



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON OPCIONES A AGRONÓMICAS O VETERINARIAS

TESIS

**CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE PROBIÓTICOS DE  
MICROORGANISMOS DE MONTAÑA REPRODUCIDOS ARTESANALMENTE EN  
AGUASCALIENTES**

PRESENTA

**DARÍO FRANCO ROMO**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS AGRONÓMICAS

TUTOR

**DR. JOSÉ DE JESÚS LUNA RUIZ**

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

**DR. RODOLFO GONZÁLEZ SEGOVIA  
DR. JOAQUÍN SOSA RAMÍREZ**

**Aguascalientes, Ags., junio de 2021.**



CARTA DE VOTO APROBATORIO  
INDIVIDUAL

**DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ**  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTE

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **DARÍO FRANCO ROMO** con ID 149981 quien realizó la tesis titulada: **CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE PROBIÓTICOS DE MICROORGANISMOS DE MONTAÑA REPRODUCIDOS ARTESANALMENTE EN AGUASCALIENTES**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"Se Lumen Proferre"**  
Aguascalientes, Ags., a 07 de junio de 2021

**DR. RODOLFO GONZÁLEZ SEGOVIA**  
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07  
Actualización: 01  
Emisión: 17/05/19

CARTA DE VOTO APROBATORIO  
INDIVIDUAL

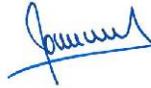
**DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ**  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**P R E S E N T E**

Por medio del presente como ASESOR designado del estudiante **DARÍO FRANCO ROMO** con ID 149981 quien realizó la tesis titulada: **CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE PROBIÓTICOS DE MICROORGANISMOS DE MONTAÑA REPRODUCIDOS ARTESANALMENTE EN AGUASCALIENTES**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
**"Se Lumen Proferre"**  
Aguascalientes, Ags., a 07 de junio de 2021



**DR. JOAQUÍN SOSA RAMÍREZ**  
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación: 16 de junio de 2021

NOMBRE: Darío Franco Romo ID: 149981

PROGRAMA: Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias LGAC (del posgrado): Producción e Inocuidad Agroalimentarias

TIPO DE TRABAJO: (  ) Tesis (  ) Trabajo Práctico

TÍTULO: "CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE PROBIÓTICOS DE MICROORGANISMOS DE MONTAÑA REPRODUCIDOS ARTESANALMENTE EN AGUASCALIENTES"

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Esta tesis contribuye al conocimiento sobre los procesos de preparación de microorganismos de montañaria (MV) usando mantillo forestal, y su potencial probiótico.

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
<b>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</b>				
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado.
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario.
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado.
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda.
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área.
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área.
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país.
N.A.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica.
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cumple con la ética para la investigación (reporte en la herramienta antiplagio).
<b>El egresado cumple con lo siguiente:</b>				
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia.
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc).
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor.
N.A.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario.
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Coincide con el título y objetivo registrado.
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiene homologación con cuerpos académicos.
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiene el CVU del Conacyt actualizado.
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda).
<b>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</b>				
N.A.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Aceptación o publicación de los artículos según el nivel del programa.
N.A.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	El estudiante es el primer autor.
N.A.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico.
N.A.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
N.A.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se mencionan en el idioma en que fueron publicados.
N.A.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto.

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de liberación y programación del examen de grado:

SI  No

FIRMAS

Elaboró:

\* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. JOSÉ DE JESÚS LUNA RUIZ

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DR. ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ

\* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto a tutor e miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ

**Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado**

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a letra señal entre las funciones del Consejo Académico... Custodia el expediente del programa de posgrado y el Art. 205F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por hacer posible este trabajo.

Al Dr. José de Jesús Luna por confiar en mí desde un inicio y guiarme en el camino de la investigación.

Al Dr. Joaquín Sosa por su asesoría, observaciones y acompañamiento en campo.

Al Dr. Rodolfo González Segovia por creer en mí, su apoyo constante y sus enseñanzas.

Al Dr. Fidel Guevara por sus observaciones pertinentes y permitirme trabajar en el laboratorio.

Al Dr. Jesús Meraz por su apoyo contante desde el proceso de ingreso al posgrado.

A la Lic. Lizbeth Montañez por su gran apoyo y asesoría en el Laboratorio de Microbiología Sanitaria y Ambiental.

A la Mtra. Liliana Barba por su asesoría y permitirme trabajar en Laboratorio de Análisis de suelos, Agua y Nutrientes Vegetales.

A la Mtra. Araceli Mendieta por su apoyo en el Laboratorio de Semillas y Recursos Fitogenéticos.

Mtro. Víctor Calderón por su asesoría y acompañamiento en campo.

Al personal de limpieza y mantenimiento de la universidad por sostener los espacios de trabajo.

A todas las personas que de alguna forma apoyaron en este trabajo y que no mencioné.

A mi familia y amistades por su cariño y apoyo.

**ÍNDICE GENERAL**

ÍNDICE GENERAL ..... 1

ÍNDICE DE TABLAS ..... 4

ÍNDICE DE FIGURAS ..... 4

ACRÓNIMOS ..... 7

RESUMEN ..... 8

ABSTRACT ..... 11

1. INTRODUCCIÓN ..... 14

1.1 HIPÓTESIS ..... 15

1.2 OBJETIVOS ..... 15

    1.2.1 Objetivo general ..... 15

    1.2.2 Objetivos específicos ..... 15

2. MARCO TEÓRICO ..... 16

    2.1 Microorganismos de montaña MM ..... 16

        2.1.1 Reproducción artesanal de MM ..... 17

        2.1.2 MM como potencial probiótico para consumo animal ..... 19

        2.1.3 MM como probiótico para consumo humano ..... 19

    2.2 Mantillo forestal ..... 19

    2.3 El género *Quercus* ..... 20

    2.4 Contexto forestal en Aguascalientes ..... 21

    2.5 Área Natural Protegida Sierra Fría ..... 21

        2.5.1 Especies del género *Quercus* en el ANP Sierra Fría ..... 22

    2.6 Probióticos ..... 24

        2.6.1 Bacterias ácido lácticas (BAL) ..... 24

2.6.2 Levaduras .....	25
2.6.3 Efectos de los probióticos en la salud .....	26
2.6.4 Condiciones para la definición, aprovechamiento y comercialización de los probióticos .....	28
2.6.5 Legislación y normatividad de los probióticos .....	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 ELABORACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS PREPARADOS MM.....	31
3.1.1 Colecta de mantillo forestal .....	31
3.1.2 Reproducción de MM.....	33
3.2 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO .....	35
3.2.1 Identificación tradicional.....	35
3.2.2 Identificación molecular.....	37
3.3 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE LOS MM.....	39
3.3.1 Tolerancia a pH ácido .....	40
3.3.2 Tolerancia a sales biliares.....	40
3.3.3 Porcentaje de resistencia a pH ácido y Sales biliares.....	40
3.3.4 Análisis estadístico .....	41
3.4 Recomendaciones para la preparación de los MM.....	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	41
4.1 ELABORACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS PREPARADOS MM.....	41
4.1.1 Características de los sitios de recolección de mantillo forestal .....	41
4.1.2 Reproducción en fase sólida MMS.....	42
4.1.3 Reproducción en fase líquida MMA.....	45
4.2 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO .....	48
4.2.1 Identificación tradicional.....	48

4.2.2 Identificación molecular..... 52

4.3 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE LOS MM..... 55

    4.3.1 Tolerancia a pH ácido y sales biliares..... 55

4.4 GUIA DE RECOMENDACIONES PARA LA PREPARACIÓN DE LOS MM ..... 62

5. CONCLUSIONES ..... 65

6. REFERENCIAS..... 67



**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1 Proporciones e ingredientes para la reproducción MMS y MMA según varios autores. .... 18

Tabla 2 Probióticos y sus efectos estudiados en la salud humana y animal. Fuente: (Parvez, Malik, Ah Kang, y Kim, 2006). ..... 27

Tabla 3. Reactivos y cantidades utilizadas para la reacción de PCR en bacterias..... 39

Tabla 4. Reactivos y cantidades utilizadas para la reacción de PCR en levaduras..... 39

Tabla 5 Geoposicionamiento, altitud y fecha de colecta de mantillo forestal de los cinco sitios en el ANP Sierra Fría. .... 42

Tabla 6 Promedio de las lecturas de pH de los MMS de los sitios y tiempo de almacenamiento.... 44

Tabla 7 Promedio de lecturas semanales de pH de los MMA. .... 47

Tabla 8. Unidades formadoras de colonias por ml de los productos MMA de los cinco sitios en medios nutritivos, selectivos y diferenciales. .... 49

Tabla 9 Características macro y micromorfológicas de BAL y levaduras aisladas de los MMA de cinco sitios..... 50

Tabla 10 BAL y Levaduras aisladas de los MMA de los cinco sitios, observadas en microscopio a 100x..... 51

Tabla 11 Identificación de *Lactobacillus* y *Saccharomyces* aislados de MMA de cinco sitios mediante tipificación molecular. .... 54

Tabla 12 Aislados identificados por PCR como *Lactobacillus* observados en microscopio a 100x. 54

Tabla 13 Porcentaje de resistencia de las BAL aisladas de los preparados MMA cultivadas en pH 2, 4 y 0.3% de sales biliares por 24 horas. .... 56

Tabla 14 Porcentaje de resistencia de las levaduras aisladas de los preparados MMA cultivadas a pH 2, 4 y 0.3% de sales biliares por 24 horas..... 59

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1 Ilustración del proceso de reproducción de MMS..... 17

Figura 2 Ilustración de la hoja de Q. potosina. .... 23

Figura 3 Ilustración de la hoja de Q. sideroxyla. .... 23

Figura 4 Área que conforma la ANP Sierra Fría y ubicación de los sitios de colecta. .... 32

Figura 5 Detalle del geoposicionamiento de los sitios de colecta dentro del ANP..... 32

Figura 6 Sitio de colecta 1, *Q. sideroxylla*. ..... 32

Figura 7 Sitio de colecta 4, *Q. potosina*. ..... 32

Figura 8 Mantillo forestal y salvado humedecido con piloncillo previo a su mezcla..... 34

Figura 9 MMS al momento de su preparación ..... 34

Figura 10 Detalle de la bolsa de poliéster con los MMS. .... 35

Figura 11 MMA al momento de su preparación ..... 35

Figura 12 Detalle del mantillo forestal de *Q. sideroxylla*. ..... 42

Figura 13 Detalle de mantillo forestal de *Q. potosina*. ..... 42

Figura 14 MMS de las muestras 1 a 4. .... 43

Figura 15 Detalle de los MMS del sitio 5 utilizados para su reproducción MMA. .... 44

Figura 16 Interior del recipiente que contenía los MMS del sitio 5..... 44

Figura 17 MMA de los sitios 1 y 2 con una semana de activación..... 45

Figura 18 MMA de los sitios 1 y 2 con dos semanas de activación..... 45

Figura 19 Comparación de preparados MMA de los cinco sitios..... 46

Figura 20 MMA del sitio 5 con una semana de activación. .... 46

Figura 21 MMA del sitio 5 con formación de micelio. .... 46

Figura 22 Comportamiento del pH de los MMA de todos los sitios durante 8 semanas. .... 47

Figura 23 Gel de validación de oligonucleótidos. .... 52

Figura 24 Gel de identificación del género *Lactobacillus* (a).. ..... 53

Figura 25 Gel de identificación del género *Lactobacillus* (b). ..... 53

Figura 26 Gel de identificación del género *Saccharomyces*. ..... 53

Figura 27 Porcentaje de resistencia de las BAL aisladas de los productos MMA de los cinco sitios y el control *L. rhamnosus* GG, cultivadas a pH 2 por 24 h ..... 57

Figura 28 Porcentaje de resistencia de las BAL aisladas de los productos MMA de los cinco sitios y el control *L. rhamnosus* GG, cultivadas a pH 4 por 24 h ..... 57

Figura 29 Porcentaje de resistencia de las BAL aisladas de los productos MMA de los cinco sitios y el control *L. rhamnosus* GG, cultivadas a 0.3% de sales biliares por 24 h ..... 57

Figura 30 Porcentaje de resistencia de las levaduras aisladas de los productos MMA y el control *S. boulardii*, cultivadas a pH 2 por 24 h ..... 60

Figura 31 Porcentaje de resistencia de las levaduras aisladas de los productos MMA y el control *S. boulardii*, cultivadas a pH 4 por 24 h ..... 60

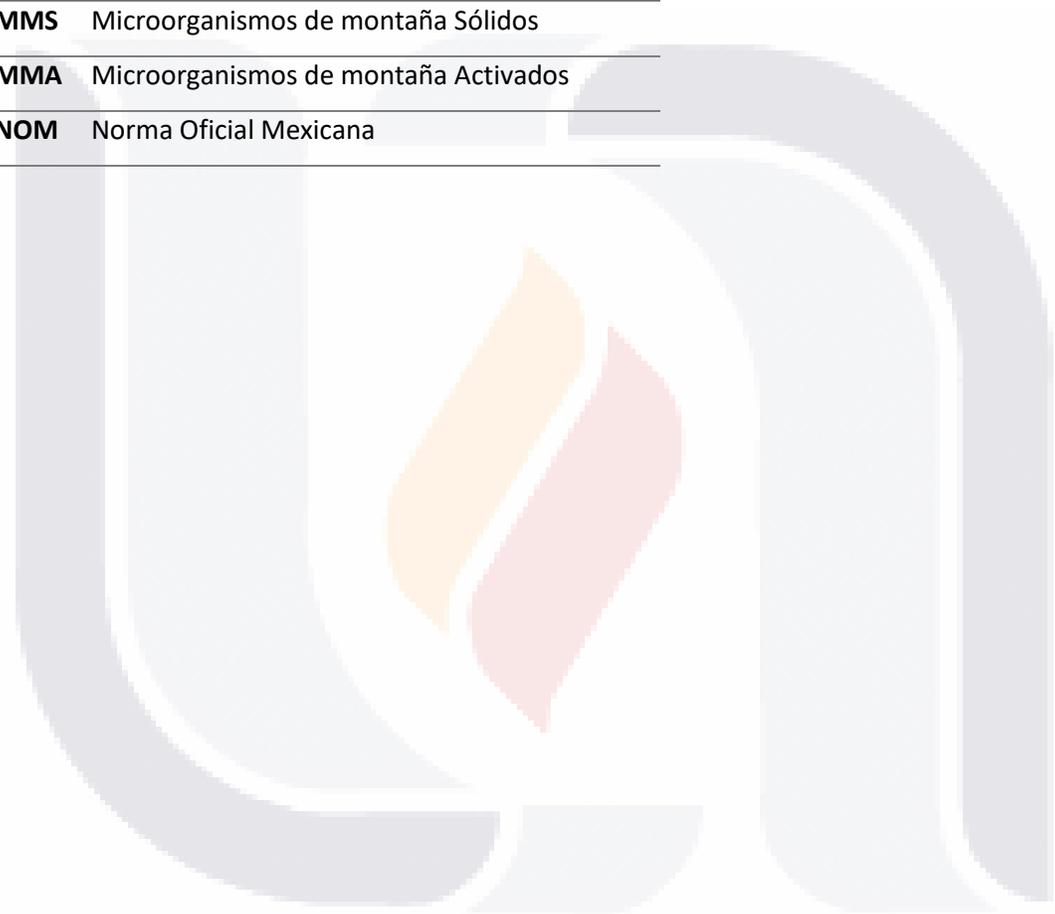
Figura 32 Porcentaje de resistencia de las levaduras aisladas de los productos MMA y el control *S. boulardii*, cultivadas a 0.3% de sales biliares por 24 h..... 60

Figura 33 Guía con recomendaciones para la elaboración de productos MM..... 64



## ACRÓNIMOS

<b>ANP</b>	Área Natural Protegida
<b>BAL</b>	Bacterias ácido lácticas
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>MM</b>	Microorganismos de montaña
<b>MMS</b>	Microorganismos de montaña Sólidos
<b>MMA</b>	Microorganismos de montaña Activados
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana



## RESUMEN

Se llama microorganismos de montaña (MM) a la técnica de reproducción artesanal que aprovecha los microorganismos nativos del mantillo forestal para incorporarse a las unidades agropecuarias con varias funciones; una de estas como suplemento para el ganado por sus supuestos beneficios en parámetros productivos y gastrointestinales. La funcionalidad de los MM ha sido documentada principalmente en guías técnicas, pero se carece de evidencia científica para comprender sus dinámicas.

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se suministran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud. Los principales microorganismos identificados y aprovechados como probióticos son las bacterias ácido lácticas (BAL). Dentro de las BAL, el género *Lactobacillus* ha sido el foco de estudios y del mercado global. Otros microorganismos usados como probióticos son las levaduras *Saccharomyces*.

En Aguascalientes el Área Natural Protegida Sierra Fría (ANP SF) contiene 90% de los bosques templados y de montaña del estado, cuenta con 13% de las 161 especies de *Quercus* de México y 84% de la diversidad de la entidad. Se encuentra con mayor frecuencia *Q. potosina*, y *Q. sideroxylla* en tercer lugar. *Q. potosina* se presenta en varias altitudes, es de menor porte, tiene hojas más grandes y de mayor senescencia que *Q. sideroxylla*, especie de mayor porte, hojas de menor tamaño, de poca senescencia y ubicada a mayor altitud en la ANP SF.

La presente tesis tuvo como objetivo general caracterizar y evaluar el potencial probiótico de los microorganismos de montaña reproducidos artesanalmente a partir del mantillo forestal de *Quercus spp.* de la ANP SF. Para ello se plantearon cuatro objetivos específicos: (1) realizar la reproducción artesanal de MM a partir del mantillo forestal de *Quercus spp.* y la descripción de los productos; (2) aislar e identificar microorganismos de los productos MM mediante métodos tradicionales y moleculares; (3) evaluar el potencial probiótico de los microorganismos obtenidos de la reproducción artesanal de MM; y (4) desarrollar una guía con recomendaciones para la elaboración de los MM. El estudio se llevó a cabo entre agosto de 2019 y abril de 2021.

Para el objetivo 1, se colectaron muestras de mantillo forestal, dos sitios de *Q. potosina*, dos de *Q. sideroxylla* y se incluyó una quinta muestra proveniente de una preparación artesanal elaborada en 2015 con mantillo de *Q. potosina*. Las muestras de cada sitio se procesaron en el Laboratorio de Recursos Fitogenéticos del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA). Se elaboraron productos fermentados en fase sólida (MMS) con 30 días de almacenamiento anaeróbico y a partir de estos se preparó otra fermentación anaeróbica en fase líquida (MMA) de una semana de procesamiento. Cada producto fue monitoreado y se describieron sus características observadas a simple vista. Se midió el pH de los MMS con distinto tiempo de almacenamiento entre los preparados y se realizaron lecturas semanales de pH de los MMA durante ocho semanas. El monitoreo del pH mostró que los productos mantienen estabilidad en su fase sólida y líquida y presentan semejanza con los procesos y características de los ensilajes y los alimentos líquidos fermentados para ganado.

En el objetivo 2, se aislaron e identificaron los microorganismos de los cinco productos MMA mediante métodos tradicionales (cultivo en medios nutritivos, selectivos y diferenciales, tinciones y prueba de catalasa) y moleculares (análisis genérico por PCR) en el Laboratorio de Microbiología Sanitaria y Ambiental de la UAA. El análisis microbiológico de los cinco sitios mostró similitudes en las cantidades mesófilos aerobios, con siete unidades logarítmicas, también en las potenciales BAL, con ocho unidades logarítmicas, además se presentaron levaduras con cinco a siete unidades logarítmicas. En cuatro sitios no se detectaron potenciales enterobacterias y en ningún sitio se encontraron estafilococos. Se aislaron un total de 16 BAL y ocho levaduras de los cinco sitios, de estas 10 BAL y cinco levaduras fueron estudiadas. Mediante análisis por PCR, cinco aislados de BAL se identificaron como *Lactobacillus* y ninguna levadura resultó del género *Saccharomyces*.

Para el objetivo 3, se aplicaron pruebas de resistencia a pH ácido (2 y 4) y 0.3% de sales biliares para evaluar el potencial probiótico de las BAL y levaduras aisladas de los 5 sitios durante el objetivo 2. Este análisis de potencial probiótico se realizó en el Laboratorio de Microbiología Sanitaria y Ambiental de la UAA. Las BAL y levaduras aisladas, mostraron en general un mejor comportamiento que los probióticos comerciales usados como control, con porcentajes de resistencia considerables

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y varias con diferencias significativas tras su cultivo a pH 2, 4 y 0.3% de sales biliares por 24 horas, indicando cierta potencialidad probiótica por su tolerancia *in vitro* a condiciones del tracto gastrointestinal.

Para cumplir con el objetivo 4, se desarrolló una guía con recomendaciones para la elaboración de los MM a partir de la revisión bibliográfica, y los resultados y experiencias adquiridas durante la elaboración de esta tesis. La guía incluye observaciones y prácticas para productoras y productores que ya conozcan la técnica y busca aportar a la mejora de los materiales existentes, y a la preparación y uso responsable de los MM.

Se concluye que, aunque se trate de un método artesanal, se pueden lograr productos MM con estabilidad y similitud en los valores de pH, así como en sus poblaciones microbianas y con presencia de BAL y levaduras con potencial probiótico. A pesar de sus diferencias en el origen del mantillo forestal, de la especie de *Quercus* y sus variables relacionadas (ubicación, altitud, época de colecta, características del mantillo). Además del tiempo de almacenamiento, insumos utilizados y método de preparación, ya que en el caso del producto del sitio 5, fue elaborado y manejado sin cuidados y contaba con cinco años de almacenamiento.

Esta tesis representa un acercamiento preliminar para explicar los procesos que rodean a los preparados MM y su potencialidad probiótica, al abonar conocimiento científico de los MM. Sin embargo, es necesario realizar más evaluaciones tanto *in vitro* como *in vivo*, con el fin de comprender en detalle los procesos bioquímicos y las dinámicas microbianas que rodean a los MM, y así confirmar su capacidad probiótica, su seguridad y beneficios potenciales.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas, Levaduras, *Lactobacillus*.

## ABSTRACT

Mountain microorganisms, MM henceforth, are called to the artisanal reproduction technique that uses communities of native microorganisms present in the forest litterfall, in order to be incorporated into farms with various functions, one of them as a supplement for livestock due to its potential benefits in productive and gastrointestinal parameters. The functionality of MM has been mainly documented in technical guides, but scientific evidence is lacking to understand its dynamics.

Probiotics are live microorganisms that, when supplied in appropriate amounts, confer a health benefit on the host. The main microorganisms identified and used as probiotics are lactic acid bacteria (LAB, henceforth). Within LAB, the genus *Lactobacillus* has been the focus of studies and the global market. Other microorganisms used as probiotics are *Saccharomyces* yeasts.

In Aguascalientes, the Sierra Fría Natural Conservation Area (SF NCA, henceforth) It contains 90% of the temperate and mountain forests of the state, has 13% of the 161 *Quercus* species in Mexico and 84% of the diversity of the state. *Q. potosina* is most frequently found, and *Q. sideroxylla* in third place. *Q. potosina* occurs at various altitudes, is smaller, has larger and more senescent leaves than *Q. sideroxylla*, a larger species, smaller leaves, of little senescence, and located at a higher altitude in the SF NCA

The general objective of this thesis was to characterize and evaluate the probiotic potential of mountain microorganisms reproduced in an artisanal way from the forest litterfall of *Quercus* spp. of the SF PNA. For this, four specific objectives were proposed: (1) to carry out the artisanal reproduction of MM from the forest mulch of *Quercus* spp. and the description of the products; (2) isolate and identify microorganisms from MM products by traditional and molecular methods; (3) evaluate the probiotic potential of the microorganisms obtained from the artisanal reproduction of MM; and (4) develop a guide with recommendations for the preparation of MM. The study was carried out between August 2019 and April 2021.

For objective 1, samples of forest litterfall were collected, two sites of *Q. potosina*, two of *Q. sideroxylla* and a fifth sample was included from an artisan preparation made in 2015 with litterfall of *Q. potosina*. The samples from each site were processed in the Laboratorio de Recursos Fitogenéticos at the Centro de Ciencias Agropecuarias of the Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA, henceforth). Solid-phase fermented products (MMS) were made with 30 days of anaerobic storage and from these, another liquid phase anaerobic fermentation (MMA) of one week of processing was prepared. Each product was monitored and its characteristics observed were described. The pH of the MMS was measured with different storage times between the preparations and weekly pH readings of the MMA were made for eight weeks. The pH monitoring showed that the products maintain stability in their solid and liquid phases and show similarities with the processes and characteristics of silage and fermented liquid feed for livestock.

In objective 2, the microorganisms of the five MMA products were isolated and identified by traditional methods (culture in nutritive, selective and differential media, stains and catalase test) and molecular (generic analysis by PCR) in the Laboratorio de Microbiología Sanitaria y Ambiental of the UAA. The microbiological analysis of the five sites showed similarities in the aerobic mesophilic quantities, with seven logarithmic units, also in the potential LAB, with eight logarithmic units moreover, yeasts with five to seven logarithmic units were presented. Potential enterobacteria were not detected at four sites and *Staphylococcus* were found at no site. A total of 16 BAL and eight yeasts were isolated from the five sites, of these 10 LAB and five yeasts were studied. By PCR analysis, five LAB isolates were identified as *Lactobacillus* and no yeast resulted from the genus *Saccharomyces*.

For objective 3, resistance tests were applied to acidic pH (2 and 4) and 0.3% of bile salts to evaluate the probiotic potential of the LAB and yeasts isolated from the 5 sites during objective 2. This probiotic potential analysis was carried out in the Laboratorio de Microbiología Sanitaria y Ambiental of the UAA. The LAB and isolated yeasts, showed in general a better behavior than the commercial probiotics used as control, with considerable resistance percentages and several with

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

significant differences after culturing at pH 2, 4 and 0.3% of bile salts for 24 hours, indicating certain Probiotic potential due to its *in vitro* tolerance to gastrointestinal tract conditions.

To meet objective 4, a guide was developed with recommendations for the preparation of MM from the bibliographic review, and the results and experiences acquired during the preparation of this thesis. The guide includes observations and practices for producers who already know the technique and seek to contribute to the improvement of existing materials and the preparation and responsible use of MM.

It is concluded that, although it is an artisan method, MM products can be achieved with stability and similarity in pH values, as well as in their microbial populations and with the presence of LAB and yeasts with probiotic potential. Despite the differences in the origin of the forest litterfall of the *Quercus* species and its related variables (location, altitude, collection time, characteristics of the litterfall), as well as storage time, inputs used, and preparation method, which in the case of the product from site 5, it was produced and handled carelessly and had five years of storage

This thesis represents a preliminary approach to explain the processes that surround MM preparations and their probiotic potential, by contributing to the scientific knowledge of MM. However, further evaluations, both *in vitro* and *in vivo*, are required to fully understand the biochemical processes and microbial dynamics surrounding MM, and thus confirm their probiotic ability, safety, and potential benefits.

Key words: Lactic acid bacteria, yeasts, *Lactobacillus*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se suministran en cantidades apropiadas confieren al huésped un beneficio para la salud (FAO y OMS, 2006). Los principales microorganismos identificados y aprovechados como probióticos son las bacterias ácido lácticas (BAL) (Srivastava et al., 2018) y dentro de estas el género *Lactobacillus*. Otros microorganismos aprovechados como probióticos son las levaduras *Saccharomyces*, las cuales han sido usadas por muchos años tanto en humanos como en ganado (Liong, 2011).

También denominados microorganismos de bosque, microorganismos nativos o microorganismos autóctonos, se les llama microorganismos de montaña (MM) a las colonias de hongos filamentosos, bacterias y levaduras benéficas que se encuentran en los ecosistemas de manera natural y que generan la descomposición de la materia orgánica (Suchini, 2012).

Su reproducción artesanal consiste en una técnica de bajo costo que no requiere de insumos ni equipo sofisticado, y que busca el aprovechamiento de las comunidades de microorganismos nativos de zonas boscosas, presentes en el mantillo forestal. Esta práctica de reproducir microorganismos artesanalmente se incorpora a las fincas bajo distintas prácticas de producción agropecuaria (Castro Barquero et al., 2015).

Entre los diferentes campos de aplicación de los MM por los productores agropecuarios, se destaca la inoculación de suelos y abonos, tratamiento de aguas residuales, desechos de ganado, control de olores, control de plagas y enfermedades en los cultivos y como tratamiento de enfermedades digestivas en animales (Rodríguez et al., 2018).

Existen algunos trabajos de investigación donde se ha valorado la eficiencia de la administración de los MM en la dieta del ganado, al evaluar parámetros productivos, reproductivos y gastrointestinales, como el de Barreto Argilagos et al., (2015) y Montejo et al., (2017).

El uso de los MM ha ido en aumento en los últimos años, fomentado por instituciones educativas, organizaciones gubernamentales, de la sociedad civil y consultores independientes de agricultura orgánica, quienes han documentado su eficacia, como ACTo et al., (2017), Guzñay, (2016) y Restrepo y Hensel, (2007). Sin embargo, al ser manejado desde una perspectiva muy artesanal, la documentación científica con la que se cuenta es limitada (Umaña et al., 2017). Por lo cual es

necesario establecer directrices y protocolos para la reproducción y manejo de los MM, así como conocer sus propiedades fisicoquímicas, identificar los microorganismos presentes tanto benéficos como potencialmente dañinos, y evaluar el potencial probiótico de estos productos elaborados artesanalmente.

Por ello, en el presente trabajo de tesis se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos:

### **1.1 HIPÓTESIS**

- Los microorganismos de montaña reproducidos artesanalmente a partir del mantillo forestal de *Quercus spp.* del ANP Sierra Fría, Aguascalientes, presentan potencial probiótico.
- Los productos artesanales MM elaborados con mantillo forestal de *Quercus spp.* presentan un pH estable y contienen bacterias ácido lácticas y levaduras con propiedades probióticas.

### **1.2 OBJETIVOS**

#### **1.2.1 Objetivo general**

Caracterizar y evaluar el potencial probiótico de microorganismos de montaña reproducidos artesanalmente a partir de mantillo forestal de *Quercus spp.* en Aguascalientes.

#### **1.2.2 Objetivos específicos**

1. Realizar la reproducción artesanal de MM a partir de mantillo forestal de *Quercus spp.* y la descripción de los productos.
2. Aislar e identificar microorganismos de los productos MM mediante métodos tradicionales y moleculares.
3. Evaluar el potencial probiótico de los microorganismos obtenidos de la reproducción artesanal de MM.
4. Desarrollar una guía con recomendaciones para la elaboración de los MM.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Microorganismos de montaña MM

Los denominados microorganismos de montaña MM, o microorganismos de bosque, son colonias de hongos filamentosos, bacterias y levaduras que se encuentran de manera natural en diferentes ecosistemas (Suchini, 2012). La técnica de reproducción artesanal de los MM genera un producto de bajo costo, que no requiere medios de crecimiento sofisticados, y que busca el aprovechamiento de la diversidad microbiana nativa de zonas boscosas, con el fin de incorporarse en las unidades de producción agrícola. Los usuarios de esta práctica mencionan que la mejor fuente de inóculo es el mantillo forestal de los bosques cercanos a las fincas, ya que presentan microorganismos adaptados a las condiciones de la zona (Castro Barquero et al., 2015; Campo et al., 2014; Restrepo y Hensel, 2007).

Algunos de los beneficios mencionados de los MM se presentan al incorporarse como inóculo para la descomposición de materia orgánica, al favorecer la fermentación de abonos, biopreparados y extractos naturales. Para recuperar la microbiota y fertilidad de los suelos, facilitar la disponibilidad de los nutrientes a las plantas, suprimir o controlar microorganismos que causan enfermedades en los cultivos, así como el control biológico de plagas (Suchini, 2012). Entre otros usos se encuentran el tratamiento de aguas residuales, los desechos del ganado, el control de olores, así como el tratamiento de enfermedades digestivas en animales (Rodríguez et al., 2018).

La eficiencia de los MM ha sido documentada principalmente en libros, guías técnicas y manuales. Como ejemplo se tienen los trabajos de ACTo et al., (2017), Guzñay, (2016), Restrepo y Hensel, (2007), Simón, (2016) y Suchini, (2012). También existen algunas tesis de licenciatura y maestría de universidades como la de Costa Rica y Nicaragua, donde se han evaluado parámetros productivos del ganado tras la incorporación de MM en sus dietas (Casco y González, 2017; Centeno, 2012; Chiari, 2015; López y Carballo, 2014). Sin embargo, aún se carece de un cuerpo de documentación científicamente caracterizada para entender lo que sucede con ellos. Así, es que surge la necesidad de diseñar experimentos con los cuales se puedan cuantificar las diferencias con respecto a los sistemas de control para entender sus dinámicas y mejorar su potencial de aplicabilidad (Umaña et al., 2017).

**2.1.1 Reproducción artesanal de MM**

Los MM se conservan en una fase sólida y se utilizan principalmente en una fase líquida. El proceso varía según las experiencias de los autores y productores agropecuarios, sin embargo, existen claras similitudes en cuanto a los insumos, su mezcla y almacenamiento. Los cuatro ingredientes básicos de cualquier preparado MM son: mantillo forestal, subproductos de gramíneas como salvado, semolina o pulidura, melaza o azúcar, y agua sin clorar (Tabla 1).

La reproducción o fermentación en fase sólida (MMS) consiste en la mezcla de estos cuatro ingredientes y su almacenamiento en capas compactadas dentro un recipiente hermético buscando la anaerobiosis como si se tratara de un forraje ensilado (Figura 1). El producto MMS resulta en un semillero o silo de microorganismos (Simón, 2016), el cual puede almacenarse de uno a dos años (ACTo et al., 2017).

Aproximadamente después de 30 días de almacenamiento anaeróbico, se procede a realizar la activación o fermentación en fase líquida (MMA). Para hacerlo se toma cierta cantidad de MMS y se coloca dentro de una tela en suspensión en agua sin clorar con melaza, piloncillo o azúcar, diluidos dentro de un recipiente hermético adaptado con una trampa de aire que permita la salida de gases y mantenga la anaerobiosis por aproximadamente una semana (Restrepo y Hensel, 2007). El resultado es una solución color ámbar con un olor a fermento agradable, los cuales son indicadores de buena calidad (Suchini, 2012).

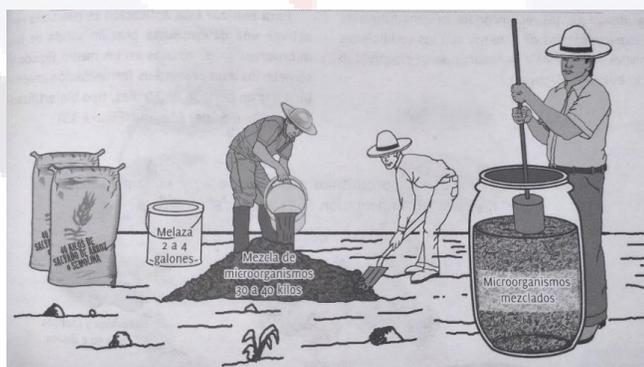


Figura 1 Ilustración del proceso de reproducción de MMS.

Fuente: (Restrepo y Hensel, 2007).

Tabla 1 Proporciones e ingredientes para la reproducción MMS y MMA según varios autores.

<b>Microorganismos de montaña sólidos MMS</b>				
	(Castro Barquero et al., 2015)	(Suchini, 2012)	(Restrepo y Hensel, 2007)	(ACTo et al., 2017)
<b>Mantillo (costal)<sup>1</sup></b>	2	1	1	2
<b>Salvado, semolina o afrecho (costal)</b>	1	1	2	1
<b>Melaza (litros)<sup>2</sup></b>	2	4	2 a 4	4
<b>Agua (litros)</b>	-	4	Prueba del puño. <sup>3</sup>	Prueba del puño.
<b>Tiempo (días)</b>	30	30	30	25 a 30
<b>Microorganismos de montaña líquidos o activados MMA</b>				
<b>MMS (kilogramos)</b>	0.4	8	5	8
<b>Agua (litros)</b>	8	190	175	180
<b>Melaza (litros)</b>	0.3	0.5	4	4
<b>Tiempo (días)</b>	12 o 16	4	5 a 10	15 a 20
<b>Observaciones en proceso e ingredientes</b>	Semolina de arroz.	Semolina de arroz, harina de maíz, sorgo, o yuca, salvado de trigo o arroz.	Salvado de trigo, 2 kg de polvo de roca en MMS.	Semolina de arroz o maíz molido, MMA aeróbico.
<b>Microorganismos de montaña sólidos MMS</b>				
	(CENTA, 2012)	(Guzñay, 2016)	(Simón, 2016)	(Paniagua, 2014)
<b>Mantillo (costal)</b>	3	3	1	3
<b>Salvado, semolina o afrecho (costal)</b>	2	2	1	2
<b>Melaza (litros)</b>	8	4	No específica	4
<b>Agua (litros)</b>	prueba del puño	prueba del puño	-	-
<b>Tiempo (días)</b>	15 a 20	30	30	30
<b>Microorganismos de montaña líquidos o activados MMA</b>				
<b>MMS (kilogramos)</b>	5.4	3.5 a 4.5	3 a 5	5
<b>Agua (litros)</b>	180	170	150	Completar recipiente 200 litros
<b>Melaza (litros)</b>	4	4 a 8	2	4
<b>Tiempo (días)</b>	5 a 15	15	4	4 a 15
<b>Observaciones en proceso e ingredientes</b>	Semolina de arroz, harina de maíz o sorgo	Salvado de arroz 2 kg de roca fosfórica en MMS, 1 a 2 kg de roca fosfórica y 225 gr de salvado en MMA	Salvado de trigo, arroz o cascarilla de arroz, MMA aeróbico, con 2 litros de leche y 5 kg de polvo de roca	Pulidura de arroz

<sup>1</sup> La unidad de un costal se consideró entre 40 y 50 kg.

<sup>2</sup> En las recetas indicadas con galones la unidad definió en 4 litros.

<sup>3</sup> La prueba del puño consiste en humedecer hasta que apenas suelte una gota al apretarse con la mano.

### ***2.1.2 MM como potencial probiótico para consumo animal***

Entre los trabajos de investigación donde se ha documentado y evaluado la suplementación de MM en la dieta del ganado, al medir parámetros productivos, reproductivos y gastrointestinales se encuentra el de Montejo et al., (2017), donde se mostró un incremento en la ganancia diaria de peso en cerdos en distintas etapas de desarrollo y la disminución en el periodo de engorda, lo que resultó en un incremento en los ingresos. Así mismo, Barreto Argilagos et al., (2015) presentan el tratamiento de colibacilosis neonatal en lechones con una recuperación del 90% de los individuos, describiéndola como una opción terapéutica factible y accesible para los productores. Rodríguez et al., (2018) describen un distinto uso de los MM por un grupo de productores agropecuarios en Cuba, quienes los aprovechan en sus fincas como biofertilizante de sus cultivos, higienización de corrales y como suplemento para tratamiento de enfermedades en el ganado.

### ***2.1.3 MM como probiótico para consumo humano***

No se han encontrado trabajos experimentales, artículos de revisión u otros materiales informativos sobre el uso de MM para consumo humano. Sin embargo, diversas plataformas digitales ofrecen recomendaciones, preparaciones y formas de aprovechamiento mediante cursos, diplomados y seminarios. Algunos de ellos son impartidos por divulgadores de agricultura orgánica y regenerativa con reconocimiento internacional, entre ellos Ignacio Simón Zamora (Gaia Orgánicos, 2019) y Jairo Restrepo Rivera (La Mierda de Vaca, 2019).

## **2.2 Mantillo forestal**

El mantillo forestal consiste en hojas, ramas pequeñas, flores, inflorescencias, frutos y otras estructuras vegetales. Las hojas son las que comprenden la mayor parte de la producción anual de material vegetal e ingreso de nutrientes en los suelos forestales (Pérez-Suárez et al., 2009).

En este manto que reviste la parte inferior de los bosques, están presentes millones de microorganismos que se conforman de una gran cantidad de grupos funcionales de bacterias,

actinomicetos, hongos, algas y protozoarios (Restrepo y Hensel, 2007). Ejerce un control importante sobre la transferencia e intercambio de agua y nutrientes entre la atmósfera, el dosel y el suelo dentro de los ecosistemas forestales. Así, la presencia de parches de vegetación contribuye a la gran variabilidad espacio temporal de los procesos hidrológicos y del ciclo de nutrientes en los ecosistemas forestales (Pérez-Suárez, 2009).

Características climáticas como la temperatura, precipitación y variaciones estacionales pueden influenciar la existencia de microorganismos en la fauna del suelo que afectan significativamente la velocidad de descomposición. La diversidad del mantillo forestal también tiene influencia en la actividad de las comunidades microbianas del suelo y los procesos de descomposición (Krishna y Mohan, 2017).

La diversidad biológica en la comunidad microbiana del suelo es muy alta. En solo 1 m<sup>2</sup> de un suelo se estima que pudieran existir de 1,000 a 5,000 especies de bacterias y 100 especies dominantes de hongos. Esta gran diversidad en un suelo orgánico crea un potencial muy alto para la inoculación del nuevo sustrato como la hojarasca, estimándose una presencia de 10<sup>9</sup> g<sup>-1</sup> de bacterias activas o en estado de reposo (Berg y McLaugherty, 2008). Entre la microfauna del suelo, los hongos son los principales descomponedores, presentan más de un 75% del potencial de reducción de materia orgánica que otros microorganismos, y varía su actividad según la época del año. Los hongos y las bacterias del mantillo son una parte significativa del proceso de descomposición, y corresponden a un valor de entre 25 y 30% de la biomasa microbiana total del suelo (Krishna y Mohan, 2017).

### **2.3 El género *Quercus***

El género *Quercus*, llamados comúnmente encinos y robles, es uno de los géneros más importantes de plantas leñosas presentes en el hemisferio norte. En México existen de 150 a 200 especies distribuidas en todos los estados, excepto Quintana Roo y Yucatán (Mendoza, 2000). Algunos autores indican que la mayor concentración de especies de encinos en el continente americano y tal vez en el mundo, se encuentra en la porción central y sur de México (Zavala, 1990; Nixon, 1993). Se caracterizan por tener como hábitat zonas montañosas. Se localizan principalmente entre los 1200 y 2800 msnm, y su distribución puede llegar hasta los 3,100 msnm. Junto con los pinares

constituyen la mayor proporción de la cubierta vegetal de áreas de clima templado y semihúmedo, además se presentan en regiones de clima caliente, húmedo y semiárido. Los encinares se distribuyen como masas puras o principalmente mezclados con diversas especies de pinos, así como con *Cupressus* o *Juniperus* (de la Cerda, 1999).

Una de las características fisiológicas relevantes del género *Quercus* es el patrón de duración de las hojas. Existen encinos perennifolios con sustitución paulatina de follaje, y caducifolios, los cuales pierden todas sus hojas en la estación de sequía (Arizaga et al., 2009). En su aprovechamiento además de la alta calidad de la madera, los encinos son un recurso importante para las comunidades rurales, ya que son ampliamente utilizados por sus usos no leñosos como medicina, alimento, forraje para el ganado, obtención de taninos y colorantes (Luna et al., 2003).

#### **2.4 Contexto forestal en Aguascalientes**

El estado de Aguascalientes se localiza en la parte central de la República Mexicana, su territorio presenta altitudes de los 1,540 msnm hasta los 3,050 msnm. Se ubica dentro de tres provincias fisiográficas distintas, la Sierra Madre Occidental, Mesa del Centro y Eje Neovolcánico. Se presentan ocho formaciones forestales en cinco ecosistemas, bosque de coníferas, bosque mixto y bosque de latifoliadas, selvas bajas, zonas semiáridas, áridas y las denominadas otras áreas forestales. Además de una importante extensión de áreas no forestales con desarrollo de actividades agropecuarias. El 52.5% del estado contiene alguna formación forestal, todos los municipios contienen al menos cuatro formaciones, sin embargo, en el municipio de San José de Gracia donde se encuentra la mayor superficie del ANP Sierra Fría se encuentran todas las 8 formaciones forestales (SEMARNAT y CONAFOR, 2014).

#### **2.5 Área Natural Protegida Sierra Fría**

Su protección fue decretada el 30 de enero de 1994, el Área Natural Protegida ANP Sierra Fría se ubica al noroeste del estado de Aguascalientes, con una superficie de 112,090 ha distribuida entre los municipios de San José de Gracia, Pabellón de Arteaga, Rincón de Romos, Calvillo y Jesús María. Es una región montañosa con altitudes que van de los 2,200 a 3,050 msnm, que presenta

precipitaciones entre los 600 y los 700 mm anuales. Contiene 90% de los bosques templados y de montaña del estado, y uno de sus servicios ecosistémicos de mayor relevancia es la recarga de los mantos acuíferos del valle de Aguascalientes. Presenta una gran diversidad biológica debido a su diversidad ambiental, es una región montañosa constituida por serranías, valles, mesetas y cañadas, con una importante variedad de zonas ecológicas y tipos de vegetación, así como con cantidades importantes de géneros y especies de flora y fauna (Sosa Ramírez et al., 2014).

#### **2.5.1 Especies del género *Quercus* en el ANP Sierra Fría**

El ANP Sierra Fría cuenta con 13% de las 161 especies de *Quercus* de México y 84% de la riqueza de encinos de Aguascalientes, donde se encuentran 21 de las 25 especies del estado. Se presenta con mayor frecuencia *Q. potosina* y en orden descendiente *Q. eduardii*, *Q. sideroxylla*, *Q. grisea* y *Q. rugosa*, y es posible encontrarlas en un amplio rango altitudinal y de tipos de vegetación. La presencia de las especies de encinos está ligada a condiciones particulares de altitud y tipo de vegetación, al igual que a factores de humedad, tipo de suelos, o exposición solar (Sosa Ramírez et al., 2014; Martínez-Calderón et al., 2017).

##### **2.5.1.1 *Quercus potosina* Trel.**

Se trata de un árbol de 3 a 7 m de alto con copa redondeada, tronco corto de 15 a 30 cm de grueso con corteza gris escamosa, a veces es un arbusto de 2 a 3 m de alto, florece en mayo y fructifica en el mes de septiembre (de la Cerda, 1999). En Aguascalientes se encuentra en los municipios de Aguascalientes, Asientos, Calvillo, Cosío, El Llano, Jesús María, San José de Gracia y Tepezalá en bosque de encino, pino-encino, bosque de junípero y matorral templado y subtropical de 1890 a 2900 m. Se asocia usualmente con *Q. laeta* y *Q. eduardii*. Se puede identificar por el gran número de tricomas glandulares rojos en las hojas jóvenes, a menudo crece en forma de colonia clonal (Martínez et al., 2017). Es una especie caducifolia, su caída ocurre en un evento principal, la mayor senescencia de las hojas en los meses de marzo y abril, con un volumen de concentración de hojarasca de  $4869 \pm 510$  kg/ha en poblaciones monoespecíficas (Pérez-Suárez et al., 2009).

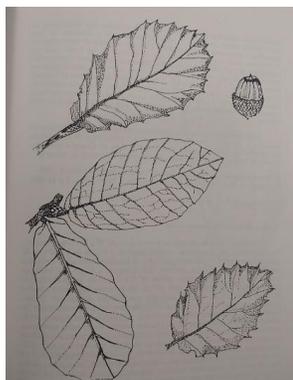


Figura 2 Ilustración de la hoja de *Q. potosina*.

Fuente: (de la Cerda, 1999).

**2.5.1.2 *Quercus sideroxylo* Humb. & Bonpl.**

Árbol de 6 a 15 m de alto, florece de junio a agosto y fructifica de noviembre a enero. En Aguascalientes se encuentra en los municipios de Calvillo, Jesús María y San José de Gracia en bosques de encino, pino-encino, encino-junípero, en pendientes húmedas de 2300 a 2867 m (Martínez-Calderón et al., 2017; Sabás, 2011).

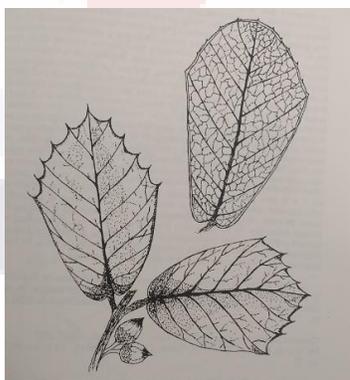


Figura 3 Ilustración de la hoja de *Q. sideroxylo*.

Fuente: (de la Cerda, 1999).

## 2.6 Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas generan efectos benéficos a la salud del huésped (FAO, 2006). Desde hace miles de años, la humanidad ha consumido alimentos que contienen probióticos, principalmente bacterias ácido lácticas y algunas levaduras, en alimentos como pan, queso, leche y otras bebidas fermentadas (Reyes y Rodríguez, 2012). En el mercado global actual los probióticos se encuentran principalmente en tres categorías principales: alimentos, suplementos alimenticios y farmacéuticos (Sanders et al., 2018).

### 2.6.1 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL, principales microorganismos identificados y aprovechados como probióticos, son un grupo de bacterias Gram-positivas, anaerobias o facultativas, cocos o bacilos, no formadoras de esporas, que generan ácido láctico como uno de sus productos principales de fermentación de carbohidratos (Srivastava et al., 2018). Predominan en el medio ambiente en fermentaciones espontáneas de materia orgánica de origen vegetal o animal. En las hojas de las plantas, las BAL se encuentran en cantidades de  $10^1$  a  $10^3$  por gramo, lo que corresponde a no más del 0.01% al 1% de la microflora total (Teuber, 2008). Dentro de las BAL, los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han sido el foco de estudios en la investigación sobre el papel de los probióticos en el mantenimiento de una buena salud intestinal, ya que son generalmente un indicador de un sistema digestivo sano (Liong, 2011).

#### 2.6.1.1 *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* es el más grande y más diverso género de las BAL, el cual incluye más de 200 especies. La distribución ambiental de las especies de *Lactobacillus* es altamente variable, con una extraordinaria diversidad genómica y metabólica dentro del género. Estos rasgos les permiten adaptarse y sobrevivir en ambientes diversos (Martino et al., 2016). Los lactobacilos presentan requerimientos nutricionales complejos, se encuentran y asocian en distintos medios, desde el cuerpo humano, en la cavidad oral, tracto intestinal y vagina, hasta plantas y material vegetal. Así

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

como en el suelo, agua, estiércol, aguas residuales, alimentos fermentados y en descomposición, así como en productos de cereales y ensilaje (Stiles y Holzapfel, 1997). Morfológicamente son microorganismos en forma de varilla, o bien con forma circular, a los cuales se les llama cocobacilos. Son fermentativos, microaerófilos y quimioorganotróficos (Liong, 2011).

Los lactobacilos crecen bajo condiciones anaeróbicas o bajo una reducida tensión de oxígeno en todos los hábitats que les provean diversidad de carbohidratos, productos de descomposición de proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas. Su rango de temperatura es mesofílico a ligeramente termofílico. En general son acidúricos o acidofílicos y disminuyen el pH de los sustratos por debajo de 4.0 a causa del ácido láctico producido, lo cual previene o disminuye drásticamente el desarrollo de competidores, a excepción de otras BAL y levaduras (Whitman, 2009).

Los lactobacilos se presentan en la naturaleza en bajas cantidades en todas las superficies de las plantas, pero en conjunto con otras BAL, se desarrollan ampliamente en material vegetal en descomposición, especialmente frutas. Por lo tanto, los lactobacilos son importantes para la producción, así como para la descomposición de los alimentos vegetales fermentados como chucrut, kimchi, aceitunas, pepinillos, así como cerveza, vino y jugos. Los lactobacilos son organismos extremadamente fastidiosos, están adaptados a sustratos orgánicos complejos y necesitan de aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o éteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Los requerimientos nutricionales son característicos para cada especie y a menudo por cepa (Whitman, 2009).

### **2.6.2 Levaduras**

Las levaduras son hongos unicelulares, facultativas, con desarrollo en condiciones aerobias y anaerobias, la mayoría son mesófilas y su pH de crecimiento se encuentra entre 4.5 y 6.5, aunque algunas especies crecen a 3 y 8. Su reproducción puede ser asexual o sexual. Presentan formas y dimensiones celulares diversas, al depender de factores como su edad y sustrato en el que estén presentes. Se encuentran en hábitats ricos en carbohidratos simples, ambientes húmedos o líquidos, ácidos o alcalinos (Herrera, 2008).

### **2.6.2.1 *Saccharomyces***

Las levaduras del género *Saccharomyces* han sido usadas por muchos años tanto en humanos como en ganado (Gaggia et al., 2010) Su reproducción vegetativa es por gemación multilateral. Las células son globosas, elipsoidales o cilíndricas (Vaughan-Martini y Martini, 2011).

*S. cerevisiae* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y puede ser encontrada en plantas, frutas y suelo, es incluida en alimentos y bebidas por su papel clave en procesos de fermentación (Gaggia et al., 2010). *S. cerevisiae* y *S. cerevisiae* var. *boulardii* son las únicas levaduras comercializadas para consumo humano (Liong, 2011). En el caso de *S. boulardii*, es usada como probiótico en ganado rumiante y porcino (Gaggia et al., 2010). *S. cerevisiae* posee el estatus GRAS Generally Recognized as Safe por la FDA, por su parte la Unión Europea ha aprobado cinco cepas para uso animal (Büchl et al., 2010).

### **2.6.3 Efectos de los probióticos en la salud**

Existe una variedad de propuestos beneficios a la salud por los probióticos. Entre los síntomas que se han reportado como tratados o tienen el potencial para ser tratados con probióticos se incluyen: diarrea, gastroenteritis, síndrome del colon irritable, enfermedad inflamatoria del colon, cáncer, depresión del sistema inmune, digestión inadecuada de la lactasa, alergias infantiles, hiperlipidemia, enfermedades hepáticas y otros (Parvez et al., 2006).

Los probióticos pueden tener beneficios de largo alcance, esto es posible debido a la diversidad de actividades probióticas que pudieran evocar un beneficio fisiológico. Algunos de los mecanismos de acción que se han descubierto sobre diversas cepas de probióticos incluyen la modulación del sistema inmune, interacciones con la microbiota intestinal del hospedero, producción de ácidos orgánicos, exclusión competitiva, mejora en la función de barrera, producción de moléculas pequeñas con efectos sistémicos y producción de enzimas (Sanders et al., 2018). En la Tabla 2 se muestran varios probióticos y sus efectos en la salud.

Para que los probióticos ejerzan sus efectos benéficos deben ser capaces de sobrevivir dentro del tracto gastrointestinal y mantenerse en cantidades suficientes. La dosis general que se ha observado

para la administración de probióticos de forma oral es superior a las 10<sup>9</sup> UFC/día. La mayoría ejercen beneficios tras su adherencia a las células intestinales, por eso se ha recomendado su consumo diario, ya que las células son constantemente eliminadas del tracto digestivo a través de las heces, por cambios fisiológicos, o por consumo de antibióticos (Liong, 2011).

Tabla 2 Probióticos y sus efectos estudiados en la salud humana y animal.

Fuente: (Parvez et al., 2006).

Probiótico	Efectos asociados
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Reducción en la incidencia de enterocolitis neonatal necrotizante
<i>Enterococcus faecium</i>	Disminución en la duración de diarrea aguda por gastroenteritis
<i>Lactobacillus</i>	Mejora en pouchitis tras la administración de varias cepas. Mejora en la digestión de lactosa, disminución en la diarrea y síntomas en individuos con intolerancia, síndrome de intestino corto y niños con diarrea Terapia de eliminación de patógenos en conjunto con antibióticos Mejora en la función inmune de la mucosa, secreción de mucina y prevención de enfermedades
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Disminución significativa en la diarrea de pacientes que recibían irradiación pélvica Pólipos disminuidos, adenomas y cáncer de colon en animales experimentales Prevención en la infección urogenital ante la exposición a patógenos Disminución en los niveles de colesterol sérico
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Reducción en la incidencia de diarrea en niños de guarderías Reducción de la inflamación en intestino inflamatorio en niños y ratas Disminución del dolor y estreñimiento en síndrome de colon irritable Reducción de la hinchazón, flatulencia y dolor en síndrome de colon irritable Efecto positivo en la inmunidad de niños VIH+
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Acortamiento en la duración de gastroenteritis aguda Acortamiento de diarrea aguda
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Mejoramiento en la inmunidad celular en adultos sanos
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Supresión y erradicación de <i>Helicobacter pylori</i> en cultivo de tejidos y modelos animales
<i>Bacteroides spp.</i>	Efectos en colitis crónica, gastritis y artritis
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Reducción en la recurrencia de diarrea por <i>Clostridium difficile</i> Efectos en <i>C. difficile</i> y <i>Klebisella oxytoca</i> y la disminución en el riesgo y acortamiento de la duración de diarrea asociada a antibióticos Reducción en la duración de gastroenteritis aguda Disminución en la diarrea funcional

#### **2.6.4 Condiciones para la definición, aprovechamiento y comercialización de los probióticos**

A raíz una consulta mixta de expertos de la FAO y la OMS sobre la evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos, se elaboró un informe con la finalidad de generar directrices para la declaración, evaluación e incorporación los probióticos en los alimentos (FAO, 2006). A continuación, se resumen los ejes principales.

- a. Identificación a nivel de género, especie y cepa mediante ensayos fenotípicos y genéticos.
- b. Ensayos in vitro: acidez gástrica, sales biliares, adherencia a mucosas y/o células epiteliales, actividad antimicrobiana ante patógenos, reducción de la adhesión de patógenos, actividad hidrolasa de sales biliares.
- c. Inocuidad: patrones de resistencia a antibióticos, evaluación de actividades metabólicas y efectos colaterales en humanos, supervisión epidemiológica, actividad hemolítica.
- d. Estudios in vivo: modelos animales previo a ensayos en humanos
- e. Declaraciones de propiedades saludables específicas, con evidencia científica que las respalde y etiquetado claro con su identificación taxonómica, número viable, cantidad sugerida de consumo, condiciones de almacenamiento y datos de contacto.

La viabilidad y supervivencia de los probióticos son unos de los parámetros más importantes a fin de generar funciones terapéuticas, debido a esto, la resistencia al tránsito gástrico constituye un criterio de selección relevante. Al ingerirse, el estrés celular de los microorganismos comienza en el estómago, con pH de hasta 1.5, posteriormente, la bilis secretada en el intestino delgado reduce la supervivencia al destruir la membrana celular. Por lo tanto, los probióticos deben de cumplir con varios criterios como la tolerancia al ácido y sales biliares. Así, la primera herramienta en la selección de un probiótico de interés se representa en métodos in vitro dirigidos a asegurar la habilidad de supervivencia a través del tracto gastro intestinal superior y llegar vivo al sitio de acción (Succi, y otros, 2005).

Las técnicas tradicionales de identificación microbiana se basan en el estudio de las características fenotípicas y fisiológicas de los microorganismos. Primero se comienza con un análisis morfológico

de las colonias aisladas e incubadas en medios sólidos, continuando con su examen microscópico de un frotis teñido con la técnica de Gram, para continuar con pruebas bioquímicas como: sistemas indicadores de pH, formación o degradación de ciertas sustancias y actividades enzimáticas (Nieto et al., 2004). Estos métodos fenotípicos son menos discriminatorios que los métodos genotípicos o moleculares ya que la expresión de los caracteres fenotípicos resulta de la interacción del genotipo con el ambiente y pueden presentarse modificaciones cuando cambian las condiciones ambientales (Narváez et al., 2005).

En los últimos años ha aumentado de manera importante el desarrollo y aplicación de técnicas moleculares para la identificación de microorganismos. Los sistemas genéricos son usados para monitorear las dinámicas de las BAL en los procesos de fermentación y productos alimenticios, mientras que los específicos tienen el potencial de determinar el comportamiento de las bacterias probióticas en estos sistemas, así como en el tracto intestinal del consumidor. La mayoría de las herramientas moleculares se basan en secuencias de ADN ribosómico 16S, metodologías más robustas y superiores que los métodos tradicionales basados en acercamiento fenotípicos (Ben Amor et al., 2007).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es un método rápido con el que se detectan y amplifican fragmentos específicos de ADN. La polimerasa es una enzima que sintetiza las cadenas de ADN complementarias a cadenas sencillas. Para esto necesita pequeñas secuencias de ADN llamados *primers* que tienen que ser complementarios de los extremos de la secuencia a ampliar. Este método consta de tres pasos que se repiten cierta cantidad de ciclos: separación del ADN, unión de *primers* a las cadenas sencillas y síntesis de cadena complementaria de ADN a partir de los *primers*. El análisis cualitativo de ADN mediante PCR permite detectar si hay presencia o ausencia de ciertas secuencias de ADN en una muestra, como alguna secuencia característica de algún organismo (Gonzalez Rumayor et al., 2005).

#### **2.6.5 Legislación y normatividad de los probióticos**

Se ha dado un progreso significativo en la legislación para la evaluación de la seguridad de los probióticos en Europa, Estados Unidos y Canadá, sin embargo, no existe un estándar internacional.

En Estados Unidos, los microorganismos utilizados para el consumo humano deben tener el estatus GRAS, el cual es regulado por la FDA en Europa la European Food Safety Authority EFSA cuenta con el concepto Qualified Presumption of Safety QPS, este provee un sistema de evaluación genérico que puede ser aplicado a las solicitudes de evaluación de seguridad de los microorganismos (Gaggia et al., 2010).

En México no existe una norma específica para probióticos, por lo que las empresas que generan estos productos se tienen que basar en lineamientos internacionales y en las Normas Oficiales Mexicanas NOM que más se apegan a los requerimientos de calidad, inocuidad y correcta presentación de la información de los productos. Entre ellos la NOM-243-SSA1-2010 de productos y servicios; leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos; disposiciones y especificaciones sanitarias; métodos de prueba; la NOM 051-SCFI/SSA1-2010, de especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria (Yakult, 2015). Por otro lado, algunos trabajos sobre bebidas con potencial probiótico se han basado en la NOM-181-SCFI-2010 de yogurt-denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba (Velázquez-López et al., 2018).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 ELABORACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS PREPARADOS MM.

##### 3.1.1 Colecta de mantillo forestal

Se seleccionaron cuatro sitios (1 a 4) dentro de la ANP Sierra Fría, en el municipio de San José de Gracia, Aguascalientes, México (Figuras 4 y 5). Se eligieron dos rangos de altitudes distintas en las que predominaran las especies *Q. sideroxylla* y *Q. potosina*. Los sitios de colecta de *Q. sideroxylla* se realizaron en el terreno ejidal Monte Grande, al norte de la ANP, (Figura 6) y de *Q. potosina* en la zona Las Mesas en dos predios privados (Figura 7).

Adicionalmente, se utilizó un preparado MMS previamente procesado en septiembre de 2015, el cual se usó como referencia puesto que no fue realizado bajo los mismos estándares de este trabajo de investigación. El mantillo forestal de este sitio (5), correspondiente a *Q. potosina*, fue colectado en el área de conservación Arroyo Seco, el cual pertenece al Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, y se encuentra a 3km de los límites del polígono de la ANP.

La recolección del mantillo forestal de los sitios seleccionados se realizó en el mes de octubre de 2019, posterior a la caída de la hojarasca para *Q. potosina* (especie caducifolia) y al final del periodo de lluvias (Pérez-Suárez et al., 2009; INEGI, 1994).

Se ubicaron los sitios con mayor densidad y acumulación de mantillo para cada especie de *Quercus*. Para la recolección se descartó la capa más superficial del mantillo compuesta por hojas sin indicios de descomposición y se colectó material vegetal hasta antes del suelo visible. Si la profundidad del mantillo era poca, el punto de recolección fue extendido gradualmente de forma radial. Las colectas fueron de aproximadamente 1.5 kg de material vegetal, estas se tomaron manualmente y se depositaron en bolsas plásticas previamente etiquetadas. Los sitios fueron geoposicionados con GPS y las muestras colectadas se transportaron en una mochila a temperatura ambiente.

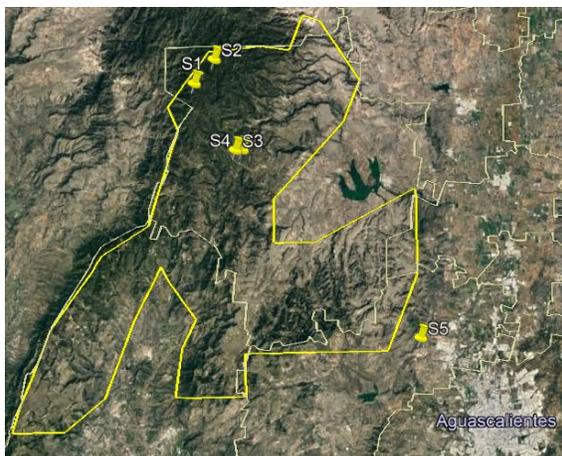


Figura 4 Área que conforma la ANP Sierra Fría y ubicación de los sitios de colecta.

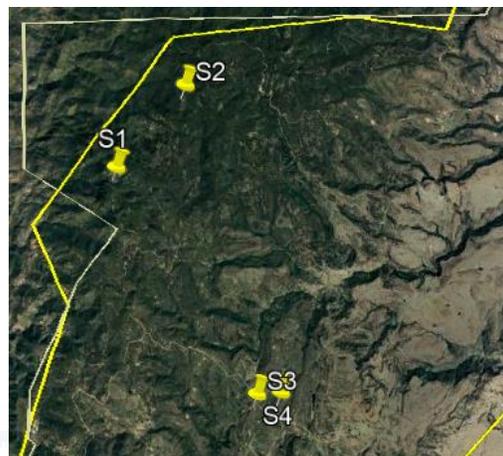


Figura 5 Detalle del geoposicionamiento de los sitios de colecta dentro del ANP.



Figura 6 Sitio de colecta 1, *Q. sideroxylla*.



Figura 7 Sitio de colecta 4, *Q. potosina*.

### **3.1.2 Reproducción de MM**

Para el método de reproducción de MM se tomaron en cuenta los trabajos de Restrepo y Hensel, (2007), Suchini, (2012), Castro Barquero et al., (2015), Paniagua, (2014) y Simón, (2016), sintetizados en la Tabla 1, a los cuales se aplicaron algunos ajustes.

#### **3.1.2.1 Reproducción de MM en fase sólida o MMS**

La reproducción MMS se realizó en el Laboratorio de Semillas y Recursos Fitogenéticos del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Las muestras de los sitios 1 y 2 se procesaron para iniciar la reproducción al día siguiente de su colecta, mientras tanto se mantuvieron en el laboratorio a temperatura ambiente. Las muestras de los sitios 3 y 4 se procesaron el mismo día de su recolección.

El preparado original de MMS del sitio 5, elaborado en septiembre de 2015 se encontraba almacenado en un recipiente plástico de 120 litros con tapa hermética. Estaba compuesto por una relación de salvado y mantillo forestal de 2:1, a diferencia de las preparaciones nuevas cuya relación fue de 1:1. Fue preparado con melaza y agua de lluvia, mezclado al aire libre sobre una lona plástica, con ayuda de herramientas de jardinería, de manera completamente artesanal.

El procesamiento de muestras consistió en diluir por hervor 250 gr de piloncillo en 500 ml de agua purificada, se eliminaron las impurezas mayores a 1 mm con una coladera plástica y se dejó enfriar a 26 °C en un vaso de precipitado cubierto con papel aluminio. Posterior a ello, se vertieron 500 ml de la solución en un recipiente plástico con 500 gr de salvado de trigo, se mezcló manualmente hasta que se humedeció de forma homogénea, y por último se incorporaron y se mezclaron 500 gr de mantillo forestal (Figura 8). La mezcla resultante se colocó en capas de alrededor de 2 cm de grosor dentro de frascos de vidrio de un galón con boca de cuatro pulgadas y tapa plástica con rosca. Las capas se compactaron manualmente para desplazar la mayor cantidad de aire de la mezcla, se taparon y se dejaron a temperatura ambiente por 30 días (Figura 9). Para la preparación y manipulación de cada uno de los preparados MM se utilizaron guantes de nuevos de nitrilo o látex. Todos los recipientes fueron previamente lavados con agua y jabón, y limpiados con alcohol isopropílico al 90%, y enjuagados con agua purificada.



Figura 8 Mantillo forestal y salvado humedecido con piloncillo previo a su mezcla.



Figura 9 MMS al momento de su preparación

### **3.1.2.2 Reproducción de MM en fase líquida o microorganismos de montaña activados (MMA)**

Transcurridos al menos 30 días de almacenamiento anaeróbico de los MMS, se tomaron 100 gr del producto y se colocaron dentro de bolsas de malla de poliéster, sujetadas con una liga de látex (Figura 10). Las bolsas se depositaron en suspensión en frascos de vidrio de un galón con 475 ml de solución de piloncillo y 525 ml de agua purificada. Se taparon los frascos y los MMS fueron compactados nuevamente. Para la solución de piloncillo se diluyeron 250 gr en 350 ml de agua purificada. Al concluir el hervor se eliminaron las impurezas mayores a 1 mm con una coladera plástica y se dejó enfriar a 26 °C en un vaso de precipitado cubierto con papel aluminio. La tapa de cada frasco de vidrio fue adaptada con una trampa de aire para expulsar los gases producto de la fermentación sin permitir la entrada de oxígeno. Para esto se realizaron perforaciones de ½ pulgada y se ajustaron empaques de silicón de grado alimenticio de 12 mm (Figura 11). Para el sitio 5 se tomó una muestra de MMS en aproximadamente una pulgada de profundidad por debajo de la superficie, donde presentó coloración, humedad y otras características similares a cuando se preparó en 2015.



Figura 10 Detalle de la bolsa de poliéster con los MMS.

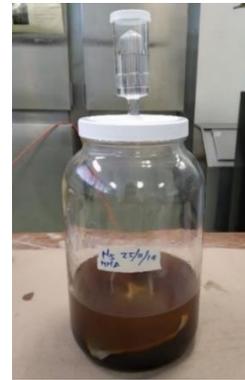


Figura 11 MMA al momento de su preparación

### **3.1.2.3 Lecturas de pH de los preparados MM**

Se realizaron lecturas semanales de pH de los MMA con al menos una semana de preparación. Las lecturas se realizaron por triplicado con un potenciómetro OAKTON® 510. Además, se midió el pH de los MMS con al menos 30 días de almacenamiento y del preparado con 5 años de almacenamiento. Para ello se utilizó el método para la determinación del pH en ensilaje de (Rico-Oliveros, 2002). Se tomaron 5 gr de MMS, y se dejaron secar por 24 horas a temperatura ambiente extendidos sobre charolas plásticas; por último, las muestras secas fueron colocadas en frascos con 25 ml de agua destilada y mantenidas en agitación durante 20 minutos.

## **3.2 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO**

### **3.2.1 Identificación tradicional**

#### **3.2.1.1 Cultivo en medios nutritivos, selectivos y diferenciales**

Se tomaron muestras de los productos MMA de cada uno de los sitios con al menos una semana de preparación para lo cual se usaron pipetas serológicas estériles. Las muestras se colocaron en tubos Falcon estériles, y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su cultivo siguiendo las

especificaciones de la NOM-109-SSA1-1994 para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis.

Para el cultivo y desarrollo de BAL se usó agar MRS. Para mesófilos aerobios se usó agar soya, tripticaseína AST. Para levaduras se empleó AST suplementado con 10 mg de estreptomicina y 10,000 unidades de penicilina en NaCl al 0.9%. Para enterobacterias se utilizó agar MacConkey y para estafilococos se usó Sal y Manitol.

Se trabajaron diluciones seriadas  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  y  $50 \times 10^3$  para MRS y AST, y  $1 \times 10^3$  para McConkey y Sal y Manitol. Como diluyente, se utilizó agua peptonada al 0.1%. Se sembraron por triplicado alícuotas de 100  $\mu$ l mediante dispersión en placa con una varilla de vidrio acodada para incubarse a 37°C durante 48 h.

#### ***3.2.1.2 Conteo y descripción de colonias***

Después de 48 horas de incubación, se realizó el conteo de UFC/ml y se describieron las colonias con macromorfología diferente y se elaboraron frotis, tinción simple de las colonias desarrolladas en AST suplementado con antibiótico, y tinción de Gram para MRS, McConkey y Sal y Manitol.

Las tinciones se observaron al microscopio y se describió su morfología celular. Para las levaduras se usaron las clasificaciones descritas por Yarrow, (1998) y Kirk et al., (2008). Una vez descritas, las colonias de bacterias Gram positivas y las levaduras se aislaron en tubos de ensaye con caldo AST y MRS, se incubaron a 37°C durante 48 horas y se mantuvieron en refrigeración a  $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### ***3.2.1.3 Tinción de esporas y prueba de catalasa para identificación de BAL***

A las colonias aisladas en caldo MRS, identificadas como bacterias Gram positivas, se les llevó a cabo la tinción de Schaeffer Fulton para la tinción específica de spora bacteriana, realizada con cinco minutos de coloración a emisión de vapores con verde malaquita y contratinción con safranina. Para la prueba de catalasa se vaciaron en cavidades de microplaca 30  $\mu$ l de cultivo bacteriano

previamente agitado, en 100 µl de peróxido de hidrógeno al 3%. La prueba es positiva si reacciona con presencia de burbujas. Como control positivo se utilizó *S. aureus*.

#### **3.2.1.4 Conservación de aislados**

Una vez realizada la descripción de la morfología colonial y celular de las levaduras y BAL, así como las tinciones y prueba de catalasa de las BAL, se conservaron mediante siembra por picadura en tubos de ensayo con PDA para las levaduras y agar MRS para las BAL. Las muestras de aislados fueron incubadas a 37°C durante al menos 24 horas y posteriormente almacenadas en refrigeración a 4°C ± 2°C.

#### **3.2.2 Identificación molecular**

Para identificación de aislados de BAL y levaduras pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Saccharomyces*, se aplicó la técnica PCR basada en el protocolo reportado por Dubernet et al., (2002) el cual consiste en la amplificación de la Secuencia Intergénica Ribosomal (ITS) 16S/23S de *Lactobacillus*. Para *Saccharomyces* se usó el método descrito por Sharpe et al., (2014), el cual identifica el gen HSP30 (YCR021C). Como controles positivos se aislaron *Lactobacillus rhamnosus* GG a partir del probiótico comercial Vivere®; *Saccharomyces cerevisiae* de levadura para panificación, y *S. boulardii* del probiótico comercial Flos-Pro®, el cual se usó para evaluaciones del potencial probiótico. Como control negativo se empleó un aislado de *Escherichia coli*, donado por el Departamento de Microbiología de la UAA.

##### **3.2.2.1 Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN, los aislados de los MMA de los cinco sitios y los controles positivos fueron cultivados en caldo ICC durante 24 horas a 37°C. Se centrifugaron 1.5 ml de los cultivos a 10,000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante se descartó y las células se lavaron con PBS (pH 7.2), a las que se les añadieron 500 µl de Buffer de lisis (Tris HCl, EDTA 0.5 M, SDS 0.5%, agua destilada) y 20

$\mu\text{l}$  de proteinasa K (20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), incubados a 60°C por 24 horas. Algunos aislados fueron sonicados hasta 5 ciclos de 10 segundos con 3 ml de Buffer de lisis para facilitar la extracción de ADN. De las muestras sonicadas se tomó un volumen de 500  $\mu\text{l}$ . A los aislados digeridos se les agregaron 500  $\mu\text{l}$  de fenol, luego mezclados por inmersión 30 segundos, se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 minutos, se extrajo el sobrenadante, el cual se colocó en un tubo limpio y se añadió 500  $\mu\text{l}$  de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, Sigma), luego mezcladas por inmersión 30 segundos para luego centrifugarse a 14,000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante se transfirió a tubos limpios. Para precipitar el ADN se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol (Sigma), se agitó manualmente 30 veces y fue incubado 10 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugarse a 14,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se decantó y se agregó 1 ml de etanol frío al 70% (Sigma) para lavar la pastilla, luego centrifugado a 14,000 rpm por 5 minutos, decantado y secado a temperatura ambiente. Una vez secos, se les añadieron 30  $\mu\text{l}$  de agua inyectable estéril y el ADN fue resuspendido por 2 horas a 60°C. Finalmente las muestras se conservaron en refrigeración a -20°C hasta su uso.

Para determinar la pureza y concentración de los ADN extraídos, se empleó un espectrofotómetro Jenway 7305, las lecturas se realizaron por duplicado a 260 y 280 nm. Las muestras se revisaron en un gel de agarosa al 1.2% revelado con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador Bio Rad®.

### **3.2.2.2 Reacción de PCR**

Para la identificación genérica de *Lactobacillus* se realizó un análisis de PCR con los iniciadores R16-1 5P-CTTGTA CAC ACC GCC CGT CA-3P, LbLMA1-rev 5P-CTC AAA ACT AAA CAAAGT TTC-3P, con los que se obtiene un producto de amplificación de 250 pb (Dubernet et al., 2002). Para la tipificación por PCR del género *Saccharomyces* se usaron los primers YCR021C F1 GGTGGTAACCGTATACAGCCAGATGG y YCR021C R1 GCAGTCTCTCCAGATGCTCTTGGGC para una amplificación de 236 pb (Sharpe et al., 2014). El volumen final de reacción fue de 10  $\mu\text{l}$ . Los reactivos y cantidades utilizados para cada reacción se muestran en las Tablas 3 y 4. Se empleó un termociclador Techne® programado de la siguiente manera: 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 40 segundos a 60° y 1 minuto a 72°C.

Tabla 3. Reactivos y cantidades utilizadas para la reacción de PCR en bacterias.

Reactivos	1X $\mu$ l
PCR Master Mix 2x (Invitrogen®)	5
ADN	1
R16-1 (20 pmol/ $\mu$ l)	1.5
LbLMA1-rev (20 pmol/ $\mu$ l)	0.5
H <sub>2</sub> O desionizada	2
<b>Volumen total</b>	<b>10</b>

Tabla 4. Reactivos y cantidades utilizadas para la reacción de PCR en levaduras.

Reactivos	1X $\mu$ l
PCR Master Mix 2x (Invitrogen®)	5
ADN	1
YCR021C F1 (20 pmol/ $\mu$ l)	0.5
YCR021C R1 (20 pmol/ $\mu$ l)	0.5
H <sub>2</sub> O desionizada	3
<b>Volumen total</b>	<b>10</b>

### Electrofóresis de ADN

Los productos se visualizaron en gel de agarosa al 2.5% (p/v) en TBE 1X (Trizma Base, Ácido bórico, EDTA 0.5 M pH 8) teñido con bromuro de etidio. La electrofóresis fue realizada a 100 volts, luego observados en el transiluminador Bio Rad®. Como marcador de peso molecular se empleó Ladder Invitrogen® de 100 bp.

### 3.3 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE LOS MM

Se evaluó el potencial probiótico de los aislados de BAL y levaduras de los preparados MMA de los cinco sitios mediante su tolerancia a pH ácido y sales biliares. Los controles positivos fueron *Lactobacillus rhamnosus* GG aislado a partir del probiótico comercial Vivere® y *Saccharomyces boulardii* del probiótico comercial Flos-Pro®. El método de las evaluaciones se adaptó del trabajo de Bao et al., (2010).

### **3.3.1 Tolerancia a pH ácido**

Se preparó caldo MRS pH 6.5 para las BAL e Infusión cerebro corazón (ICC) pH 7.3 para levaduras, y se ajustó el pH a 2 y 4. Se vaciaron 4 ml en tubos de ensayo de 10 ml de capacidad y se les añadieron 100 µl de inóculo de cada aislado, previamente refrescado en MRS o ICC a 37°C 24 horas. Para cada aislado se usó medio sin acidificar como control. Se agitaron en vortex e incubaron a 37° C por 24 horas. Para medir el desarrollo celular se tomó 1 ml de cultivo agitado en vortex, colocado en 3 ml de PBS pH 7.32. El crecimiento fue cuantificado por medición de la absorbancia (DO) a 600 nm en espectrofotómetro Jenway® 7305 con lecturas por triplicado.

### **3.3.2 Tolerancia a sales biliares**

En tubos de ensayo con 4 ml de caldo MRS e ICC adicionados con sales biliares (Sigma B8756) 0.3% p/v ajustado a pH 7.0, se añadieron 100 µl de inóculo de los aislados refrescados en caldo MRS o ICC a 37°C 24 horas y fueron incubados en las mismas condiciones. Como control para cada aislado se usó medio sin modificar. Se agitaron en vortex para colocarse 1 ml en 3 ml de PBS pH 7.32. El crecimiento se midió por DO<sub>600</sub>, con lecturas por triplicado.

### **3.3.3 Porcentaje de resistencia a pH ácido y Sales biliares**

El porcentaje de resistencia de los aislados ante pH ácido y sales biliares se calculó con la siguiente ecuación adaptada de (Bao et al., 2010). Donde N<sub>1</sub> representa la lectura de absorbancia a 600 nm después de su evaluación y N<sub>0</sub> la lectura de absorbancia en el pH sin modificar, en los medios MRS (pH 6.5) e ICC (pH 7.3).

$$\%R_{pH} = \frac{DO_{600} N_1 * 100}{DO_{600} N_0}$$

### **3.3.4 Análisis estadístico**

Se elaboró una base de datos con los porcentajes de resistencia de las evaluaciones de tolerancia de pH y sales biliares de los aislados. Para el análisis de los datos se utilizó el programa STATISTICA. Se realizó un análisis ANOVA de una sola vía ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos y el control y una comparación de medias mediante las pruebas de Tukey y Dunnett.

### **3.4 Recomendaciones para la preparación de los MM**

Se realizó una revisión de guías técnicas y manuales sobre la reproducción artesanal de MM. Fueron identificados elementos prioritarios considerados faltantes o que se deberían de abordar con mayor énfasis, a fin de asegurar una mejor calidad en los preparados. Además, se consideraron los resultados de la descripción de los productos, el comportamiento del pH, el análisis microbiológico, la caracterización e identificación de las BAL y levaduras aisladas y la evaluación de sus propiedades probióticas. A partir de esta revisión se elaboró una propuesta de guía técnica como recurso informativo para productoras y productores agropecuarios que ya conozcan las técnicas de reproducción MM.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### **4.1 ELABORACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS PREPARADOS MM.**

#### **4.1.1 Características de los sitios de recolección de mantillo forestal**

En la Tabla 5 se muestran los datos de geoposicionamiento, altitud y fecha de colecta del mantillo forestal en cada uno de los sitios. En las zonas con predominancia de *Q. sideroxylo*, especie de mayor porte, hojas de menor tamaño, de poca senescencia y ubicada a mayor altitud en el ANP Sierra Fría, se encontró un mantillo forestal con espesor de 2 cm, con poca diferencia entre el material nuevo depositado en la superficie y el descompuesto o en proceso de descomposición bajo la superficie

del suelo (Figura 12), por lo que el mantillo recolectado llevaba algo de suelo impregnado por estar en contacto directo. Los sitios con *Q. potosina*, especie de mayor presencia y distribución dentro del ANP, de menor porte, hojas de mayor tamaño y mayor senescencia presentaron espesores de mantillo mayores a 5 cm y una clara diferenciación entre el material nuevo, material en proceso de descomposición y material completamente degradado (Figura 13).

Tabla 5 Geoposicionamiento, altitud y fecha de colecta de mantillo forestal de los cinco sitios en el ANP Sierra Fría.

Sitio	Especie	Latitud Norte	Longitud Oeste	Altitud m.s.n.m.	Fecha de colecta
1	<i>Q. sideroxylla</i>	22° 14.699	102° 38.433	2830	01/10/19
2	<i>Q. sideroxylla</i>	22° 16.229	102° 37.001	2890	01/10/19
3	<i>Q. potosina</i>	22° 10.364	102° 35.672	2611	22/10/19
4	<i>Q. potosina</i>	22° 10.390	102° 35.186	2585	29/10/19
5	<i>Q. potosina</i>	21° 57.972	102° 22.930	1970	05/09/15



Figura 12 Detalle del mantillo forestal de *Q. sideroxylla*.



Figura 13 Detalle de mantillo forestal de *Q. potosina*.

#### 4.1.2 Reproducción en fase sólida MMS

##### 4.1.2.1 MMS de los sitios 1, 2, 3 y 4

Dos días después de iniciado el proceso de reproducción MMS en las muestras de los sitios 1, 2, 3 y 4 se observó un abultamiento en las tapas plásticas de los frascos de vidrio, señalando la generación

y presencia de gases derivados del proceso de fermentación. Cada semana se revisaron los frascos para liberar la concentración de gases, en cada ocasión se desenroscaron ligeramente las tapas hasta que dejaron de mostrar abultamiento por presión. La presión por concentración de gases disminuyó notablemente después de dos meses de almacenamiento y posterior a los dos meses disminuyó gradualmente hasta parar.

Al abrirse por completo a los 30 días de iniciado el proceso, los MMS de los cuatro sitios presentaron un olor fermentado dulce, afrutado agradable e intenso y con aroma a alcohol. El color del salvado se volvió ámbar por la solución de piloncillo. No se observaron cambios en la composición de los materiales originales, ni desarrollo de micelio u otro tipo de macromorfología microbiana (Figura 14).



Figura 14 MMS de las muestras 1 a 4.

#### 4.1.2.2 MMS Sitio 5

A cuatro años de la elaboración de los MMS del sitio 5, este presentó un olor afrutado muy fuerte, avinagrado y con una coloración muy oscura debido a la melaza (Figura 15). La exposición al ambiente en distintas ocasiones al abrir y cerrar el contenedor a lo largo del tiempo, comenzó a presentar desarrollo micelial de distinta macromorfología (Figura 16).



Figura 15 Detalle de los MMS del sitio 5 utilizados para su reproducción MMA.



Figura 16 Interior del recipiente que contenía los MMS del sitio 5.

#### 4.1.2.3 pH de los MMS

En la Tabla 6 se muestran los promedios de las lecturas de pH de los MMS de los cinco sitios a distintos días de almacenamiento. Todos los valores resultaron similares pese a las diferencias del origen del mantillo forestal y tiempo de almacenamiento. El sitio 5 también presentó un pH similar a los nuevos preparados MMS, a pesar de sus diferencias en tiempo de almacenamiento, ingredientes, proporciones y forma de elaboración. El pH de los cinco productos coincide con los valores promedio esperados en un ensilado de calidad según J. López y Wernli, (1984).

Tabla 6 Promedio de las lecturas de pH de los MMS de los sitios y tiempo de almacenamiento.

Sitio	Especie	pH	Días de almacenamiento
1	<i>Q. sideroxylla</i>	4.44	61
2	<i>Q. sideroxylla</i>	4.43	61
3	<i>Q. potosina</i>	4.68	41
4	<i>Q. potosina</i>	4.52	34
5	<i>Q. potosina</i>	4.56	Desde 2015

**4.1.3 Reproducción en fase líquida MMA**

Después de una hora de su elaboración, se observó la generación de gases en las trampas de aire adaptadas a las tapas plásticas de los frascos de vidrio. Con el paso de las semanas la actividad de las trampas se vio notoriamente disminuida y las bolsas que contenían los MMS perdieron flotación. Las soluciones MMA de los sitios 1, 2, 3 y 4 exhibieron cambios en su color con el paso de los días, desde un tono ámbar caramelo intenso y turbio hacia ámbar transparente (Figura 17 y 18). Su olor era fuerte a fermento frutal agradable y ligeramente alcohólico, similar al pulque, lo cual coincidió con los indicadores que menciona Suchini, (2012) para los productos MM de buena calidad. El sitio 5 con una semana de activación, mostró un líquido ámbar muy oscuro, con un olor fermentado intenso y dulce característico de la melaza.



Figura 17 MMA de los sitios 1 y 2 con una semana de activación.



Figura 18 MMA de los sitios 1 y 2 con dos semanas de activación

En la Figura 19 se observan los preparados MMA de los cinco sitios con distintas fechas de activación, alineados del 1 al 5 de derecha a izquierda. Los MMA de los sitios 1 y 2 elaborados el mismo día y con un mes de activación, 3 y 5 preparados el mismo día y con una semana de activación y el sitio 4 con tres días de activación. En algunos de los preparados MMA se formó una capa superficial muy delgada y blanquecina sobre la suspensión, esto se presentó principalmente en el sitio 5 (Figura 20) lo cual se consideró parte del proceso de fermentación. Esta característica se aceptó para el análisis microbiológico. Sin embargo, preparados MMA de los sitios 4 y 5 en una ocasión mostraron micelio blanquecino en la superficie de la solución, por lo que fueron descartados y se prepararon nuevamente (Figura 21).



Figura 19 Comparación de preparados MMA de los cinco sitios.

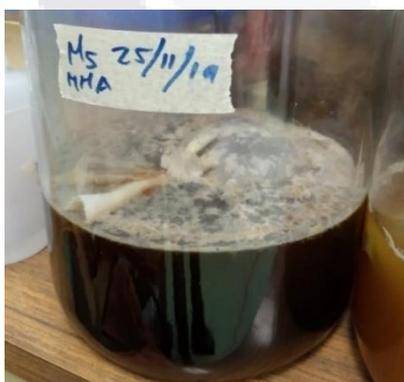


Figura 20 MMA del sitio 5 con una semana de activación.



Figura 21 MMA del sitio 5 con formación de micelio.

4.1.3.1 pH de los MMA

En la Tabla 7 y la Figura 22 se presenta el promedio de lecturas semanales del pH de los preparados MMA de los cinco sitios. Todos los productos mantuvieron su pH debajo de 4 con valores entre 3.3 y 3.96. Lo cual indica una considerable estabilidad pese a las diferencias de origen del mantillo forestal y su consecuente carga microbiana, el tiempo de almacenamiento de su fase sólida MMS al momento de prepararse y en el caso del sitio 5, los insumos y condiciones de elaboración.

Tabla 7 Promedio de lecturas semanales de pH de los MMA.

Sitio	Especie	1	2	3	4	5	6	7	8
1	<i>Q. sideroxylla</i>	-	-	3.67	3.71	3.79	3.80	3.78	3.80
2	<i>Q. sideroxylla</i>	-	-	3.86	3.90	3.94	3.96	3.90	3.87
3	<i>Q. potosina</i>	3.68	3.59	3.62	3.62	3.59	3.53	3.49	3.49
4	<i>Q. potosina</i>	3.78	3.82	3.80	3.74	3.72	3.69	3.69	3.67
5	<i>Q. potosina</i>	3.70	3.57	3.52	3.51	3.43	3.39	3.35	3.38

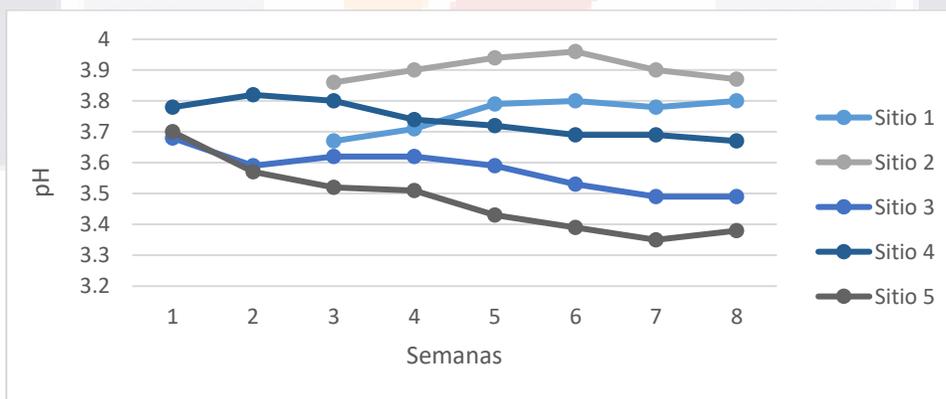


Figura 22 Comportamiento del pH de los MMA de todos los sitios durante 8 semanas.

Por sus características, los preparados MMA se pueden considerar semejantes a los alimentos líquidos fermentados para ganado. Los cuales consisten en una mezcla de subproductos alimenticios líquidos y materiales convencionales secos para alimentación animal o de forraje sin procesar mezclado con agua, fermentados con el fin de mejorar la calidad del alimento y con este la salud y

productividad de los animales (Missotten et al., 2015). Se menciona que un pH menor a 4.5 en los alimentos líquidos fermentados es una de sus características deseadas. Dicho pH se alcanza y se mantiene en su fase estable y final para su aprovechamiento (Van Winsen et al., 2001).

## **4.2 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO**

### ***4.2.1 Identificación tradicional***

### ***4.2.2 Diversidad microbiológica de todos los sitios***

Los promedios de los conteos UFC/ml de los MMA de los cinco sitios cultivados en los medios nutritivos, selectivos y diferenciales se muestran en la Tabla 8. En los conteos de mesófilos aerobios todos los sitios presentaron valores de siete unidades logarítmicas. El conteo de BAL muestra valores potenciales debido a que no se suplementó el medio MRS para la exclusión de organismos eucariotas. El sitio 3 fue el que mostró un mayor valor, con nueve unidades logarítmicas, las esperadas para un alimento líquido fermentado de calidad (Van Winsen et al., 2001). Los otros sitios presentaron valores de ocho unidades logarítmicas.

En el conteo de levaduras, el sitio 3 presentó la mayor cantidad con siete unidades logarítmicas, seguido del sitio 2 con seis unidades, el 1 y 4 con cinco unidades y el sitio 5 que no presentó desarrollo. Los conteos de los sitios 1 a 4 coinciden con las UFC de levaduras encontradas en los alimentos líquidos fermentados para ganado, los cuales presentan de cinco a siete unidades logarítmicas desde la transición de su fase estable hasta el momento de su aprovechamiento (Geary et al., 1999; Missotten et al., 2010).

No se presentó desarrollo de potenciales enterobacterias en los sitios 1, 2, 3 y 5. Estas bacterias se encuentran en el tracto digestivo humano y animal sin causar daño, aunque pueden ser oportunistas o patógenas, las cuales producen una gran variedad de enfermedades en los humanos (Linton y Hinton, 1988; Pérez Guerrero et al., 2014). Por lo que no son deseables en los procesos de ensilaje (Pahlow et al., 2003) ni en los alimentos líquidos fermentados (Brooks, 2008; Missotten et al., 2010). En el sitio 4, donde sí se dio la presencia de potenciales enterobacterias, dos colonias fueron bacterias Gram negativas y dos levaduras. La ausencia de potenciales enterobacterias en la mayoría

de los preparados MM coincide con Muck, (2010), quien menciona que las enterobacterias, además de ser las principales competidoras de las BAL en ambientes anaeróbicos de los silos, son inhibidas en un pH entre 4.5 y 5. De igual manera Missotten et al., (2015) describen como los enteropatógenos son inhibidos en los alimentos líquidos fermentados de calidad. Finalmente, ningún preparado MMA presentó desarrollo de potenciales estafilococos, los cuales son considerados entre las bacterias de importancia médica por su presencia en diversas patologías (Pasachova Garzón et al., 2019).

Tabla 8. Unidades formadoras de colonias por ml de los productos MMA de los cinco sitios en medios nutritivos, selectivos y diferenciales.

Sitio	Mesófilos aerobios	Potenciales BAL	Levaduras	Potenciales enterobacterias	Potenciales estafilococos
1 <i>Q. sideroxylla</i>	25.19 x 10 <sup>7</sup>	6.63 x 10 <sup>8</sup>	8.2 x 10 <sup>5</sup>	0	0
2 <i>Q. sideroxylla</i>	25.75 x 10 <sup>7</sup>	3.27 x 10 <sup>8</sup>	1.12 x 10 <sup>6</sup>	0	0
3 <i>Q. potosina</i>	22.81 x 10 <sup>7</sup>	3.39 x 10 <sup>9</sup>	4.63 x 10 <sup>7</sup>	0	0
4 <i>Q. potosina</i>	13.05 x 10 <sup>7</sup>	1.99 x 10 <sup>8</sup>	2.5 x 10 <sup>5</sup>	1.0 x 10 <sup>6</sup>	0
5 <i>Q. potosina</i>	32.44 x 10 <sup>7</sup>	1.28 x 10 <sup>8</sup>	Sin desarrollo	0	0

#### 4.2.3 Aislados identificados como bacterias ácido lácticas BAL y levaduras

Se asilaron un total de 16 bacterias y ocho levaduras de los preparados MMA de los cinco sitios. Sus características macro y micro morfológicas se muestran en la Tabla 9. Las bacterias se identificaron como bacterias ácido lácticas (BAL) al ser Gram positivas, catalasa negativas, no formadoras de esporas. En la Tabla 10 se presentan fotografías de algunos aislados visualizados en el microscopio a 100x. De la totalidad de aislados, se realizó la identificación molecular y la evaluación del potencial probiótico de 10 BAL y cinco levaduras, ya que estas fueron las que resistieron su manipulación y refrigeración constante al momento de refrescarse para su análisis, además de los controles positivos *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Saccharomyces boulardii* obtenidos de probióticos comerciales.

Tabla 9 Características macro y micromorfológicas de BAL y levaduras aisladas de los MMA de cinco sitios.

Sitio	Clave <sup>1</sup>	Macromorfología <sup>2</sup>			Micromorfología <sup>3</sup>
		Tamaño	Forma	Color	
1 <i>Q. sideroxylla</i>	B1-1	P	R	Mb	Bco
	B2-1	P	R	Bn	Coc
	B3-1	P	R	Bo	Coc
	L1-1	G	I	Bo	Lev Sub Ovo Ge m
	L2-1	Mg	I	Bo	Lev Ova Ovo Ge m
	L3-1	M	I	Bo	Lev Ova Ovo Gem
2 <i>Q. sideroxylla</i>	B1-2	M	R	Mb	Bco
	B2-2	P	R	Mb	Bco
	B3-2	P	R	Bn	Bco
	L1-2	Mg	I	Bo	Lev Ova Ovo Ge m
	L2-2	G	I	Bo	Lev Ova Ovo Ge m
	L3-2	M	I	Bo	Lev Ova Ovo Ge m
3 <i>Q. potosina</i>	B1-3	P	L	Bn	Bco
	B2-3	G	R	Bn	Bla
	B3-3	P	R	Bn	Bco
	L1-3	M	R	Bl	Lev Glb Sgl Ge m
4 <i>Q. potosina</i>	B1-4	P	R	Mb	Cbl
	B2-4	Mp	R	Mb	Coc
	L1-4	G	R	Bl	Lev Glb Sgl Ge m
5 <i>Q. potosina</i>	B1-5	G	R	Mb	Bco
	B2-5	M	R	Bl	Bco
	B3-5	P	L	Bn	Bco
	B4-5	P	R	Bl	Bla
	B5-5	P	L	Tr	Bla
	B6-5	D	R	Tr	Bco
	B7-5	Mp	R	Bl	Bla

<sup>1</sup> B: bacteria. L: levadura

<sup>2</sup> Macromorfología colonial.

Tamaño. D: diminuta (~0.5 mm). Mp: muy pequeña (~1 mm). P: pequeña (~2 mm). M: mediana (~3 mm). G: grande (~4 mm). Mg: muy grande (≥5 mm).

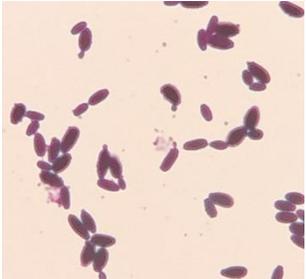
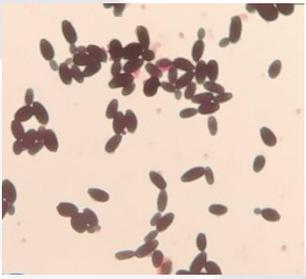
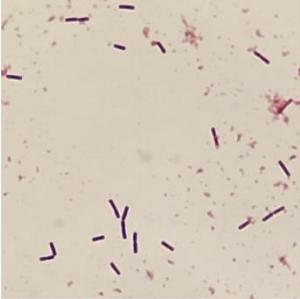
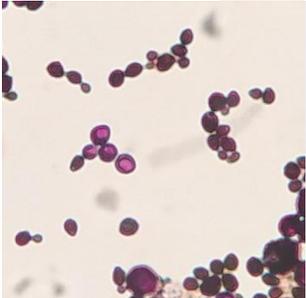
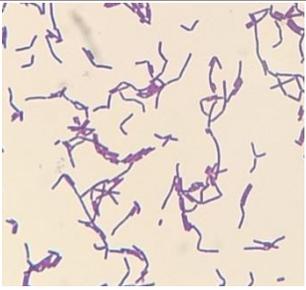
Forma. R: redonda. L: ligeramente irregular. I: irregular

Color. Mb: muy blanca. Bl: blanca. Bn: blanquecina. Bo: blanquecina opaca. Tr: traslúcida

<sup>3</sup> Micromorfología celular.

Bco: bacilo corto. Cbl: cocobacilo. Coc: coco. Bla: bacilo largo. Lev: levadura. Sub: subprolata. Ova: oval. Ovo: ovoide Glb: globosa. Sgl: subglobosa. Gem: gemación multilateral

Tabla 10 BAL y Levaduras aisladas de los MMA de los cinco sitios, observadas en microscopio óptico a 100x.

Sitio	Aislado	Fotografía	Aislado	Fotografía
1 <i>Q. sideroxylla</i>	B1-1		L2-1	
2 <i>Q. sideroxylla</i>	B1-2		L3-2	
3 <i>Q. potosina</i>	B3-3		L1-3	
4 <i>Q. potosina</i>	B1-4		L1-4	
5 <i>Q. potosina</i>	B5-5		B7-5	

**4.2.2 Identificación molecular**

**4.2.2.1 Validación de oligonucleótidos**

Los *primers* utilizados para la identificación molecular de *Lactobacillus* (LbLMA1-rev y R16-1) mostraron bandas de alrededor de 250 pb con el aislado de *Lactobacillus rhamnosus* GG. Similarmente, los *primers* YCR021C F1, y YCR021C R1 utilizados para *Saccharomyces* generaron una banda de alrededor de 236 pb con el aislado de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 23). Esta validación coincidió con el trabajo de Dubernet et al., (2002), en el que reportan que se logra una banda de alrededor de 250 pb al utilizar los *primers* LbLMA1-rev y R16-1 para *Lactobacillus*. Y de acuerdo a Sharpe et al., (2014), que al utilizar los *primers* YCR021C F1, y YCR021C R1 para *Saccharomyces* se obtiene una banda de alrededor de 236 pb.

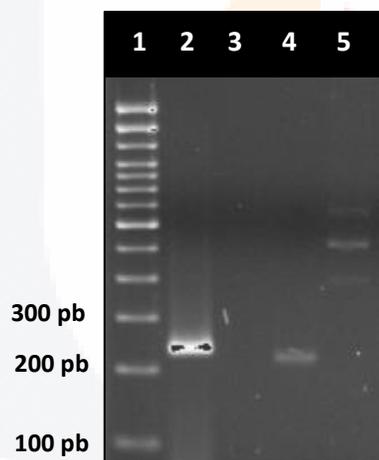


Figura 23 Gel de validación de oligonucleótidos. Pozo 1 marcador de peso molecular (DNA Ladder 100 bp Invitrogen®). Pozo 2 *S. cerevisiae* de producto comercial para panificación. Pozo 3 NTC (control negativo sin ADN). Pozo 4 *Lactobacillus rhamnosus* GG del producto comercial Vivera®. Pozo 5 *E. coli* como control negativo.

**4.2.2.2 Identificación de los aislados**

De los 10 aislados de BAL analizados por PCR, cinco se identificaron como *Lactobacillus* sp., las cuales presentaron un amplicon de alrededor de 250 pb, igual al generado para el control positivo *L. rhamnosus* GG, (Figura 24 y 25). En su descripción micromorfológica, estos aislados presentaron

características típicas del género *Lactobacillus*, al ser bacilos largos, cortos y cocobacilos Gram positivos. Los aislados no identificados como *Lactobacillus* corresponden a BAL de otros géneros, al haberse confirmado previamente como Gram positivos, catalasa negativos, no formadores de esporas. De los cinco aislados de levaduras analizados por PCR, ninguno se identificó como *Saccharomyces* (Figura 26). En la Tabla 11 se muestra un resumen de los resultados de la identificación molecular y en la Tabla 12 se presentan fotografías de los aislados identificados como *Lactobacillus* observados en microscopio.

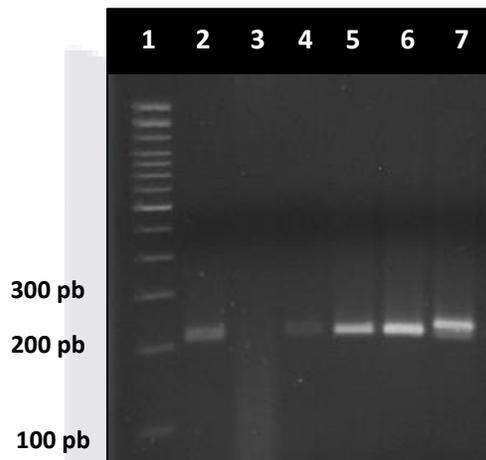


Figura 24 Gel de identificación del género *Lactobacillus* (a). Pozo 1 marcador de peso molecular (DNA Ladder 100 bp Invitrogen®). Pozos 2 a 6 aislados B3-1, B4-5, B1-4, B2-5, B1-2. Pozo 7 control *Lactobacillus rhamnosus* GG del producto comercial Vivera®.

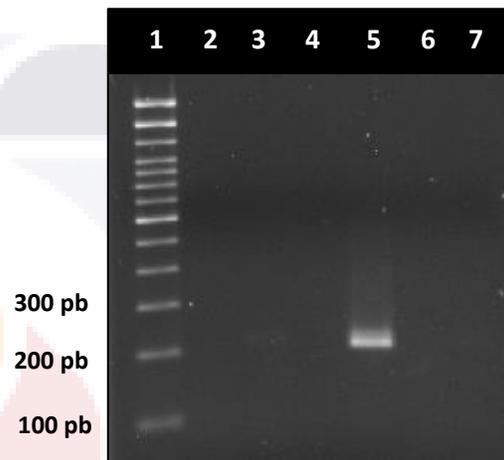


Figura 25 Gel de identificación del género *Lactobacillus* (b). Pozo 1 marcador de peso molecular (DNA Ladder 100 bp Invitrogen®). Pozos 2 a 4 aislados B3-2, B2-3, B1-3. Pozo 5 control *Lactobacillus rhamnosus* GG del producto comercial Vivera®. Pozo 6: aislado B3-3. Pozo 7 NTC.

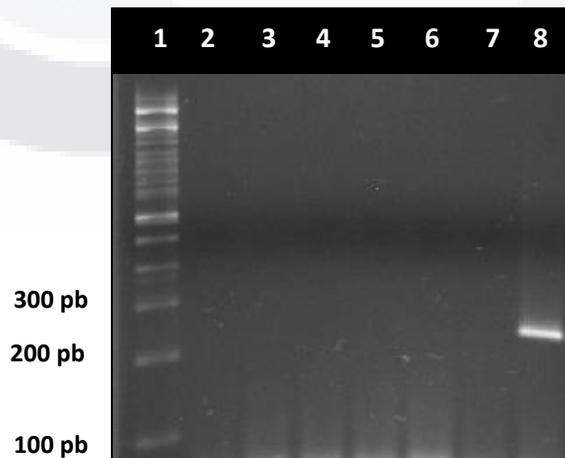


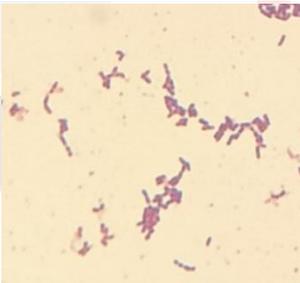
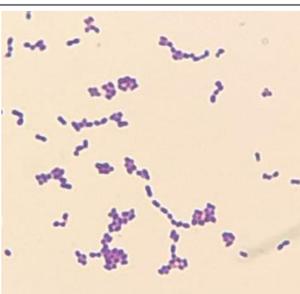
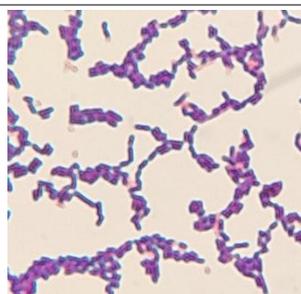
Figura 26 Gel de identificación del género *Saccharomyces*. Pozo 1 Marcador de peso molecular (DNA Ladder 100 bp Invitrogen®). Pozo 2-6 aislados L3-2, L2-2, L2-1, L1-3, L3-1. Pozo 7 NTC. Pozo 8 control *S. cerevisiae*.

Tabla 11 Identificación de *Lactobacillus* y *Saccharomyces* aislados de MMA de cinco sitios mediante tipificación molecular. <sup>1</sup>

Sitio	Aislado	Identificación tradicional	Tipificación molecular
1 <i>Q. sideroxylla</i>	B3-1	BAL	+
	L2-1	Levadura	-
	L3-1	Levadura	-
2 <i>Q. sideroxylla</i>	B3-2	BAL	-
	L2-2	Levadura	-
	L3-2	Levadura	-
3 <i>Q. potosina</i>	B1-3	BAL	-
	B2-3	BAL	+
	B3-3	BAL	-
	L1-3	Levadura	-
4 <i>Q. potosina</i>	B1-4	BAL	+
	B2-4	BAL	-
5 <i>Q. potosina</i>	B1-5	BAL	+
	B2-5	BAL	+
	B4-5	BAL	-

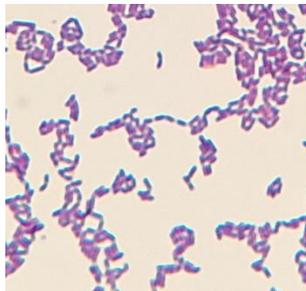
<sup>1</sup> Análisis de PCR realizado con *primers* genéricos para *Lactobacillus* y *Saccharomyces* indicados en metodología.

Tabla 12 Aislados identificados por PCR como *Lactobacillus* observados en microscopio a 100x.

Sitio	Aislado	Fotografía	Sitio	Aislado	Fotografía
1 <i>Q. sideroxylla</i>	B3-1		3 <i>Q. potosina</i>	B2-3	
4 <i>Q. potosina</i>	B1-4		4 <i>Q. potosina</i>	B2-4	

5  
*Q. potosina*

B1-5



Si bien las directrices internacionales indican la importancia de la caracterización de los probióticos a nivel de cepa mediante las técnicas moleculares más actuales, el uso de medios de cultivo nutritivos, selectivos y diferenciales, las tinciones y las pruebas bioquímicas resultan de gran relevancia para el estudio preliminar de los productos de elaboración artesanal, que por sus características presentan microbiota con potencial probiótico. Como ejemplo está el trabajo de Cueto et al., (2007) quienes replicaron las condiciones artesanales de un producto líquido fermentado con el fin de describir el perfil microbiológico mediante el conteo de BAL, mesófilos aerobios, levaduras y enterobacterias. Además, este estudio lo continuaron con la evaluación del potencial probiótico de las BAL aisladas producto artesanal Cueto-Vigil et al., (2010). Por otro lado, la combinación de técnicas tradicionales de identificación microbiológica con técnicas moleculares a nivel de género, ayuda a complementar los análisis que requieren la caracterización de microorganismos de interés como *Lactobacillus*, como lo presentan Sossa et al., (2009) al utilizar métodos de identificación convencional, bioquímica y molecular para describir las dinámicas de las BAL y la presencia de *Lactobacillus* en un proceso de fermentación industrial.

#### 4.3 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE LOS MM

##### 4.3.1 Tolerancia a pH ácido y sales biliares

###### 4.3.1.1 Bacterias ácido lácticas BAL

Los resultados de la respuesta de las BAL a pH y sales biliares se resumen en la Tabla 13 y en las Figuras 27, 28 y 29. Los resultados se presentan como porcentaje de resistencia de las BAL de los

cinco sitios a pH 2 y 4, así como al 0.3% de sales biliares durante 24 horas. Los resultados incluyen como control al aislado comercial de *L. rhamnosus* GG.

A pH 2, nueve de los diez aislados presentaron mayor porcentaje de resistencia que el control *L. rhamnosus* GG ( $p < 0.05$ ), con valores entre 1.8% y 7.14%. A pH 4, con porcentajes de resistencia entre 1.99% y 104.60%, siete aislados tuvieron mayor desarrollo que el control, sin embargo, solo tres exhibieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). En 0.3% de sales biliares, a excepción de uno, los aislados mostraron mayor porcentaje de resistencia que el control, con valores de 20.12% a 146.63%, seis con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Tabla 13 Porcentaje de resistencia de las BAL aisladas de los preparados MMA cultivadas en pH 2, 4 y 0.3% de sales biliares por 24 horas.

Sitio	Aislado	Porcentaje de resistencia a pH 2		Porcentaje de resistencia a pH 4		Porcentaje de resistencia a 0.3% de sales biliares	
Control <i>L. rhamnosus</i> GG	LGG	1.05	d	49.63	a	15.79	a c
1 <i>Q. sideroxylla</i>	B3-1 <sup>+</sup>	5.41*	f	5.71	xx c	142.34*	xx xf
2 <i>Q. sideroxylla</i>	B3-2	7.14*	g	7.39	xx c	20.44	ab
3 <i>Q. potosina</i>	B1-3	2.09*	a	58.45	ab	21.60	ab
	B2-3 <sup>+</sup>	2.03*	a	53.68	ab	20.12	a
4 <i>Q. potosina</i>	B3-3	3.41*	e	56.17	ab	39.13*	de
	B1-4 <sup>+</sup>	1.80*	a	1.99	c	51.58*	e
5 <i>Q. potosina</i>	B2-4	4.13*	b	104.60*	e	146.63*	xx xf
	B1-5 <sup>+</sup>	4.23*	b	74.36*	d	76.35*	xxx g
5 <i>Q. potosina</i>	B2-5 <sup>+</sup>	4.45*	b	63.41*	b d	35.24*	b d
	B4-5	0.44	c	55.71	ab	3.24	xx c

\* Valores mayores al control según la prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ). Valores con diferentes letras en cada columna difieren significativamente entre sí (prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

<sup>+</sup> Aislados de BAL identificados por PCR como *Lactobacillus*.

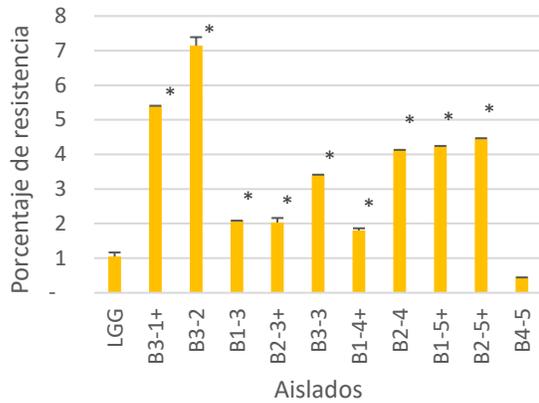


Figura 27 Porcentaje de resistencia de las BAL aisladas de los productos MMA de los cinco sitios y el control *L. rhamnosus* GG, cultivadas a pH 2 por 24 h (% de resistencia calculado con base al crecimiento del mismo aislado en medio MRS a pH 6.5). \* Valores diferentes al control ( $p < 0.05$ ) según prueba de Dunnett. Valores promedio  $\pm$  EE. (+) Aislados identificados por PCR como *Lactobacillus*.

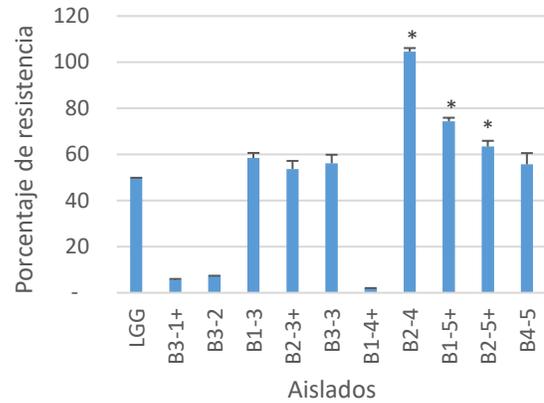


Figura 28 Porcentaje de resistencia de las BAL aisladas de los productos MMA de los cinco sitios y el control *L. rhamnosus* GG, cultivadas a pH 4 por 24 h (% de resistencia calculado con base al crecimiento del mismo aislado en medio MRS a pH 6.5). \* Valores diferentes al control ( $p < 0.05$ ) según prueba de Dunnett. Valores promedio  $\pm$  EE. + Aislados identificados por PCR como *Lactobacillus*.

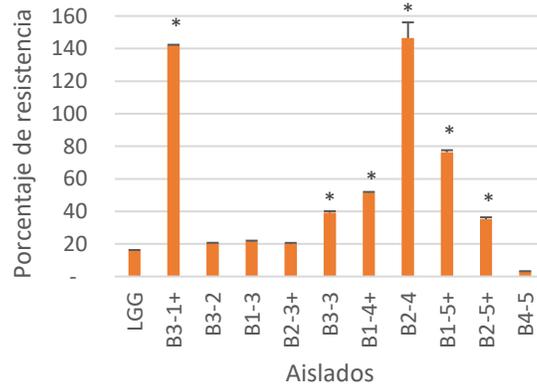


Figura 29 Porcentaje de resistencia de las BAL aisladas de los productos MMA de los cinco sitios y el control *L. rhamnosus* GG, cultivadas a 0.3% de sales biliares por 24 h (% de resistencia calculado con base al crecimiento del mismo aislado en medio MRS a pH 6.5). \*Valores diferentes al control ( $p < 0.05$ ) según prueba de Dunnett. Valores promedio  $\pm$  EE. + Aislados identificados por PCR como *Lactobacillus*.

La similitud de los porcentajes de resistencia a pH 2 entre varios aislados evaluados de distintos géneros de BAL, se relaciona con lo presentado por Cueto-Vigil et al., (2010), sin embargo, estos autores reportaron que en 0.3% de sales biliares hubo mayor efecto inhibitorio que en pH 2 tras dos horas de incubación, contrario a los resultados del presente trabajo, con valores considerablemente menores a este pH, pero con 24 horas de incubación.

Los resultados de resistencia a pH 4 indican un mejor comportamiento tanto en los aislados como en el control, respecto a las otras dos evaluaciones (pH 2 y 0.3% sales biliares), lo cual coincide con el trabajo de Landa-Salgado et al., (2019), en el que se evaluaron bacterias ácido lácticas, algunas identificadas como *Lactobacillus*, y mostraron que tras 24 horas de cultivo a pH 4 los aislados presentaron valores de resistencia superiores al 50%.

Todos los aislados fueron capaces de sobrevivir en presencia de sales biliares, y dos aislados (B3-1 y B2-4) tuvieron mayor desarrollo en el medio con 0.3% de sales biliares que en pH 6.5. Esta resistencia generalizada de los aislados de BAL es similar a lo reportado por Rondón et al., (2008), estos autores mencionan que ciertas BAL son capaces de desconjugar las sales biliares, lo cual explica su buen desarrollo bajo estas condiciones de estrés. Cueto-Vigil et al., (2010) también reportaron porcentajes similares de supervivencia entre distintos aislados de BAL evaluados en 0.3% de sales biliares.

De los cinco aislados identificados por PCR como *Lactobacillus* (B3-1, B2-3, B1-4, B1-5, B2-5), y a excepción de B3-1 y B1-4 en pH 4, los aislados mostraron mejor comportamiento que el control bajo pH 2, pH 4 y 0.3% de sales biliares ( $p < 0.05$ ). El aislado B3-1 presentó el segundo valor más alto de todos los aislados a pH 2 y 0.3% de sales biliares, además de mostrar un sobredesarrollo en sales biliares respecto a su cultivo control en medio MRS a pH 6.5, aunque a pH 4 tuvo el segundo menor valor de todos los aislados, precedido por B1-4 con el porcentaje más bajo.

La considerable disminución de la viabilidad del control *L. rhamnosus* GG, aislado de un producto comercial y evaluado condiciones de estrés, coincide con el trabajo de (Succi, y otros, 2005) quienes reportaron una diferencia de cinco unidades logarítmicas entre pH 2 y 3, tan solo a las dos horas de incubación. Sin embargo, se debe tener presente que cada cepa de *Lactobacillus* exhibe comportamientos distintos al evaluarse su resistencia en pH ácido y sales biliares, por lo que cuentan con mayor o menor habilidad para sobrevivir al estrés a corto o largo plazo (Chou y Weimer, 1999).

En cuanto a la resistencia de aislados de *Quercus* a pH 2, los aislados de *Q. sideroxylla* mostraron más resistencia que los aislados de *Q. potosina*. Esta condición se invierte a pH 4, donde los aislados de *Q. potosina* presentaron valores de resistencia considerablemente más altos. Por otro lado, bajo 0.3% de sales biliares los porcentajes de resistencia de aislados varían entre las dos especies de *Quercus*.

#### 4.3.1.2 Levaduras

La Tabla 14 y las Figuras 30, 31 y 32 muestran el porcentaje de resistencia de las levaduras aisladas de los preparados MMA de tres sitios, así como el aislado comercial control *S. boulardii*, cultivadas a pH 2, 4 y 0.3% de sales biliares por 24 horas.

A pH 2, cuatro de los cinco aislados presentaron mayor porcentaje de resistencia que el control ( $p < 0.05$ ), con valores entre 43.47% y 71.82%. A pH 4 el control presentó mayor desarrollo que todos los aislados, aunque sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Cuatro aislados y el control, este con 158.95%, mostraron sobredesarrollo y superaron su propio crecimiento a pH 7.3. En 0.3% de sales biliares el control no se desarrolló (0% resistencia), sin embargo, los aislados de MMA exhibieron valores de resistencia entre 4.20% y 24.29%.

Tabla 14 Porcentaje de resistencia de las levaduras aisladas de los preparados MMA cultivadas a pH 2, 4 y 0.3% de sales biliares por 24 horas.

Sitio	Aislado	Porcentaje de resistencia a pH 2	Porcentaje de resistencia a pH 4	Porcentaje de resistencia a 0.3% de sales biliares
Control <i>S. boulardii</i>	Sb	13.27 b	158.95 c	0.0 b
1 <i>Q. sideroxylla</i>	L2-1	46.99* a	112.67 a	21.21* a
	L3-1	43.47* a	108.54 a	20.76* a
2 <i>Q. sideroxylla</i>	L2-2	44.40* a	111.48 a	21.17* a
	L3-2	71.82* c	105.01 a	24.29* a
3 <i>Q. potosina</i>	L1-3	10.07 b	5.88 b	4.20* b

\* Valores diferentes al control,  $p < 0.05$  (prueba de Dunnett). Valores con diferentes letras en cada columna difieren significativamente (prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

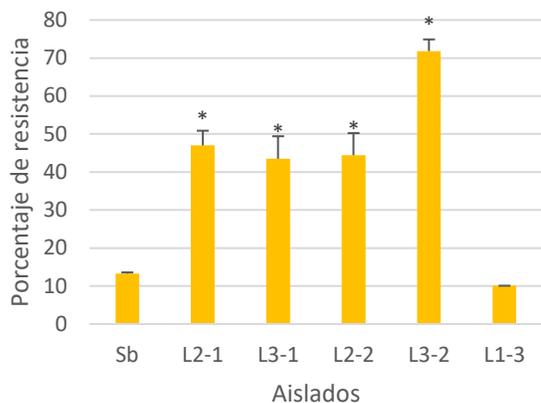


Figura 30 Porcentaje de resistencia de las levaduras aisladas de los productos MMA y el control *S. boulardii*, cultivadas a pH 2 por 24 h (% de resistencia calculado con base al crecimiento del mismo aislado en medio ICC a pH 7.3). \* Valores diferentes al control ( $p < 0.05$ ) según prueba de Dunnett. Valores promedio  $\pm$  EE.

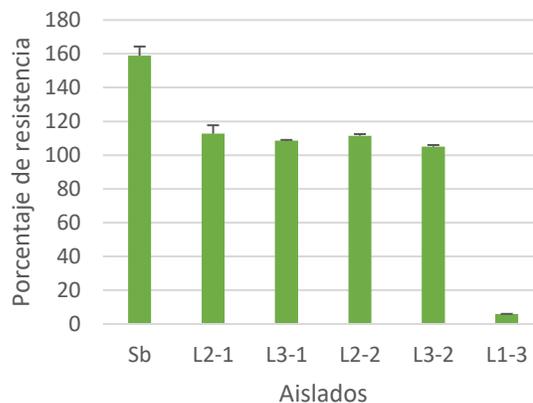


Figura 32 Porcentaje de resistencia de las levaduras aisladas de los productos MMA y el control *S. boulardii*, cultivadas a pH 4 por 24 h (% de resistencia calculado con base al crecimiento del mismo aislado en medio ICC a pH 7.3). \* Valores diferentes al control ( $p < 0.05$ ) según prueba de Dunnett. Valores promedio  $\pm$  EE.

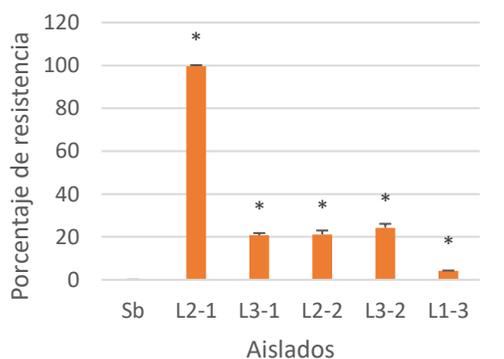


Figura 31 Porcentaje de resistencia de las levaduras aisladas de los productos MMA y el control *S. boulardii*, cultivadas a 0.3% de sales biliares por 24 h (% de resistencia calculado con base al crecimiento del mismo aislado en medio ICC a pH 7.3). \* Valores diferentes al control ( $p < 0.05$ ) según prueba de Dunnett. Valores promedio  $\pm$  EE.

Los aislados de levaduras de los productos MMA presentaron un mejor comportamiento que las BAL, con mayores porcentajes de resistencia a pH 2 y 4, así como una considerable similitud de los valores entre aislados, igualmente observada en las sales biliares. Aunque ninguno de los cinco aislados de levaduras se identificó como *Saccharomyces*, existen otros géneros de levaduras que también son usados como probióticos en animales, como *Candida pintolopesii*, *C. utilis* y *C. saitoana* (Liong, 2011). Por esto, los resultados obtenidos en la presente investigación se pueden relacionar con el trabajo de Gavilanes-torres et al., (2018), donde levaduras presentadas como nuevas especies mostraron mayor tolerancia que *S. boulardii* bajo pH ácido y sales biliares. Similarmente, De Hoyos et al., (2019) describen una cepa de levadura nativa, y la proponen para su aprovechamiento probiótico al ser muy prometedora por su tolerancia *in vitro* a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

La alta sensibilidad de *S. boulardii* ante las sales biliares pero considerable resistencia a pH ácido observada en el presente estudio, coinciden con los resultados de Fietto et al., (2004), quienes compararon un aislado de un producto comercial de *S. boulardii* contra *S. cerevisiae*. Sin embargo, estos autores mostraron que la viabilidad de sus aislados disminuyó considerablemente en tan solo 60 minutos a pH 2.

Es importante considerar que la viabilidad de los probióticos puede verse afectada de manera importante por la composición de la matriz alimentaria que les rodea y que funciona como vehículo (Mattila-Sandholm et al., 2002), así como los constituyentes no ácidos de la secreción gástrica, por lo que su comportamiento pudiera ser más favorable en condiciones fisiológicas que en los ensayos *in vitro* (Palacio Delgado, 2005). Por esto, se debe de considerar que, tanto los resultados de los controles *L. rhamnosus* y *S. boulardii*, como los resultados con los aislados obtenidos de los productos MM pudieran ser más favorables al ingerirse junto con el excipiente, en el caso de los probióticos comerciales, y en el caso de los aislados de los MM, con sus respectivos medios sólido y líquido que les sirven de sustrato y alimento.

El estrés celular de los probióticos comienza en el estómago, con un pH que puede disminuir hasta 1.5. Después de pasar a través del estómago, los probióticos entran al tracto intestinal superior, donde es secretada bilis, la cual presenta concentraciones variables a lo largo del sistema. Luego de transitar por este ambiente hostil, los microorganismos colonizan el epitelio del tracto intestinal inferior. Así, los organismos usados como probióticos deben de ser capaces de tolerar el ambiente ácido por al menos durante 90 minutos, incluyendo las sales biliares (Chou y Weimer, 1999).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Durante la primera hora de digestión, las sales biliares presentan concentraciones desde 1.5 hasta 2% (p/v), y luego disminuye a 0.3% (Bao et al., 2010). Esta habilidad de supervivencia a través del tracto gastrointestinal superior se considera como el primer criterio en la selección de los probióticos (Succi et al., 2005).

En este trabajo las BAL y levaduras aisladas de preparados MMA se evaluaron bajo condiciones de pH ácido y sales biliares por 24 horas y mostraron un mejor comportamiento que los controles aislados de productos comerciales ante la simulación de las condiciones de estrés del tracto gastrointestinal, por lo que se puede inferir el potencial probiótico de las BAL y levaduras aisladas de los productos MM bajo estudio. Los resultados también explican en cierta forma los beneficios reportados sobre parámetros productivos, reproductivos y gastrointestinales del ganado suministrado con preparados MM, como lo proponen Montejo et al., (2017), Barreto Argilagos et al., (2015) y Restrepo y Hensel, (2007).

Sin embargo, este es un primer acercamiento sobre las dinámicas de la microbiota de los preparados MM, y sobre las relaciones entre la potencialidad probiótica y el origen del mantillo forestal usado como inóculo. Por esto, resulta de gran relevancia continuar con más evaluaciones y estudios sobre el tema, a fin de comprender mejor los procesos microbiológicos y bioquímicos que ocurren durante las fases sólida y líquida. Asimismo, resulta de gran relevancia confirmar la seguridad e inocuidad de los MM y el potencial probiótico de las BAL y levaduras presentes en estos productos, a través de ensayos y pruebas sobre su actividad antimicrobiana, resistencia a antibióticos, adhesión de patógenos, estudios in vivo en modelos animales, así como la identificación rigurosa de los grupos microbianos presentes, según las directrices internacionales para las declaraciones y aprovechamiento de los probióticos.

#### **4.4 GUIA DE RECOMENDACIONES PARA LA PREPARACIÓN DE LOS MM**

La guía técnica sobre recomendaciones en la elaboración de preparados MM se presenta en la Figura 33. Esta guía no busca incentivar la elaboración de los MM, más bien pretende presentar una serie de recomendaciones para productoras y productores que ya conozcan la técnica de reproducción de MM. La guía busca aportar a la mejora de los materiales ya existentes y a la preparación y uso responsable de los MM.

Durante la revisión de materiales y reportes de organizaciones civiles e instituciones gubernamentales sobre la reproducción de MM, se detectó que hay poco énfasis en los procesos y recomendaciones sobre el mantenimiento de la higiene y la calidad de los insumos y materiales para su preparación. Si bien se trata de una técnica artesanal con un fin principalmente agronómico, es importante tomar en cuenta ciertas prácticas que ayuden a disminuir problemas potenciales relacionados con las contaminaciones de origen biótico y abiótico durante los procesos de reproducción de microorganismos y fermentación en estado sólido y líquido. Estas recomendaciones son más relevantes cuando los productos MM se elaboran para suplementar la dieta del ganado. Existen similitudes entre los procesos de los productos MM, los procesos de ensilaje y los alimentos líquidos fermentados para ganado. Por esta semejanza, en los MM se pueden presentar errores en su manejo que pueden causar la presencia de bacterias y hongos oportunistas y/o patógenos. Estos contaminantes afectan la calidad del producto, disminuyen el desempeño de los animales y son una amenaza a la salud humana (Pahlow et al., 2003; Missotten et al., 2010). Entre las prácticas principales para mantener la calidad de los procesos de ensilaje están el uso de ingredientes de calidad, el mantenimiento de la anaerobiosis con una adecuada compactación y sellado de los contenedores, así como el evitar almacenamiento por largos periodos de tiempo (Queiroz et al., 2018).

Si bien, las y los productores no pueden acceder fácilmente a un laboratorio de microbiología, o incluso a tiras reactivas para medir el pH, si es posible obtener productos MM con buena calidad. Para ello es importante poner atención a ciertos procesos, a la calidad de los materiales utilizados y apoyarse en prácticas de verificación sensorial durante todo el proceso.

<p><b>¿USTED PREPARA MICROORGANISMOS DE MONTAÑA (MM)?</b></p> <p>A continuación, algunas recomendaciones para evitar problemas y tener productos de la mejor calidad posible</p> <p><b>Higiene</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lavarse las manos con agua y jabón antes de recolectar, preparar y manejar los MM.</li> <li>• Lavar con agua y jabón todas las herramientas y recipientes donde se transporten, preparen y almacenen los MM.</li> <li>• Usar recipientes que no hayan contenido químicos, basura u otro elemento que pueda dañar los MM.</li> <li>• Tomar la hojarasca de un lugar que esté lo más alejado posible, limpio, sin basura ni ganado</li> </ul> 	<p><b>Condición de los materiales e insumos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Usar agua purificada, o de pozo, sin clorar, para los todos los preparados MM.</li> <li>• Usar recipientes de plástico, que sellen bien, sin orificios o grietas.</li> <li>• No usar recipientes, tapas o conexiones de metal porque se corroen.</li> <li>• Preparar los MM en recipientes del tamaño que se necesite; igual que un silo, entre menos espacio de aire mejor.</li> <li>• Usar ingredientes que no tengan mucho tiempo guardados, estén húmedos o tengan hongos (melaza, salvado, piloncillo).</li> </ul> 	<p><b>Calidad de los preparados MM</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Transportar la hojarasca o mantillo de bosque en un recipiente limpio, oscuro y a temperatura ambiente.</li> <li>• Preparar los microorganismos de montaña sólidos (MMS) el mismo día que se recolectó la hojarasca o mantillo de bosque.</li> <li>• Compactar y sellar bien los MMS después de usarse.</li> <li>• Los MM deben de oler a fermento dulce agradable, con un poco de olor a alcohol, tener un color como la melaza o piloncillo, pudiendo ser más o menos oscuros.</li> <li>• No usar cualquier preparado MM si huele a podrido.</li> <li>• Dejar enfriar el piloncillo diluido en agua a temperatura ambiente antes de incorporar los MMS.</li> <li>• Cuidar el sellado de los recipientes y mantener con agua las trampas de aire.</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mantener los recipientes con los MM en un lugar limpio y a la sombra.</li> <li>• Preparar los MM considerando la cantidad a utilizar, evitar preparar de más y almacenar por mucho tiempo.</li> <li>• Con el tiempo pueden crecer hongos en los MMS, pero no es normal en los MMA, si crecen hongos "vellosos" en la superficie del líquido hay que desecharlos y volver a preparar.</li> </ul> <p><b>Fuentes de consulta</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Guznay D., C. (2016). Guía agroecológica para una agricultura resiliente en la parte baja de la subcuenta del río Daule. Quito: Agrónomos y veterinarios sin fronteras - AVSF.</li> <li>• Restrepo Rivera, J. (2013). El ABC de la agricultura orgánica, fosfitos y panes de piedra. Mérida: Uniprint.</li> <li>• Simón Zamora, J. I. (2016). Manual de microbiótica en la remineralización de suelos en manos campesinas. Guadalajara: Rápido-Print.</li> <li>• Suchini, J. (2012). Innovaciones agroecológicas para una producción agropecuaria sostenible en la región del Trifinio. Turrilba: CATIE.</li> </ul>  <p>Elaborado por: IA Darío Franco Contacto: #### ##</p>
--	---	---	--

Figura 33 Guía con recomendaciones para la elaboración de productos MM dirigido a productoras y productores agropecuarios.

## 5. CONCLUSIONES

Los preparados MM de los cinco sitios presentaron estabilidad en el pH tanto en la fase sólida como en la fase líquida. Por sus características, los preparados MM se pueden relacionar con los procesos de ensilaje, y al igual que en estos, el mantenimiento de anaerobiosis y pH ácido son unos de los factores más importantes para asegurar la calidad y viabilidad del producto final.

La diversidad de la microbiota de los preparados MM de los cinco sitios fue semejante, con valores similares en el conteo de mesófilos aerobios con siete unidades logarítmicas, potenciales bacterias ácido lácticas, cuyos valores oscilaron entre ocho y nueve unidades logarítmicas, y levaduras entre cinco y siete unidades logarítmicas. Además de mostrar inhibición de potenciales patógenos como enterobacterias, las cuales no se desarrollaron en cuatro sitios y estafilococos que no se detectaron en ningún sitio.

Se logró el aislamiento de 16 BAL y ocho levaduras; de estas, 10 BAL y cinco levaduras fueron sometidas a evaluaciones de potencial probiótico mediante pruebas de resistencia a pH 2, 4 y 0.3% de sales biliares. Todos los sitios produjeron aislados generalmente con mejor comportamiento, que los controles *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Saccharomyces boulardii* obtenidos de probióticos comerciales.

De los 10 aislados de BAL evaluadas, cinco se identificaron como *Lactobacillus* mediante PCR. Ninguno de los cinco aislados de levaduras evaluadas correspondieron al género *Saccharomyces*; sin embargo, por su comportamiento en las evaluaciones de simulación del trato gastrointestinal, las levaduras aisladas de los MM presentan potencial probiótico.

Los productos y aislados de los cinco sitios mostraron un comportamiento muy similar, a pesar de las diferencia entre especies de *Quercus* y variables relacionadas de sitio, como ubicación, altitud, fecha de colecta, características del mantillo forestal, así como el tiempo de almacenamiento de los MMS, los insumos utilizados y el método de preparación, que en el caso del sitio 5, contaba con cinco años de almacenamiento y una elaboración y manejo que se realizó sin cuidar la inocuidad del producto. Todo lo anterior indica que, aunque se trate de un método artesanal, se pueden lograr productos semejantes, con presencia considerable de BAL y su consecuente inhibición de potenciales patógenos.

Los resultados obtenidos en esta tesis representan un acercamiento preliminar para explicar los procesos que rodean a los preparados MM. Los resultados también permiten evaluar de manera indirecta, los beneficios potenciales de MM en el ganado. Sin embargo, es necesario realizar más evaluaciones, tanto *in vitro* como *in vivo* a fin de comprender en detalle los procesos bioquímicos y las dinámicas microbianas que rodean a los MM, y así poder asegurar su capacidad probiótica. El esfuerzo de este trabajo abona al conocimiento científico de los MM.



## 6. REFERENCIAS

- ACTo, JICA, y MAG. (2017). *Guía técnica para la difusión de tecnologías de producción agropecuaria sostenible*.
- Arizaga, S., Martínez-Cruz, J., Salcedo-Cabrales, M., y Bello-González, M. Á. (2009). Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos. En *Instituto Nacional de Ecología*.
- Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Wang, Y., y Zhang, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21(5), 695–701. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.010>
- Barreto Argilagos, G., de la Caridad Rodríguez Torrens, H., Bertot Valdés, J. A., y Delgado Fernández, R. (2015). Microorganismos autóctonos multipropósitos para el tratamiento de la colibacilosis neonatal porcina. *Rev. prod. anim*, 27(2).  
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=110038954&lang=es&site=ehost-live>
- Ben Amor, K., Vaughan, E. E., y de Vos, W. M. (2007). Advanced Molecular Tools for the Identification of Lactic Acid Bacteria. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 741S-747S.  
<https://doi.org/10.1093/jn/137.3.741S>
- Berg, B., y McClaugherty, C. (2008). *Plant Litter*. Springer Berlin Heidelberg.
- Brooks, P. H. (2008). Fermented liquid feed for pigs. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3(073).  
<https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20083073>
- Büchl, N. R., Hutzler, M., Mietke-Hofmann, H., Wenning, M., y Scherer, S. (2010). Differentiation of probiotic and environmental *Saccharomyces cerevisiae* strains in animal feed. *Journal of Applied Microbiology*, 109(3), 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04705.x>
- Campo, A. del P., Acosta, R. Li., Morales, S., y Prado, F. A. (2014). Evaluación de microorganismos de montaña (MM) en la producción de acelga de la meseta de Popayán. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(1), 79–87.
- Casco, X., y González, K. (2017). *Impacto sanitario y productivo en cerdos topig categoría de*

crecimiento en la granja Alba Porcina, Cofradía, con la administración de microorganismos de montaña como probióticos. Universidad Nacional Agraria.

Castro Barquero, L., Murillo Roos, M., Lorío, L. U., y Mata Chinchilla, R. (2015). *Inoculación al suelo con Pseudomonas fluorescens, Azospirillum oryzae, y su efecto sobre un sistema de rotación soya-tomate bajo condiciones de invernadero*. 39(3), 21–36.

CENTA. (2012). *Microorganismos Guía Técnica 4* (p. 4).

Centeno, J. (2012). *Microorganismos benéficos de montaña como bioestimulantes y probióticos contribuyentes al bienestar animal* [Universidad Nacional Agraria].  
<http://repositorio.una.edu.ni/1467/1/tnl02c397m.pdf>

Chiari, P. (2015). *Evaluación de forrajes enriquecidos con microorganismos de montaña en la producción y calidad de leche caprina*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.

Chou, L.-S., y Weimer, B. (1999). Isolation and Characterization of Acid- and Bile-Tolerant Isolates from Strains of Lactobacillus acidophilus. *Journal of Dairy Science*, 82(1), 23–31.  
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75204-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75204-5)

Cueto-Vigil, M. C., Acuña-eMonsalv, Y., y Valenzuela-Riaño, J. (2010). Evaluación in Vitro Del Potencial Probiótico De Bacterias. *Actual Biology*, 32(93), 129–138.

Cueto, C., García, D., Garcés, F., y Cruz, J. (2007). Preliminary studies on the microbiological characterization of lactic acid bacteria in suero costeño, a Colombian traditional fermented milk product. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 49(1–2), 12–18.

De Hoyos, K., Cardona, J., y Gomezccaceres, L. del C. (2019). Características probióticas de levaduras nativas aisladas de vacas lecheras de raza Gyr en el departamento de Sucre. En *Bioteología aplicada al sector agropecuario en el departamento de Sucre* (pp. 137–161).  
<https://doi.org/10.21892/9789585547063>

de la Cerda, M. (1999). *Encinos de Aguascalientes*. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Dubernet, S., Desmasures, N., y Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*, 214(2), 271–275.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00895-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00895-9)

FAO. (2006). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Estudios FAO alimentación y nutrición*, 85, 52.

file:///C:/Users/Acer/Documents/paty/homework1/PROBIOTICOS OPS 2006.pdf

Fietto, J. L. ., Araújo, R. S., Valadão, F. N., Fietto, L. G., Brandão, R. L., Neves, M. J., Gomes, F. C. ., Nicoli, J. R., y Castro, I. M. (2004). Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(8), 615–621. <https://doi.org/10.1139/w04-050>

Gaggìa, F., Mattarelli, P., y Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141(SUPPL.), S15–S28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031>

Gaia Orgánicos. (2019). *Gaia Orgánicos*. <http://gaiaorganicos.com.mx/>

Gavilanes-torres, L. E., Koch, A. R., Portero, P., y Carvajal-barriga, E. J. (2018). Dos nuevas especies de levaduras pertenecientes a la biodiversidad Ecuatoriana con potencial actividad probiótica. *Rev. Inst. Salud Pública Chile.*, 4, 18–25.

Geary, T. M., Brooks, P. H., Beal, J. D., y Campbell, A. (1999). Effect on weaner pig performance and diet microbiology of feeding a liquid diet acidified to ph 4 with either lactic acid or through fermentation with *pediococcus acidilactici*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(4), 633–640. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0010\(19990315\)79:4<633::aid-jsfa231>3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(19990315)79:4<633::aid-jsfa231>3.0.co;2-l)

Gonzalez Rumayor, V., Ruiz, O., García, E., y Vega, M. (2005). Aplicaciones de la Biotecnología en Seguridad Alimentaria. En S. Enríquez (Ed.), *Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAs)*. Genoma España. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Aplicaciones+de+la+Biotecnología+en+Seguridad+Alimentaria#1>

Guzñay, C. (2016). *Guía agroecológica para una agricultura resiliente en la parte baja de la Subcuenca del río Daule* (Vol. 0, Número 0). AGRÓNOMOS Y VETERINARIOS SIN FRONTERAS - AVSF.

Herrera, M. (2008). *Identificación polifásica de levaduras y bacterias ácido lácticas aisladas de aguamiel, pulque y semilla*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de

Ensenada.

INEGI. (1994). *Estudio Hidrológico del Estado de Aguascalientes*. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática.

Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., y Stalpers, J. A. (2008). *Dictionary of the Fungi* (10th ed.). CABI.

Krishna, M. P., y Mohan, M. (2017). Litter decomposition in forest ecosystems: a review. *Energy, Ecology and Environment*, 2(4), 236–249. <https://doi.org/10.1007/s40974-017-0064-9>

La Mierda de Vaca. (2019). *La Mierda de Vaca*. <http://lamierdadevaca.com/>

Landa-Salgado, P., Caballero-Cervantes, Y., Ramírez-Bribiesca, E., Hernandez-Anguiano, A. M., Ramírez-Hernández, L. M., Espinosa-Victoria, D., y Hernández-Sánchez, D. (2019). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico para becerros del altiplano mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(1). <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i1.4512>

Linton, A. H., y Hinton, M. H. (1988). Enterobacteriaceae associated with animals in health and disease. *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 71S-85S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb04646.x>

Liong, M.-T. (Ed.). (2011). *Probiotics* (Vol. 21). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20838-6>

López, G., y Carballo, R. (2014). *Efecto de la suplementación con microorganismos benéficos de montaña en pollos de engorde como probiótico natural, finca Santa Rosa, Universidad Nacional Agraria* [Universidad Nacional Agraria]. <https://repositorio.una.edu.ni/3149/1/tnq52l864.pdf>

López, J., y Wernli, C. (1984). *Ensilaje de maíz: algunas técnicas que mejoran su calidad* (pp. 33–38). Investigación y Progreso Agropecuario La Platina.

Luna, A. de L., Montalvo, L., y Rendón, B. (2003). Los usos no leñosos de los encinos en México. *Bol. Soc. Bot. Méx.*, 72(72), 107–117.

Martínez-Calderón, V. M., Siqueiros-Delgado, M. E., y Martínez-Ramírez, J. (2017). Checklist of the genus *Quercus* (Fagaceae) of Aguascalientes, México. *Check List*, 13(1), 2045.

<https://doi.org/10.15560/13.1.2045>

- Martínez, V., Siqueiros, M., y Martínez, J. (2017). *Especies del Genero Quercus (Fagaceae) presentes En El ANP Sierra Fría, Aguascalientes, México*. 25(71), 12–18.
- Martino, M. E., Bayjanov, J. R., Caffrey, B. E., Wels, M., Joncour, P., Hughes, S., Gillet, B., Kleerebezem, M., van Hijum, S. A. F. T., y Leulier, F. (2016). Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. *Environmental Microbiology*, 18(12), 4974–4989. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13455>
- Mattila-Sandholm, T., Blaut, M., Daly, C., Vuyst, L. De, Doré, J., Gibson, G., Goossens, H., Knorr, D., Lucas, J., Lähteenmaki, L., Mercenier, A., Saarela, M., Shanahan, F., y Vos, W. M. de. (2002). Food, GI-tract Functionality and Human Health Cluster: PROEUHEALTH. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14(2), 65–74. <https://doi.org/10.1080/08910600260081702>
- Mendoza, A. (2000). *Ecología, manejo y conservación de Quercus potosina y Q. eduardii en la Sierra Fría, Aguascalientes*.
- Missotten, J. A. M., Michiels, J., Degroote, J., y De Smet, S. (2015). Fermented liquid feed for pigs: An ancient technique for the future. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-6-4>
- Missotten, J. A. M., Michiels, J., Obyn, A., de Smet, S., y Dierick, N. A. (2010). Fermented liquid feed for pigs. *Archives of Animal Nutrition*, 64(6), 437–466. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2010.512725>
- Montejo, I., Lamela, L., Arece, J., Lay, M., y García, D. (2017). Effect of non-conventional diets with native microorganisms on pig rearing. *Pastos y Forrajes*, 40(4), 287–292.
- Muck, R. E. (2010). Silage microbiology and its control through additives. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(suppl spe), 183–191. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982010001300021>
- Narváez, P., Pedroza, R., Alonso, G., y Rodríguez Lemoine, V. (2005). Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 29–34.
- Nieto, L. I., Donolo, A. S., Bava, A. J., y Yantorno, O. M. (2004). Empleo de espectroscopia infrarroja transformada de fourier para diferenciar bacterias de importancia clínica. *Acta*

*Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 38(3), 289–295.

Nixon, K. C. (1993). The genus *Quercus* in Mexico. En T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, y J. Fa (Eds.), *Biological diversity of Mexico: origins and distribution* (pp. 447–458). Oxford University Press.

Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Elfrink, S. J., Oude Elferink, S. J. W. ., y Spoelstra, S. F. (2003). Microbiology of Ensiling. *Silage Science and Technology*, 42, 31–93.

Palacio Delgado, S. (2005). *Oviedo, 2005*. Universidad de Oviedo.

Paniagua, J. J. (2014). *Curso de especialización en agricultura orgánica*.

Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., y Kim, H.-Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>

Pasachova Garzón, J., Ramirez Martinez, S., y Muñoz Molina, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, 17(32), 25–38. <https://doi.org/10.22490/24629448.3631>

Pérez-Suárez, M. (2009). *Understanding the role of Pinus cembroides and Quercus potosina in water and nutrient dynamics in a semi-arid forest ecosystem of central northwest Mexico applying the functional matrix approach*. Instituto Potosino de investigación Científica y Tecnológica.

Pérez-Suárez, M., Arredondo-Moreno, J. T., Huber-Sannwald, E., y Vargas-Hernández, J. J. (2009). Production and quality of senesced and green litterfall in a pine-oak forest in central-northwest Mexico. *Forest Ecology and Management*, 258(7), 1307–1315. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.06.031>

Pérez Guerrero, P., Galán Sánchez, F., Gutiérrez Saborido, D., y Guerrero Lozano, I. (2014). Infecciones por enterobacterias. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(55), 3276–3282. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(14\)70768-1](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70768-1)

Queiroz, O. C. M., Ogunade, I. M., Weinberg, Z., y Adesogan, A. T. (2018). Silage review: Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4132–4142. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13901>

- Restrepo, J., y Hensel, J. (2007). *El ABC de la agricultura orgánica, fosfitos y panes de piedra : manual práctico*. Feriva.
- Reyes, J., y Rodriguez, L. (2012). Los probióticos: ¿cómo una mezcla de microorganismos hacen un gran trabajo? *Rev Mex Cienc Farm*, 43(1), 7–17.
- Rodríguez, D., Pérez, N., González, J., y Mazorra, C. (2018). *Microorganismos autóctonos multipropósitos en sistemas productivos de la provincia Ciego del Ávila. Estudio preliminar*. 7(2), 182–194.
- Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M. J., Laurencio, M., y Pérez, M. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos*, 6(1), 56–63.
- Sabás, J. (2011). *Taxonomía, diversidad y distribución de los encinos (Quercus spp.) del estado de San Luis Potosí, México*. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Sanders, M. E., Merenstein, D., Merrifield, C. A., y Hutkins, R. (2018). Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin*, 43(3), 212–225. <https://doi.org/10.1111/nbu.12334>
- SEMARNAT, y CONAFOR. (2014). *Inventario Estatal Forestal y de Suelos de Aguascalientes*.
- Sharpe, B., Hulin, M., Thorne-Wallis, J., y Wheals, A. (2014). Synteny analysis provides a route to design genus-specific PCR primers for rapid identification of all *Saccharomyces* species. *FEMS Yeast Research*, 14(3), 517–525. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12124>
- Simón, J. I. (2016). *Manual de microbiótica en la remineralización de suelos en manos campesinas*. (p. 93). Gaia Orgánicos.
- Sosa Ramírez, J., Breceda Solís Cámara, A., Leonor Jiménez Sierra, C., Íñiguez Dávalos, L., y Ortega Rubio, A. (2014). Manejo del Área Natural Protegida Sierra Fría, Aguascalientes: situación actual y desafíos. *Investigación y Ciencia*, 22(60), 71–77.
- Sossa, D., González, L., y Vanegas, M. (2009). Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* contaminantes en una planta colombiana de fermentación alcohólica. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 12(2), 163–172. <https://doi.org/10.31910/rudca.v12.n2.2009.702>

- Srivastava, A., Singh, P., Chandra, N., Tiwari, D., Shukla, V., Tiwari, A., y Kumar, S. (2018). Role of probiotics in control of gastrointess. *Journalism*, 13(2/3), 55–68.
- Stiles, M. E., y Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1–29. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0)
- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S., y Coppola, R. (2005). Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS Microbiology Letters*, 244(1), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.037>
- Suchini, J. (2012). *Innovaciones agroecológicas para una producción en la región del Trifinio Innovaciones agroecológicas* (Número 506). [https://app.box.com/download/external/f\\_2724900702/0/Innovaciones+agroecológicas+para+una+produccion+agropecuar+sostenible+en+la+región+del+Trifinio.pdf?embed\\_hash=vblb4byzgt3l3vs](https://app.box.com/download/external/f_2724900702/0/Innovaciones+agroecológicas+para+una+produccion+agropecuar+sostenible+en+la+región+del+Trifinio.pdf?embed_hash=vblb4byzgt3l3vs)
- Teuber, M. (2008). Lactic Acid Bacteria. En *Biotechnology* (pp. 325–366). Wiley-VCH Verlag GmbH. <https://doi.org/10.1002/9783527620821.ch10>
- Umaña, S., Rodríguez, K., y Rojas, C. (2017). ¿Funcionan realmente los microorganismos de montaña (MM) como estrategia de biofertilización? Un enfoque de ingeniería de biosistemas. *Revista de Ciencias Ambientales*, 51(2), 133–144. <https://doi.org/10.15359/rca.51-2.7>
- Van Winsen, R. L., Urlings, B. A. P., Lipman, L. J. A., Snijders, J. M. A., Keuzenkamp, D., Verheijden, J. H. M., y Van Knapen, F. (2001). Effect of Fermented Feed on the Microbial Population of the Gastrointestinal Tracts of Pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3071–3076. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3071-3076.2001>
- Vaughan-Martini, A., y Martini, A. (2011). *Saccharomyces Meyen ex Reess* (1870). En C. Kurtzman y J. Fell (Eds.), *The Yeasts* (4th ed., Vol. 2, pp. 733–746). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00061-6>
- Velázquez-López, A., Covatzin-Jirón, D., Toledo-Meza, M. D., y Vela-Gutiérrez, G. (2018). Bebida fermentada elaborada con bacterias ácido lácticas aisladas del pozol tradicional chiapaneco.

*CienciaUAT*, 13(1), 165. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i1.871>

Whitman, W. B. (2009). Volume 3: The Firmicutes. En P. Vos, G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. . Rainey, K.-H. Schleifer, y W. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Second). Springer. <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-68489-5>

Yakult. (2015). *Descripción y función tecnológica del producto lácteo fermentado denominado YAKULT*. [http://www.yakult.mx/uploads\\_yakult/galerias/222/imagen\\_Comunicado\\_especial\\_222.pdf](http://www.yakult.mx/uploads_yakult/galerias/222/imagen_Comunicado_especial_222.pdf)

Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. En *The Yeasts* (Número Wickerham, pp. 77–100). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044481312-1/50014-9>

Zavala, F. (1990). *Los encinos de México: un recurso desaprovechado*. 16(95), 43–51.

