte. Comisión Forestal de América del norte. No. 3. Washington, DC, E.U.A.
- Challenger, A. (1998). Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F., México. 847 p.
- Donate-Correa, J; M. León-Barrios and R. Pérez Galdona. (2004). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant Soil*. 266. 261-272.
- Duarte O, Paull R. E. (2015) *Exotic Fruits and Nuts of the New World*. CABI. Wallingford, RU. 332 pp.
- Evangelista, Z., Quiñones, E. y Rincón, G. (2017). Potencial Biotecnológico De Las Actinobacterias Aisladas De Suelos De México Como Fuente Natural De Moléculas Bioactivas: Compuestos Antimicrobianos Y Enzimas Hidrolíticas. *Temas De Ciencia Y Tecnología*, 21(63), 39-51.
- Fernández D. M.J., de Castro R. R., Garrido F. A., González C. F., González P. F., Nosti V. M., Heredia M. A., Mínguez M. M. I., Rejano N. L., Duran Q. M., Sánchez R. C. F., GARCIA G. P., de Castro A. (1985). *Biotecnología de las Aceitunas de Mesa*. CSIC Madrid. 51-123.
- Koziol MJ, Macía MJ (1998) Chemical composition, nutritional evaluation, and economic prospects of *Spondias purpurea* (Anacardiaceae). *Econ. Bot.* 52: 373-380.

- Lorenzo-Bautista, J.L. (1977). El desarrollo prehistórico e histórico de los agroecosistemas, p. 1-21. In Hernández-xolocotzi, E. (ed.). Agroecosistemas de México. Colegio de Postgraduados. Primera Edición. Chapingo, México.
- López D, S., M. T. C., Espirito S.F., Tavares P. Pereira R. C. (2006). Phenotypic characterization of food waste degrading *Bacillus* strains isolated from aerobic bioreactors. *J. Basic. Microbiol.* 46. 34-36.
- Morath, S.U.; Hung, R.; Bennett, J.W. (2012). Fungal Volatile Organic Compounds: A Review With Emphasis On Their Biotechnological Potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2–3): 73–83.
- Pereira B.J., Pires de A. D., Furtado M. E. M., Souza T. P. A., (2022). Bacterias del ácido láctico aisladas de frutas: una revisión sobre métodos para la evaluación del potencial probiótico. *Revista de investigación en alimentación y nutrición.* 711 – 726.
- Pennington, T.D. & J. Sarukhán. (1998). Árboles tropicales de México. 2da edición. Fondo de Cultura Económica, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., México. 521 p.
- Quintana, M. D., Barranco, C. R., García, P.G. Balbuena, M. B., & Fernández, A. G. (1997). Bacterias del ácido láctico en la fermentación de aceitunas de mesa, revista *Grasas y Aceites*, 48, 297-311.
- Ramírez Hernández B.C., Pimienta B. E., Castellanos R. J.Z, Muñoz U.A., Hasbach P. G., & Pimienta B.E. (2008). Sistemas de producción de *Spondias purpurea* (Anacardiaceae) en el centro-occidente de México. *Rev. Biol. Trop.* 56 (2), 675-687.

Solórzano M. S., Alia T. I., Rivera C. F., López M.V., Pérez F.L.J., Pelayo Z.C., Guillén S.D., Díaz de L. S. F., Maldonado AYI (2015) Quality attributes and functional compounds of Mexican plum (*Spondias purpurea* L.) fruit ecotypes. *Fruits* 70(5): 261-270.

VIII. ANEXOS

Anexos A. Secuencias en Formatos FASTA de las BAL aisladas.

>CC4, CC6, CC7, CC8

```
TRGCKRYKMKGRGCTATMATGCAGTCGAGCGAACAGACGAGGAGCTTGCTCCTTTGACGT
TAGCGGWGGCSGGGTRAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGWYYGGGATAACTTCGG
GAAACCGGAGCTAATAACCGGATAATATTTGAACCGCATGGTTCGATAGTGAAAGATGGC
TCTGCTATCACTTATAGATGGACCTGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTA
CCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACAC
GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAG
AACAAACGTGTAAGTAACTGTGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGACAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCG
TAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAG
GGTCATTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCG
GTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAC
TGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CRTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCAT
TAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCATGCTTGAAACTCAAAGATGACGGGACCCGC
ACAAGCGGTGGAGCATGTGATTATCGGAGCACGCKAAGATCTMACGAAATCTGACATCTT
GACGATCTAGAGATAGCAGTTGCCTTCGGGGACAAGTGACATGGTGGTGCATGACTGTC
```

>CM1

ASWASAATAGMGGCTACACATGCAGTCGAACGGKRCARSCAAGAGCTTGCTKCTTYGCTG
ACYWARGSGGYRGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGAAGGYGGGGGAWAACTACTG
GAAACGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCT
TGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTWGTWGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCG
ACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT
GCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGT
AAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
ACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCT
GATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTC
AGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGA
CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACSCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGAMAT
CCMYCGGAAG

>CM4

GATCCWTGYGGGTGCTATACATGCAGTCGAGCGAACTGAYYAGAAGCTTGCTTCTATGAC
GTTTRARGGGGCTRGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGYWWTWCKGRRATAACTTCG
GGAAACCGAAGCTAATACCGGATAAGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGG
TTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG
CGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG
AGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTA
ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACG
CATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGGCCCCGCACAAGCGGTGGGAGCATGGTGGTTTAATTCGAG

Anexo B Protocolo para clonas recombinantes portadoras del GEN 16s (Strata Clone PCR cloning Kit)

1.- De acuerdo con las instrucciones de la casa comercial del vector, si el fragmento a clonar es;3Kb y el resultado de la PCR indica una amplificación “abundante” (de 100 a 500 ng/μl) y específica, se deberá hacer una dilución 1:10 del producto de PCR, en caso contrario, se omite la dilución.

2. Preparar la reacción de ligación de la siguiente manera:

Reacción de Ligación

StrataCloning Buffer	3 μl
StrataCloning Vector Mix	1.0 μl
Producto de PCR	2μl

4.- Mezclar la reacción por pipeteo, incubara la reacción a temperatura ambiente por 5 minutos

5.- Posteriormente incubar en hielo

NOTA: Si no se va utilizar enseguida la reacción de ligación para hacer la transformación, se puede almacenar a -2°C hasta que se vaya realizar la transformación.

Transformación.

1. Centrifugar el tubo de la reacción de ligación y mantenerlo en hielo.
2. Descongelar sobre hielo un tubo de células competentes por cada ligación/ transformación.
3. Tomar con una pipeta 2 μ l de cada reacción de ligación y colocarla en el tubo de las células competentes.
5. Mezclar suavemente e incubar la reacción en hielo por 20 min.
6. Dar un choque térmico a 42 °C por aproximadamente 45/50 seg. No mezclar ni agitar, al pasar el tiempo del choque térmico, colocar en hielo por 2 min.
7. Adicionar 250 μ l de medio LB (a temperatura ambiente) a cada tubo.
8. Incubar los tubos a 37 °C/ 1 h a 225 rpm.
9. Agregar 50 μ l de X-Gal (80 mg/ml) y 20 μ l de IPTG (0.1 M) a cada tubo de transformación, mezclar suavemente.
10. Marcar placas de agar LB conteniendo 100 mg/ml de ampicilina. Sembrar en dos placas 5 y 100 μ l de células transformadas.
11. Asegurase que el líquido se haya absorbido, enseguida colocar las placas invertidas a 37 C al menos por 18 hrs.

Anexo C Secuenciación

1.- Preparación de amplicones

Todos los fragmentos de PCR obtenidos por PCR deben someterse a la siguiente reacción de purificación utilizando Exo-SAP-it:

Producto de PCR	5.0 μ l
ExoSAP	2.0 μ l
Total	7.0 μ l

Mezclar en un tubo de PCR los reactivos antes mencionados y colocarlos en el programa EXO2 ((37 °C por 15 min y 80 °C por 15 min) del termociclador MJ Research. Al finalizar los ciclos, guardar las reacciones a -20°C, o continuar con las reacciones de secuenciación y purificación.

2. Preparación por muestra de la siguiente secuenciación:

	1X	4X
DNA templado		1 μ l
Primer (5 μ M)		0.5 μ l
Ready Reacc. Premix 2X		2 μ l
Big Dye Seq. Buffer		2 μ l
Agua destilada		4.5 μ l
Volumen total de agua		10 μ

Correr en el programa **SEC3130** (96 °C por 1 min y 25 ciclos de 96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s y 60 °C por 4 min, para finalizar a 4 °C).

3.- Purificación Xterminator

SAM buffer	45 µl	22.5 µl
Xterminator*	10 µl	5 µl
Reacc. Secuenciación	10 µl	5 µl

Incubar con agitación en el termomixer durante exactamente 30 min. Asegurarse que la resina se encuentra totalmente resuspendida.

***IMPORTANTE: asegurarse de mezclar al vortex la resina del Xterminator antes de agregar a la reacción.**

Centrifugar las reacciones a 2000rpm durante 2 minutos

Tomar 25µl del sobrenadante sin tomar nada de la resina y pasar a un tubo nuevo.

Almacenar a -20°C hasta que se envíe a analizar.