



UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA

DECANATO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y FACULTAD DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Evaluación del Efecto Antagónico de las Bacterias Probióticas
Aisladas del Pulque frente a Microorganismos Patógenos

Para obtener el título de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

EVA MARIEL ORTEGA RODRÍGUEZ

Directora:

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz

Codirectora:

Mtra. Ana Rosa Huevo Sánchez

Asesores:

Dr. Elie Girgis El Kassis

Dra. Laura Contreras Mioni

Puebla, México



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla
Decanato de Ciencias Biológicas
Facultad de Biotecnología

Maestría en Biotecnología

Se aprueba la Tesis:

Evaluación del Efecto Antagónico de las Bacterias Probióticas
Aisladas del Pulque frente a Microorganismos Patógenos

EVA MARIEL ORTEGA RODRÍGUEZ

Comité Asesor

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz
Directora

Mtra. Ana Rosa Huezo Sánchez
Codirectora

Dr. Elie Girgis El Kassis
Asesor

Dra. Laura Contreras Mioni
Asesora

Puebla, México

DEDICATORIA

A mi papá, mi mamá y mi hermana.

Porque esto no sería posible sin ustedes.

A mi abuelita, Felicia.

A quien me hubiera encantado leerle este trabajo.

Toda la vida estaré agradecida por su apoyo y amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Beatriz Pérez Armendáriz, por ver potencial en mí e introducirme al fascinante mundo de los probióticos y los postbióticos, además de que siempre mantuvo la puerta de su oficina abierta cuando me topaba con problemas o preguntas sobre mi investigación. Asimismo, agradezco inmensamente a mi codirectora de tesis, la Mtra. Ana Rosa Huezo Sánchez, con quien tuve la dicha de compartir numerosas horas de trabajo en el Laboratorio de Biotecnología de la UPAEP. Esta investigación no hubiera sido posible sin su apoyo, supervisión y comprensión.

De igual manera, quisiera mostrar la más profunda gratitud y admiración a mis asesores, el Dr. Elie Girgis El Kassis y la Dra. Laura Contreras Mioni, ya que compartieron sus valiosos conocimientos conmigo durante mis comités tutoriales, además de que plantearon importantes correcciones y sugerencias a mi investigación para desafiarme a convertirme en una mejor científica. Asimismo, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), ya que gracias a sus becas tuve la oportunidad de continuar con mi formación académica y lograr uno de los tantos sueños que me he planteado y que hoy me ha sido posible cumplir.

Nada de esto podría haber sucedido sin mi familia. Agradezco infinitamente a mis padres, René y Tití, quienes han trabajado incansablemente para asegurarse de que cuente con todas las herramientas necesarias para convertirme en una mejor persona, además de que me han enseñado a enfrentarme a la vida con una sonrisa. Finalmente, a mi hermana Giovanna, agradezco porque siempre ha sido mi más grande apoyo, me ha escuchado sin importar lo repetitiva que fuera y se ha encargado de alegrar mis días con su particular sentido del humor.

Es un placer agradecer a todos aquellos que hicieron de este proyecto una tesis completa.

RESUMEN

El consumo inmoderado de los antibióticos representa un riesgo importante para la salud pública debido a la aparición de microorganismos patógenos multirresistentes. Por esta razón, la investigación científica se ha enfocado en el aprovechamiento de las bacterias probióticas aisladas de fuentes naturales para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. En este contexto, el objetivo del presente estudio consistió en evaluar el efecto antagónico *in vitro* de *L. plantarum*, *L. paracasei* y *B. mojavensis* aisladas de pulque sobre patógenos de relevancia médica en México. Para ello, se realizaron pruebas de antagonismo por enfrentamiento físico utilizando medios de crecimiento selectivos, así como pruebas de antagonismo por microdilución utilizando los postbióticos obtenidos de su fermentación, y se analizó la disminución en la densidad celular de cada especie de forma cualitativa y cuantitativa. Todos los productos probióticos y postbióticos mostraron un efecto inhibitorio significativo ($p < 0.05$) sobre el crecimiento de todos los patógenos, así como una relación dosis-respuesta en la que *E. coli* fue el microorganismo más susceptible y *S. aureus* el más resistente. Asimismo, fue posible identificar una mejora en las tasas de crecimiento específicas de los probióticos en aguamiel y un incremento en su actividad antimicrobiana al utilizar este sustrato, lo cual se atribuyó a su elevado contenido en fructooligosacáridos, aminoácidos y minerales. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente documento demuestran el potencial de las bebidas fermentadas como el pulque para la obtención de productos probióticos, postbióticos y prebióticos que sirvan como coadyuvantes en el tratamiento y prevención de las enfermedades infecciosas.

Palabras clave: Antagonismo microbiano, Probióticos, Postbióticos, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Bacillus mojavensis*, Aguamiel, Pulque.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AGM	Aguamiel
BAL	Bacterias Ácido-Lácticas
BM	<i>Bacillus mojavensis</i>
DO	Densidad Óptica
FIF	Fórmula Infantil Fermentada
FOS	Fructooligosacáridos
GOS	Galactooligosacáridos
IgA	Inmunoglobulina A
IMC	Índice de Masa Corporal
LPA	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>
LPL	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
MALDI-TOF	Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz
MAMP	Patrones Moleculares Asociados a Microbios
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
Mx	Muestra clínica
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patrones
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES GENERALES	12
1.1. Introducción	12
1.2. Planteamiento del Problema	14
1.3. Justificación	15
1.4. Preguntas de Investigación	16
1.5. Objetivos	16
1.5.1. Objetivo General	16
1.5.2. Objetivos Específicos.....	17
1.6. Hipótesis	17
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	18
2.1. Resistencia, Persistencia y Tolerancia a los Antimicrobianos.....	18
2.1.1. Bases Genéticas de la Resistencia a los Antibióticos	20
2.1.2. Mecanismos Moleculares de la Resistencia a los Antibióticos	21
2.2. Antimicrobianos Naturales: el Pulque	23
2.2.1. Propiedades Fisicoquímicas y Microbiológicas del Pulque.....	26
2.2.2. Introducción a las Bacterias Ácido-Lácticas.....	27
2.3. Probióticos, Prebióticos y Simbióticos	32
2.3.1. Mecanismos de Acción de los Probióticos	34
2.3.2. Mecanismos de Acción de los Prebióticos.....	36
2.3.3. Mecanismos de Acción de los Simbióticos	38

2.4. Introducción a los Postbióticos	39
2.4.1. Mecanismo de Acción de los Postbióticos.....	41
2.4.2. Aplicaciones Actuales de los Postbióticos.....	43
2.4.3. Postbióticos Derivados de <i>Lactobacillus</i> : Bacteriocinas	47
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.1. Etapa 1: Preparación de los Microorganismos bajo Estudio	51
3.1.1. Purificación y Caracterización de las Bacterias del Pulque.....	51
3.1.2. Análisis de la Cinética de Crecimiento en Caldo MRS	51
3.1.3. Cultivo de las Bacterias Patógenas ATCC y de Aislamiento Clínico	52
3.2. Etapa 2: Procesamiento del Aguamiel	52
3.2.1. Estandarización y Pasteurización del Aguamiel	52
3.2.2. Inoculación del Aguamiel: Obtención de un Simbiótico.....	53
3.2.3. Análisis de la Cinética de Crecimiento en Aguamiel	53
3.3. Etapa 3: Obtención de un Postbiótico en MRS y Aguamiel.....	54
3.3.1. Purificación del Postbiótico Obtenido en Caldo MRS	54
3.3.2. Purificación del Postbiótico Obtenido en Aguamiel.....	54
3.4. Etapa 4: Pruebas de Antagonismo con Probióticos	55
3.4.1. Pruebas de Antagonismo por Enfrentamiento Físico.....	55
3.4.2. Análisis Estadístico del Antagonismo Probiótico.....	56
3.5. Etapa 5: Pruebas de Antagonismo con Postbióticos	56
3.5.1. Pruebas de Antagonismo por Microdilución	56

3.5.2. Análisis Estadístico del Antagonismo Postbiótico	58
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
4.1. Etapa 1: Preparación de los Microorganismos bajo Estudio	59
4.1.1. Crecimiento de las Bacterias Probióticas en Caldo MRS	59
4.1.2. Crecimiento de los Patógenos ATCC y de Aislamiento Clínico	61
4.2. Etapa 2: Procesamiento del Aguamiel	63
4.2.1. Análisis de la Cinética de Crecimiento en Aguamiel	63
4.3. Etapa 3: Pruebas de Antagonismo con Probióticos	66
4.3.1. Pruebas de Antagonismo con Probióticos Individuales.....	66
4.3.2. Pruebas de Antagonismo con Mezclas de Probióticos	68
4.4. Etapa 4: Pruebas de Antagonismo con Postbióticos	71
4.4.1. Pruebas de Antagonismo con Postbióticos Individuales	71
4.4.2. Pruebas de Antagonismo con Mezclas de Postbióticos	79
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	87
5.1. Conclusiones	87
5.2. Perspectivas y trabajo futuro.....	88
ANEXOS	89
A.1. Identificación de las Bacterias Aisladas de Pulque: MALDI-TOF.....	89
A.2. Glosario	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismos más comunes de la resistencia a los antibióticos	21
Figura 2 Proceso tradicional para la elaboración del pulque	25
Figura 3 Mecanismos de acción de los microorganismos probióticos	34
Figura 4 Mecanismos de acción propuestos para los postbióticos	42
Figura 5 Metodología general para evaluar el antagonismo de los probióticos	50
Figura 6 Proceso de estandarización de los lotes de aguamiel	53
Figura 7 Metodología general de las pruebas de antagonismo probiótico	55
Figura 8 Diseño experimental del ensayo de antagonismo postbiótico.....	57
Figura 9 Curvas de crecimiento de los probióticos en caldo MRS.....	59
Figura 10 Crecimiento de las bacterias patógenas en caldo nutritivo.....	62
Figura 11 Curvas de crecimiento de los probióticos en aguamiel	63
Figura 12 Comparación del crecimiento probiótico en caldo MRS y aguamiel.....	64
Figura 13 Resultados del antagonismo probiótico individual	67
Figura 14 Resultados del antagonismo con mezclas de probióticos.....	69
Figura 15 Efectividad de los probióticos individuales y en mezclas	71
Figura 16 Crecimiento de los patógenos frente a los postbióticos en caldo MRS.....	73
Figura 17 Crecimiento de los patógenos frente a los postbióticos en aguamiel	74
Figura 18 Inhibición de <i>E. coli</i> Mx y <i>S. aureus</i> Mx con los postbióticos de <i>L. plantarum</i>	76
Figura 19 Inhibición de <i>E. coli</i> Mx con los postbióticos de <i>L. paracasei</i> y <i>B. mojavensis</i>	77
Figura 20 Inhibición de <i>S. aureus</i> 25923 con los postbióticos de <i>L. paracasei</i> y <i>B. mojavensis</i>	78
Figura 21 Crecimiento de los patógenos con los postbióticos de MRS en mezclas	80
Figura 22 Crecimiento de los patógenos con los postbióticos de aguamiel en mezclas.....	81

Figura 23 Inhibición de ambas cepas de <i>Salmonella</i> con los postbióticos de LPL+LPA	83
Figura 24 Inhibición de ambas cepas de <i>S. aureus</i> con los postbióticos de LPA+BM	84
Figura 25 Inhibición de ambas cepas de <i>E. coli</i> con los postbióticos de LPL+BM	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Grupos de antimicrobianos basados en su mecanismo de acción.....	19
Tabla 2 Efectos de las bacterias ácido-lácticas probióticas en ensayos clínicos	30
Tabla 3 Aplicaciones actuales de los postbióticos en la industria y la salud	45
Tabla 4 Clasificación de las Bacteriocinas	48
Tabla 5 Parámetros cinéticos de los probióticos en caldo MRS y aguamiel	65
Tabla 6 Resultados del antagonismo de los postbióticos individuales	75
Tabla 7 Resultados del antagonismo de los postbióticos en mezclas	82

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. Introducción

La introducción de los antibióticos en el tratamiento de diversas enfermedades microbianas revolucionó el curso de la medicina moderna, ya que les permitió a los seres humanos enfrentarse de manera efectiva a condiciones que, hasta ese entonces, conducían a su muerte (Byrne et al., 2019). Sin embargo, el uso indiscriminado e irresponsable de los antibióticos también ha generado problemas importantes para la salud pública, particularmente debido a la aparición de cepas resistentes a dichos compuestos, lo cual ha afectado no solo al tratamiento primario de las infecciones, sino también al uso profiláctico de los antibióticos en procedimientos quirúrgicos de rutina (Fowler et al., 2014).

En este contexto, de acuerdo con un estudio realizado en febrero de 2017 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en conjunto con la División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Tubinga en Alemania, cerca de 700 mil personas mueren cada año debido a infecciones causadas por agentes resistentes a diversos antibióticos, pero se prevé que esta cifra aumente hasta los 10 millones de muertes anuales para el año 2050 si no se implementan medidas preventivas y de control inmediatas (Talebi et al., 2019).

Por este motivo, resulta indispensable incluir enfoques multidisciplinarios que permitan revertir el daño producido por el consumo indiscriminado de los antibióticos, así como continuar con el tratamiento de las enfermedades que aquejan a la población. En consecuencia, en los últimos años la investigación científica se ha enfocado en la búsqueda de terapias antimicrobianas alternativas basadas en el uso de productos naturales, ya sea con el objetivo de reducir la selección de microorganismos resistentes, o bien, para reemplazar definitivamente el uso de los antibióticos en el tratamiento de ciertas patologías (Aslam et al., 2018).

Una de las propuestas más relevantes incluye la implementación de bacterias probióticas como agentes antimicrobianos preventivos o complementarios en el tratamiento de las infecciones, dado que numerosos ensayos clínicos han demostrado que son eficaces contra una amplia gama de afecciones patológicas, tales como la diarrea, el síndrome de ovario poliquístico, la colitis ulcerosa, el estrés, la ansiedad, la enfermedad inflamatoria intestinal, el cáncer de mama y la diabetes (Kechagia et al., 2013). Esto es posible gracias a que los microorganismos probióticos cuentan con la capacidad de colonizar al huésped después de su ingesta y de contribuir a su salud regulando el microbioma y realizando otras funciones biológicas importantes como la diferenciación del sistema inmunológico, la síntesis de nutrientes y el incremento de la resistencia contra microorganismos patógenos (D. Silva et al., 2020).

En México, de acuerdo con la farmacopea tradicional, el consumo de alimentos fermentados como el pulque, el tepache y el pozol ha sido asociado a numerosos beneficios nutricionales gracias a la presencia de bacterias ácido-lácticas con potencial probiótico (Escalante et al., 2004). Particularmente, las bacterias aisladas del pulque han demostrado una importante actividad antimicrobiana, además de que su ingesta representa una fuente rica en hierro, ácido ascórbico, riboflavina, folato y saponinas esteroides bioactivas (Pérez-Armendáriz & Cardoso-Ugarte, 2020). Por esta razón, la presente investigación tiene como principal objetivo analizar el efecto antagónico *in vitro* de las bacterias probióticas aisladas de una muestra de pulque frente a diversos patógenos de relevancia médica en el país. Para ello, se llevó a cabo un análisis comparativo del crecimiento de los microorganismos patógenos frente a las bacterias probióticas y a los postbióticos obtenidos de su fermentación individual o en mezclas de dos componentes. Asimismo, se evaluó el efecto prebiótico del aguamiel con respecto al caldo MRS para el enriquecimiento selectivo de los bacilos y lactobacilos en el laboratorio.

1.2. Planteamiento del Problema

Como se mencionó en el apartado anterior, el consumo irracional de los antibióticos ha producido consecuencias graves en el ámbito de la salud pública, particularmente debido a la difusión de microorganismos patógenos multirresistentes. Sumado a lo anterior, es importante considerar la relación entre el contexto socioeconómico y la prevalencia de las enfermedades infecciosas en México, especialmente aquellas causadas por agentes multirresistentes, ya que las poblaciones marginadas presentan una mayor vulnerabilidad ante las enfermedades transmisibles, además de que carecen de servicios de atención médica de calidad una vez que han sido infectados (Alsan et al., 2011). Por lo tanto, la implementación de nuevas terapias antimicrobianas que atiendan esta problemática de forma inmediata resulta indispensable.

En este sentido, debido a que numerosos estudios científicos han reportado que los probióticos actúan de forma efectiva en el tratamiento y la prevención de las enfermedades infecciosas (D. Silva et al., 2020), es necesario continuar con el estudio del efecto antimicrobiano de las bacterias probióticas provenientes de diversas fuentes alimentarias tradicionales, ya que de esta manera será posible proponer su consumo como un complemento preventivo o como un sustituto definitivo al tratamiento con antibióticos más económico, eficaz y accesible.

De hecho, en México se han transmitido invaluable técnicas ancestrales para la preparación artesanal de numerosas bebidas fermentadas enriquecidas con microorganismos probióticos, tales como el pulque, el atole, el tepache, el pozol y el chorote (Pérez-Armendáriz & Cardoso-Ugarte, 2020). Por ejemplo, en el caso del pulque, su consumo puede remontarse a la época olmeca, alrededor del año 2000 a. C., alcanzando su producción máxima a mediados del siglo XX. Sin embargo, cuando las condiciones de salubridad en su proceso de elaboración fueron cuestionadas por el Estado mexicano, los conocimientos tradicionales fueron eclipsados

por un sistema mediado por procedimientos burocráticos, lo cual terminó por generar un rechazo contundente en su consumo y una disminución en su notoriedad como elemento para la futura investigación científica (Montes, 2014). Por este motivo, es primordial continuar con la investigación sobre la actividad de las bacterias ácido-lácticas y bacilos que forman parte de la microbiota natural de las bebidas fermentadas tradicionales como el pulque, ya que de este modo será posible erradicar las concepciones erradas que llevaron a una baja tanto en la producción como en el estudio de esta bebida endémica mexicana.

1.3. Justificación

Si bien es cierto que el potencial antimicrobiano de las bacterias ácido-lácticas aisladas de alimentos fermentados ha sido documentado con anterioridad (Mathur et al., 2020; Serna et al., 2011; Soemarie et al., 2021), la información sobre el potencial probiótico y postbiótico de estas bacterias cuando son aisladas de bebidas tradicionales mexicanas es muy limitada. Por esta razón, el presente proyecto de investigación propone un nuevo enfoque en el que se evalúa el efecto antimicrobiano de las bacterias probióticas aisladas del pulque frente a diferentes microorganismos patógenos de relevancia médica en el país, además de que se compara su efectividad sobre bacterias autóctonas provenientes de aislamientos clínicos y sus respectivas cepas de colección ATCC. De este modo, se espera que los hallazgos reportados permitan aprovechar el potencial de esta bebida endémica mexicana en el diseño de agentes preventivos o de coadyuvantes en el tratamiento de enfermedades infecciosas prevalentes en el país.

Asimismo, en vista de que las bacterias ácido-lácticas presentan requerimientos nutricionales complejos que consecuentemente elevan los costos de mantenimiento y producción a gran escala (Sánchez et al., 2019), en el presente documento se analiza el efecto prebiótico del

aguamiel y se compara con el caldo MRS para el enriquecimiento selectivo de los lactobacilos, ya que de esta manera será posible proponer su uso como un medio de cultivo más económico.

Finalmente, debido a que el pulque es una bebida tradicional mexicana que refleja la cosmovisión de sus pueblos, se espera que los resultados derivados de la presente investigación funcionen como una herramienta para erradicar los prejuicios que han disminuido su consumo y que han terminado por afectar económicamente a los productores de estas bebidas ancestrales, además de que motive a otros investigadores a continuar con el estudio del potencial antimicrobiano de éste y otros alimentos fermentados endémicos.

1.4. Preguntas de Investigación

- ¿Las bacterias probióticas aisladas de pulque son capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de microorganismos patógenos de relevancia médica en México?
- ¿Los productos postbióticos derivados de la fermentación de las bacterias probióticas aisladas de pulque son capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de microorganismos patógenos de relevancia médica en México?
- ¿El efecto prebiótico del aguamiel puede aprovecharse para el enriquecimiento selectivo de los bacilos y lactobacilos en el laboratorio, así como para estimular la producción de metabolitos antimicrobianos?

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

Evaluar el efecto antagónico *in vitro* de las bacterias probióticas aisladas de una muestra de pulque sobre distintos patógenos de relevancia médica en México, para así valorar el

potencial de las bebidas fermentadas tradicionales como coadyuvantes en el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Implementar la elaboración de un producto postbiótico a partir de la fermentación de las bacterias ácido-lácticas y bacilos aislados del pulque.
- Evaluar el efecto antagónico de las bacterias ácido-lácticas aisladas de una muestra de pulque sobre distintos patógenos de relevancia médica en México.
- Evaluar el efecto antagónico del producto postbiótico obtenido sobre distintos patógenos de relevancia médica en México.
- Comparar el efecto prebiótico del aguamiel con respecto al caldo MRS para el enriquecimiento selectivo de los bacilos y lactobacilos.

1.6. Hipótesis

- Las bacterias probióticas aisladas de pulque son capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de microorganismos patógenos de relevancia médica en México.
- Los productos postbióticos obtenidos de la fermentación de las bacterias aisladas del pulque son capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de diversos patógenos.
- Los probióticos y postbióticos derivados de la combinación de cepas bacterianas muestran un efecto sinérgico para inhibir el crecimiento *in vitro* de diversos patógenos.
- El efecto prebiótico del aguamiel permite el mantenimiento de los bacilos y lactobacilos en el laboratorio, así como la producción de metabolitos antimicrobianos, con una eficacia similar a la del caldo MRS.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Resistencia, Persistencia y Tolerancia a los Antimicrobianos

La disponibilidad de las terapias basadas en el uso de antibióticos ha sido fundamental para incrementar la esperanza de vida de la población general, así como para garantizar el éxito de las cirugías invasivas y de alta gama, incluidos los trasplantes de órganos y los tratamientos inmunomoduladores en reumatología, oncología y muchas otras disciplinas médicas (Huemer et al., 2020). Sin embargo, dado que los nuevos medicamentos antimicrobianos son escasos y que un número mayor de bacterias se está convirtiendo en resistentes a múltiples antibióticos, la propagación rápida y masiva de enfermedades infecciosas se ha convertido en una gran amenaza para los sistemas de atención médica modernos (World Economic Forum, 2019).

Por esta razón, a pesar de que en la naturaleza existen microorganismos que presentan una resistencia intrínseca a ciertos compuestos antibióticos de manera independiente a sus niveles de exposición, la prescripción inadecuada de una terapia antimicrobiana, así como un incremento en su consumo, han favorecido la aparición desmesurada de nuevos microorganismos multirresistentes (Reygaert, 2018). No obstante, es importante mencionar que las bacterias patógenas también pueden evadir a los antibióticos a través de mecanismos de persistencia y tolerancia. De este modo, la resistencia se define como la capacidad de las bacterias para sobrevivir y replicarse en presencia de un fármaco, mientras que la persistencia es la capacidad de un subconjunto de células de entrar en un estado metabólicamente reprimido (dormancia) para soportar por mayor tiempo la exposición a una concentración de fármaco bactericida (Balaban et al., 2019). Por otro lado, las bacterias tolerantes son aquellas que resultan de la exposición repetida a sustancias antibióticas durante varias generaciones, lo cual termina por convertirlas en células resistentes (Hossain et al., 2021).

De manera general, los agentes antimicrobianos pueden clasificarse en cinco grupos: 1) agentes que inhiben la síntesis de la pared celular, 2) compuestos que despolarizan la membrana celular, 3) agentes que inhiben la síntesis de proteínas, 4) compuestos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos y 5) agentes que inhiben ciertas vías metabólicas (Reygaert, 2018). Como resultado, el personal de salud tiene la obligación de mantenerse informado sobre los agentes antimicrobianos modernos y sus mecanismos de acción, ya que esto determinará su efectividad en el tratamiento de diversas patologías (Prabh-Singh et al., 2021). A continuación, en la **Tabla 1** se presentan algunos ejemplos de compuestos antimicrobianos comunes para cada uno de los mecanismos de acción mencionados.

Tabla 1

Grupos de antimicrobianos basados en su mecanismo de acción

Mecanismo de acción	Grupo antimicrobiano
Inhibición de la síntesis de la pared celular	β -lactamas Carbapenémicos Cefalosporinas Monobactamas Penicilinas Glucopéptidos
Despolarización de la membrana celular	Lipopéptidos
Inhibición de la síntesis de proteínas	Se unen a la subunidad ribosómica 30S Aminoglucósidos Tetraciclinas Se unen a la subunidad ribosómica 50S Cloranfenicol Lincosamidas Oxazolidinonas Macrólidos Estreptograminas
Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	Quinolonas Fluoroquinolonas
Inhibición de vías metabólicas	Sulfonamidas Trimetoprima

2.1.1. Bases Genéticas de la Resistencia a los Antibióticos

Los genomas bacterianos poseen una elevada plasticidad que, junto con los tiempos de generación típicamente cortos, les permiten a las células responder de manera eficiente y efectiva a una amplia gama de amenazas ambientales, incluyendo la presencia de moléculas antibióticas que ponen en riesgo su supervivencia (Verma et al., 2019). Desde un punto de vista evolutivo, las bacterias patógenas pueden utilizar dos estrategias para defenderse del ataque de los antibióticos: la generación de cambios mutacionales en genes asociados al mecanismo de acción del fármaco, y la adquisición de ADN exógeno que codifica determinantes de resistencia a través de la transferencia horizontal de estos genes (Munita & Arias, 2001).

En el primer escenario, las bacterias provenientes de una población susceptible a un antibiótico desarrollan mutaciones que disminuyen su penetrabilidad al sitio de acción en la célula, de tal forma que el fármaco termina por eliminar al resto de las células sensibles para que predominen las resistentes (Munita & Arias, 2001). En este sentido, a pesar de que desde un punto de vista energético las bacterias portadoras de mutaciones podrían parecer menos aptas que los organismos de tipo salvaje, éste es un fenómeno temporal compensado por mutaciones adicionales que favorecen su estabilidad incluso en ausencia de presión selectiva, es decir, aún al prescindir del uso de antibióticos (Verma et al., 2019).

Por otro lado, en el caso de la transferencia horizontal de genes, las bacterias patógenas son capaces de adquirir material genético exógeno a partir de tres mecanismos principales: la transformación, la transducción y la conjugación (Munita & Arias, 2016). Durante la transformación, los genes de resistencia del ADN bacteriano muerto son integrados a un cromosoma receptor mediante un proceso conocido como recombinación homóloga, mientras que en la conjugación la integración del material genético está mediada por elementos genéticos

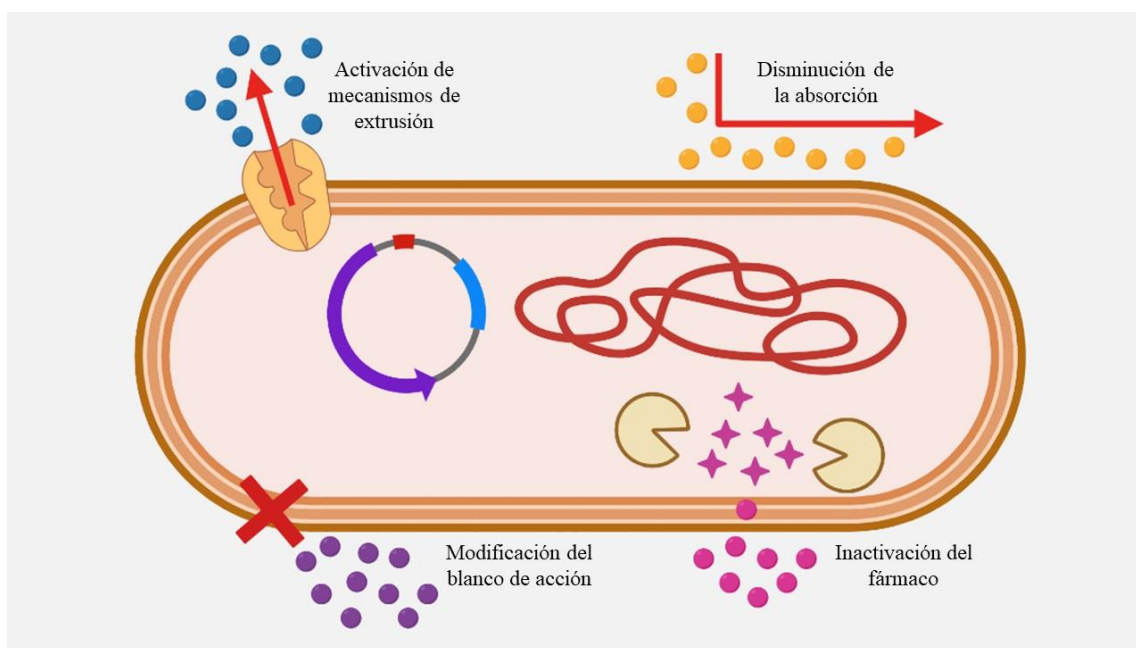
móviles como los plásmidos y los transposones, y en la transducción por bacteriófagos que infectan a nuevas especies bacterianas (Hasan et al., 2022).

2.1.2. Mecanismos Moleculares de la Resistencia a los Antibióticos

Así como las bases genéticas de la resistencia a los antimicrobianos pueden variar entre microorganismos, existen diversos mecanismos moleculares que les permiten interactuar y defenderse de estos compuestos, de los cuales, cuatro muestran una alta prevalencia en los aislamientos clínicos: 1) la disminución en la absorción del fármaco, 2) las modificaciones en el blanco de acción, 3) la inactivación del fármaco y 4) la activación de mecanismos de extrusión (Reygaert, 2018). A continuación, la **Figura 1** muestra un resumen esquemático de los mecanismos de resistencia mencionados.

Figura 1

Mecanismos más comunes de la resistencia a los antibióticos



Nota. Adaptado de “An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria” por W. Reygaert, 2018, AIMS Microbiology, 4 (3).

De este modo, tanto la absorción como la concentración intracelular de un antibiótico se pueden reducir al impedir su entrada a la célula, lo cual es particularmente relevante en el caso de las bacterias Gram negativas, ya que su membrana externa forma una barrera de permeabilidad eficiente (Baylay et al., 2019). Por su parte, las bacterias que no poseen pared celular son intrínsecamente resistentes a todos los fármacos dirigidos a esta estructura, mientras que las bacterias que producen biopelículas de polisacáridos dificultan la entrada y acción de numerosos agentes antimicrobianos (Reygaert, 2018).

Asimismo, debido a que la mayoría de los antibióticos se unen de forma específica a los receptores celulares que presentan una elevada afinidad, los cambios estructurales en sus sitios de unión impiden su actividad normal y le confieren resistencia a la célula (Blair et al., 2015). De manera similar, las bacterias pueden inactivar a los fármacos a través de la transferencia de grupos químicos como el acetilo, fosforilo y adenilo, o bien, a través de enzimas que son capaces de degradar al fármaco, como ocurre con las β -lactamasas que hidrolizan a los antibióticos de la familia de las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos (Reygaert, 2018).

Finalmente, los genomas bacterianos codifican múltiples bombas de exclusión que eliminan moléculas que resultan tóxicas para la célula, además de que desempeñan una función importante en la determinación del nivel intrínseco de susceptibilidad de una especie bacteriana a un fármaco, ya que pueden generar un fenotipo resistente cuando se sobreexpresan (Baylay et al., 2019). En este contexto, existen cinco familias de bombas de extrusión bacterianas de acuerdo con su estructura y fuente de energía: 1) la familia ABC de casetes de unión a ATP, 2) la familia MATE de extrusión de compuestos tóxicos y multifármacos, 3) la pequeña familia SMR de resistencia a múltiples fármacos, 4) la superfamilia facilitadora MFS y 5) la familia RND de división celular y nodulación de resistencia (Sun et al., 2014).

2.2. Antimicrobianos Naturales: el Pulque

La resistencia a los antibióticos es una crisis multifacética que impone una grave amenaza para la salud pública alrededor del mundo. Por esta razón, el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas se ha enfocado en el aprovechamiento de los productos naturales, los cuales han sido utilizados como poderosos remedios contra diversas bacterias patógenas desde la época dorada de los antibióticos a mediados del siglo XX (Rossiter et al., 2017). En este contexto, varios estudios han informado los beneficios para la salud de los alimentos fermentados, los cuales contienen microorganismos generalmente considerados como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés), y que pueden producir una serie de subproductos o metabolitos beneficiosos como péptidos antimicrobianos, etanol, ácidos orgánicos y ácidos grasos, entre otros (Mathur et al., 2020). No obstante, la elaboración de alimentos y bebidas fermentados no constituye una técnica nueva y poco desarrollada, sino que durante milenios los seres humanos han utilizado a las bacterias y levaduras para mejorar el proceso de conservación de los alimentos, así como su contenido nutricional, consistencia y sabor (Chacón-Vargas et al., 2020).

Un ejemplo de lo anterior es el pulque, una bebida alcohólica tradicional mexicana que se produce a partir de la fermentación de una savia conocida como aguamiel, la cual puede extraerse de una gran variedad de especies de maguey como *Agave americana*, *Agave atrovirens*, *Agave mapisaga* y *Agave salmiana*, entre otras (Pérez-Armendáriz & Cardoso-Ugarte, 2020). Aunado a lo anterior, el aguamiel no solo ha sido utilizado para la producción de bebidas alcohólicas destiladas y no destiladas con reconocimiento nacional e internacional, sino que también se ha aprovechado para la elaboración de miel de agave, pan de pulque, jarabes de alta fructosa y fructanos de agave como ingredientes para alimentos y piensos con un mayor valor nutricional (Jasso-Padilla et al., 2017).

Aunque en la actualidad el pulque se produce de forma artesanal en los estados centrales y zonas rurales del territorio mexicano (Escalante et al., 2016), su consumo se remonta a tiempos prehispánicos cuando la cultura azteca se encontraba en su máximo esplendor, ya que como ha sido representado en relieves tallados en piedra en las distintas zonas arqueológicas del país, el pulque era considerado una bebida de los dioses que tomaba gran relevancia durante las celebraciones religiosas y rituales sagrados (Muñoz-Aparicio & García, 2021).

Como se muestra en la **Figura 2**, el proceso de elaboración del pulque comienza con la selección de las plantas de agave con entre 6 y 15 años de maduración, de tal forma que su capullo floral pueda ser cortado simulando una cavidad capaz de almacenar aproximadamente 2 litros. Posteriormente, el aguamiel es recolectado y se transporta en toneles de madera o en sacos de piel de cabrito, para después transferirlo a grandes contenedores de plástico, madera o arcilla. El proceso de fermentación concluye alrededor de las 12 a 24 horas después de la transferencia, con una concentración final de alcohol que varía entre el 3 y el 6% (Escalante et al., 2004; Valadez-Blanco et al., 2012). De este modo, la fermentación del pulque es un proceso discontinuo y sin agitación realizado en condiciones no asépticas, por lo que su comunidad microbiana nativa está conformada por aquellas bacterias, hongos y levaduras que se presentan naturalmente durante la acumulación de la savia dentro de la cavidad del cajete en el maguey, así como los incorporados durante la recolección, transporte, preparación y manipulación de las semillas (Escalante et al., 2004). En este sentido, a pesar de que la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-199-SCFI-2015 establece las propiedades fisicoquímicas deseables del pulque para su consumo directo (Diario Oficial de la Federación, 2016), durante la elaboración tradicional el grado de fermentación puede variar según el productor y se considera adecuado cuando se alcanza una textura característica (Escalante et al., 2004).

Figura 2

Proceso tradicional para la elaboración del pulque



Nota. Adaptado de “Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects” por A. Escalante, 2016, *Frontiers in Plant Science* 11.

2.2.1. *Propiedades Fisicoquímicas y Microbiológicas del Pulque*

Los principales atributos que determinan las cualidades del pulque son su viscosidad, acidez y contenido alcohólico, los cuales son conferidos por los microorganismos que forman parte de su proceso de fermentación (Álvarez-Ríos et al., 2020). De este modo, la viscosidad del pulque se asocia principalmente con el metabolismo de las bacterias del género *Leuconostoc*, que acidifican la savia utilizando sacarosa y produciendo dióxido de carbono y polisacáridos extracelulares. Por otro lado, las bacterias del género *Lactobacillus* son responsables de la producción de ácido láctico y ácido acético, los cuales disminuyen el valor del pH final (entre 3.5 y 4.2), al mismo tiempo que favorecen la formación de compuestos aromáticos que influyen en la calidad y el sabor. Finalmente, el contenido de etanol del pulque, que varía entre el 3 y el 6%, es el resultado del metabolismo de los azúcares por parte de las levaduras de los géneros *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, así como de la bacteria *Zymomonas mobilis*, que además producen vitaminas, aminoácidos y compuestos volátiles que influyen en el sabor y en el perfil aromático (Álvarez-Ríos et al., 2020; Chacón-Vargas et al., 2020).

A pesar de lo anterior, es necesario mencionar que la composición microbiana del pulque no se mantiene constante, sino que varía significativamente como consecuencia de la acumulación de los metabolitos a medida que avanza el proceso de fermentación. De esta manera, después de las primeras tres horas, las bacterias *Lactobacillus spp.*, *Enterobacter agglomerans*, y *Leuconostoc mesenteroides*, así como levaduras de tipo no *Saccharomyces*, se convierten en las especies predominantes. En contraste, al final del proceso de fermentación, la diversidad microbiana se compone principalmente por bacterias *L. acidophilus* y *L. lactis* homofermentativas, así como por bacterias *L. mesenteroides* heterofermentativas y levaduras productoras de etanol (Escalante et al., 2008; Lappe-Oliveras et al., 2008).

Adicionalmente, el aguamiel que se utiliza para la producción del pulque se caracteriza por su elevado contenido en azúcares reductores como la glucosa y la fructosa, así como por la presencia de fructooligosacáridos (FOS), minerales (como el potasio, calcio, sodio y hierro), aminoácidos, vitaminas del complejo B, ácido ascórbico y saponinas con actividad antiinflamatoria (Romero-López et al., 2015). En este sentido, los fructanos de la savia del agave se consideran compuestos prebióticos porque son resistentes a la digestión humana y llegan intactos al colon, donde pueden estimular el crecimiento de microorganismos beneficiosos (por ejemplo, bifidobacterias y lactobacilos), además de estimular la producción de ácidos grasos libres por parte de la microbiota del colon, los cuales disminuyen el nivel de glucosa en la sangre, favorecen la homeostasis de los lípidos e incrementan los procesos de absorción de los minerales (Escobedo-García et al., 2020).

2.2.2. Introducción a las Bacterias Ácido-Lácticas

Como se estudió en el apartado anterior, las propiedades fisicoquímicas y nutricionales del pulque dependen en gran medida de la actividad de las bacterias productoras de ácido láctico con potencial probiótico. En este sentido, las bacterias ácido-lácticas (BAL) pueden definirse como un grupo de cocos y bacilos grampositivos, que no forman esporas y que presentan una respiración anaerobia aerotolerante (de Filippis et al., 2020). Asimismo, estas bacterias se caracterizan por la producción de ácido láctico como producto final del catabolismo de los carbohidratos, así como de sustancias inhibidoras del crecimiento de microorganismos competidores como bacteriocinas, polioles y peróxido de hidrógeno (Bintsis, 2018).

En 1919 las investigaciones de Orla Jensen sentaron las bases para la clasificación de las bacterias del ácido láctico en función de su morfología celular, los productos obtenidos de su fermentación, su capacidad para utilizar azúcares y su temperatura óptima de crecimiento (Ayivi

et al., 2020). Como resultado, este sistema de clasificación reconoció sólo cuatro géneros de bacterias ácido-lácticas: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*.

Adicionalmente, estas bacterias pueden clasificarse como organismos homofermentativos o heterofermentativos de acuerdo con su capacidad para llevar a cabo la fermentación del ácido láctico. De este modo, las BAL homofermentativas únicamente producen ácido láctico a partir de los azúcares disponibles en el medio, mientras que las BAL heterofermentativas producen ácido láctico, ácido acético o alcohol y dióxido de carbono (de Filippis et al., 2020).

En la actualidad, las bacterias del ácido láctico constituyen un grupo diverso de microorganismos seguros y de elevada importancia industrial, ya que se utilizan como cultivos iniciadores en la fermentación de diversos productos lácteos, vegetales, carnes, pescados y cereales, así como para la producción de alimento para ganado en forma de ensilaje (Hatti-Kaul et al., 2018). De igual modo, otras aplicaciones importantes de las BAL incluyen su uso como vehículos para la administración de medicamentos como proteínas terapéuticas y vacunas de ADN, así como su aprovechamiento en la catálisis biológica de materias primas renovables para la fabricación de productos con un alto valor agregado en los sectores alimentarios y no alimentarios (Wu et al., 2017). No obstante, estos microorganismos exhiben necesidades nutricionales complejas, ya que precisan del enriquecimiento de su medio de cultivo con aminoácidos, péptidos, bases nucleotídicas, vitaminas, minerales, ácidos grasos y carbohidratos, por lo que muestran un mayor crecimiento en sustratos alimentarios ácidos en contraste con lo observado en medios artificiales comerciales (Mokoena, 2017).

Sumado a lo anterior, las propiedades funcionales de las bacterias ácido-lácticas han sido ampliamente reportadas en la literatura en poblaciones sanas y enfermas. Así pues, como se muestra en la **Tabla 2**, la mayoría de los ensayos clínicos han evaluado el efecto probiótico de

distintas formulaciones compuestas por bacterias del ácido láctico en una concentración aproximada de 10^9 y 10^{10} células al día por vía oral. En este sentido, se ha propuesto la suplementación de estas bacterias enriquecidas con *Bifidobacterium spp.* y fibras prebióticas en el tratamiento o mejora de los síntomas de enfermedades del intestino, desórdenes metabólicos, trastornos mentales e infecciones bacterianas, así como también para mejorar el rendimiento físico durante el ejercicio y fortalecer la respuesta inmunológica en lactantes.

Más específicamente, durante el tratamiento de pacientes adultos que presentaban síndromes inflamatorios del intestino, la administración de una mezcla de 4 a 6 cepas de *Lactobacillus spp.* resultó en una mejora significativa en los síntomas de hinchazón (Oh et al., 2019; Yılmaz et al., 2019). Adicionalmente, en el tratamiento de infecciones bacterianas, la formulación con diferentes cepas de *L. acidophilus*, *L. paracasei* y *B. lactis* condujo a una disminución importante en los eventos de colonización por *Pseudomonas* en pacientes hospitalarios tratados con amoxicilina (Wieërs et al., 2021), así como a una reducción en la incidencia de la diarrea causada por *C. difficile* en adultos mayores (de Wolfe et al., 2018). Finalmente, en estudios independientes, la administración de *L. plantarum* resultó en una disminución significativa en la fatiga durante el ejercicio en adultos sanos sin entrenamiento atlético (Huang et al., 2019), así como en una reducción de los comportamientos desafiantes y de oposición en niños diagnosticados con autismo (Liu et al., 2019). No obstante, es importante mencionar que ninguno de los estudios incluidos en esta revisión presentó una justificación sobre las dosis administradas de acuerdo con las cepas y tipos de poblaciones objetivo. Por lo tanto, es necesario evaluar diferentes dosis para comprender el efecto real del consumo de las bacterias ácido-lácticas sobre los resultados de salud observados, además de considerar el impacto de la variabilidad individual de la microbiota de los pacientes bajo estudio (Ayivi et al., 2020).

Tabla 2

Efectos de las bacterias ácido-lácticas probióticas en ensayos clínicos

Bacterias probióticas	Dosis	Población	Duración	Diseño del estudio	Efecto observado	Referencia
<i>L. acidophilus</i> DDS1, <i>B. lactis</i> UABla-12, <i>B. longum</i> UABl-14, <i>B. bifidum</i> UABb-10	69 mg (15×10 ⁹ UFC)	Mujeres y hombres con obesidad IMC= 33.5 kg/m ² (n=10)	Diaria por tres meses	Intervención aleatoria controlada con placebo	Disminución significativa en el IMC, porcentaje de grasa y nivel de glucosa	(Sergeev et al., 2020)
<i>L. pentosus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. lindneri</i>	400 ml (2×10 ⁹ UFC)	Pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales (n=25)	Diaria por un mes	Ensayo prospectivo, aleatorio y controlado	Aumento en los niveles de hemoglobina y reducción en las puntuaciones de hinchazón	(Yılmaz et al., 2019)
<i>L. crispatus</i> CTV-05 (Lactin-V)	2×10 ⁹ UFC	Mujeres con vaginosis bacteriana (n=106)	Dos veces a la semana por 24 semanas	Ensayo aleatorizado y controlado con doble ciego y placebo	Disminución en la recurrencia de la vaginosis después de 12 semanas	(Cohen et al., 2020)
<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>B. lactis</i> BB12	6.5×10 ⁹ UFC	Mujeres con 12- 17 semanas de embarazo (n=164)	Diaria por 36 semanas	Diseño factorial 2×2, aleatorio con doble ciego y placebo	No se observó una diferencia significativa en las puntuaciones de depresión	(Dawe et al., 2020)
<i>L. gasseri</i> CP2305	1×10 ¹⁰ UFC	Adultos jóvenes (n=74)	Diaria por 24 semanas	Ensayo controlado y doble ciego con placebo y grupos paralelos	Reducción en la ansiedad y en los trastornos del sueño	(Nishida et al., 2019)

Bacterias probióticas	Dosis	Población	Duración	Diseño del estudio	Efecto observado	Referencia
<i>L. plantarum</i> TWK10	3×10^{10} UFC	Adultos sanos sin entrenamiento atlético ($n=54$)	Tres veces al día por 6 semanas	Ensayo aleatorizado controlado con doble ciego y placebo	Disminución en la fatiga y mejora en el rendimiento	(Huang et al., 2019)
<i>L. plantarum</i> PS128	425 mg (3×10^{10} UFC)	Niños de 7 a 15 años con un diagnóstico de autismo ($n=71$)	Diaria por 4 semanas	Ensayo aleatorizado controlado con doble ciego, grupos paralelos y placebo	Disminución en comportamientos desafiantes o de oposición	(Liu et al., 2019)
<i>L. paracasei</i> CBA L74	5.9×10^9 UFC	Lactantes recién nacidos de entre 37 y 40 semanas ($n=78$)	Diaria por 3 meses	Ensayo aleatorizado controlado	Aumento en la producción de IgA secretora	(Roggero et al., 2020)
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> Lpc-37, <i>B. lactis</i> Bl-04, <i>B. lactis</i> Bi-07	2×10^9 UFC	Pacientes tratados por 10 días con amoxicilina ($n=120$)	Diaria por 30 días	Ensayo aleatorizado controlado con doble ciego y placebo	Disminución significativa en la colonización con <i>Pseudomonas</i>	(Wieërs et al., 2021)
<i>L. acidophilus</i> NCFM, <i>L. paracasei</i> Lpc-37, <i>B. lactis</i> Bi-07, <i>B. lactis</i> B1-04	1.7×10^{10} UFC	Adultos con al menos 78 años y con infección por <i>C. difficile</i> ($n=31$)	Diaria por 4 semanas	Ensayo PICO aleatorizado controlado con doble ciego y placebo	Reducción significativa en la diarrea causada por <i>C. difficile</i>	(de Wolfe et al., 2018)
<i>Lactobacillus</i> spp., <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. salivarium</i>	1×10^9 UFC	Adultos con enfermedades inflamatorias intestinales ($n=50$)	Diaria por 4 semanas	Ensayo aleatorizado controlado con doble ciego y placebo	Mejoría en los síntomas inflamatorios de acuerdo con la escala SGA	(Oh et al., 2019)

2.3. Probióticos, Prebióticos y Simbióticos

La modificación microbiana intestinal a través de la ingesta de alimentos y bebidas fermentados ocurre principalmente debido a la presencia de probióticos, prebióticos y simbióticos (T. F. da Silva et al., 2020). En el caso de los probióticos, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) los definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio comprobable para la salud del huésped (Kim et al., 2019). En este contexto, los probióticos se consideran las herramientas más útiles para recuperarse de la disbiosis, un estado de equilibrio alterado en la microbiota intestinal que influye en el mantenimiento de la salud humana y la prevención de enfermedades en todo el cuerpo, desde el intestino hasta sitios corporales no intestinales como el cerebro y la piel (Lee et al., 2018). Sin embargo, para que un microorganismo pueda ser considerado como probiótico se requiere comprobar su inocuidad, es decir, que se encuentre libre de factores de patogenicidad y toxicidad. Además, un probiótico debe exhibir una gran capacidad de supervivencia frente a las condiciones gastrointestinales (por ejemplo, su pH ácido, las secreciones pancreáticas y sales biliares), ejercer un efecto antagónico contra microorganismos patógenos y estimular la respuesta del sistema inmunológico (Plaza-Díaz et al., 2019).

Por su parte, los prebióticos comúnmente son definidos como ingredientes alimentarios no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped al estimular el crecimiento y la actividad de un número limitado de bacterias en el colon (Holscher, 2017). No obstante, los expertos convocados por la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP, por sus siglas en inglés) decidieron incorporar a esta definición el hecho de que los prebióticos son ingredientes fermentados selectivamente por los microorganismos en el colon con el objetivo de

producir cambios específicos en la composición y actividad de la microbiota gastrointestinal, además de que son resistentes a la hidrólisis por las enzimas de los mamíferos y no sufren modificaciones durante su procesamiento (Gibson et al., 2017). En este sentido, la selectividad se considera un aspecto fundamental para el concepto de prebiótico ya que, a diferencia de las fibras como la celulosa y las pectinas que promueven el crecimiento de diversos microorganismos en el intestino, los prebióticos como los fructooligosacáridos y los galactooligosacáridos estimulan específicamente la proliferación de las bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Quigley, 2019).

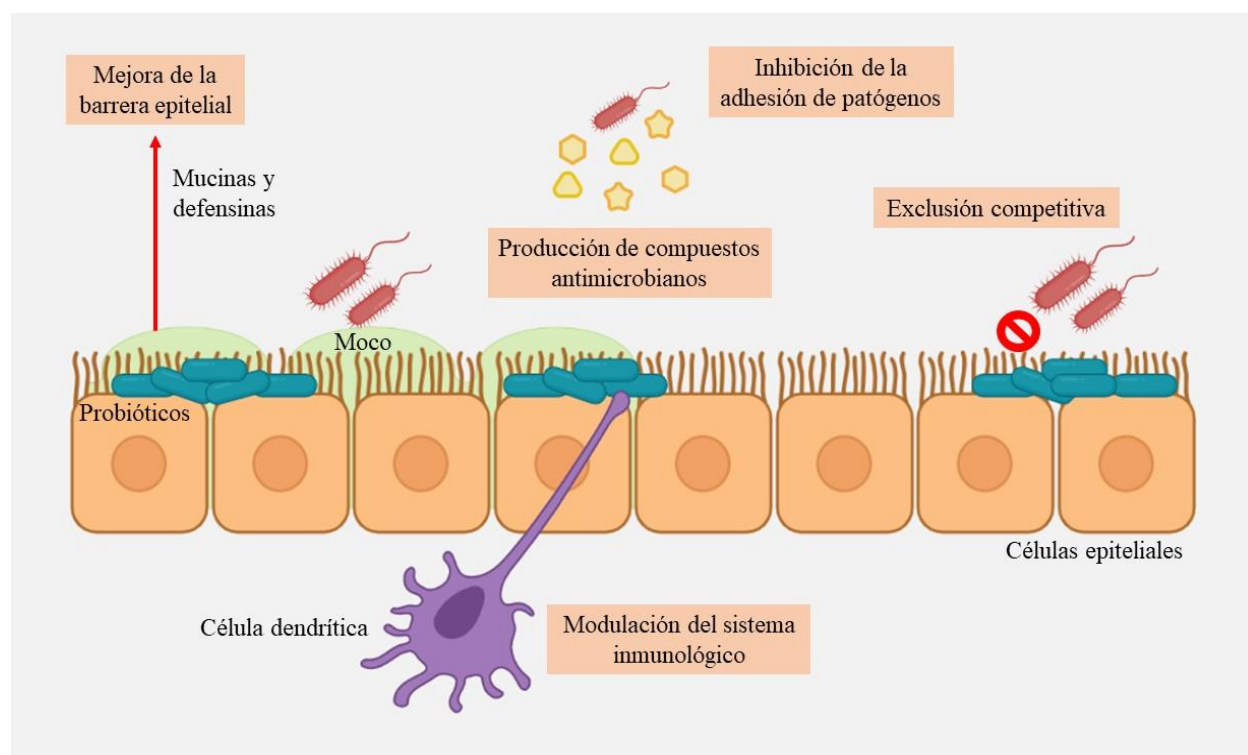
Finalmente, los simbióticos pueden explicarse como una mezcla de probióticos y prebióticos que han sido seleccionados con el objetivo de mejorar la supervivencia e implantación de los microorganismos vivos y suplementos dietéticos que contienen, de tal forma que es posible estimular selectivamente el crecimiento y actividad metabólica de un número limitado de bacterias promotoras de la salud, lo cual termina por mejorar el estado de bienestar general del huésped (Bijle et al., 2020). Para ello, los simbióticos pueden formularse utilizando dos enfoques diferentes. El primero, conocido como simbiótico complementario, consiste en un probiótico y un prebiótico que funcionan de forma independiente para lograr uno o más beneficios para la salud. Por otro lado, en el caso de los simbióticos sinérgicos, se mezcla selectivamente un microorganismo vivo con un sustrato fermentable por el mismo, por lo que están diseñados para trabajar en conjunto (Swanson et al., 2020). En este sentido, algunos de los beneficios para la salud asociados con el consumo de los simbióticos incluyen el aumento en los niveles de cepas de lactobacilos y bifidobacterias en el intestino, el mantenimiento del equilibrio de la microbiota, la mejora de la función hepática en pacientes cirróticos y la disminución de la susceptibilidad a los patógenos en pacientes quirúrgicos (Rovinaru & Pasarin, 2020).

2.3.1. Mecanismos de Acción de los Probióticos

Los principales mecanismos de acción de los probióticos, los cuales se muestran de manera resumida en la **Figura 3**, incluyen: 1) la colonización y regulación de la microbiota intestinal disbiótica, 2) la protección de la barrera epitelial tras la inducción de la secreción de mucinas y defensinas, 3) la exclusión competitiva de microorganismos patógenos, 4) la producción de sustancias antimicrobianas, y 5) la modulación de las respuestas del sistema inmunitario innato y adaptativo del huésped a través de la interacción con células epiteliales, células dendríticas, monocitos, macrófagos y linfocitos (Batista et al., 2020).

Figura 3

Mecanismos de acción de los microorganismos probióticos



Nota. Adaptado de “*Probiotic Mechanisms of Action*” por M. Bermúdez-Brito, 2012, *Nutrition & Metabolism*, 61.

La barrera intestinal es un importante mecanismo de defensa utilizado para mantener la integridad epitelial y prevenir la entrada sistémica de toxinas, bacterias y otros compuestos exógenos capaces de inducir respuestas inflamatorias (Raheem et al., 2021). De hecho, datos recientes han informado que los probióticos son capaces de prevenir la ruptura de la barrera mucosa a través de la exclusión de los patógenos, así como de iniciar la reparación de la función epitelial a partir de la producción de sus principales componentes macromoleculares: las glicoproteínas de mucina y las defensinas (Bermúdez-Brito et al., 2012).

De manera general, la exclusión competitiva de los microorganismos probióticos se refiere a su capacidad de adherirse al epitelio a través de receptores específicos, reduciendo así el potencial de unión de otras bacterias presentes en el intestino (Muñoz-Quezada et al., 2013). Los mecanismos de exclusión competitiva más estudiados incluyen la reducción del pH en el lumen, la competencia por las fuentes nutricionales disponibles y la producción de metabolitos selectivos capaces de inhibir el crecimiento o la actividad metabólica de los competidores (Plaza-Díaz et al., 2019). Más específicamente, los probióticos producen moléculas de bajo peso molecular como las bacteriocinas, el ácido láctico y el ácido acético, los cuales presentan un potente efecto inhibidor contra las bacterias gramnegativas y han sido considerados los principales compuestos antimicrobianos responsables de la actividad inhibidora de los probióticos contra los patógenos (Raheem et al., 2021).

Adicionalmente, las bacterias probióticas funcionan como un puente de comunicación entre la respuesta inmunológica innata y adaptativa, ya que tienen la capacidad de interactuar con células epiteliales y dendríticas, así como con los monocitos, macrófagos y linfocitos (Bermúdez-Brito et al., 2012). De esta manera, mientras la respuesta inmune adaptativa depende de la identificación de antígenos específicos por parte de los linfocitos B y T, la respuesta

inmune innata se basa en el reconocimiento de estructuras conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés), los cuales son compartidos por la mayoría de los microorganismos nocivos (Plaza-Díaz et al., 2019). En este último escenario, las células dendríticas actúan como sensores de los ligandos microbianos a través de la activación de receptores inmunitarios innatos como los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores de lectina tipo C. De este modo, las vías de señalización desencadenadas por las moléculas derivadas de las bacterias probióticas producen cambios en los fenotipos de las células dendríticas que, finalmente, conducen a la integración del metabolismo microbiano y del huésped con las funciones inmunitarias (Frei et al., 2015).

2.3.2. Mecanismos de Acción de los Prebióticos

Como se mencionó anteriormente, los seres humanos no son capaces de digerir a los prebióticos debido a la ausencia de enzimas que hidrolicen sus enlaces poliméricos. Por lo tanto, los prebióticos llegan prácticamente inalterados al colon y son fermentados por bacterias sacarolíticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Guarino et al., 2020). De este modo, los mecanismos de acción de los prebióticos incluyen: 1) la estimulación de la producción de ácidos grasos de cadena corta con efectos moduladores en el metabolismo de los lípidos, 2) la regulación de la producción de glicoproteínas de mucina, 3) un incremento en la absorción de los minerales en el cuerpo, y 4) el aumento en la secreción de la inmunoglobulina A que estimula la función fagocítica de los macrófagos (Markowiak & Ślizewska, 2017).

En este sentido, la fermentación y la producción de ácidos grasos de cadena corta, como el ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico, juegan un papel integral a nivel colónico y sistémico (Slavin, 2013). Por ejemplo, el butirato es la fuente de energía preferida por las células epiteliales del colon, por lo que contribuye al mantenimiento de las funciones de la barrera

intestinal al mismo tiempo que exhibe propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias (Rivière et al., 2016). Adicionalmente, el cerebro, los músculos y los tejidos metabolizan el acetato sistémicamente como una fuente de acetyl-CoA lipogénico (Zhao et al., 2020), mientras que el propionato es eliminado por el hígado y puede disminuir los niveles de colesterol en la sangre al interferir con su síntesis (Slavin, 2013). Aunado a lo anterior, la fermentación y la producción de ácidos grasos de cadena corta reducen el pH luminal y fecal, lo cual a su vez reduce la degradación de péptidos y la formación resultante de compuestos tóxicos como el amoníaco, las aminas y los compuestos fenólicos, además de que suprimen la actividad de enzimas bacterianas indeseables (Markowiak & Ślizewska, 2017).

De esta manera, partiendo de los supuestos anteriores, es posible observar que el impacto metabólico de los prebióticos se extiende más allá de los procesos fermentativos, ya que algunos de sus efectos beneficiosos están relacionados con las interacciones entre el epitelio y el sistema inmunitario, así como con el metabolismo de los ácidos biliares y la respuesta neuroendocrina (Quigley, 2019). En este contexto, varios compuestos tienen el potencial de ser clasificados como prebióticos, aunque la mayoría son oligosacáridos no digeribles producidos artificialmente, incluidos los fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, fructanos y maltooligosacáridos, así como las ciclodextrinas, la lactulosa, la lactosacarosa y la inulina (Markowiak & Ślizewska, 2017). En contraste, los sustratos que tienen la capacidad de afectar la composición de la microbiota a través de mecanismos que no involucran su fermentación selectiva no pueden ser considerados prebióticos (Guarino et al., 2020). Como ejemplo de lo anterior podemos encontrar a los antibióticos, los minerales, las vitaminas y los bacteriófagos que, aunque no son sustratos de crecimiento para los microorganismos del huésped, su ingesta puede alterar el microbioma y la composición metabólica (Gibson et al., 2017).

2.3.3. Mecanismos de Acción de los Simbióticos

Considerando el hecho de que un probiótico es esencialmente activo en el intestino delgado, y que el efecto de un prebiótico se observa principalmente en el intestino grueso, se sugiere que la combinación de los dos presenta un efecto sinérgico (Hamasalim, 2016). De manera similar, debido a que los prebióticos se utilizan principalmente como un medio selectivo para el crecimiento de las cepas probióticas, así como para el favorecimiento de los procesos fermentativos y del tránsito intestinal, los simbióticos adquieren una mayor tolerancia frente a las condiciones ambientales del intestino, como lo son su oxigenación, pH y temperatura (Markowiak & Ślizewska, 2017).

Con base en lo anterior, es posible afirmar que los simbióticos funcionan de dos maneras diferentes: mejorando la viabilidad de los probióticos y brindando beneficios independientes, pero aditivos, para la salud del hospedero. Más específicamente, la ingesta de un alimento simbiótico conduce a una modulación de las actividades metabólicas con un mantenimiento de la estructura biológica del intestino, así como también a un mayor desarrollo de la microbiota beneficiosa y a una inhibición en el crecimiento de los patógenos potenciales presentes en el tracto gastrointestinal (Manigandan et al., 2012).

De este modo, durante el tratamiento dietético simbiótico, los prebióticos son hidrolizados a sus respectivos azúcares por los probióticos implantados en el tracto intestinal del huésped para posteriormente utilizarlos como fuente de carbono para aumentar la biomasa de bacterias beneficiosas. Adicionalmente, para facilitar el proceso de colonización las bacterias probióticas aprovechan a los prebióticos del medio para adherirse a la barrera epitelial y evitar la unión de los microorganismos patógenos oportunistas (Huynh et al., 2017). Sumado a lo anterior, el metabolismo simbiótico produce una amplia gama de compuestos que pueden ser utilizados

tanto por las bacterias intestinales como por el huésped, además de que estudios recientes han informado que algunos aminoácidos esenciales como la histidina, isoleucina, lisina, fenilalanina, valina y triptófano, así como aminoácidos no esenciales como la alanina, el glutamato y la tirosina, son liberados durante la fermentación simbiótica (Rodríguez et al., 2011).

Finalmente, los simbióticos dan como resultado concentraciones reducidas de metabolitos indeseados o tóxicos como las cetonas, disulfuros de carbono y acetatos de metilo, así como la inactivación de nitrosaminas y sustancias cancerígenas (Pandey et al., 2015). En contraste, su administración frecuente conduce a un aumento significativo en los niveles de ácidos grasos de cadena corta, además de que contrarrestan los procesos de descomposición en el intestino, previenen el estreñimiento y la diarrea, regulan la respuesta inmunológica y reducen los niveles de azúcar y grasa en la sangre (Markowiak & Ślizewska, 2017).

2.4. Introducción a los Postbióticos

Como se mencionó al inicio de este capítulo, los probióticos pueden definirse como microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades suficientes, ejercen un efecto benéfico sobre el tracto gastrointestinal. No obstante, a pesar de sus innumerables beneficios, nuevas investigaciones han enfatizado algunas de las limitaciones relacionadas con el consumo de los probióticos, como lo son el desconocimiento de sus mecanismos moleculares exactos, la variabilidad en el comportamiento de las cepas alóctonas o autóctonas, la transferencia horizontal de genes de virulencia y los problemas relacionados con el mantenimiento de la viabilidad durante su procesamiento (Nataraj et al., 2020). En tal sentido, recientemente se ha reportado la transferencia de genes provenientes de diversas cepas de *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. gasseri* y *L. plantarum* (Cicenia et al., 2014), lo cual representa un riesgo inminente para la salud, ya que la microbiota intestinal constituye un hábitat importante

para la acumulación de genes de resistencia a los antibióticos. Es por ello por lo que resulta indispensable continuar la investigación para demostrar la ausencia de factores de virulencia asociados al consumo de los probióticos, especialmente si estos pertenecen a un género con potencial patogénico (Lerner et al., 2017).

Como consecuencia de lo anterior, la identificación de los factores solubles derivados de la actividad metabólica de los probióticos, para los cuales se ha acuñado el término de postbióticos, ha favorecido el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas personalizadas que prescinden de los riesgos asociados a la administración de bacterias vivas (Cicenia et al., 2014). De este modo, los postbióticos pueden definirse como sustancias bioactivas producidas a partir de la fermentación de un microorganismo de grado alimentario que ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped de manera directa o indirecta (Żółkiewicz et al., 2020).

Particularmente, los tipos de postbióticos más comunes son los paraprobióticos y las fórmulas infantiles fermentadas (FIF). Por un lado, los paraprobióticos se definen como células microbianas no viables o inactivadas que, cuando se administran en cantidades suficientes, confieren beneficios a la salud del huésped (Nataraj et al., 2020). En contraste, las FIF son preparados para lactantes que han sido fermentados con bacterias productoras de ácido láctico y que, en la mayoría de los casos, no contienen células viables (Szajewska et al., 2015). Por lo consiguiente, los postbióticos pueden incluir diversos metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta, fracciones de células microbianas, proteínas funcionales, polisacáridos extracelulares, lisados bacterianos, ácido teicoico, muropéptidos derivados de peptidoglicanos y estructuras tipo pili (Żółkiewicz et al., 2020).

Es por este motivo por el que los postbióticos pueden aprovecharse como ingredientes funcionales en el mantenimiento del balance del ecosistema microbiano intestinal, conocido

como estado de eubiosis (Iebba et al., 2016), así como también como coadyuvantes en el tratamiento de pacientes en estado crítico, niños pequeños o recién nacidos prematuros, ya que eluden el desafío técnico de la colonización probiótica en el intestino, facilitan la entrega de los componentes activos en el sitio de acción, mejoran la vida útil del producto final y simplifican su proceso de envasado y transporte (Wegh et al., 2019).

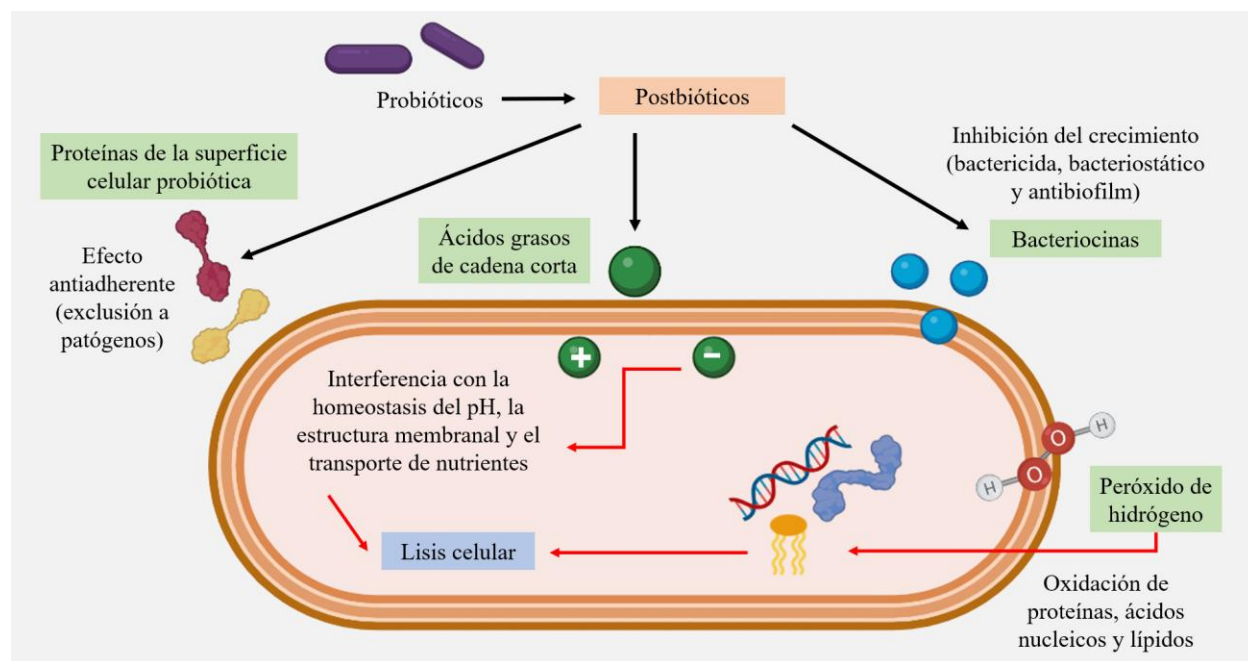
2.4.1. Mecanismo de Acción de los Postbióticos

Los mecanismos de acción que subyacen a los efectos de los postbióticos en la mejora de la salud del huésped aún no están claramente definidos, pero parecen estar mediados por la interacción entre una serie de receptores de reconocimiento que son capaces de asociarse a los compuestos microbianos y activar la respuesta inmunitaria innata y adquirida (Wegh et al., 2019). En el caso particular de los lactobacilos con potencial probiótico, estos poseen Patrones Moleculares Asociados a Microbios (MAMP, por sus siglas en inglés) que se encuentran altamente conservados y que incluyen al peptidoglicano, los ácidos lipoteicoicos, la proteína A de la capa S, los exopolisacáridos y el ADN genómico, los cuales pueden ser reconocidos por ciertos Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR, por sus siglas en inglés) y activar cascadas de señalización en contra de los patógenos detectados (Teame et al., 2020).

Por lo tanto, tal como se muestra en la **Figura 4**, los efectos de los postbióticos sobre las respuestas metabólicas sistémicas pueden ser regulados directamente por los metabolitos o enzimas dentro y sobre la superficie de los microorganismos inactivados que los componen (Salminen et al., 2021). Un ejemplo es la sal biliar hidrolasa (BSH), una enzima microbiana encargada de la transformación de los ácidos biliares primarios en ácidos biliares no conjugados y secundarios, lo cual es esencial para el mantenimiento de la homeostasis del huésped en procesos como el metabolismo de la glucosa y la producción de energía (Long et al., 2017).

Figura 4

Mecanismos de acción propuestos para los postbióticos



Nota. Adaptado de “*Postbiotics against Pathogens Commonly Involved in Pediatric Infectious Diseases*” por A. Mantziari, 2020, *Microorganisms*, 8 (10).

Por otro lado, los postbióticos también pueden modular a la microbiota intestinal de manera indirecta al transportar moléculas de detección de quórum y extinción de quórum, o bien, al transportar ácido láctico que puede ser consumido por algunos miembros de la microbiota, dando como resultado la formación de ácidos grasos de cadena corta con una función beneficiosa en el metabolismo de los lípidos y la respuesta a los xenobióticos (Laverde Gómez et al., 2019). Asimismo, los microorganismos pueden producir compuestos neuroactivos como la serotonina, la dopamina y la acetilcolina, los cuales actúan tanto en el sistema nervioso entérico como en el sistema nervioso central, por lo que tienen el potencial de modular el comportamiento y la función cognitiva de los seres humanos. De manera similar, las enzimas microbianas pueden metabolizar precursores dietéticos para la síntesis de neurotransmisores del huésped, por

ejemplo, el triptófano para la serotonina y la tirosina para la dopamina, reduciendo así su biodisponibilidad cuando resulta necesario (Salminen et al., 2021).

2.4.2. Aplicaciones Actuales de los Postbióticos

Como se mencionó en la parte superior, los postbióticos provenientes de diferentes especies del género *Lactobacillus* consisten en una amplia gama de moléculas capaces de efectuar funciones beneficiosas para los seres humanos, como lo son la inmunomodulación, la preservación de la barrera epitelial y su efecto antagónico contra numerosos patógenos (Batista et al., 2020). Aunado a lo anterior, los postbióticos poseen varias ventajas en comparación con los probióticos, incluida la elucidación de sus estructuras químicas, sus parámetros de dosis seguras y una vida útil más prolongada (Teame et al., 2020). Por lo tanto, el uso de postbióticos representa una alternativa válida y más segura a las bacterias probióticas en el desarrollo de alimentos funcionales y nuevas terapias antimicrobianas personalizadas.

En este contexto, tal como se muestra en la **Tabla 3**, diversos estudios han demostrado la efectividad de diferentes productos postbióticos provenientes de microorganismos que se encuentran naturalmente en los alimentos y bebidas fermentados. Por ejemplo, se ha reportado el efecto mitigante de un extracto de la pared celular de diferentes especies de microorganismos probióticos sobre los síntomas de la artritis, incluyendo los géneros *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, entre otros (Meei-Yn et al., 2020). Asimismo, Lin y colaboradores (2022) desarrollaron una pastilla de células inactivadas con calor de *Lactobacillus salivarius* AP-32, *L. paracasei* ET-66 y *L. plantarum* LPL28 capaz de exhibir un efecto antimicrobiano contra los patógenos presentes en la cavidad oral de los pacientes tratados, lo cual terminó por mejorar sus condiciones gastrointestinales. Por su parte, la administración de una fórmula anti-regurgitación parcialmente fermentada con lactobacilos y combinada con

galactooligosacáridos de cadena corta y fructooligosacáridos de cadena larga mejoró los síntomas gastrointestinales en bebés (Bellaiche et al., 2021), mientras que Jeong y colaboradores (2020) estudiaron el efecto terapéutico de una solución inactivada de *Lactobacillus rhamnosus* en infantes con dermatitis atópica, la cual resultó en la disminución de la expresión de diferentes proteínas asociadas a la inflamación.

Es importante mencionar que las formulaciones postbióticas se han aprovechado en ámbitos distintos al de la salud humana. Por ejemplo, Jackson, Jewell y Panickar (2022) desarrollaron un alimento para mascotas enriquecido con un triterpeno pentacíclico y betaglucanos producidos por diferentes géneros de levaduras con el propósito de tratar, prevenir o mejorar los síntomas de las enfermedades asociadas a niveles elevados de toxinas urémicas y problemas renales. De manera similar, Barnes, Carpenter y Showell (2017) confeccionaron un alimento para animales compuesto por una mezcla de probióticos (células viables de *B. subtilis*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* y *L. plantarum*), prebióticos (fructooligosacáridos) y postbióticos (sobrenadantes liofilizados de los probióticos mencionados) con el objetivo de promover su crecimiento y estado de bienestar general. Por otro lado, Joning y colaboradores (2021) reportaron el efecto antifúngico de una solución inactivada con calor de *L. plantarum* GS12 y *Bacillus cereus* GS15 contra el hongo marino *Lagenidium thermophilum*, uno de los principales riesgos sanitarios en la industria del cultivo de crustáceos con fines alimentarios. Sumado a lo anterior, Incili y colaboradores (2021) propusieron la implementación de un conservador a base de quitosano y un filtrado de *P. acidilactici* para combatir la contaminación microbiana en los productos cárnicos del pollo y para extender su vida útil. Finalmente, Yordshahi y colaboradores (2020) desarrollaron un nanopapel antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes* a partir de un liofilizado de *L. plantarum* para la conservación de la carne molida.

Tabla 3

Aplicaciones actuales de los postbióticos en la industria y la salud

Producto	Tipo de estudio	Postbiótico	Efecto observado	Referencia
Formulación terapéutica para los síntomas de la artritis	Ensayo <i>in vitro</i> en la línea celular de condrosarcoma central primario SW1353	Liofilizados de <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i> , y de levaduras probióticas	Incremento en la secreción del TGF- β para favorecer la restauración del cartílago	(Meei-Yn et al., 2020)
Pastillas para la mejora y el mantenimiento de la salud bucal	Ensayo aleatorizado, controlado y con placebo en individuos sanos ($n=75$) durante 4 semanas	Células inactivadas con calor (2.2×10^{11} UFC) de <i>L. salivarius</i> AP-32 y <i>L. paracasei</i> ET-66	Aumento en la IgA salival, inhibición en el crecimiento de patógenos orales e incremento en la cantidad de microbiota beneficiosa	(Lin et al., 2022)
Fórmula infantil parcialmente fermentada	Ensayo controlado, aleatorizado y doble ciego, en lactantes ($n=82$) durante 4 semanas	Lactofidus TM adicionado con galactooligosacáridos de cadena corta y fructooligosacáridos de cadena larga (relación 9:1)	Mejora en las puntuaciones del Cuestionario de Síntomas Gastrointestinales Infantiles	(Bellaiche et al., 2021)
Formulación terapéutica para tratar la dermatitis atópica (DA)	Ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo durante 12 semanas en niños de 1 a 12 años con DA moderada ($n=66$)	Células tindalizadas (inactivadas) de <i>L. rhamnosus</i> IDCC 3201 (1.0×10^{10} UFC)	Disminución en la inflamación asociada con el decremento en la expresión de la proteína catiónica de eosinófilos y la IL-31	(Jeong et al., 2020)
Formulación para alimento para mascotas de compañía	Ensayo aleatorizado y longitudinal en caninos sanos con cultivo de sangre <i>ex vivo</i> 28 días después de la intervención	Triterpeno pentacíclico y betaglucanos producidos por levaduras de los géneros <i>Candida</i> , <i>Hansenula</i> , <i>Kloeckera</i> , <i>Pichia</i> , <i>Saccharomyces</i> , entre otros	Reducción en las toxinas urémicas circulantes para prevenir o mejorar los síntomas de las enfermedades asociadas con niveles anormales de quimiocina 10	(Jackson et al., 2021)

Producto	Tipo de estudio	Postbiótico	Efecto observado	Referencia
Alimento para mascotas de compañía, aves de corral, cerdos, peces, camarones y rumiantes	Ensayo controlado en camarones ($n=3384$), aves de corral ($n=60$) y cerdos ($n=144$) durante aproximadamente 50 días	Mezcla de probióticos (células viables de <i>B. subtilis</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> y <i>L. plantarum</i>), prebióticos (fructooligosacáridos) y postbióticos (liofilizados)	Incremento en la tasa de conversión de alimento (FCR), así como un aumento en el crecimiento y estado de bienestar general de los animales	(Barnes et al., 2017)
Solución desinfectante contra oomicetos marinos en los criaderos de crustáceos	Método de difusión en agar de cada postbiótico contra <i>L. thermophilum</i> IPMB 1401 y ensayo de toxicidad utilizando nauplios de camarones en salmuera	Solución inactivada con calor de <i>L. plantarum</i> GS12 y <i>B. cereus</i> GS15	Efecto antifúngico contra el hongo <i>L. thermophilum</i> con una concentración mínima inhibitoria del 50% y una mortalidad acumulada del 7% en nauplios de camarones	(Joning et al., 2021)
Matriz de quitosano y una formulación postbiótica como conservador de diferentes productos cárnicos del pollo	Determinación de la actividad antioxidante (DPPH), contenido fenólico (Folin-Ciocalteu) y análisis microbiano (conteo en placa después de 7 días)	Filtrado del sobrenadante de <i>P. acidilactici</i> B-LC-20 (9.0×10^{10} UFC)	Prolongación de 12 días en la vida útil de los filetes de pechuga sin cambios en el pH e inhibiendo a <i>S. typhimurium</i> y <i>L. monocytogenes</i>	(İncili et al., 2021)
Papel antimicrobiano de nanocelulosa bacteriana impregnado con una formulación postbiótica para envolver carne molida	Ensayo antimicrobiano <i>in vitro</i> (método de recuento en placa), análisis de la vida de anaquel y evaluación sensorial	Liofilizado del filtrado de <i>L. plantarum</i> en una membrana de $0.42 \mu\text{m}$ (8.0×10^{10} UFC)	Reducción en los recuentos de mesófilos y psicrófilos totales, así como de <i>L. monocytogenes</i> en la carne molida después de 9 días almacenada a 4°C .	(Shafipour Yordshahi et al., 2020)

2.4.3. *Postbióticos Derivados de Lactobacillus: Bacteriocinas*

Diferentes especies de *Lactobacillus* producirán diferentes tipos de paraprobióticos y postbióticos, aunque por lo general los paraprobióticos consisten en peptidoglicanos, proteínas de superficie y polisacáridos de la pared celular, mientras que los postbióticos incluyen proteínas y péptidos secretados, bacteriocinas y ácidos orgánicos (Teame et al., 2020). En el caso particular de las bacteriocinas, éstas pueden definirse como péptidos antimicrobianos con actividad contra microorganismos estrechamente relacionados, en su mayoría bacterias grampositivas, los cuales son secretados para obtener una ventaja competitiva sobre los nutrientes disponibles en el ambiente (Parada et al., 2007).

De acuerdo con la información presentada en la **Tabla 4**, las bacteriocinas se agrupan en tres clases diferentes. Las bacteriocinas de la clase I generalmente se componen de péptidos de 19 a 50 aminoácidos que sufren extensas modificaciones después de la traducción, lo que da como resultado aminoácidos no estándar como la lantionina, β -metil lantionina, deshidrobutirina, deshidroalanina y la laberíntica (Kumariya et al., 2019). Por otro lado, las bacteriocinas de la clase II, también conocidas como no lantibióticas, están conformadas por péptidos pequeños menores a 10 kDa que no sufren modificaciones postraduccionales extensas y que son resistentes al calor (Pérez et al., 2014). De este modo, las bacteriocinas de la clase II se encuentran subdivididas en la clase IIa de bacteriocinas similares a pediocinas, la clase IIb de bacteriocinas no modificadas de dos péptidos, la clase IIc de bacteriocinas circulares, y la clase IId de bacteriocinas lineales no modificadas (Kumariya et al., 2019). Finalmente, las bacteriocinas de la clase III son proteínas antimicrobianas de gran peso molecular y termolábiles que generalmente están compuestas por diferentes dominios peptídicos (Álvarez-Sieiro et al., 2016).

Tabla 4

Clasificación de las Bacteriocinas

Clase	Características	Productores	Espectro de acción
I a	Lantibióticos (péptidos que contienen lantionina y β -metil lantionina)	<i>L. lactis</i>	Gram positivas
I b	Lantibióticos carbacíclicos que contienen laberintina y labionina	<i>B. thuringiensis</i>	VIH, VHS
I c	Sactibióticos (antibióticos que contienen azufre en su carbono alfa)	<i>L. sakei</i>	Gram positivas
II a	Pequeños péptidos estables al calor, sintetizados en forma de precursores	<i>P. pentosaceus</i>	Gram positivas y Gram negativas
II b	Sistemas de dos péptidos para formar un complejo de poración activo	<i>L. plantarum</i>	Gram positivas
II c	Bacteriocinas circulares	<i>L. gasseri</i>	Gram positivas
II d	Bacteriocinas no modificadas, lineales	<i>L. salivarius</i>	Gram positivas
III	Moléculas grandes sensibles al calor	<i>L. helveticus</i>	Gram positivas y Gram negativas

Nota. Adaptado de “*Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria*” por R. Kumariya et al., 2019, Microbial Pathogenesis, 128.

La producción de bacteriocinas es un fenómeno común entre diversas especies bacterianas debido a que sus maquinarias biosintéticas son relativamente simples y, a menudo, se asocian con elementos transferibles como los transposones conjugativos (Pérez et al., 2014). De este modo, los genes involucrados en la biosíntesis de bacteriocinas generalmente se encuentran agrupados en operones dentro del cromosoma, o bien, en plásmidos y otros elementos genéticos móviles (Kumariya et al., 2019). No obstante, las bacteriocinas son sintetizadas como precursores, por lo que su transcrito no solo comprende los genes estructurales, sino también

regiones para la síntesis de enzimas involucradas en sus modificaciones postraduccionales, así como una serie de transportadores con actividad de proteasa separada o combinada (Zheng & Sonomoto, 2018). Asimismo, las bacteriocinas poseen señales de reconocimiento que protegen a la cepa productora al mantenerlas en un estado inactivo mientras se localizan dentro de la célula, además de que interactúan con el dominio propeptídico para asegurar que su conformación sea la adecuada durante la interacción enzima-sustrato (Pérez et al., 2014).

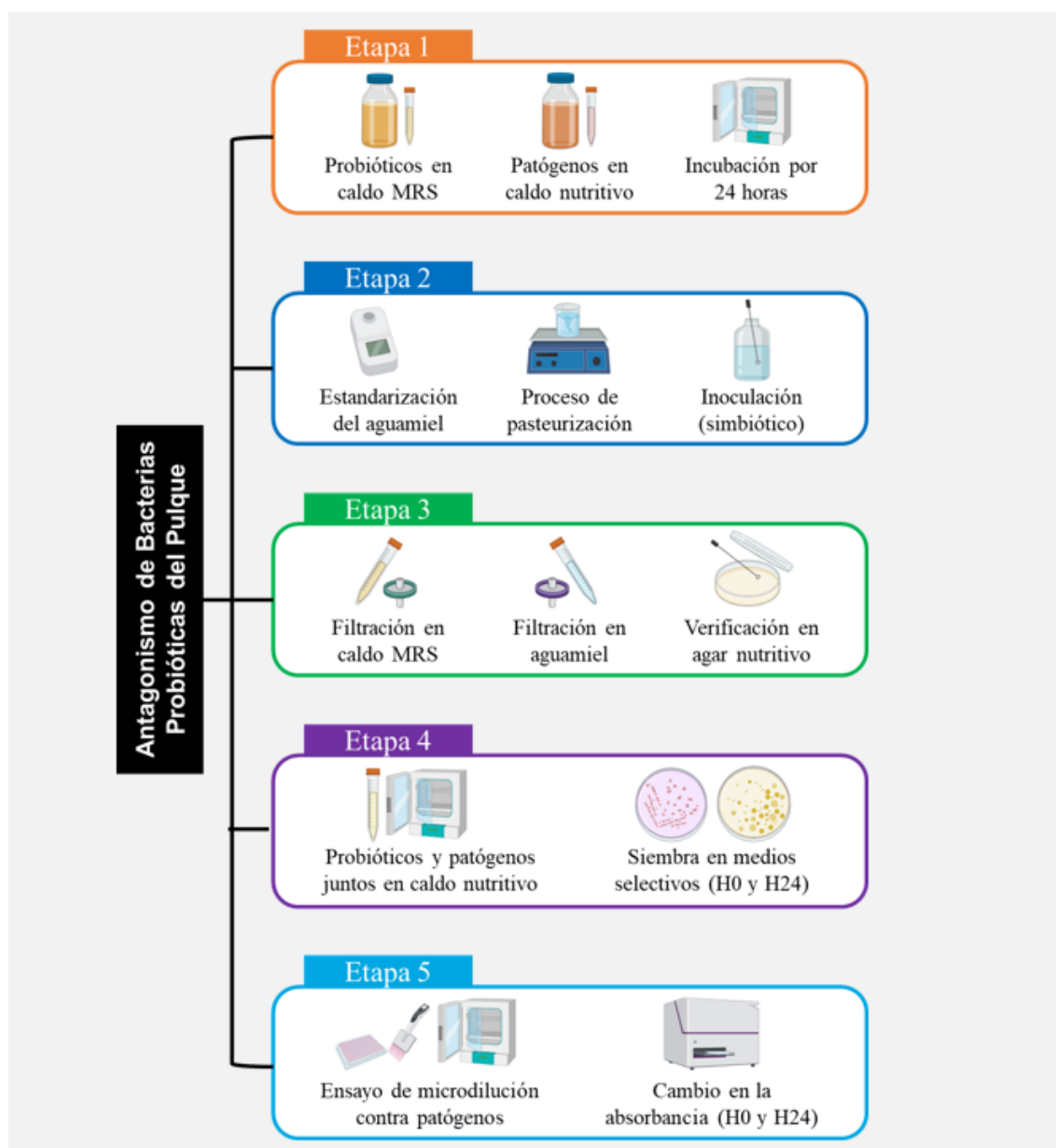
La mayoría de las bacteriocinas son bactericidas, mientras que solo algunas son bacteriostáticas. Independientemente de cuál sea el caso, las bacteriocinas únicamente poseen actividad antimicrobiana después de sufrir las modificaciones postraduccionales correspondientes, como lo pueden ser enlaces cruzados de tioéter o la deshidratación de residuos de serina y treonina, además de que su expresión está regulada por factores de inducción externos secretados por la propia cepa productora y su biosíntesis depende de las condiciones ambientales como la temperatura y el pH (Mokoena et al., 2021). Actualmente, el caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) es considerado el medio más efectivo para el crecimiento de los lactobacilos y la síntesis de sus bacteriocinas. Sin embargo, los componentes del caldo MRS son complejos y caros, los cuales lo convierten en un sustrato inadecuado para la producción a gran escala. Por lo tanto, el desarrollo de un medio de cultivo de bajo costo y alta eficiencia para la producción de bacteriocinas resulta particularmente importante (Zhang et al., 2020).

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

En la **Figura 5** se presentan de manera resumida las etapas del diseño experimental implementado para evaluar el efecto antagónico de las bacterias probióticas aisladas de una muestra de pulque, el cual será explicado con mayor profundidad en las siguientes secciones.

Figura 5

Metodología general para evaluar el antagonismo de los probióticos



3.1. Etapa 1: Preparación de los Microorganismos bajo Estudio

3.1.1. Purificación y Caracterización de las Bacterias del Pulque

Un consorcio de bacterias probióticas aisladas de una muestra de pulque (*Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus paracasei* y *Bacillus mojavensis*) y conservadas en glicerol a -80 °C fue proporcionado por la Dra. Beatriz Pérez Armendáriz del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP). Por duplicado, los microorganismos fueron reactivados en 15 ml de caldo MRS (Difco BD 288130) adicionado con 200 mg/L de cisteína (Sigma Aldrich C7880) y se incubaron a 37 °C por 24 horas en condiciones de anaerobiosis.

Posteriormente, con el objetivo de establecer cultivos puros de las bacterias con potencial probiótico, se llevaron a cabo siembras sucesivas en agar MRS (Millipore 110660) utilizando el método de estría cruzada y se incubaron bajo las condiciones descritas anteriormente. Este procedimiento se repitió hasta observar una morfología colonial homogénea y, finalmente, la identidad de los microorganismos fue confirmada por el Dr. Manuel Reinhart Kirchmayr del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) utilizando la técnica de Espectrometría de masas MALDI-TOF.

3.1.2. Análisis de la Cinética de Crecimiento en Caldo MRS

Por triplicado, las bacterias probióticas fueron inoculadas de manera individual y en mezclas de dos componentes en 15 ml de caldo MRS e incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, se colocó una muestra de 20 µl de cada tubo en una microplaca de poliestireno estéril (B1-B3 para *L. plantarum*, C1-C3 para *L. paracasei* y D1-D3 para *B. mojavensis*) y se completó el volumen final a 100 µl utilizando caldo MRS, el cual sirvió como blanco para la

lectura de la absorbancia en los pocillos A1-A3. Seguido de esto, la microplaca se incubó bajo las condiciones descritas anteriormente y se midió su densidad óptica cada hora a una longitud de onda de 620 nm utilizando un fotómetro Multiskan FC (Thermofisher 51119000). Finalmente, los datos se procesaron en el software Prism GraphPad 8 para obtener la curva de crecimiento de cada microorganismo con respecto al tiempo.

3.1.3. Cultivo de las Bacterias Patógenas ATCC y de Aislamiento Clínico

Tres cepas de bacterias patógenas provenientes de aislamientos clínicos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella*), así como sus respectivas cepas de colección ATCC (*E. coli* 25922, *S. aureus* 25923 y *S. enteritidis* 13076), fueron proporcionadas por la Dra. Laura Contreras Mioni del Laboratorio Clínico de Salud Pública del Estado de Puebla. Cada microorganismo fue sembrado en 15 ml de caldo nutritivo (Difco BD 234000) por duplicado e incubado a 37 °C por un periodo de 24 horas. Posteriormente, con el objetivo de monitorear el crecimiento de cada bacteria, se extrajo una muestra del medio antes y después de su periodo de incubación y se determinó su densidad óptica a una longitud de onda de 620 nm.

3.2. Etapa 2: Procesamiento del Aguamiel

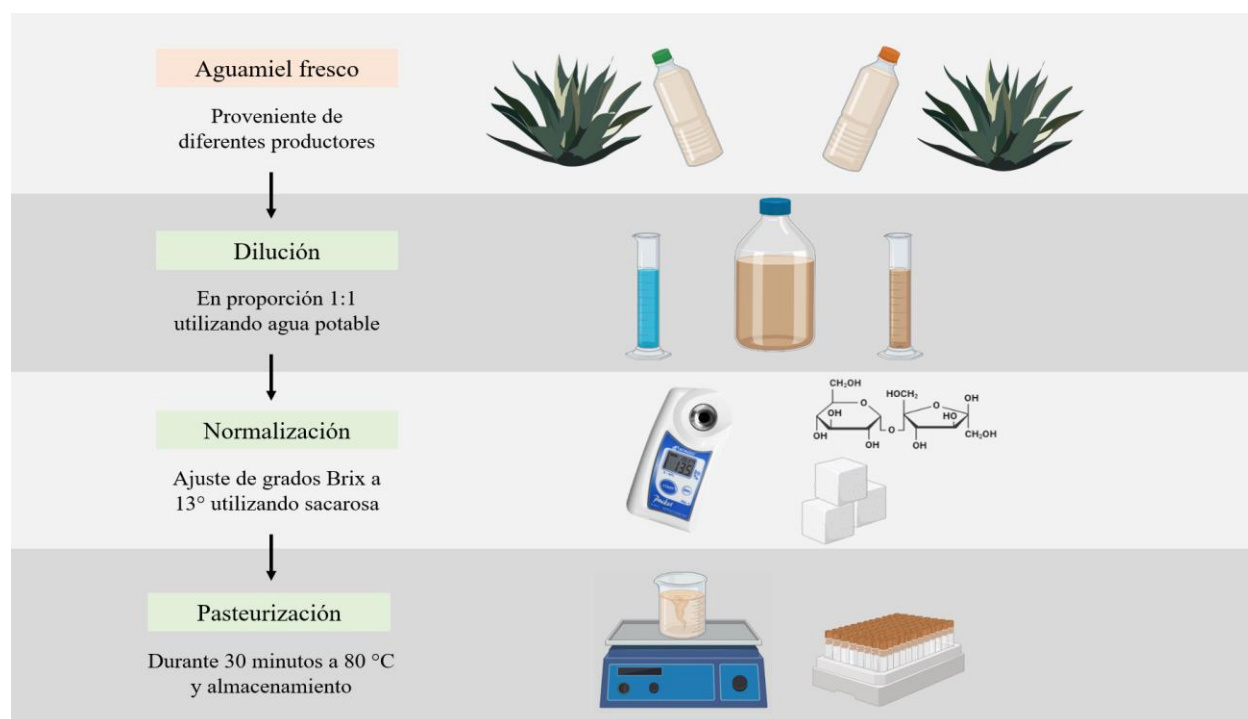
3.2.1. Estandarización y Pasteurización del Aguamiel

Como se observa en la **Figura 6**, las muestras de aguamiel provenientes de distintos productores de la región de San Pedro Cholula (Puebla, México) fueron diluidas con agua potable en una proporción 1:1 hasta alcanzar un volumen equivalente a 1 litro (Huezo-Sánchez, 2020). Seguido de esto, con el objetivo de normalizar la concentración de azúcares disueltos en los diferentes lotes de aguamiel, se realizó una medición de sus grados Brix utilizando un refractómetro digital Pal-1 (Profesional Atago 3810) y se ajustaron al 13% utilizando sacarosa.

Finalmente, las muestras fueron pasteurizadas a 80 °C durante 30 minutos para garantizar la ausencia de microorganismos viables y el contenido se transfirió en volúmenes de 15 ml a tubos de ensayo estériles, los cuales se almacenaron a 4 °C.

Figura 6

Proceso de estandarización de los lotes de aguamiel



3.2.2. Inoculación del Aguamiel: Obtención de un Simbiótico

Por triplicado, las bacterias probióticas provenientes de sus cultivos puros en agar MRS se sembraron de manera individual en los tubos de ensayo con 15 ml del aguamiel pasteurizado y se incubaron en condiciones anaerobias a 37 °C por 24 horas.

3.2.3. Análisis de la Cinética de Crecimiento en Aguamiel

En una microplaca de poliestireno estéril se colocó una muestra de 20 µl de cada bacteria probiótica crecida en aguamiel (B1-B3 para *L. plantarum*, C1-C3 para *L. paracasei* y D1-D3

para *B. mojavensis*) y se completó el volumen final a 100 µl utilizando aguamiel pasteurizado, el cual sirvió como blanco para la lectura de la absorbancia en los pocillos A1-A3. Seguido de esto, la microplaca se incubó a 37 °C por 24 horas y se midió su densidad óptica cada hora a una longitud de onda de 620 nm utilizando un fotómetro Multiskan FC. Finalmente, los datos se procesaron en el software Prism GraphPad 8 para obtener la curva de crecimiento de cada microorganismo y compararlas con aquellas obtenidas en caldo MRS.

3.3. Etapa 3: Obtención de un Postbiótico en MRS y Aguamiel

3.3.1. Purificación del Postbiótico Obtenido en Caldo MRS

Los productos obtenidos de la fermentación individual de las bacterias probióticas crecidas en caldo MRS se homogeneizaron por inversión y se hicieron pasar por un microfiltro estéril para jeringa con una membrana de 0.22 µm (Millipore SLGS033SS). Posteriormente, se extrajeron muestras de 20 µl de cada filtrado, se sembraron en agar MRS y se incubaron a 37 °C durante 24 horas para verificar la ausencia de microorganismos viables utilizando los tubos originales (sin filtrar) como controles positivos.

3.3.2. Purificación del Postbiótico Obtenido en Aguamiel

Los simbióticos obtenidos de la fermentación individual de las bacterias probióticas crecidas en aguamiel se hicieron pasar por un microfiltro estéril para jeringa de 0.22 µm, pero sin homogeneizarlos previamente para evitar la saturación de la membrana. Seguido de esto, se extrajeron muestras de 20 µl de cada filtrado, se sembraron en agar MRS y se incubaron a 37 °C durante 24 horas para verificar la ausencia de microorganismos viables utilizando los tubos originales (sin filtrar) como controles positivos.

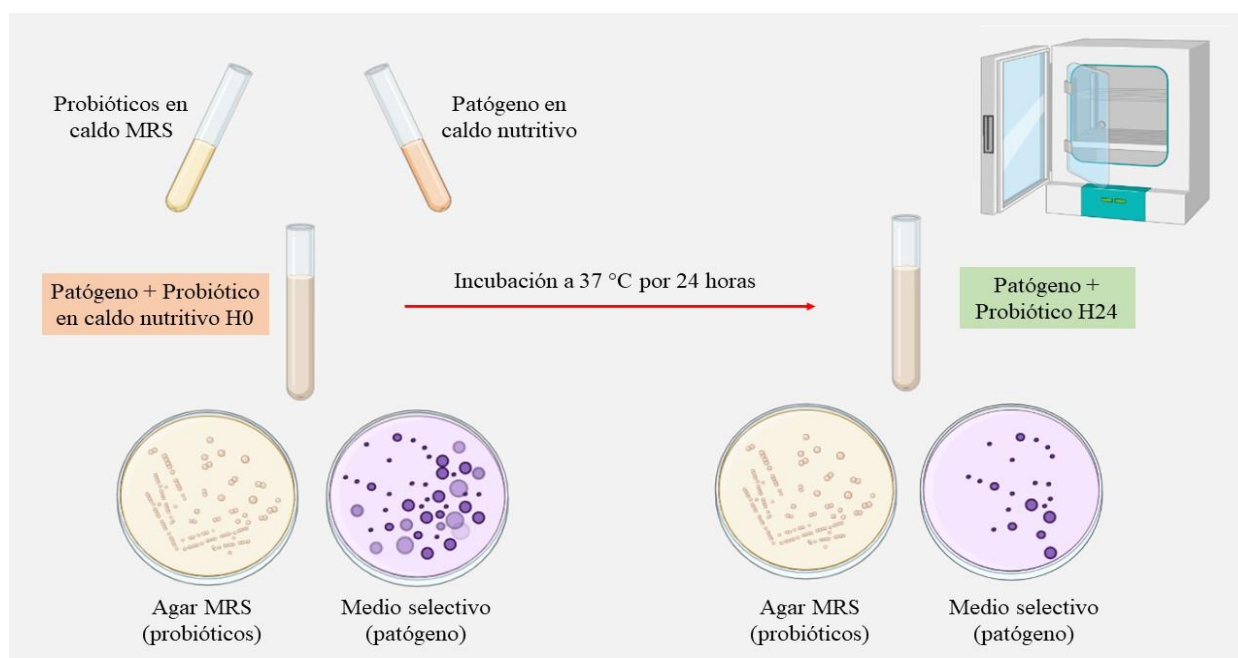
3.4. Etapa 4: Pruebas de Antagonismo con Probióticos

3.4.1. Pruebas de Antagonismo por Enfrentamiento Físico

Las pruebas de antagonismo probiótico se llevaron a cabo utilizando una modificación del método de co-cultivo (Balouiri et al., 2016), también conocido como método de enfrentamiento físico o biomasa-biomasa. Para ello, tal como se muestra en la **Figura 7**, los microorganismos patógenos se sembraron por duplicado en caldo nutritivo con cada una de las bacterias probióticas crecidas en caldo MRS, así como con sus mezclas de dos componentes. Posteriormente, los tubos se incubaron a 37 °C por 24 horas y se extrajo una muestra de cada medio antes y después de su periodo de incubación para determinar el cambio en la densidad celular de cada especie en un medio selectivo sólido.

Figura 7

Metodología general de las pruebas de antagonismo probiótico



En este sentido, se utilizó agar MacConkey (DIBICO 1019-B) para evaluar el enfrentamiento físico de los probióticos contra las dos cepas de *E. coli*, agar Salmonella-Shigella (BD 254047) para las dos cepas de *Salmonella*, agar sal-manitol (DIBICO 1023-B) para las dos cepas de *S. aureus* y agar MRS para los lactobacilos. Adicionalmente, se utilizó como control negativo el crecimiento libre de cada bacteria en su medio selectivo.

3.4.2. Análisis Estadístico del Antagonismo Probiótico

Para el análisis estadístico se empleó un diseño por bloques completos al azar, donde cada bloque se conformó por los microorganismos patógenos estudiados, cada factor del tratamiento correspondió a la especie de bacteria con potencial probiótico (o a sus mezclas de dos componentes) y la variable de respuesta se definió como la reducción en la densidad celular de cada patógeno. En este sentido, la actividad antagónica se midió en tres niveles, donde el primer nivel de la escala correspondió al crecimiento completo del patógeno sobre la superficie del medio de cultivo selectivo (sin inhibición), mientras que el tercer nivel hizo referencia a la ausencia de crecimiento visible sobre el agar (máxima inhibición). Finalmente, se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey para determinar su significancia estadística ($p < 0.05$).

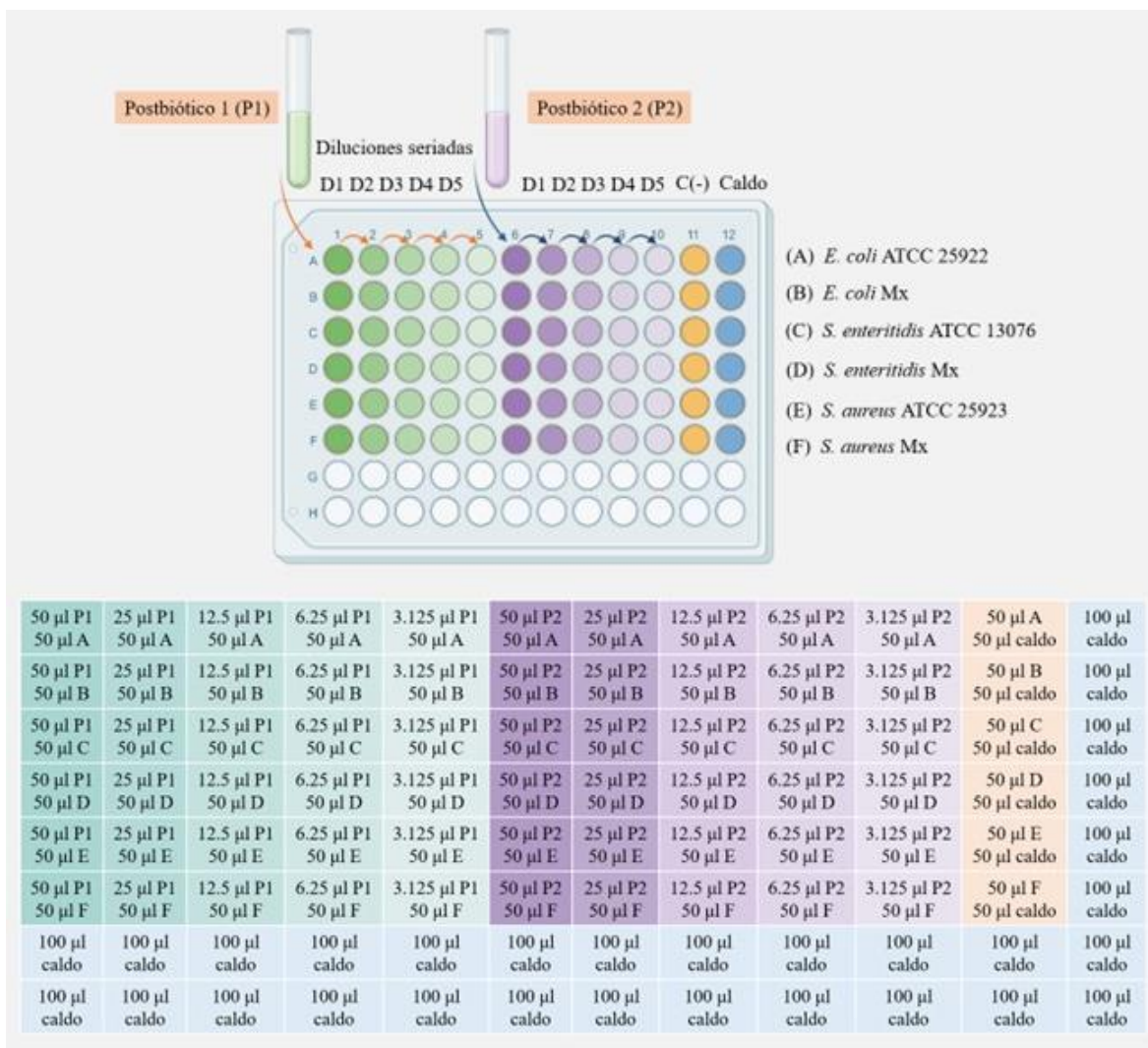
3.5. Etapa 5: Pruebas de Antagonismo con Postbióticos

3.5.1. Pruebas de Antagonismo por Microdilución

Como se muestra en la **Figura 8**, las pruebas de antagonismo postbiótico se llevaron a cabo por el método de microdilución utilizando caldo nutritivo (Balouiri et al., 2016). Para ello, se seleccionaron microplacas estériles de poliestireno de 96 pocillos (Corning 3788) y se dividieron por la mitad para evaluar el efecto de dos postbióticos de manera simultánea.

Figura 8

Diseño experimental del ensayo de antagonismo postbiótico



De manera más específica, se agregaron 100 µl del primer filtrado en los pocillos A1-F1 y 100 µl del segundo filtrado en los pocillos A6-F6 de la microplaca. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de los pocillos A1-F1 a A5-F5 y de A6-F6 a A11-F11 descartando porciones de 50 µl de las últimas columnas (6 y 11). Seguido de esto, las filas A-F se inocularon con 50 µl de cada microorganismo patógeno (uno por fila) y la columna 11 se utilizó como

control negativo (crecimiento libre del patógeno en caldo nutritivo). Todas las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se midió el cambio en su densidad óptica a 620 nm.

3.5.2. Análisis Estadístico del Antagonismo Postbiótico

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y únicamente se consideraron los resultados en los que se observó una coincidencia en al menos dos de los tres pocillos inoculados. Para ello, se empleó un diseño estadístico por bloques completos al azar, donde cada bloque se conformó por los microorganismos patógenos estudiados, cada factor del tratamiento correspondió a la especie de bacteria con potencial postbiótico (o a sus mezclas de dos componentes), y la variable de respuesta se definió como la reducción en la densidad celular de cada patógeno con respecto a su control y expresada en porcentaje de inhibición (%). Por lo tanto, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y una prueba de comparaciones de Dunnett con respecto al control negativo ($p < 0.05$) para determinar la significancia estadística de las diferencias observadas entre los tratamientos.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Etapa 1: Preparación de los Microorganismos bajo Estudio

4.1.1. Crecimiento de las Bacterias Probióticas en Caldo MRS

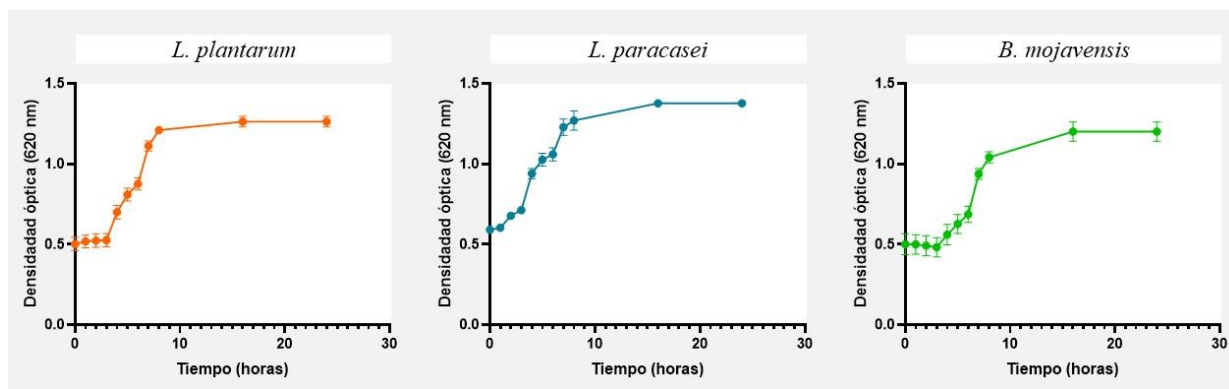
Las bacterias con potencial probiótico identificadas como *L. plantarum*, *L. paracasei* y *B. mojavensis* se crecieron en condiciones de anaerobiosis a 37 °C utilizando caldo MRS estéril. Posteriormente, se trazaron sus curvas de crecimiento (**Figura 9**) y se calcularon sus tasas de crecimiento específicas (μ) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln(X) - \ln(X_0)}{\Delta t}$$

Donde X representa la densidad óptica al final de la fase de crecimiento exponencial, X_0 corresponde a la densidad óptica al comienzo de la fase de crecimiento exponencial, y Δt se refiere al tiempo transcurrido entre las observaciones (Maier, 2009).

Figura 9

Curvas de crecimiento de los probióticos en caldo MRS



Naturalmente, las bacterias productoras de ácido láctico presentan requerimientos nutricionales complejos, por lo que resulta indispensable utilizar medios de cultivo que se encuentren enriquecidos no solo con carbohidratos como fuentes de energía y de carbono, sino

también con aminoácidos y nucleótidos como fuentes complejas de nitrógeno, sales minerales y vitaminas (Kwoji et al., 2022). Por esta razón, el caldo MRS ha sido considerado como uno de los medios de cultivo más eficientes para el crecimiento de los enterococos y los lactobacilos en el laboratorio, así como para la síntesis de algunas bacteriocinas, ya que se trata de una mezcla de peptonas, glucosa, extractos de carne y de levadura, polisorbato 80, acetato de sodio y citrato de amonio que proporcionan los factores de crecimiento necesarios para su cultivo mientras inhiben el desarrollo de los microorganismos competidores (Zhang et al., 2020).

De este modo, tal como se muestra en la **Figura 9**, las curvas de crecimiento de los tres probióticos se caracterizaron, en primer lugar, por la presencia de una fase de adaptación de 3 horas, así como por una fase de crecimiento exponencial de aproximadamente 5 horas y, finalmente, por una fase estacionaria que se prolongó desde la hora 8 hasta la hora 24. Estos resultados coinciden con los datos reportados en estudios previos de la cinética de crecimiento de diversas especies de bacterias del género *Lactobacillus*, pues se ha demostrado que estos microorganismos requieren de un periodo de adaptación de por lo menos 4.10 ± 1.56 horas antes de entrar en la fase de crecimiento exponencial, la cual puede extenderse por más de 8 horas dependiendo de las características de la cepa analizada (Śliżewska & Chlebicz-Wójcik, 2020).

A pesar de que *L. plantarum* mostró la mayor tasa de crecimiento específica dentro de la fase exponencial (0.167 h^{-1}), su densidad óptica final únicamente presentó un ligero incremento con respecto al resto de los probióticos (1.264 ± 0.034). Estos resultados son similares a los reportados en la literatura utilizando el modelo matemático de Ratkowsky, donde *L. plantarum* se caracterizó por exhibir una tasa de crecimiento específica que iba desde 0.15 h^{-1} hasta 1.89 h^{-1} en caldo MRS, la cual dependió significativamente de la temperatura de incubación seleccionada (Matejceková et al., 2019).

Por otro lado, *B. mojavensis* presentó una tasa de crecimiento específica de 0.154 h^{-1} y una densidad óptica final de 1.237 ± 0.101 . A pesar de que no se han evaluado los parámetros cinéticos de esta especie en caldo MRS, estos resultados concuerdan con los reportados para otras especies de bacterias del género *Bacillus*, los cuales van desde 0.08 h^{-1} para *B. atrophaeus* hasta 0.31 h^{-1} para *B. pumilus* en este medio (Valdivia-Anistro et al., 2016). Adicionalmente, una cepa bacteriocinogénica de *B. cereus* SS28 presentó un periodo de crecimiento exponencial desde la hora 6 hasta la hora 22 en caldo MRS a 37°C , alcanzando la misma tasa de crecimiento específica reportada para *B. mojavensis* en este estudio (Yusra et al., 2014).

Finalmente, *L. paracasei* exhibió la menor tasa de crecimiento específica en comparación con el resto de los probióticos (0.116 h^{-1}). No obstante, esta bacteria alcanzó una densidad óptica superior al final del periodo de incubación (1.377 ± 0.017). Este comportamiento también ha sido observado en estudios realizados en caldo MRS a 37°C , en los cuales se han calculado tasas de crecimiento específicas de entre 0.12 y 2.44 h^{-1} para cepas bacteriocinogénicas de *L. paracasei* aisladas de yogur y queso (Carneiro et al., 2017; Yang et al., 2018), las cuales concuerdan con las observadas en esta investigación.

4.1.2. Crecimiento de los Patógenos ATCC y de Aislamiento Clínico

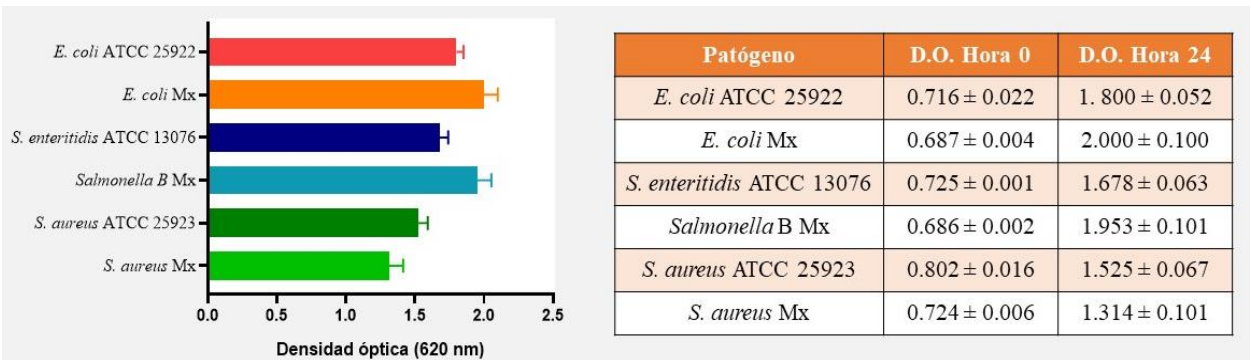
El caldo nutritivo es un medio de cultivo basal que favorece el crecimiento de una amplia gama de microorganismos sin requerimientos nutricionales o ambientales específicos, por lo que se utiliza comúnmente para el enriquecimiento no selectivo de bacterias provenientes de aislamientos clínicos o alimentarios (Jorgensen et al., 2019). Sumado a lo anterior, diversos estudios han reportado el mantenimiento y desarrollo óptimo de cepas patogénicas de *E. coli* ATCC 35150, *S. enteritidis* KCCM 12021, *S. aureus* KCCM 11335 y *S. typhimurium* ATCC 14028 en caldo nutritivo a 37°C previo a la evaluación del efecto antagónico de bacterias ácido-

lácticas aisladas de alimentos fermentados como el kimchi (A. R. Choi et al., 2018), el kéfir (Iraporda et al., 2017) y el ayib o queso etíope (Jermen et al., 2015).

Particularmente, *Escherichia coli* es una bacteria gramnegativa, anaerobia facultativa y en forma de bastoncillo, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y que constituye uno de los microorganismos mejor adaptados y más versátiles patogénicamente, ya que es responsable de causar numerosas enfermedades gastrointestinales e infecciones extraintestinales (Pakbin et al., 2021; Riley, 2020). Asimismo, las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* están constituidas por bacilos gramnegativos móviles que no forman esporas, pero que son capaces de colonizar a los humanos y de causar infecciones graves como la gastroenteritis, la fiebre entérica y la bacteriemia (Ajmera & Shabbir, 2022; Sabike et al., 2015). Por otro lado, *Staphylococcus aureus* es una bacteria grampositiva en forma de coco y con una respiración anaerobia facultativa, la cual se considera altamente virulenta y adaptable al contar con la capacidad de infectar, invadir, persistir y replicarse en cualquier tejido humano, incluidos la piel, los huesos y los órganos viscerales (Missiakas & Schneewind, 2013; Paharik & Horswill, 2016).

Figura 10

Crecimiento de las bacterias patógenas en caldo nutritivo



De este modo, durante el desarrollo de la presente investigación, las bacterias patógenas mostraron un crecimiento óptimo en caldo nutritivo a 37 °C (Figura 10). Particularmente, el

aislamiento clínico de *E. coli* exhibió una mayor densidad celular después de 24 horas de incubación (2.000 ± 0.100), mientras que el aislamiento clínico de *S. aureus* mostró un menor crecimiento en todas sus réplicas (1.314 ± 0.101). A pesar de lo anterior, tras realizar una prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$), no fue posible encontrar diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de cada microorganismo con respecto a su tipo de aislamiento o a la especie bacteriana a la que pertenece, por lo que no se consideran un factor de variabilidad importante para las pruebas de antagonismo subsecuentes.

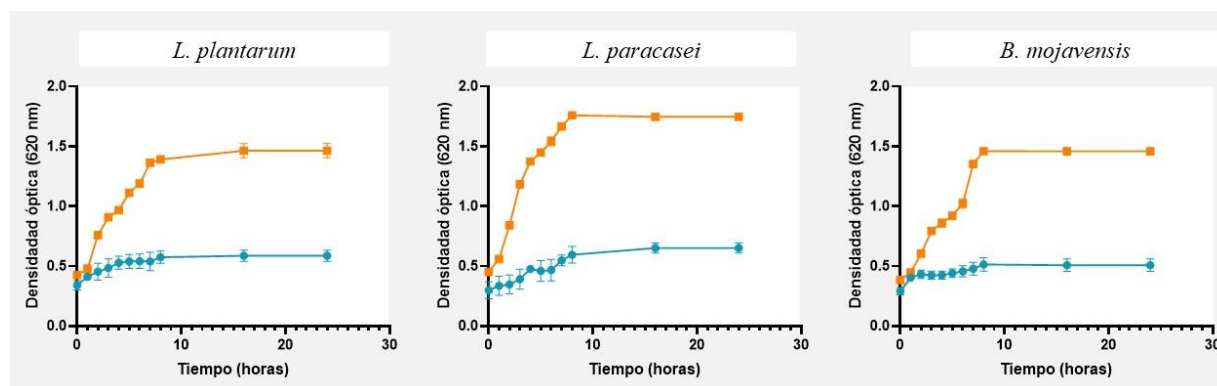
4.2. Etapa 2: Procesamiento del Aguamiel

4.2.1. Análisis de la Cinética de Crecimiento en Aguamiel

De la misma forma que en la **Etapa 1**, las bacterias con potencial probiótico se incubaron a 37 °C en condiciones de anaerobiosis, pero utilizando aguamiel pasteurizado como sustrato. Posteriormente, se trazaron sus curvas de crecimiento (**Figura 11**) y se analizaron sus parámetros cinéticos antes (4.9°) y después (13°) de realizar el ajuste en los grados Brix del medio.

Figura 11

Curvas de crecimiento de los probióticos en aguamiel



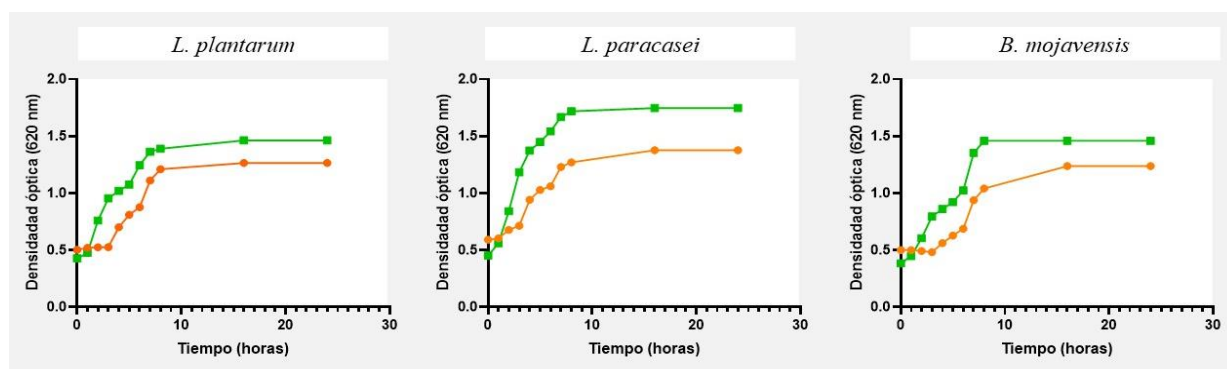
Nota. Se presenta el crecimiento de *L. plantarum*, *L. paracasei* y *B. mojavensis* en aguamiel antes (—●—) y después (—■—) del ajuste de los grados Brix del aguamiel a 13°.

Como se muestra en la **Figura 11**, el aguamiel previo al ajuste en sus grados Brix (4.9°) limitó el desarrollo de las bacterias con potencial probiótico, dando como resultado tasas de crecimiento subóptimas de 0.063, 0.061 y 0.029 h⁻¹ para *L. plantarum*, *L. paracasei* y *B. mojavensis*, respectivamente. Por lo tanto, es posible concluir que el crecimiento de las bacterias en un medio de cultivo dependerá principalmente de su capacidad para utilizar los carbohidratos fermentables disponibles y, por lo tanto, su tasa de crecimiento específica será directamente proporcional a la concentración de azúcares aprovechables en el medio (Sutikno et al., 2013).

En el caso del aguamiel fresco, se ha reportado que la sacarosa es el azúcar simple que se encuentra en mayor proporción (>65% del peso seco), sin embargo, su concentración varía estacionalmente y puede verse afectada por la actividad de enzimas endógenas o microbianas (Enríquez-Salazar et al., 2017). Por esta razón, el ajuste de los grados Brix con este disacárido resulta indispensable para el establecimiento de cultivos en los que se vea favorecido el crecimiento de los lactobacilos, además de que se ha reportado que el enriquecimiento con sacarosa permite inhibir el crecimiento de enterobacterias indeseadas (Zi et al., 2022).

Figura 12

Comparación del crecimiento probiótico en caldo MRS y aguamiel



Nota. Se presenta el crecimiento de *L. plantarum*, *L. paracasei* y *B. mojavensis* después de 24 horas a 37 °C en caldo MRS (—●—) y en aguamiel (—■—).

Por otro lado, tras comparar las curvas de crecimiento obtenidas en el aguamiel ajustado a 13° Brix con respecto a aquellas obtenidas en el caldo MRS adicionado con cisteína (**Figura 12**), fue posible identificar una reducción importante en la fase de adaptación de las tres bacterias probióticas, así como un incremento en la duración de la fase de crecimiento exponencial (promedio de 7.33 ± 0.02 horas). Sumado a lo anterior, como se muestra en la **Tabla 5**, los parámetros cinéticos calculados para *L. paracasei* y *B. mojavensis* en el aguamiel ajustado mostraron un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.0001$) en comparación con los obtenidos en caldo MRS. Asimismo, a pesar de que *L. plantarum* exhibió una menor tasa de crecimiento específica en el aguamiel (0.154 h^{-1}), alcanzó una mayor densidad celular al final del periodo de incubación, por lo que es posible concluir que este sustrato puede aprovecharse como un medio de enriquecimiento para el desarrollo y mantenimiento de los bacilos y lactobacilos.

Tabla 5

Parámetros cinéticos de los probióticos en caldo MRS y aguamiel

Bacteria	Medio de cultivo	D.O. final (620 nm)	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Valor P
<i>L. plantarum</i>	Caldo MRS	1.264 ± 0.034	0.167 h^{-1}	<0.0001
	Aguamiel 13° Brix	1.463 ± 0.059	0.154 h^{-1}	
<i>L. paracasei</i>	Caldo MRS	1.377 ± 0.017	0.116 h^{-1}	<0.0001
	Aguamiel 13° Brix	1.746 ± 0.022	0.182 h^{-1}	
<i>B. mojavensis</i>	Caldo MRS	1.237 ± 0.101	0.154 h^{-1}	<0.0001
	Aguamiel 13° Brix	1.459 ± 0.003	0.184 h^{-1}	

El crecimiento selectivo de las bacterias ácido-lácticas y bacilos en el aguamiel es el resultado de su elevado contenido en azúcares fermentables, aminoácidos esenciales, antioxidantes como las saponinas y los compuestos fenólicos, vitaminas del complejo B y minerales como el potasio, el calcio, el sodio, el hierro y el magnesio (Peralta-García et al.,

2020). Desafortunadamente, debido a la complejidad de los requisitos nutrimentales de estas bacterias y a la falta de modelos matemáticos que permitan describir la disponibilidad de los nutrientes a lo largo del periodo de incubación, no ha sido posible elucidar qué compuestos son los responsables de la limitación en el desarrollo celular (Leroy & de Vuyst, 2001). No obstante, los resultados obtenidos en la presente investigación permiten concluir que los azúcares y los aminoácidos corresponden a dos factores de crecimiento muy importantes.

4.3. Etapa 3: Pruebas de Antagonismo con Probióticos

4.3.1. Pruebas de Antagonismo con Probióticos Individuales

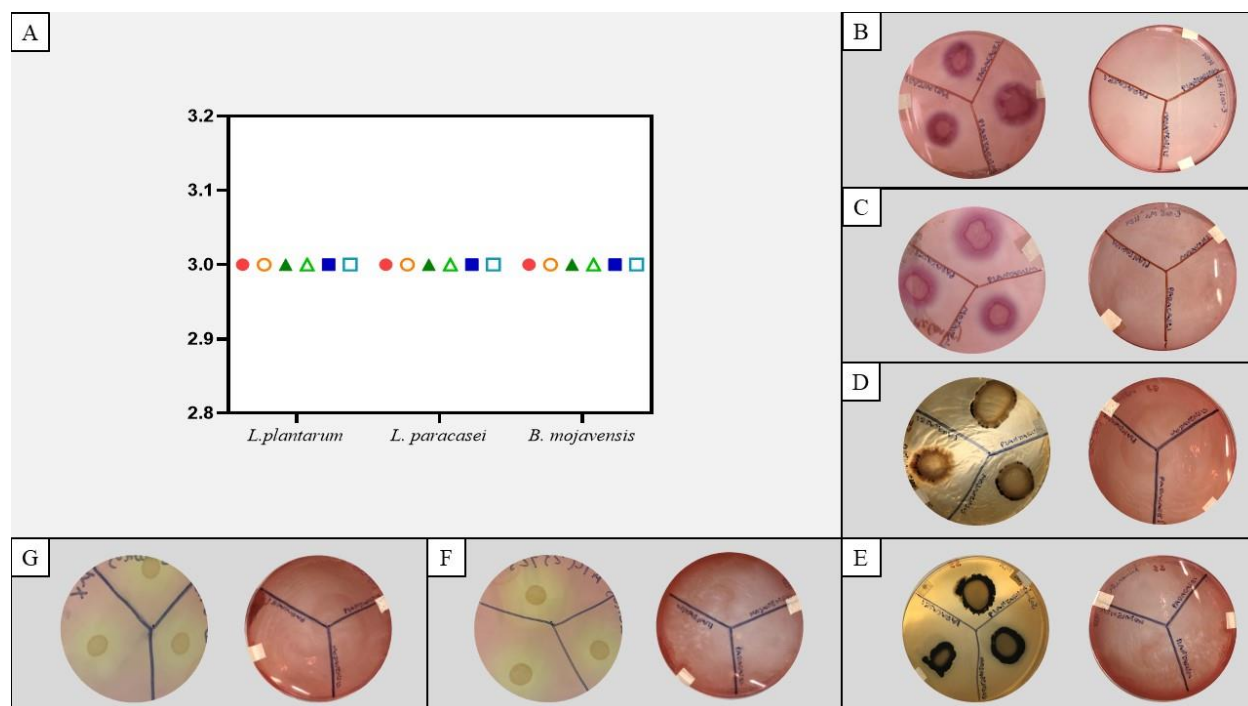
Las bacterias con potencial probiótico identificadas como *L. plantarum* (LPL), *L. paracasei* (LPA) y *B. mojavensis* (BM) se sembraron en conjunto con cada uno de los microorganismos patógenos. Posteriormente, se extrajo una muestra del medio al inicio y al final de su periodo de incubación con el objetivo de comparar el cambio en la densidad celular de cada especie utilizando un medio sólido de enriquecimiento selectivo. Finalmente, los niveles de inhibición en el crecimiento de las cepas patógenas se estimaron utilizando la siguiente escala: 1 para la inhibición nula (densidad celular elevada), 2 para la inhibición moderada (pequeños halos de crecimiento) y 3 para la inhibición elevada (ausencia de crecimiento).

En este sentido, tal como se muestra en la **Figura 13 (incisos B-G)**, todos los microorganismos patógenos crecieron de manera óptima en su medio selectivo antes del periodo de incubación con las tres cepas probióticas. Por el contrario, después de las 24 horas de enfrentamiento físico, no fue posible identificar la presencia de células microbianas en la superficie de ninguno de los medios de cultivo, por lo que se concluye una elevada actividad antagónica por parte de todos los probióticos (nivel 3, **Figura 13A**). Esto es posible gracias a la

capacidad de estos microorganismos para inhibir el crecimiento de las células patogénicas al competir por los nutrientes y el espacio disponible (Raheem et al., 2021).

Figura 13

Resultados del antagonismo probiótico individual



Nota. En el inciso A se muestra el nivel de antagonismo observado para los tres probióticos individuales contra *E. coli* ATCC 25922 (●) y su aislado clínico (○), *S. enteritidis* ATCC 13076 (▲) y su aislado clínico (△), y para *S. aureus* ATCC 25923 (■) con su aislado clínico (□). Adicionalmente, se presentan fotografías de los medios de enriquecimiento selectivo antes (a la izquierda) y después (a la derecha) del enfrentamiento físico entre los tres probióticos contra *E. coli* ATCC 25922 (B), *E. coli* Mx (C), *S. enteritidis* ATCC 13076 (D), *Salmonella* Mx (E), *S. aureus* ATCC 25923 (F) y *S. aureus* Mx (G).

Estos resultados coinciden con lo reportado anteriormente en la literatura. Por ejemplo, se ha descrito la actividad antagónica de diferentes cepas de *L. plantarum* y *L. paracasei* aisladas de

alimentos fermentados frente a patógenos putrefactivos como *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* y *S. enteritidis*, la cual se relaciona principalmente con la producción de bacteriocinas, ácidos orgánicos como el ácido láctico y el ácido acético, y sustancias de bajo peso molecular (da Costa et al., 2018; Reuben et al., 2020). Adicionalmente, numerosos estudios han descrito la capacidad de estos dos probióticos para inhibir el crecimiento de cepas multirresistentes de *S. aureus* utilizando mecanismos de exclusión celular directa (Sikorska & Smoragiewicz, 2013) y a partir de la producción de biosurfactantes con propiedades antiadherentes o bactericidas (Jia et al., 2021).

Por otro lado, si bien es cierto que el género *Bacillus* ha sido estudiado esencialmente por su asociación endofítica con ciertas plantas medicinales y por sus efectos protectores frente a diversas micotoxinas, recientemente se ha reportado que algunas cepas de *B. mojavensis* son capaces de producir lipopéptidos como la surfactina y la fengicina, los cuales poseen efectos antimicrobianos contra bacterias grampositivas y gramnegativas como *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *S. typhimurium*, y *S. aureus* (Jasim et al., 2016). Este descubrimiento permite explicar los resultados de antagonismo microbiano observados en esta investigación, además de que enfatizan la potencial aplicación de *B. mojavensis* como un producto probiótico, ya que se trata de una bacteria estable incluso en entornos hostiles (S. M. Choi et al., 2011).

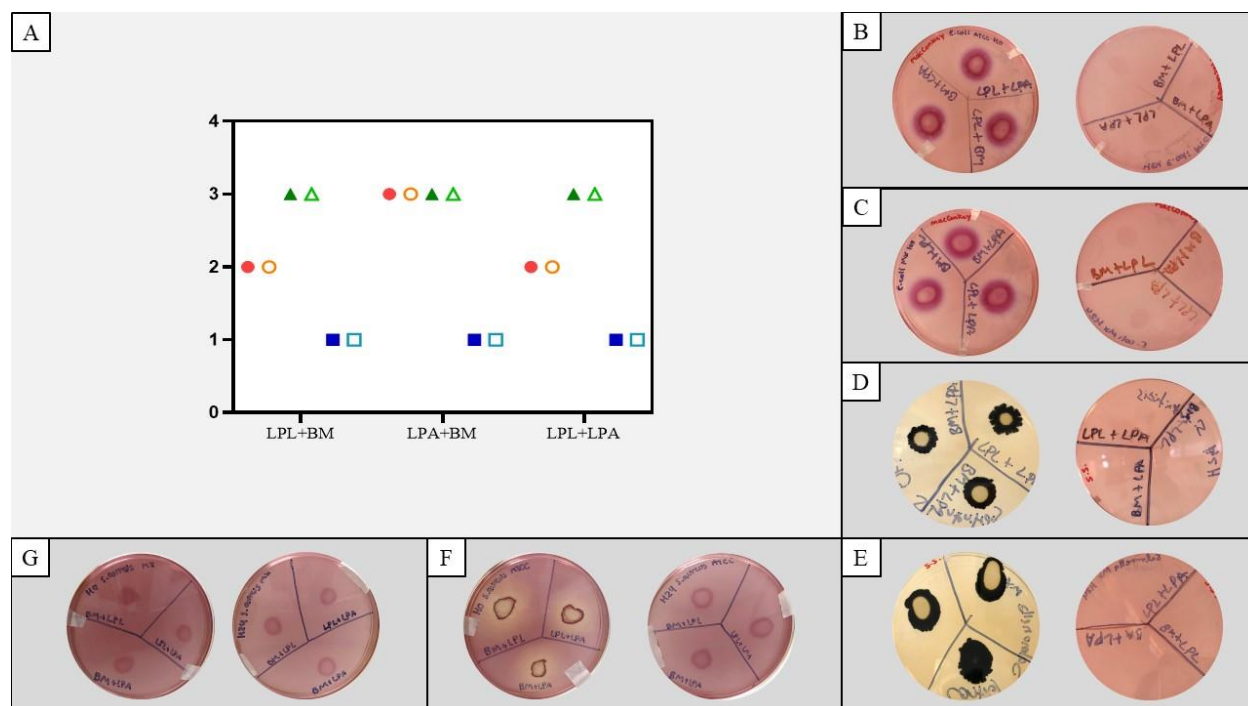
4.3.2. Pruebas de Antagonismo con Mezclas de Probióticos

De la misma manera que en el apartado anterior, las mezclas probióticas conformadas por *L. plantarum* con *B. mojavensis* (LPL+BM), *L. paracasei* con *B. mojavensis* (LPA+BM) y *L. plantarum* con *L. paracasei* (LPL+LPA) se sembraron en conjunto con cada uno de los microorganismos patógenos y se evaluó el cambio en la densidad celular de cada especie en un medio de cultivo selectivo utilizando la siguiente escala: 1 para la inhibición nula (densidad

celular elevada), 2 para la inhibición moderada (pequeños halos de crecimiento) y 3 para la inhibición elevada (ausencia de crecimiento).

Figura 14

Resultados del antagonismo con mezclas de probióticos



Nota. En el inciso A se muestra el nivel de antagonismo observado para las tres mezclas de probióticos contra *E. coli* ATCC 25922 (●) y su aislado clínico (○), *S. enteritidis* ATCC 13076 (▲) y su aislado clínico (△), y para *S. aureus* ATCC 25923 (■) con su aislado clínico (□).

Adicionalmente, se presentan fotografías de los medios de enriquecimiento selectivo antes (a la izquierda) y después (a la derecha) del enfrentamiento físico entre los tres probióticos contra *E. coli* ATCC 25922 (B), *E. coli* Mx (C), *S. enteritidis* ATCC 13076 (D), *Salmonella* Mx (E), *S. aureus* ATCC 25923 (F) y *S. aureus* Mx (G).

Como se muestra en la **Figura 14 (incisos B-G)**, todos los microorganismos patógenos crecieron de manera adecuada en su medio de cultivo selectivo antes del enfrentamiento físico

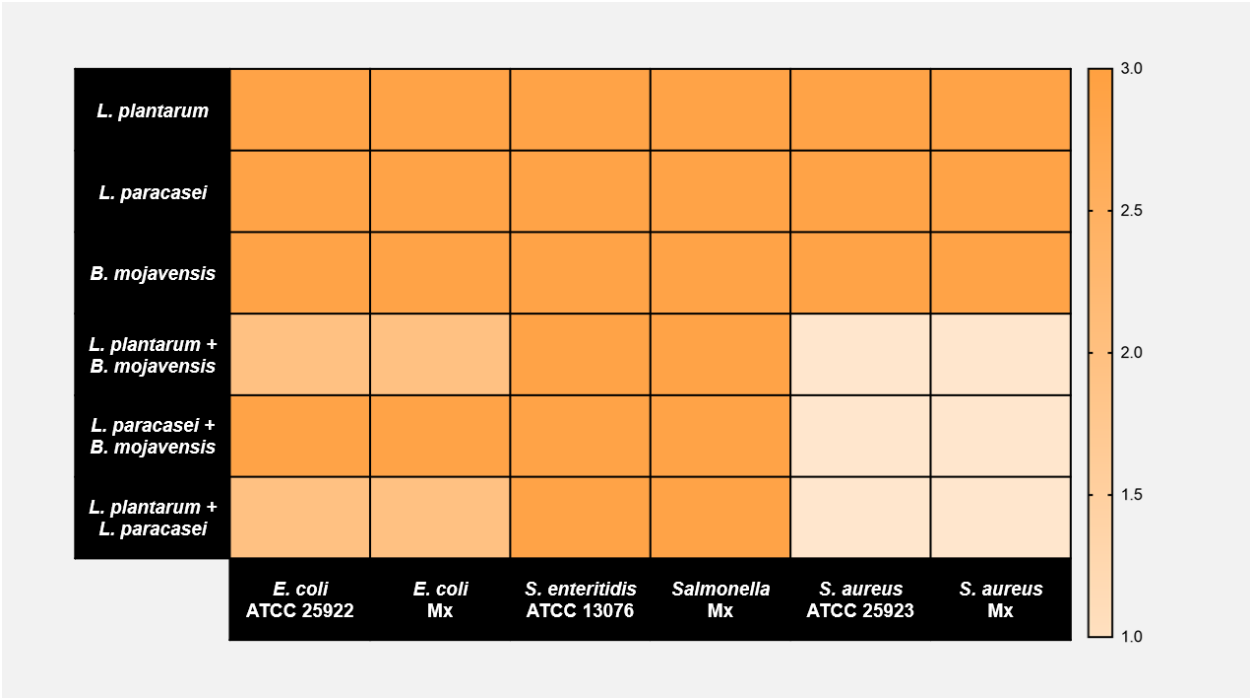
con las mezclas de probióticos. En contraste, después del periodo de incubación, el crecimiento de ambos aislamientos de *Salmonella* fue completamente suprimido por los tres tratamientos sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre las especies de probióticos involucradas ($p > 0.9999$). Estos resultados se encuentran en línea con lo reportado en la literatura, ya que se ha demostrado que el uso de una combinación de bacterias probióticas puede causar una mayor inhibición en el crecimiento de *S. enteritidis* en comparación con lo observado con una sola cepa de *Lactobacillus* (Chang et al., 2019; Chapman et al., 2012; Neveling et al., 2020). Por otro lado, mientras los aislamientos de *E. coli* fueron altamente inhibidos por la mezcla de *L. paracasei* y *B. mojavensis*, los otros tratamientos mostraron una actividad antimicrobiana significativamente menor ($p < 0.0001$), lo cual resultó en la aparición de halos de crecimiento pequeños y poco densos (**Figura 14B-C**). Finalmente, ninguna de las cepas de *S. aureus* resultó susceptible ante ninguno de los tratamientos probióticos estudiados, lo cual se evidenció en la aparición de una masa densa de crecimiento celular sobre cada medio de cultivo (**Figura 14G-F**).

En este sentido, a pesar de que numerosos estudios *in vitro* han demostrado que las mezclas de probióticos podrían exhibir mejores efectos inhibitorios contra los enteropatógenos al combinar los beneficios individuales de las cepas utilizadas (Kwoji et al., 2021; Yoon et al., 2014), recientemente se ha informado que los lactobacilos tienden a presentar una mayor inhibición sobre las cepas probióticas durante los ensayos de antagonismo por co-cultivo (Chapman et al., 2012; Pakbin et al., 2021). Por ejemplo, tras comparar el efecto antimicrobiano de cuatro cepas individuales con respecto al efecto de su mezcla, *L. plantarum* y *L. rhamnosus* mostraron antagonismo contra *L. acidophilus* y *Enterococcus faecium* (McFarland, 2021). Por otro lado, estudios adicionales han demostrado que las mezclas de probióticos son tan efectivas como sus componentes individuales, por lo que no presentan diferencias significativas frente a

distintos patógenos (Chapman et al., 2013). Por esta razón, es posible concluir que los productos probióticos de una sola cepa diseñados en el presente estudio son más efectivos que sus mezclas de dos componentes (**Figura 15**).

Figura 15

Efectividad de los probióticos individuales y en mezclas



Nota. Mapa de calor en el que se compara el efecto antimicrobiano de los probióticos individuales y de sus mezclas de dos componentes, donde el color más oscuro corresponde al mayor nivel de inhibición (3) y el color más tenue representa el nivel de inhibición más bajo (1).

4.4. Etapa 4: Pruebas de Antagonismo con Postbióticos

4.4.1. Pruebas de Antagonismo con Postbióticos Individuales

Las bacterias probióticas se crecieron en condiciones de anaerobiosis a 37 °C utilizando caldo MRS o aguamiel como sustrato. Posteriormente, se filtraron los productos de sus

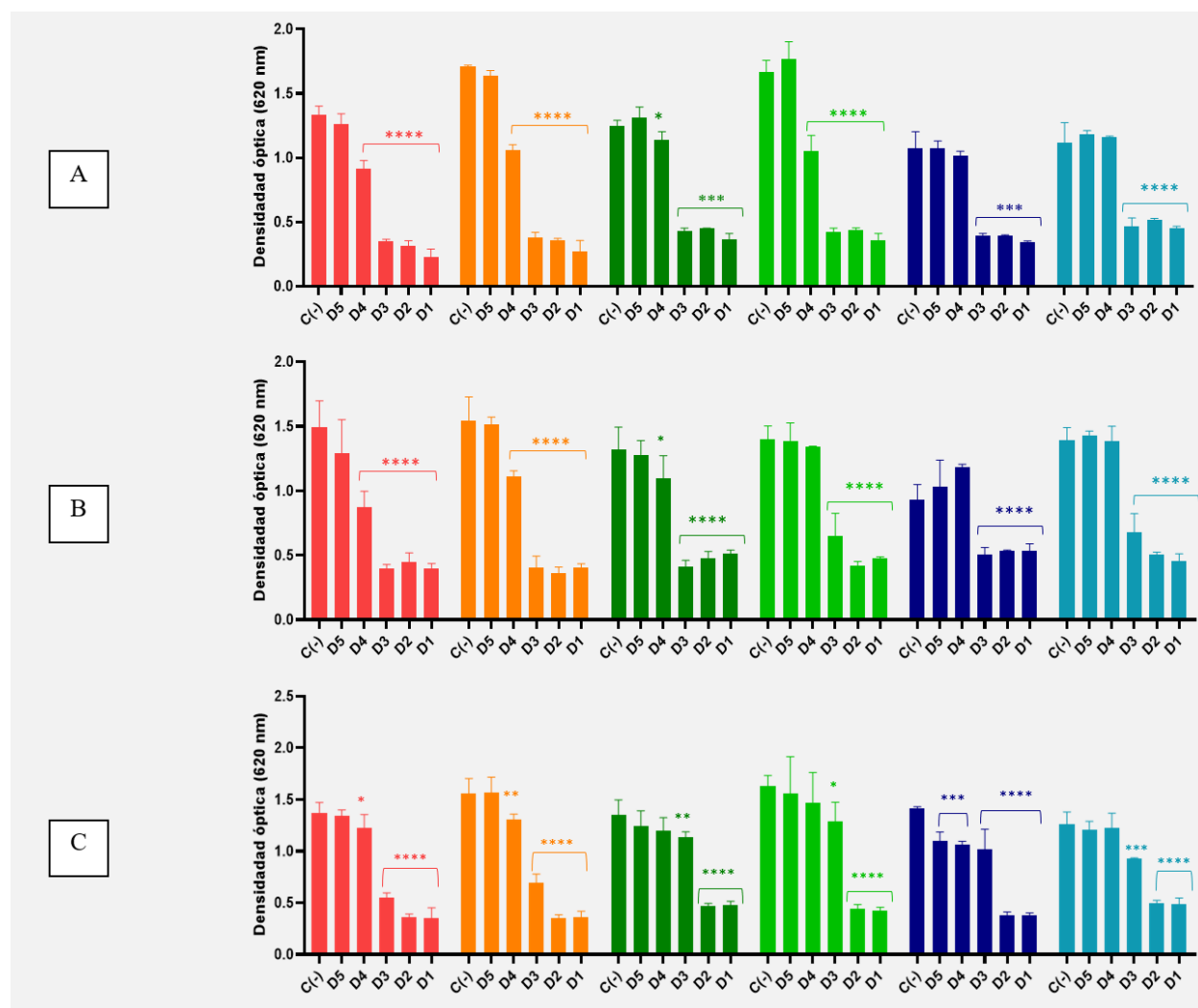
fermentaciones individuales y se realizaron cinco diluciones seriadas (D1-D5) sobre una microplaca inoculada con cada uno de los microorganismos patógenos. Finalmente, se determinó el cambio en la densidad óptica de los pocillos después de 24 horas de incubación y se calcularon los porcentajes de inhibición en el crecimiento de los patógenos de acuerdo con la siguiente ecuación (Medina-Fernández et al., 2019):

$$\% \text{ Inhibición} = \left[1 - \frac{\text{D. O. tratamiento}}{\text{D. O. control}} \right] \times 100$$

En la **Figura 16** y **Figura 17** se muestra el crecimiento de cada cepa patógena después de su tratamiento con los postbióticos obtenidos en caldo MRS y en aguamiel, respectivamente. En ambos sustratos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pocillos de la microplaca al inicio de su periodo de incubación ($p > 0.9999$), por lo que se descartaron como una fuente de variabilidad importante en los resultados de antagonismo. Asimismo, se identificó una relación dosis-respuesta entre el porcentaje de inhibición y las diluciones de cada postbiótico ($p < 0.0001$), ya que el crecimiento de los microorganismos patógenos fue considerablemente mayor en los tratamientos menos concentrados y, por lo tanto, su efecto antagónico fue menor. Curiosamente, la mayoría de los postbióticos mostraron una inhibición significativa en el crecimiento de los patógenos en sus primeras cuatro diluciones (**Tabla 6**). Esta pérdida en el efecto antimicrobiano de los postbióticos cuando se aplican en concentraciones menores al 25% (v/v) se ha reportado previamente para sobrenadantes libres de células de *L. plantarum* frente a cepas patógenas de *E. coli*, *S. enteritidis* y *S. aureus* (Arena et al., 2016). No obstante, en este caso el postbiótico de *B. mojavensis* producido en caldo MRS fue el único capaz de exhibir un efecto antimicrobiano significativo contra *S. aureus* ATCC 25923 en sus cinco diluciones ($p < 0.05$).

Figura 16

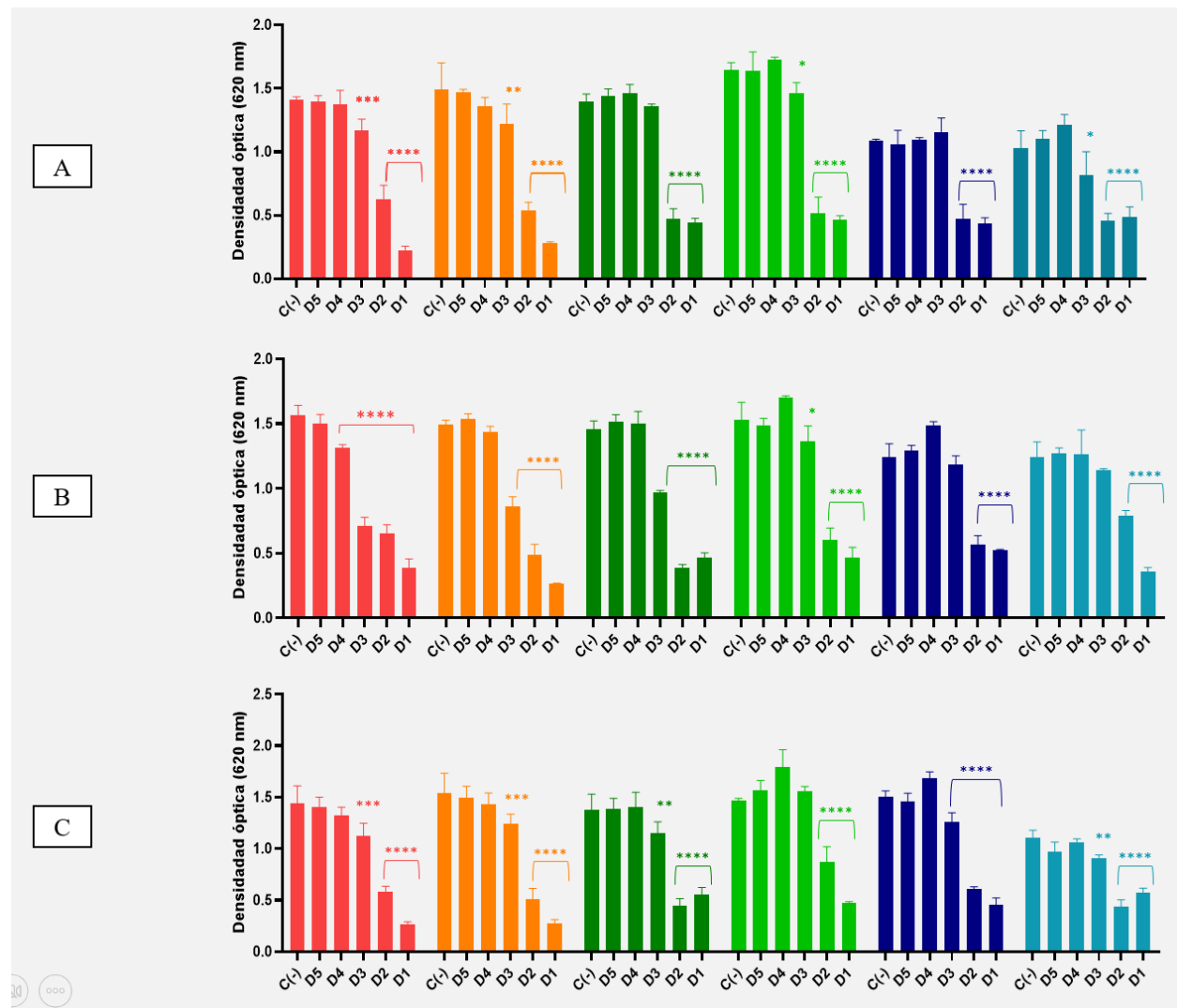
Crecimiento de los patógenos frente a los postbióticos en caldo MRS



Nota. Se muestra el crecimiento (densidad óptica a 620 nm con su desviación estándar y significancia estadística) de *E. coli* ATCC 25922 (●), *E. coli* Mx (●), *S. enteritidis* ATCC 13076 (●), *Salmonella* Mx (●), *S. aureus* ATCC 25923 (●) y *S. aureus* Mx (●) después de su tratamiento con las cinco diluciones de los postbióticos de *L. plantarum* (A), *L. paracasei* (B) y *B. mojavensis* (C) en caldo MRS.

Figura 17

Crecimiento de los patógenos frente a los postbióticos en aguamiel



Nota. Se muestra el crecimiento (densidad óptica a 620 nm con su desviación estándar y significancia estadística) de *E. coli* ATCC 25922 ($\bullet$), *E. coli* Mx ($\bullet$), *S. enteritidis* ATCC 13076 ($\bullet$), *Salmonella* Mx ($\bullet$), *S. aureus* ATCC 25923 ($\bullet$) y *S. aureus* Mx ($\bullet$) después de su tratamiento con las cinco diluciones de los postbióticos de *L. plantarum* (A), *L. paracasei* (B) y *B. mojavensis* (C) en aguamiel.

Tabla 6

Resultados del antagonismo de los postbióticos individuales

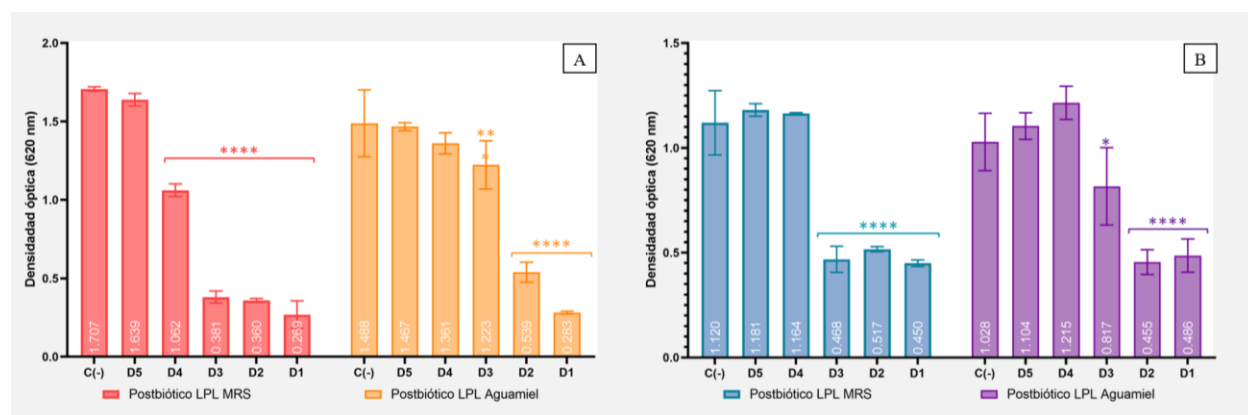
Porcentaje de inhibición (%) del postbiótico de <i>L. plantarum</i>										
Caldo MRS						Aguamiel				
Tratamiento	D1	D2	D3	D4	D5	D1	D2	D3	D4	D5
<i>E. coli</i> 25922	82.97±0.06	76.48±0.04	73.84±0.02	31.84±0.07	NS	84.11±0.03	55.50±0.11	17.49±0.09	NS	NS
<i>E. coli</i> Mx	84.24±0.09	78.93±0.01	77.70±0.04	37.81±0.04	NS	81.01±0.01	63.78±0.06	17.81±0.15	NS	NS
<i>Salmonella</i> 13076	70.45±0.04	63.84±0.00	65.58±0.02	8.58±0.06	NS	68.36±0.03	66.14±0.08	NS	NS	NS
<i>Salmonella</i> Mx	78.42±0.05	73.63±0.01	74.57±0.03	36.92±0.12	NS	71.78±0.03	68.73±0.13	10.75±0.08	NS	NS
<i>S. aureus</i> 25923	67.71±0.01	63.07±0.01	62.91±0.01	NS	NS	59.67±0.04	56.69±0.12	NS	NS	NS
<i>S. aureus</i> Mx	59.83±0.02	53.85±0.01	58.17±0.06	NS	NS	52.71±0.08	55.75±0.13	20.58±0.08	NS	NS
Porcentaje de inhibición (%) del postbiótico de <i>L. paracasei</i>										
Caldo MRS						Aguamiel				
Tratamiento	D1	D2	D3	D4	D5	D1	D2	D3	D4	D5
<i>E. coli</i> 25922	73.20±0.04	70.12±0.07	73.56±0.03	41.38±0.12	NS	75.43±0.07	58.51±0.07	54.70±0.07	16.15±0.03	NS
<i>E. coli</i> Mx	73.96±0.03	76.70±0.05	74.00±0.09	27.89±0.04	NS	82.09±0.00	67.38±0.08	42.40±0.08	NS	NS
<i>Salmonella</i> 13076	61.14±0.03	63.84±0.05	68.68±0.05	16.84±0.17	NS	67.97±0.04	73.60±0.03	33.59±0.02	NS	NS
<i>Salmonella</i> Mx	65.84±0.01	69.97±0.03	53.70±0.18	NS	NS	69.54±0.08	60.72±0.10	10.79±0.12	NS	NS
<i>S. aureus</i> 25923	42.26±0.05	42.41±0.01	45.57±0.06	NS	NS	57.82±0.01	54.11±0.07	NS	NS	NS
<i>S. aureus</i> Mx	67.46±0.06	63.67±0.02	51.41±0.15	NS	NS	71.33±0.03	36.80±0.04	NS	NS	NS
Porcentaje de inhibición (%) del postbiótico de <i>B. mojavensis</i>										
Caldo MRS						Aguamiel				
Tratamiento	D1	D2	D3	D4	D5	D1	D2	D3	D4	D5
<i>E. coli</i> 25922	74.29±0.10	73.95±0.03	59.81±0.05	10.74±0.13	NS	81.82±0.03	59.29±0.05	21.86±0.12	NS	NS
<i>E. coli</i> Mx	76.65±0.05	77.61±0.04	55.47±0.08	16.58±0.06	NS	82.08±0.04	66.66±0.10	19.09±0.09	NS	NS
<i>Salmonella</i> 13076	64.85±0.04	65.27±0.03	16.16±0.06	NS	NS	59.73±0.07	59.87±0.07	16.09±0.11	NS	NS
<i>Salmonella</i> Mx	73.78±0.03	72.80±0.04	20.80±0.19	NS	NS	67.74±0.01	40.71±0.15	NS	NS	NS
<i>S. aureus</i> 25923	73.51±0.03	73.03±0.03	28.28±0.20	25.08±0.03	22.42±0.09	69.74±0.07	59.87±0.03	16.09±0.09	NS	NS
<i>S. aureus</i> Mx	61.63±0.06	60.76±0.03	26.16±0.01	NS	NS	48.14±0.04	60.96±0.07	17.84±0.03	NS	NS

Nota. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3), donde NS significa que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control negativo.

Particularmente, el aislamiento clínico de *E. coli* fue el más susceptible al tratamiento con los postbióticos de *L. plantarum*, alcanzando una inhibición de hasta el $84.24 \pm 0.088\%$ con el postbiótico en caldo MRS y del $81.01 \pm 0.009\%$ con el postbiótico en aguamiel (**Figura 18A**). En contraste, el aislamiento clínico de *S. aureus* resultó ser el menos susceptible a ambos tratamientos, presentando porcentajes de inhibición del $59.83 \pm 0.016\%$ con el postbiótico de *L. plantarum* en caldo MRS y del $52.71 \pm 0.080\%$ con el mismo postbiótico en aguamiel (**Figura 18B**). Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura, ya que anteriormente se ha descrito una inhibición del 30 al 90% en el crecimiento de *E. coli* después de su tratamiento con un sobrenadante libre de células de una cepa de *L. plantarum* aislada de alimentos fermentados, lo cual se atribuye principalmente a la producción de compuestos antimicrobianos y antiadherentes como el peróxido de hidrógeno, el ácido láctico, el diacetilo, los surfactantes y las bacteriocinas (Lau & Chye, 2018; Mekky et al., 2022).

Figura 18

Inhibición de *E. coli* Mx y *S. aureus* Mx con los postbióticos de *L. plantarum*

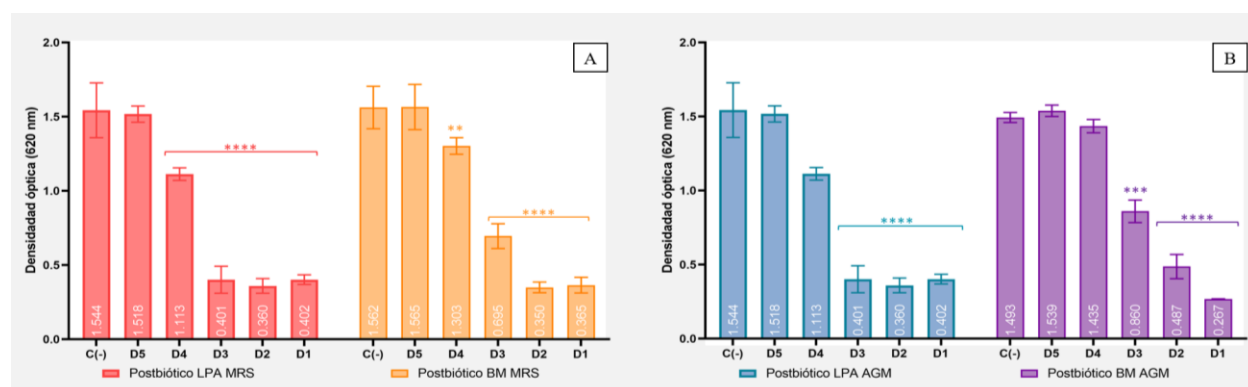


Nota. La significancia estadística se expresa con respecto al control negativo y los valores de P menores a 0.0001 se muestran con cuatro asteriscos. Los tratamientos en los que se observó una densidad óptica superior al control no resultaron estadísticamente significativos ($p > 0.05$).

De manera similar, el aislamiento clínico de *E. coli* mostró una reducción importante en su crecimiento después de su tratamiento con la segunda dilución de los postbióticos individuales de *L. paracasei* y *B. mojavensis* en caldo MRS, alcanzando porcentajes de inhibición del $76.70 \pm 0.050\%$ y del $77.61 \pm 0.036\%$, respectivamente (**Figura 19A**). Este efecto antimicrobiano aumentó significativamente ($p < 0.0001$) en los postbióticos obtenidos en aguamiel, alcanzando una inhibición de hasta el $82.09 \pm 0.002\%$ para el postbiótico de *L. paracasei* y del $82.08 \pm 0.037\%$ para el postbiótico de *B. mojavensis* (**Figura 19B**). Estos hallazgos, los cuales se presentan de manera resumida en la **Tabla 6**, se encuentran en línea con lo reportado en diferentes estudios, ya que se ha demostrado que los postbióticos obtenidos de *L. paracasei* y *B. breve* son capaces de inhibir el crecimiento de cepas patógenas de *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella* en un 40, 55 y 81%, respectivamente, lo cual se ha atribuido principalmente a la producción de ácidos orgánicos como el ácido láctico y otros compuestos antimicrobianos altamente específicos para las especies de enterobacterias involucradas (Muñoz-Quezada et al., 2013).

Figura 19

Inhibición de *E. coli* Mx con los postbióticos de *L. paracasei* y *B. mojavensis*

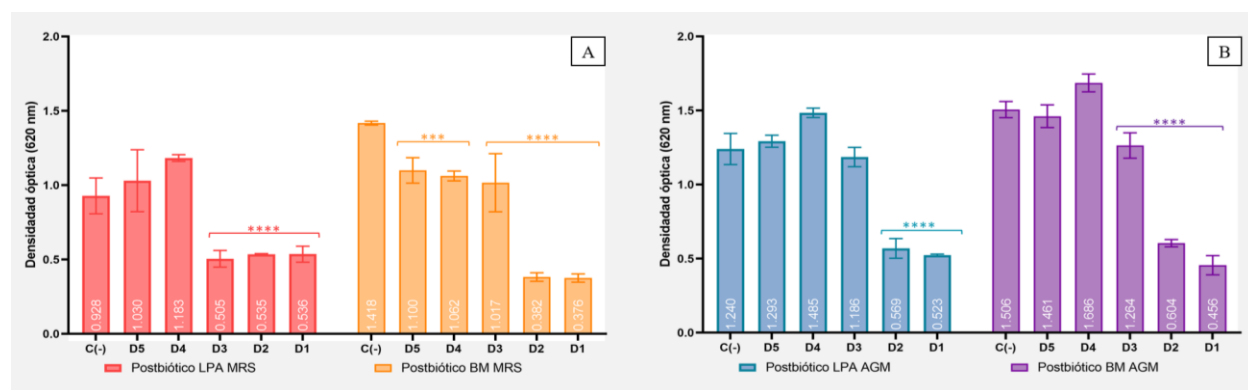


Nota. La significancia estadística se expresa con respecto al control negativo. Los valores de P menores a 0.001 y 0.01 se muestran con tres y dos asteriscos, respectivamente.

Por el contrario, *S. aureus* ATCC 25923 fue el microorganismo más resistente a ambos tratamientos, alcanzando porcentajes de inhibición del $42.26 \pm 0.0054\%$ después de su tratamiento con el postbiótico de *L. paracasei* en caldo MRS y del $73.51 \pm 0.028\%$ para el postbiótico de *B. mojavensis* en el mismo sustrato (**Figura 20A**). Sorprendentemente, el postbiótico de *L. paracasei* en aguamiel mostró un efecto antimicrobiano significativamente mayor ($p < 0.0001$) frente a *S. aureus* ATCC 25923, logrando una inhibición de hasta el $57.82 \pm 0.007\%$, mientras que el efecto del postbiótico de *B. mojavensis* en este sustrato sufrió una reducción no significativa ($69.74 \pm 0.065\%$, $p = 0.8488$). A pesar de lo anterior, estos valores (**Figura 20B**) coinciden con lo reportado en la literatura, ya que se han descrito porcentajes de inhibición en el crecimiento de *S. aureus* del 0.5 al 34.2% utilizando postbióticos de diferentes especies de lactobacilos aislados de alimentos fermentados (Hor & Liong, 2014). Asimismo, estudios previos han reportado que la capacidad de adherencia de *S. aureus* ATTC 43300 puede incrementar en presencia de un sobrenadante libre de células de *L. plantarum*, lo cual podría favorecer su supervivencia (Kalaycı Yüksek et al., 2021).

Figura 20

Inhibición de *S. aureus* 25923 con los postbióticos de *L. paracasei* y *B. mojavensis*



De manera general, todos los postbióticos analizados fueron capaces de inhibir el crecimiento de los patógenos de una manera dependiente a las cepas probióticas y patógenas

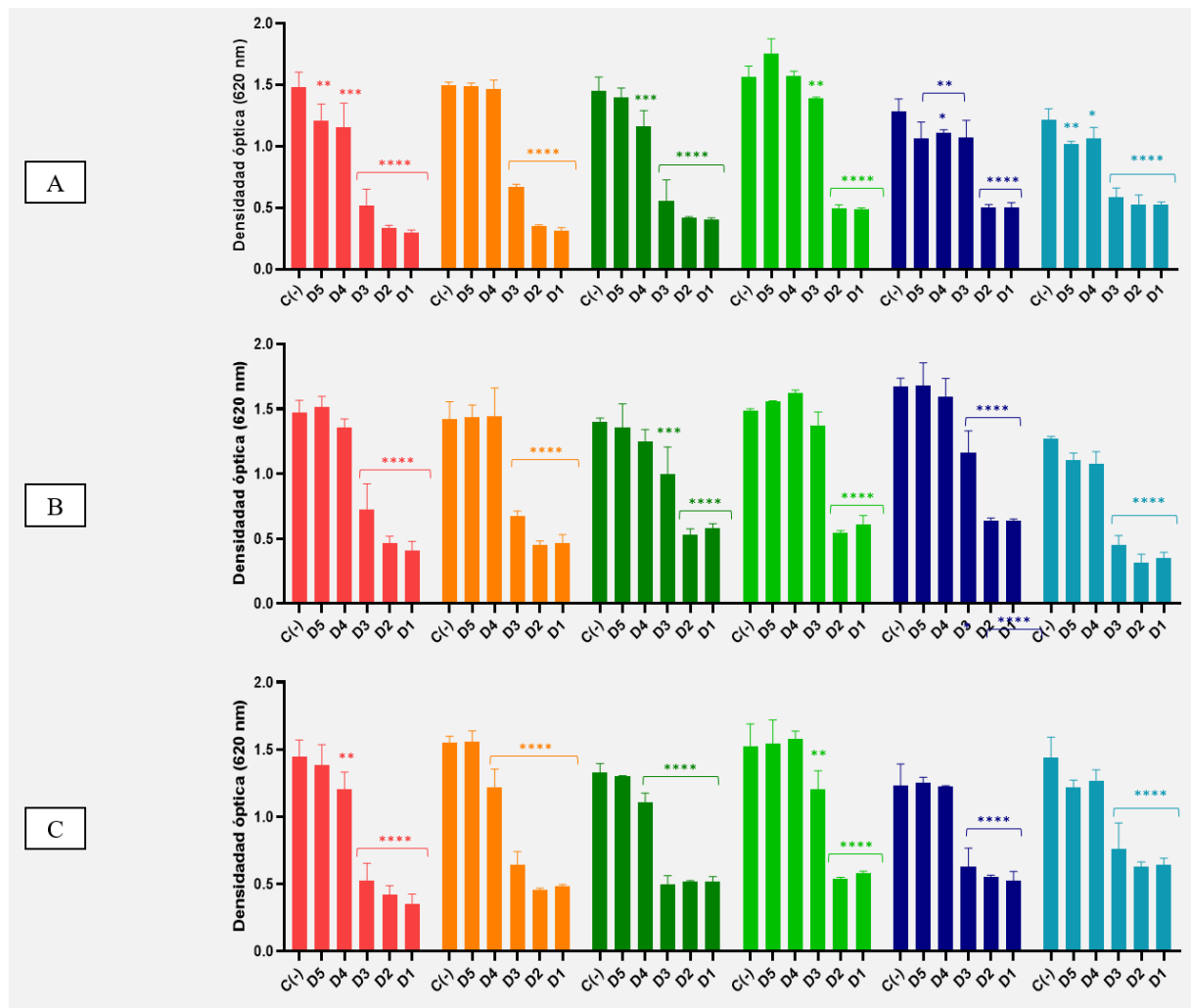
seleccionadas. Es importante mencionar que, si bien es cierto que el caldo MRS ha sido diseñado para favorecer la producción de compuestos antimicrobianos, la mayoría de los lactobacilos sufren un proceso de autoinhibición como resultado de la acumulación de los ácidos orgánicos y del agotamiento de los nutrientes (Leroy & de Vuyst, 2001). Por esta razón, el incremento en el efecto antimicrobiano de los postbióticos obtenidos utilizando aguamiel puede atribuirse a su elevado contenido nutricional, principalmente a la presencia de fructooligosacáridos (FOS), los cuales son aprovechados por las bacterias para producir compuestos con propiedades antioxidantes o bactericidas (Picazo et al., 2019). Estos resultados se encuentran en línea con lo reportado para varias cepas probióticas de *Lactobacillus* contra *E. coli* y *S. enteritidis*, ya que se ha observado un incremento en su actividad antagónica tras la suplementación del medio MRS con FOS (Muñoz et al., 2012). Sin embargo, cada microorganismo presenta una capacidad diferente para metabolizar los fructooligosacáridos y la mayoría de las cepas no son capaces de consumirlos en un elevado grado de polimerización (Boger et al., 2018).

4.4.2. Pruebas de Antagonismo con Mezclas de Postbióticos

De la misma forma que en el apartado anterior, los probióticos se crecieron en condiciones de anaerobiosis a 37 °C utilizando caldo MRS y aguamiel como sustrato y se filtraron los productos de sus fermentaciones individuales. Posteriormente, se mezclaron volúmenes equivalentes de dos postbióticos y se realizaron cinco diluciones seriadas (D1-D5) sobre una microplaca inoculada con cada uno de los microorganismos patógenos. Finalmente, se determinó el cambio en su densidad óptica después de 24 horas de incubación y se calcularon sus porcentajes de inhibición. En la **Figura 21** y **Figura 22** se muestra el crecimiento de cada cepa patógena después de su tratamiento con las mezclas de los postbióticos obtenidos en caldo MRS y en aguamiel, respectivamente.

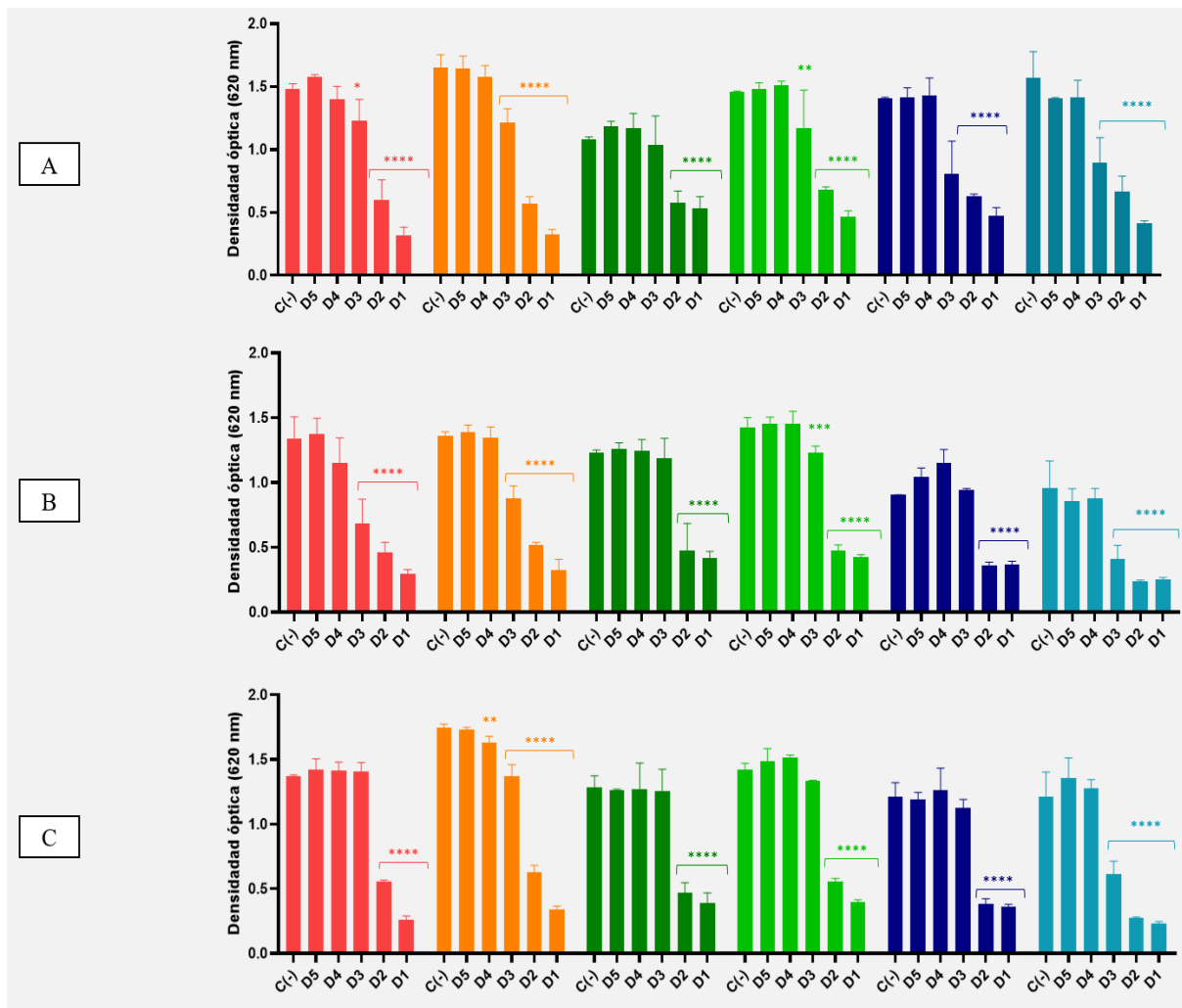
Figura 21

Crecimiento de los patógenos con los postbióticos de MRS en mezclas



Nota. Se muestra el crecimiento (densidad óptica a 620 nm con su desviación estándar y significancia estadística) de *E. coli* ATCC 25922 (●), *E. coli* Mx (●), *S. enteritidis* ATCC 13076 (●), *Salmonella* Mx (●), *S. aureus* ATCC 25923 (●) y *S. aureus* Mx (●) después de su tratamiento con las cinco diluciones de los postbióticos de *L. plantarum* con *B. mojavensis* (A), *L. paracasei* con *B. mojavensis* (B) y *L. plantarum* con *L. paracasei* (C) en caldo MRS.

Crecimiento de los patógenos con los postbióticos de aguamiel en mezclas



Nota. Se muestra el crecimiento (densidad óptica a 620 nm con su desviación estándar y significancia estadística) de *E. coli* ATCC 25922 (●), *E. coli* Mx (●), *S. enteritidis* ATCC 13076 (●), *Salmonella* Mx (●), *S. aureus* ATCC 25923 (●) y *S. aureus* Mx (●) después de su tratamiento con las cinco diluciones de *L. plantarum* con *B. mojavensis* (A), *L. paracasei* con *B. mojavensis* (B) y *L. plantarum* con *L. paracasei* (C) en aguamiel.

Tabla 7

Resultados del antagonismo de los postbióticos en mezclas

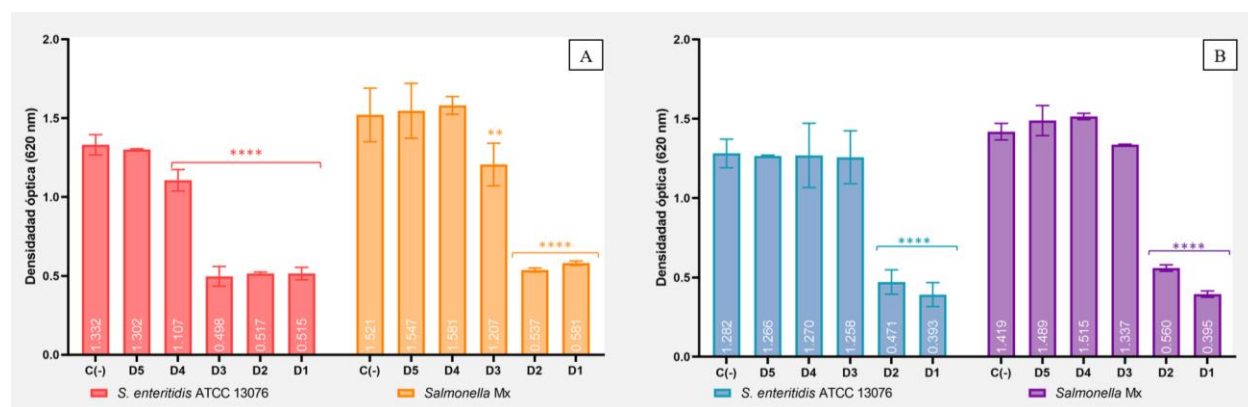
Porcentaje de inhibición (%) del postbiótico LPL+BM										
Caldo MRS						Aguamiel				
Tratamiento	D1	D2	D3	D4	D5	D1	D2	D3	D4	D5
<i>E. coli</i> 25922	79.72±0.02	77.29±0.02	64.78±0.13	22.21±0.20	18.10±0.13	78.27±0.06	59.54±0.16	17.16±0.17	NS	NS
<i>E. coli</i> Mx	78.84±0.02	76.71±0.01	55.13±0.02	NS	NS	80.35±0.04	65.61±0.06	26.55±0.11	NS	NS
<i>Salmonella</i> 13076	72.10±0.02	71.25±0.01	61.59±0.17	19.83±0.13	NS	50.81±0.09	47.00±0.10	NS	NS	NS
<i>Salmonella</i> Mx	69.00±0.02	68.38±0.03	11.24±0.01	NS	NS	68.26±0.05	53.42±0.02	19.73±0.30	NS	NS
<i>S. aureus</i> 25923	60.71±0.04	60.71±0.02	16.82±0.14	14.02±0.03	17.44±0.14	66.58±0.07	55.35±0.02	42.42±0.26	NS	NS
<i>S. aureus</i> Mx	56.72±0.02	56.77±0.08	51.78±0.08	12.49±0.09	15.91±0.02	73.65±0.02	57.64±0.12	42.93±0.20	NS	NS
Porcentaje de inhibición (%) del postbiótico LPA+BM										
Caldo MRS						Aguamiel				
Tratamiento	D1	D2	D3	D4	D5	D1	D2	D3	D4	D5
<i>E. coli</i> 25922	72.41±0.07	68.53±0.06	50.97±0.20	NS	NS	78.08±0.04	65.41±0.07	49.24±0.19	NS	NS
<i>E. coli</i> Mx	67.11±0.07	68.17±0.03	52.43±0.04	NS	NS	76.19±0.09	61.70±0.02	35.53±0.10	NS	NS
<i>Salmonella</i> 13076	58.50±0.04	61.88±0.04	28.45±0.21	NS	NS	66.19±0.05	60.95±0.21	NS	NS	NS
<i>Salmonella</i> Mx	58.68±0.07	63.21±0.02	NS	NS	NS	70.42±0.02	66.95±0.05	13.58±0.05	NS	NS
<i>S. aureus</i> 25923	61.95±0.02	62.01±0.02	30.77±0.17	NS	NS	59.76±0.03	60.16±0.03	NS	NS	NS
<i>S. aureus</i> Mx	72.21±0.04	75.24±0.07	64.25±0.07	NS	NS	73.38±0.01	75.37±0.01	56.92±0.11	NS	NS
Porcentaje de inhibición (%) del postbiótico LPL+LPA										
Caldo MRS						Aguamiel				
Tratamiento	D1	D2	D3	D4	D5	D1	D2	D3	D4	D5
<i>E. coli</i> 25922	75.52±0.07	71.03±0.07	63.89±0.13	16.89±0.13	NS	80.76±0.03	59.21±0.01	NS	NS	NS
<i>E. coli</i> Mx	68.78±0.01	70.63±0.01	58.65±0.10	21.63±0.14	NS	80.69±0.03	63.84±0.05	21.45±0.09	6.60±0.048	NS
<i>Salmonella</i> 13076	61.32±0.04	61.21±0.00	62.64±0.06	16.89±0.70	NS	69.37±0.08	63.23±0.08	NS	NS	NS
<i>Salmonella</i> Mx	61.80±0.01	64.67±0.01	20.68±0.14	NS	NS	72.14±0.02	60.57±0.02	NS	NS	NS
<i>S. aureus</i> 25923	57.43±0.07	55.34±0.02	48.78±0.14	NS	NS	70.06±0.02	68.44±0.04	NS	NS	NS
<i>S. aureus</i> Mx	55.25±0.05	56.22±0.03	47.33±0.20	NS	NS	80.67±0.01	77.39±0.01	NS	NS	NS

Nota. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3), donde NS significa que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control negativo.

Nuevamente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pocillos al inicio de su periodo de incubación ($p > 0.9999$), por lo que se descartaron como una fuente de variabilidad importante durante el análisis del antagonismo. Asimismo, se identificó una relación dosis-respuesta entre el porcentaje de inhibición y las diluciones de cada postbiótico ($p < 0.0001$), ya que el efecto antagónico fue considerablemente menor en los tratamientos menos concentrados. De hecho, únicamente el postbiótico de *L. plantarum* con *B. mojavensis* producido en caldo MRS presentó una actividad antimicrobiana significativa contra *E. coli* ATCC 25922 ($p = 0.0053$), *S. aureus* ATCC25923 ($p = 0.0028$) y su aislamiento clínico ($p = 0.0030$) en sus cinco diluciones (**Figura 21**). Adicionalmente, los tratamientos en los que se observó un mayor crecimiento de los patógenos con respecto al control negativo no resultaron estadísticamente significativos, por lo que se descartó la posibilidad de que los postbióticos fueran los responsables de este efecto proliferativo.

Figura 23

Inhibición de ambas cepas de *Salmonella* con los postbióticos de LPL+LPA

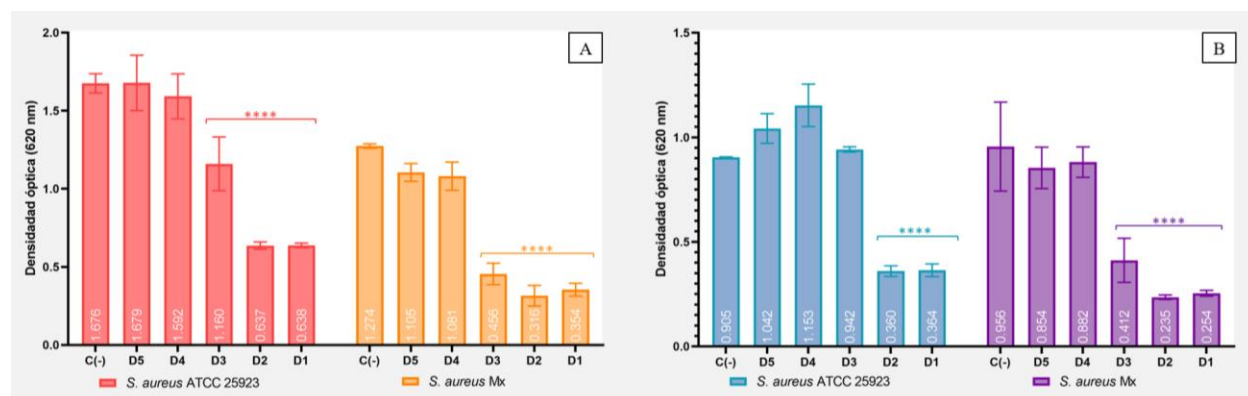


Por otro lado, el postbiótico de *L. plantarum* con *L. paracasei* en caldo MRS inhibió el crecimiento de *S. enteritidis* ATCC 13076 en un $61.32 \pm 0.04\%$, así como en un $61.80 \pm 0.01\%$ en el caso de su aislamiento clínico (**Figura 23A**). Previamente, se ha descrito una inhibición de

entre el $45.92 \pm 0.77\%$ y el $96.09 \pm 0.06\%$ en el crecimiento de cepas patógenas de *S. typhi* y *S. typhimurium* después de su tratamiento con un sobrenadante libre de células de bacterias ácido-lácticas aisladas de alimentos fermentados, lo cual se atribuyó principalmente a la secreción de metabolitos con acción de extinción de quórum, así como de ácidos orgánicos capaces de inactivar a las células patógenas para evitar la producción de biofilm (Pelyuntha et al., 2019). El efecto antimicrobiano de las primeras diluciones de este postbiótico incrementó al utilizar aguamiel como sustrato (**Figura 23B**), ya que se ha demostrado que la sacarosa puede aumentar la concentración de ácido láctico en el medio y la población de bacterias ácido-lácticas presentes (Suharman et al., 2021). Sin embargo, este fenómeno no fue significativo en todos los casos, por lo que no puede concluirse que el efecto antimicrobiano de los postbióticos en mezclas siempre incrementará al utilizar aguamiel como sustrato.

Figura 24

Inhibición de ambas cepas de *S. aureus* con los postbióticos de LPA+BM

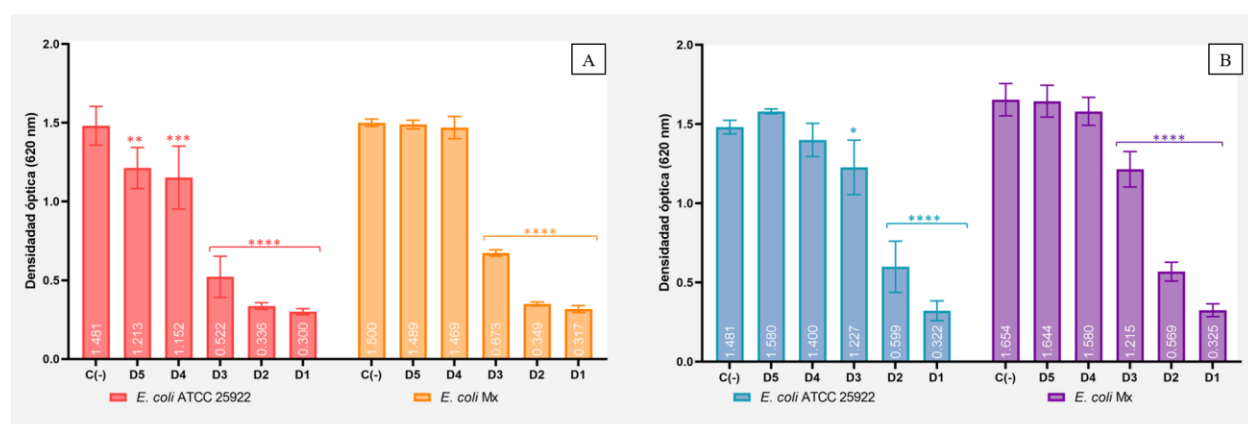


En el caso del postbiótico de *L. paracasei* con *B. mojavensis* producido en caldo MRS, éste mostró un porcentaje de inhibición del $61.95 \pm 0.02\%$ contra *S. aureus* ATCC 25923 y del $72.21 \pm 0.04\%$ contra su aislamiento clínico (**Figura 24A**). Estos resultados coinciden con lo que se ha reportado en la literatura, ya que anteriormente se han descrito porcentajes de inhibición de

entre el 32 y el 70% en el crecimiento de este enteropatógeno después de su tratamiento con un sobrenadante libre de células de bacterias productoras de ácido láctico como *L. acidophilus* y *L. casei* crecidas en caldo MRS (Koohestani et al., 2018; Mariam et al., 2014). Por otro lado, como se muestra en la **Figura 24B**, el efecto de este postbiótico producido en aguamiel mostró una ligera reducción frente a *S. aureus* ATCC 25923 ($59.76 \pm 0.03\%$), pero un incremento contra su aislamiento clínico ($73.38 \pm 0.01\%$). No obstante, estas fluctuaciones no resultaron estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

Figura 25

Inhibición de ambas cepas de *E. coli* con los postbióticos de LPL+BM



Nuevamente, *E. coli* fue el microorganismo más susceptible al tratamiento con las tres mezclas de postbióticos en ambos sustratos, alcanzando una inhibición del $79.72 \pm 0.02\%$ en el caso de su cepa de colección ATCC y del $78.84 \pm 0.02\%$ para su aislamiento clínico después de su incubación por 24 horas con el postbiótico de *L. plantarum* y *B. mojavensis* en caldo MRS (**Figura 25A**). Este efecto antimicrobiano disminuyó al utilizar aguamiel como sustrato frente a *E. coli* ATCC 25922 ($78.27 \pm 0.06\%$), pero incrementó frente a su aislamiento clínico ($80.35 \pm 0.04\%$, **Figura 25B**). Estos hallazgos se encuentran en línea con lo reportado en la literatura, ya que se ha demostrado que los metabolitos producidos por diversas cepas de *Lactobacillus* spp.

son capaces de inhibir el crecimiento de este enteropatógeno hasta en un 89% de una manera dependiente al tiempo de incubación (Kaewchomphunuch et al., 2022).

Finalmente, tras realizar una comparación entre el efecto antimicrobiano de los postbióticos individuales y de sus mezclas tanto en caldo MRS como en aguamiel, no fue posible observar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). De este modo, aunque algunos estudios han demostrado que las preparaciones postbióticas basadas en la mezcla de más de una cepa probiótica son capaces de ejercer un efecto antimicrobiano y antioxidante mayor que el de sus preparados individuales a la misma concentración (Ankaiah et al., 2021; Chapman et al., 2014), otros estudios han determinado que las mezclas de postbióticos son tan efectivas como sus componentes individuales, por lo que no presentan diferencias significativas al enfrentarse a distintos patógenos (Chapman et al., 2013). Por lo tanto, la efectividad de los productos postbióticos dependerá de las características de los metabolitos específicos presentes en dicha mezcla, así como de la susceptibilidad de las bacterias patógenas a esos compuestos, de manera que los estudios en los que se compara la efectividad de los postbióticos de una o varias especies probióticas pueden no ser consistentes.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. Conclusiones

El consumo inmoderado de los antibióticos ha producido consecuencias graves en el ámbito de la salud pública, principalmente debido a la aparición de patógenos multirresistentes. Esta problemática se ve agravada en las poblaciones marginadas del país, ya que carecen de servicios de atención médica de calidad. Por lo tanto, la implementación de nuevas terapias antimicrobianas accesibles y efectivas resulta indispensable. En México, el consumo de pulque ha sido asociado a beneficios nutricionales gracias a la presencia de bacterias probióticas, las cuales han demostrado ser efectivas en el tratamiento y prevención de las infecciones. Por esta razón, el objetivo de la presente tesis consistió en evaluar el efecto probiótico y postbiótico de las bacterias aisladas de una muestra de pulque sobre distintos patógenos de relevancia médica, para así valorar el potencial de las bebidas fermentadas tradicionales.

En este sentido, las bacterias identificadas como *L. plantarum*, *L. paracasei* y *B. mojavensis* exhibieron un potente efecto inhibitorio *in vitro* sobre el crecimiento de las cepas de colección ATCC y los aislamientos clínicos de *E. coli*, *Salmonella* y *S. aureus*, lo cual se atribuyó especialmente a la competencia directa de los probióticos por el espacio y los nutrientes disponibles en el medio. Adicionalmente, el tratamiento de los microorganismos patógenos con los postbióticos obtenidos de la fermentación y filtración de los probióticos mostró una inhibición del 13 al 84% de manera dependiente a su concentración (relación dosis-respuesta), lo cual se encuentra estrechamente relacionado con la producción y acumulación de metabolitos antimicrobianos como los ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas. Por lo tanto, es posible concluir que los bacilos y lactobacilos aislados del pulque cuentan con un elevado potencial para la elaboración de productos probióticos, simbióticos y postbióticos.

Sumado a lo anterior, debido a que las bacterias ácido-lácticas crecieron de manera óptima al utilizar aguamiel como sustrato y a que exhibieron una actividad antimicrobiana comparable a aquella obtenida en caldo MRS, es posible comprobar su potencial como prebiótico y se propone su uso como un medio de cultivo más económico para el mantenimiento de los lactobacilos y bacilos en el laboratorio. Finalmente, se espera que los resultados obtenidos en la presente investigación estimulen la producción y consumo de los alimentos y bebidas fermentados tradicionalmente, así como también promueva el desarrollo de nuevos estudios científicos sobre el potencial antagónico de las bacterias aisladas de pulque.

5.2. Perspectivas y trabajo futuro

Partiendo de los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente estudio, se recomienda explorar el efecto de diferentes técnicas de inactivación de los probióticos para la obtención de postbióticos seguros y efectivos, tales como la inactivación con calor, la sonicación o la extracción enzimática. Asimismo, se propone evaluar el efecto de diferentes condiciones de cultivo sobre la producción de metabolitos antimicrobianos, por ejemplo, partiendo del crecimiento de los probióticos en condiciones de estrés, variando el pH y la temperatura, utilizando diferentes tiempos de incubación o después su co-cultivo con otras cepas probióticas.

Adicionalmente, debido a que se encontraron diferencias significativas en la interacción entre los probióticos y los patógenos (efectos específicos de las cepas), resulta imperativa la caracterización de los metabolitos antimicrobianos a través de técnicas cromatográficas.

Finalmente, con el objetivo de potencializar los efectos benéficos de los postbióticos, se propone el estudio de nuevas formulaciones utilizando diversos compuestos prebióticos, tales como los fructooligosacáridos, así como también la investigación de agentes efectivos para la estabilización de los ingredientes activos durante su paso por el tracto gastrointestinal.

ANEXOS

A.1. Identificación de las Bacterias Aisladas de Pulque: MALDI-TOF

De acuerdo con el informe de resultados del Dr. Manuel R. Kirchmayr (CIATEJ), la biomasa se transfirió a una placa de acero inoxidable siguiendo los protocolos “Direct Transfer Method” y “Extended Direct Transfer Method” (Bruker Daltonics GmbH) y se generaron espectros de masas con el método “MBT_FC.par” en un equipo Microflex LT (Bruker Daltonics GmbH). A través del software MALDI BIOTYPER 3.1 se compararon los espectros obtenidos con espectros de referencia pertenecientes a la base de datos BDAL (Bruker Daltonics GmbH).

Tabla 8

Identificación taxonómica de las colonias analizadas mediante MALDI-TOF

Código	Identificación taxonómica	Puntuación
LPL	<i>L. plantarum</i>	2.214
LPA	<i>L. paracasei</i>	2.345
BM	<i>Bacillus subtilis</i>	1.988

Para todos los cultivos recibidos se obtuvieron de manera exitosa los espectros de masas correspondientes. En la **Tabla 8** se muestra el resultado obtenido del análisis comparativo de los espectros de masas obtenidos contra la base de datos de espectros de referencia (BDAL, v.11) y, en la **Tabla 9**, se muestra la interpretación de las puntuaciones obtenidas.

Tabla 9

Interpretación de las puntuaciones calculadas (Bruker Daltoniks GmbH)

Rango de puntuación	Descripción
2.300 – 3.000	Identificación a nivel especie altamente probable

2.000 – 2.299	Identificación a nivel género segura
	Identificación de especie probable
1.700 – 1.999	Identificación de género probable
0.000 – 1.699	Identificación no confiable

La metodología aplicada permitió identificar de manera exitosa a todos los cultivos hasta nivel de especie. Solamente una muestra, BM, resultó en una puntuación inferior a 2, lo cual pone en riesgo una identificación taxonómica certera hasta nivel de especie. Sin embargo, se aplicaron pruebas complementarias para confirmar la identidad de *B. mojavensis*.

A.2. Glosario

Anaerobio aerotolerante. Organismo que no requiere oxígeno para mantener sus funciones metabólicas, pero que puede sobrevivir en su presencia.

Antagonismo en placa. Método de detección cualitativo o de primera línea utilizado para la identificación de microorganismos antagonistas de una colección de aislados.

Conteo en placa. Método utilizado para estimar la densidad celular de una población de bacterias tras colocar una porción pequeña y diluida de la muestra en agar.

Diseño de Bloques Completos al Azar. Método estadístico para reducir y controlar la varianza cuando las unidades experimentales no son homogéneas.

Medio diferencial. Medio de cultivo que contiene compuestos que permiten distinguir visualmente los grupos de microorganismos presentes en su superficie, generalmente sobre la base de alguna diferencia bioquímica entre los dos grupos.

Medio MacConkey. Medio selectivo de diferenciación para el aislamiento de enterobacterias y otros bacilos gramnegativos a partir de muestras clínicas.

Medio MRS. Medio de cultivo apropiado para el crecimiento y aislamiento de lactobacilos y otras bacterias ácido-lácticas con elevadas exigencias nutrimentales.

Medio nutritivo. Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de microorganismos con exigencias nutrimentales menores.

Medio Sal-Manitol. Medio de cultivo para el aislamiento selectivo de estafilococos, especialmente para la detección de *S. aureus* proveniente de muestras clínicas.

Medio Salmonella-Shigella. Medio selectivo diferencial para el aislamiento de bacilos entéricos patógenos, en especial del género *Salmonella*, a partir de muestras clínicas.

Medio selectivo. Medio de cultivo que permite la selección de uno o más tipos de microorganismos, ya que serán los únicos capaces de crecer en esas condiciones, mientras que todos los demás serán inhibidos.

Microdilución. Método utilizado para probar la susceptibilidad de los microorganismos a ciertas sustancias antimicrobianas al variar su concentración a lo largo de la placa.

Microfiltración. Técnica de separación utilizada para eliminar partículas de tamaño micrométrico, como bacterias y células de levadura de una suspensión.

Pasteurización. Tratamiento térmico que reduce la cantidad de microorganismos viables presentes en una muestra líquida produciendo pequeños cambios en sus propiedades organolépticas y nutricionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajmera, A., & Shabbir, N. (2022). *Salmonella* (Ajmera A & Shabbir N, Eds.). StatPearls Publishing.
- Alsan, M. M., Westerhaus, M., Herce, M., Nakashima, K., & Farmer, P. E. (2011). Poverty, global health, and infectious disease: Lessons from Haiti and Rwanda. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 25, Issue 3, pp. 611–622).
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2011.05.004>
- Álvarez-Ríos, G. D., Figueredo-Urbina, C. J., & Casas, A. (2020). Physical, chemical, and microbiological characteristics of pulque: Management of a fermented beverage in Michoacán, Mexico. *Foods*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/foods9030361>
- Álvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 100, Issue 7, pp. 2939–2951). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Ankaiah, D., Mitra, S., Srivastava, D., Sivagnanavelmurugan, M., Ayyanna, R., Jha, N., & Venkatesan, A. (2021). Probiotic characterization of bacterial strains from fermented South Indian tomato pickle and country chicken intestine having antioxidative and antiproliferative activities. *Journal of Applied Microbiology*, 131(2), 949–963.
<https://doi.org/10.1111/jam.14991>
- Arena, M. P., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G., & Fiocco, D. (2016). Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00464>

- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., Silva, R. C. da, & Ibrahim, S. A. (2020). Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy*, 1(3), 202–232. <https://doi.org/10.3390/dairy1030015>
- Balaban, N. Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D. I., Brynildsen, M. P., Bumann, D., Camilli, A., Collins, J. J., Dehio, C., Fortune, S., Ghigo, J. M., Hardt, W. D., Harms, A., Heinemann, M., Hung, D. T., Jenal, U., Levin, B. R., ... Zinkernagel, A. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology*, 17(7), 441–448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. In *Journal of Pharmaceutical Analysis* (Vol. 6, Issue 2, pp. 71–79). Xi'an Jiaotong University. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barnes, J., Carpenter, R. S., & Showell, M. S. (2017). *Animal feed compositions and feed additives* (Patent No. 2015296538). WIPO.
- Batista, V. L., da Silva, T. F., de Jesus, L. C. L., Coelho-Rocha, N. D., Barroso, F. A. L., Tavares, L. M., Azevedo, V., Mancha-Agresti, P., & Drumond, M. M. (2020). Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for

- Intestinal Mucositis. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.544490>
- Baylay, A., Piddock, L., & Webber, M. (2019). Molecular mechanisms Part I. *Molecules to Man*, 1–26.
- Bellaiche, M., Ludwig, T., Arciszewska, M., Bongers, A., Gomes, C., Świat, A., Dakhli, F., Piollet, A., Oozeer, R., & Vandenplas, Y. (2021). Safety and Tolerance of a Novel Anti-Regurgitation Formula: A Double-Blind, Randomized, Controlled Trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 73(5), 579–585.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000003289>
- Beresford, T. P., & Cotter, P. D. (2020). Health benefits of lactic acid bacteria (Lab) fermentates. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 6, pp. 1–16). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/nu12061679>
- Bermúdez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. In *Annals of Nutrition and Metabolism* (Vol. 61, Issue 2, pp. 160–174). <https://doi.org/10.1159/000342079>
- Bijle, M. N., Ekambaram, M., Lo, E. C. M., & Yiu, C. K. Y. (2020). Synbiotics in caries prevention: A scoping review. In *PLoS ONE* (Vol. 15, Issue 8 August). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237547>
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, 4(4), 665–684.
<https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>

- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 1, pp. 42–51). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Boger, M. C. L., Lammerts Van Bueren, A., & Dijkhuizen, L. (2018). *Cross-Feeding among Probiotic Bacterial Strains on Prebiotic Inulin Involves the Extracellular exo-Inulinase of Lactobacillus paracasei Strain W20*. <https://doi.org/10>
- Byrne, M. K., Miellet, S., McGlinn, A., Fish, J., Meedya, S., Reynolds, N., & van Oijen, A. M. (2019). The drivers of antibiotic use and misuse: The development and investigation of a theory driven community measure. *BMC Public Health*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7796-8>
- Carneiro, A., Rocha Costa, C., Frutuoso, J., Oliveira Pinheiro, I., & Mota, A. (2017). Activity of metabolites produced by new strains of Lactobacillus in modified de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium against multidrug-resistant bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 11(8), 345–355. <https://doi.org/10.5897/ajmr2017.8437>
- Chacón-Vargas, K., Torres, J., Giles-Gómez, M., Escalante, A., & Gibbons, J. G. (2020). Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71864-4>
- Chang, A., Teng, P., Lee, T., & Yu, B. (2019). The effects of the supplementation of multi-strain probiotics on intestinal microbiota, metabolites and inflammation of young SPF chickens challenged with Salmonella enterica subsp. enterica. *Animal Science Journal*. <http://drive5.com/uparse/>;

- Chapman, C. M. C., Gibson, G. R., & Rowland, I. (2012). In vitro evaluation of single- and multi-strain probiotics: Inter-species inhibition between probiotic strains, and inhibition of pathogens. *Anaerobe*, 18(4), 405–413.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.05.004>
- Chapman, C. M. C., Gibson, G. R., & Rowland, I. (2014). Effects of single- and multi-strain probiotics on biofilm formation and invitro adhesion to bladder cells by urinary tract pathogens. *Anaerobe*, 27, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.02.001>
- Chapman, C. M. C., Gibson, G. R., Todd, S., & Rowland, I. (2013). Comparative in vitro inhibition of urinary tract pathogens by single- And multi-strain probiotics. *European Journal of Nutrition*, 52(6), 1669–1677. <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0501-2>
- Choi, A. R., Patra, J. K., Kim, W. J., & Kang, S. S. (2018). Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from a plant-based fermented food. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01963>
- Choi, S. M., Park, M. H., Jung, T. S., Moon, K. H., Kim, K. M., & Kang, J. S. (2011). Characterization of *Bacillus mojavensis* KJS-3 for industrial applications. *Archives of Pharmacal Research*, 34(2), 289–298. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0215-z>
- Cicenia, A., Scirocco, A., Carabotti, M., Pallotta, L., Marignani, M., & Severi, C. (2014). *Postbiotic Activities of Lactobacilli-derived Factors*. www.jcge.com
- Cohen, C. R., Wierzbicki, M. R., French, A. L., Morris, S., Newmann, S., Reno, H., Green, L., Miller, S., Powell, J., Parks, T., & Hemmerling, A. (2020). Randomized Trial of Lactin-V to Prevent Recurrence of Bacterial Vaginosis. *New England Journal of Medicine*, 382(20), 1906–1915. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1915254>

- da Costa, W. K. A., de Souza, G. T., Brandão, L. R., de Lima, R. C., Garcia, E. F., dos Santos Lima, M., de Souza, E. L., Saarela, M., & Magnani, M. (2018). Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. *Food Research International*, 108, 172–182.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.045>
- da Silva, T. F., Casarotti, S. N., de Oliveira, G. L. V., & Penna, A. L. B. (2020). The impact of probiotics, prebiotics, and synbiotics on the biochemical, clinical, and immunological markers, as well as on the gut microbiota of obese hosts. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Inc.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1733483>
- Dawe, J. P., McCowan, L. M. E., Wilson, J., Okesene-Gafa, K. A. M., & Serlachius, A. S. (2020). Probiotics and Maternal Mental Health: A Randomised Controlled Trial among Pregnant Women with Obesity. *Scientific Reports*, 10(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58129-w>
- de Filippis, F., Pasolli, E., & Ercolini, D. (2020). The food-gut axis: Lactic acid bacteria and their link to food, the gut microbiome and human health. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 44, Issue 4, pp. 454–489). Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa015>
- de Wolfe, T. J., Eggers, S., Barker, A. K., Kates, A. E., Dill-McFarland, K. A., Suen, G., & Safdar, N. (2018). Oral probiotic combination of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* alters the gastrointestinal microbiota during antibiotic treatment for *Clostridium difficile* infection. *PLoS ONE*, 13(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204253>

- Diario Oficial de la Federación. (2016, February 19). *Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-199-SCFI-2015*. Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-199-SCFI-2015, Bebidas Alcohólicas-Denominación, Especificaciones Fisicoquímicas, Información Comercial y Métodos de Prueba.
- Enríquez-Salazar, M., Veana, F., Aguilar, C. N., de la Garza-Rodríguez, I. M., López, M. G., Rutiaga-Quñones, O. M., Morlett-Chávez, J. A., & Rodríguez-Herrera, R. (2017). Microbial diversity and biochemical profile of aguamiel collected from *Agave salmiana* and *A. atrovirens* during different seasons of year. *Food Science and Biotechnology*, 26(4), 1003–1011. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0141-z>
- Escalante, A., Elena Rodríguez, M., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235(2), 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.04.045>
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., & Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>
- Escalante, A., López Soto, D. R., Velázquez Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: Historical, microbiological, and technical aspects. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>

- Escobedo-García, S., Salas-Tovar, J. A., Flores-Gallegos, A. C., Contreras-Esquivel, J. C., González-Montemayor, Á. M., López, M. G., & Rodríguez-Herrera, R. (2020). Functionality of Agave Bagasse as Supplement for the Development of Prebiotics-Enriched Foods. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(1), 96–102. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00785-z>
- Fowler, T., Walker, D., & Davies, S. C. (2014). The risk/benefit of predicting a post-antibiotic era: Is the alarm working? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1323(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/nyas.12399>
- Frei, R., Akdis, M., & O'mahony, L. (2015). Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: Experimental data and clinical evidence. *Current Opinion in Gastroenterology*, 31(2), 153–158. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000151>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 14, Issue 8, pp. 491–502). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Guarino, M. P. L., Altomare, A., Emerenziani, S., di Rosa, C., Ribolsi, M., Balestrieri, P., Iovino, P., Rocchi, G., & Cicala, M. (2020). Mechanisms of action of prebiotics and their effects on gastro-intestinal disorders in adults. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12041037>

- Hamasalim, H. J. (2016). Synbiotic as Feed Additives Relating to Animal Health and Performance. *Advances in Microbiology*, 06(04), 288–302.
<https://doi.org/10.4236/aim.2016.64028>
- Hasan, C. M., Dutta, D., & Nguyen, A. N. T. (2022). Revisiting Antibiotic Resistance: Mechanistic Foundations to Evolutionary Outlook. In *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010040>
- Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., el Enshasy, H., & Bukkyo, by. (2018). Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiology Letters*.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fny213/5087731>
- Holscher, H. D. (2017). Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. In *Gut Microbes* (Vol. 8, Issue 2, pp. 172–184). Taylor and Francis Inc.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1290756>
- Hor, Y. Y., & Liong, M. T. (2014). Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*. *Dermatologica Sinica*, 32(3), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.dsi.2014.03.001>
- Hossain, T., Deter, H. S., Peters, E. J., & Butzin, N. C. (2021). Antibiotic tolerance, persistence, and resistance of the evolved minimal cell, *Mycoplasma mycoides* JCVI-Syn3B. *IScience*, 24(5). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102391>
- Huang, W. C., Lee, M. C., Lee, C. C., Ng, K. S., Hsu, Y. J., Tsai, T. Y., Young, S. L., Lin, J. S., & Huang, C. C. (2019). Effect of *Lactobacillus plantarum* TWK10 on exercise physiological adaptation, performance, and body composition in healthy humans. *Nutrients*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/nu11112836>

- Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*, 21(12). <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
- Huezo-Sánchez, A. R. (2020). *Efecto antagónico de bebida simbiótica contra microorganismos patógenos elaborada a base de aguamiel*. UPAEP.
- Huynh, T. G., Shiu, Y. L., Nguyen, T. P., Truong, Q. P., Chen, J. C., & Liu, C. H. (2017). Current applications, selection, and possible mechanisms of actions of synbiotics in improving the growth and health status in aquaculture: A review. In *Fish and Shellfish Immunology* (Vol. 64, pp. 367–382). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.035>
- Iebba, V., Totino, V., Gagliardi, A., Santangelo, F., Cacciotti, F., Trancassini, M., Mancini, C., Cicerone, C., Corazziari, E., Pantanella, F., & Schippa, S. (2016). Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota SuMMARy. In *New Microbiologica* (Vol. 39).
- İncili, G. K., Karatepe, P., Akgöl, M., Kaya, B., Kanmaz, H., & Hayaloğlu, A. A. (2021). Characterization of *Pediococcus acidilactici* postbiotic and impact of postbiotic-fortified chitosan coating on the microbial and chemical quality of chicken breast fillets. *International Journal of Biological Macromolecules*, 184, 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.106>
- Iraporda, C., Abatemarco Júnior, M., Neumann, E., Nunes, Á. C., Nicoli, J. R., Abraham, A. G., & Garrote, G. L. (2017). Biological activity of the non-microbial fraction of kefir: Antagonism against intestinal pathogens. *Journal of Dairy Research*, 84(3), 339–345. <https://doi.org/10.1017/S0022029917000358>

- Jackson, M., Jewell, D., & Panickar, K. (2021). *Pet Food Compositions* (Patent No. 20210220385). WIPO.
- Jasim, B., Sreelakshmi, S., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2016). Identification of endophytic *Bacillus mojavensis* with highly specialized broad spectrum antibacterial activity. *3 Biotech*, 6(2). <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0508-5>
- Jasso-Padilla, I., Juárez-Flores, B., Álvarez-Fuentes, G., de la Cruz-Martínez, A., González-Ramírez, J., Moscota-Santillán, M., González-Chávez, M., Oros-Ovalle, C., Prell, F., Czermak, P., & Martinez-Gutierrez, F. (2017). Effect of prebiotics of *Agave salmiana* fed to healthy Wistar rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(2), 556–563. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7764>
- Jeong, K., Kim, M., Jeon, S. A., Kim, Y. H., & Lee, S. (2020). A randomized trial of *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 tyndallizate (RHT3201) for treating atopic dermatitis. *Pediatric Allergy and Immunology*, 31(7), 783–792. <https://doi.org/10.1111/pai.13269>
- Jermen, M. N., Fassil, A. T., & Anteneh, T. T. (2015). Evaluation of the antagonistic effect of six mixed cultures of lactic acid bacteria, isolated from the Ethiopian fermented milk ergo, against some foodborne pathogens inoculated into the Ethiopian cottage cheese ayib. *African Journal of Microbiology Research*, 9(29), 1789–1797. <https://doi.org/10.5897/ajmr2015.7504>
- Jia, G., Liu, X., Zhi, A., Li, J., Wu, Y., & Zhang, Y. (2021). Characterization and Selection of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* for prevention of oral bacterial infections from Chinese pickle. *AMB Express*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01245-1>

- Joning, E. J., Seok, A., Yong, K., Lajimin, S., Ang, C. Y., Ransangan, J., Sano, M., Dan, S., Hamasaki, K., Kasan, N. A., & Lal, T. M. (2021). Antifungal Prospect of *Bacillus cereus* Postbiotic on Crustacean Pathogen, *Lagenidium thermophilum*. In *Biocontrol Science* (Vol. 26, Issue 4).
- Jorgensen, J., Pfaller, P., Carroll, K., Funke, G., & Landry, M. (2019). *Manual of Clinical Microbiology* (12th ed., Vol. 1). ASM Press.
- Kaewchomphunuch, T., Charoenpichitnunt, T., Thongbaiyai, V., Ngamwongsatit, N., & Kaeoket, K. (2022). Cell-free culture supernatants of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. inhibit growth of pathogenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Thailand. *BMC Veterinary Research*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03140-8>
- Kalaycı Yüksek, F., Gümüş, D., Gündoğan, G. İ., & Anđ Küçükler, M. (2021). Cell-Free *Lactobacillus* sp Supernatants Modulate *Staphylococcus aureus* Growth, Adhesion and Invasion to Human Osteoblast (HOB) Cells. *Current Microbiology*, 78(1), 125–132. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02247-1>
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>
- Kim, S. K., Guevarra, R. B., Kim, Y. T., Kwon, J., Kim, H., Cho, J. H., Kim, H. B., & Lee, J. H. (2019). Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(9), 1335–1340. <https://doi.org/10.4014/jmb.1906.06064>

- Koohestani, M., Moradi, M., Tajik, H., & Badali, A. (2018). Effects of cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Lactobacillus casei* 431 against planktonic form and biofilm of *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Research Forum*, 9(4), 301–306. <https://doi.org/10.30466/vrf.2018.33086>
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. In *Microbial Pathogenesis* (Vol. 128, pp. 171–177). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>
- Kwoji, I. D., Aiyegoro, O. A., Okpeku, M., & Adeleke, M. A. (2021). *Multi-Strain Probiotics: Synergy among Isolates Enhances Biological Activities*. <https://doi.org/10.3390/biology>
- Kwoji, I. D., Okpeku, M., Adeleke, M. A., & Aiyegoro, O. A. (2022). Formulation of Chemically Defined Media and Growth Evaluation of *Ligilactobacillus salivarius* ZJ614 and *Limosilactobacillus reuteri* ZJ625. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.865493>
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1037–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x>
- Lau, L. Y., & Chye, F. Y. (2018). Antagonistic effects of *Lactobacillus plantarum* 0612 on the adhesion of selected foodborne enteropathogens in various colonic environments. *Food Control*, 91, 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.001>

- Laverde Gomez, J. A., Mukhopadhy, I., Duncan, S. H., Louis, P., Shaw, S., Collie-Duguid, E., Crost, E., Juge, N., & Flint, H. J. (2019). Formate cross-feeding and cooperative metabolic interactions revealed by transcriptomics in co-cultures of acetogenic and amyolytic human colonic bacteria. *Environmental Microbiology*, 21(1), 259–271.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14454>
- Lee, E. S., Song, E. J., Nam, Y. do, & Lee, S. Y. (2018). Probiotics in human health and disease: from nutribiotics to pharmabiotics. In *Journal of Microbiology* (Vol. 56, Issue 11, pp. 773–782). Microbiological Society of Korea. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8293-y>
- Lerner, A., Matthias, T., & Aminov, R. (2017). Potential effects of horizontal gene exchange in the human gut. *Frontiers in Immunology*, 8(NOV).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01630>
- Leroy, F., & de Vuyst, L. (2001). Growth of the Bacteriocin-Producing *Lactobacillus sakei* Strain CTC 494 in MRS Broth is Strongly Reduced Due to Nutrient Exhaustion: A Nutrient Depletion Model for the Growth of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4407–4413.
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4407-4413.2001>
- Lin, C. W. W., Chen, Y. T., Ho, H. H., Kuo, Y. W., Lin, W. Y., Chen, J. F., Lin, J. H., & Yang, S. F. (2022). Impact of the food grade heat-killed probiotic and postbiotic oral lozenges in oral hygiene. *Aging*, 14(5), 2221–2238.
- Liu, Y. W., Liong, M. T., Chung, Y. C. E., Huang, H. Y., Peng, W. S., Cheng, Y. F., Lin, Y. S., Wu, Y. Y., & Tsai, Y. C. (2019). Effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 on

- children with autism spectrum disorder in Taiwan: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/nu11040820>
- Long, S. L., Gahan, C. G. M., & Joyce, S. A. (2017). Interactions between gut bacteria and bile in health and disease. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 56, pp. 54–65). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.06.002>
- Maier, R. M. (2009). Growth in Pure Culture in a Flask. In *Environmental Microbiology* (pp. 37–56).
- Manigandan, T., Mangaiyarkarasi, R., Hemalatha, V., & Murali, N. (2012). Probiotics, Prebiotics and Synbiotics - A Review. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 5(2).
- Mariam, S. H., Zegeye, N., Tariku, T., Andargie, E., Endalafer, N., & Aseffa, A. (2014). Potential of cell-free supernatants from cultures of selected lactic acid bacteria and yeast obtained from local fermented foods as inhibitors of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. *BMC Research Notes*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-606>
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. In *Nutrients* (Vol. 9, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Matejceková, Z., Spodniaková, S., Dujmíc, E., & Valík, L. (2019). Modelling growth of *Lactobacillus plantarum* as a function of temperature: Effects of media. *Journal of Food and Nutrition Research*, 58(2), 125–134.
- Mathur, H., Beresford, T. P., & Cotter, P. D. (2020). Health benefits of lactic acid bacteria (Lab) fermentates. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 6, pp. 1–16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12061679>

- McFarland, L. v. (2021). Efficacy of Single-Strain Probiotics Versus Multi-Strain Mixtures: Systematic Review of Strain and Disease Specificity. In *Digestive Diseases and Sciences* (Vol. 66, Issue 3, pp. 694–704). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06244-z>
- Medina-Fernández, S., Cretenet, M., & Bernardeau, M. (2019). In vitro inhibition of avian pathogenic *Enterococcus cecorum* isolates by probiotic *Bacillus* strains. *Poultry Science*, 98(6), 2338–2346. <https://doi.org/10.3382/ps/pey593>
- Meei-Yn, L., Yi-Heng, C., & Hung-Pin, C. (2020). *Method for alleviating arthritis with postbiotic extract* (Patent No. 20220096572).
- Mekky, A. F., Hassanein, W. A., Reda, F. M., & Elsayed, H. M. (2022). Anti-biofilm potential of *Lactobacillus plantarum* Y3 culture and its cell-free supernatant against multidrug-resistant uropathogen *Escherichia coli* U12. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 2989–2997. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.014>
- Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2013). Growth and laboratory maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Current Protocols in Microbiology*, SUPPL.28. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc09c01s28>
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. In *Molecules* (Vol. 22, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- Mokoena, M. P., Omatola, C. A., & Olaniran, A. O. (2021). Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules26227055>

- Montes, M. J. V. (2014). Pulque limpio/pulque sucio: disputas en torno a la legitimidad y la producción social del valor. *Revista Colombiana de Antropología*, 50(2).
- Munita, J., & Arias, C. (2001). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 23(5), 464–472.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
- Muñoz, M., Mosquera, A., Alméciga-Díaz, C. J., Melendez, A. P., & Sánchez, O. F. (2012). Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in *Lactobacillus* strains isolated from ensiled corn and molasses. *Anaerobe*, 18(3), 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.01.007>
- Muñoz-Aparicio, M. C., & García, C. (2021). EL PULQUE LA BEBIDA DE LOS DIOS CON VALOR Y TRADICIÓN MILENARIA. In *Journal of Tourism and Heritage Research* (Vol. 4, Issue 1).
- Muñoz-Quezada, S., Bermúdez-Brito, M., Chenoll, E., Genovés, S., Gómez-Llorente, C., Plaza-Díaz, J., Matencio, E., Bernal, M. J., Romero, F., Ramón, D., & Gil, A. (2013). Competitive inhibition of three novel bacteria isolated from faeces of breast milk-fed infants against selected enteropathogens. *British Journal of Nutrition*, 109(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1017/S0007114512005600>
- Nataraj, B. H., Ali, S. A., Behare, P. v., & Yadav, H. (2020). Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w>
- Neveling, D. P., van Emmenes, L., Ahire, J. J., Pieterse, E., Smith, C., & Dicks, L. M. T. (2020). Effect of a Multi-Species Probiotic on the Colonisation of *Salmonella* in

- Broilers. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(3), 896–905.
<https://doi.org/10.1007/s12602-019-09593-y>
- Nishida, K., Sawada, D., Kuwano, Y., Tanaka, H., & Rokutan, K. (2019). Health benefits of lactobacillus gasseri cp2305 tablets in young adults exposed to chronic stress: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrients*, 11(8).
<https://doi.org/10.3390/nu11081859>
- Oh, J. H., Jang, Y. S., Kang, D., Chang, D. K., & Min, Y. W. (2019). Efficacy and safety of new Lactobacilli probiotics for unconstipated irritable bowel syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients*, 11(12).
<https://doi.org/10.3390/nu11122887>
- Paharik, A. E., & Horswill, A. R. (2016). The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiology Spectrum*, 4(2).
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0022-2015>
- Pakbin, B., Brück, W. M., & Rossen, J. W. A. (2021). Virulence factors of enteric pathogenic Escherichia coli: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 18). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>
- Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. v. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 52, Issue 12, pp. 7577–7587). Springer India. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>
- Parada, J. L., Caron, C. R., Bianchi, A., Medeiros, P., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3), 521–542.

- Pelyuntha, W., Chaiyasut, C., Kantachote, D., & Sirilun, S. (2019). Cell-free supernatants from cultures of lactic acid bacteria isolated from fermented grape as biocontrol against *Salmonella Typhi* and *Salmonella Typhimurium* virulence via autoinducer-2 and biofilm interference. *PeerJ*, 2019(8). <https://doi.org/10.7717/peerj.7555>
- Peralta-García, I., González-Muñoz, F., Elena, R. A. M., Sánchez-Flores, A., & López Munguía, A. (2020). Evolution of Fructans in Aguamiel (Agave Sap) During the Plant Production Lifetime. *Frontiers in Nutrition*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.566950>
- Pérez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3>
- Pérez-Armendáriz, B., & Cardoso-Ugarte, G. A. (2020). Traditional fermented beverages in Mexico: Biotechnological, nutritional, and functional approaches. *Food Research International*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109307>
- Picazo, B., Flores-Gallegos, A. C., Ilina, A., Rodríguez-Jasso, R. M., & Aguilar, C. N. (2019). Production of an enzymatic extract from *Aspergillus oryzae* dia-mf to improve the fructooligosaccharides profile of aguamiel. *Frontiers in Nutrition*, 6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00015>
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*, 10, S49–S66. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>

- Prabh-Singh, S., Qureshi, A., & Hassan, W. (2021). Mechanisms of Action by Antimicrobial Agents: A Review. *McGill Journal of Medicine*, 19(4).
www.mjmmmed.com
- Quigley, E. M. M. (2019). Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. In *Clinical Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 17, Issue 2, pp. 333–344). W.B. Saunders.
<https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.09.028>
- Raheem, A., Liang, L., Zhang, G., & Cui, S. (2021). Modulatory Effects of Probiotics During Pathogenic Infections With Emphasis on Immune Regulation. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.616713>
- Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Rubayet Ul Alam, A. S. M., & Jahid, I. K. (2020). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1223–1237.
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17092>
- Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Riley, L. W. (2020). Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 8(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020>
- Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., & de Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue JUN). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>

- Rodríguez, D., Santos, C. H., Rocha-Santos, T. A. P., Gomes, A. M., Goodfellow, B. J., & Freitas, A. C. (2011). Metabolic profiling of potential probiotic or synbiotic cheeses by nuclear magnetic resonance (NMR) Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4955–4961. <https://doi.org/10.1021/jf104605r>
- Roggero, P., Liotto, N., Pozzi, C., Braga, D., Troisi, J., Menis, C., Gianni, M. L., Berni Canani, R., Paparo, L., Nocerino, R., Budelli, A., Mosca, F., & Rescigno, M. (2020). Analysis of immune, microbiota and metabolome maturation in infants in a clinical trial of *Lactobacillus paracasei* CBA L74-fermented formula. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16582-1>
- Romero-López, M. R., Osoro-Díaz, P., Flores-Morales, A., & Robledo, N. (2015). Composición química, capacidad antioxidante y el efecto prebiótico del aguamiel (*Agave atrovirens*) durante su fermentación in vitro. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(2), 281–292.
- Rossiter, S. E., Fletcher, M. H., & Wuest, W. M. (2017). Natural Products as Platforms to Overcome Antibiotic Resistance. In *Chemical Reviews* (Vol. 117, Issue 19, pp. 12415–12474). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00283>
- Rovinaru, C., & Pasarin, D. (2020). Application of Microencapsulated Synbiotics in Fruit-Based Beverages. In *Probiotics and Antimicrobial Proteins* (Vol. 12, Issue 2, pp. 764–773). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09579-w>
- Sabike, I. I., Fujikawa, H., & Edris, A. M. (2015). The Growth Kinetics of *Salmonella* Enteritidis in Raw Ground Beef. In *Biocontrol Science* (Vol. 20, Issue 3).
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H., & Vinderola, G. (2021). The International

- Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 18, Issue 9, pp. 649–667). Nature Research.
<https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>
- Sánchez, Ó. J., Barragán, P. J., & Serna, L. (2019). Review of Lactobacillus in the food industry and their culture media. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(2), 63–76.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.81576>
- Sergeev, I. N., Aljutaily, T., Walton, G., & Huarte, E. (2020). Effects of synbiotic supplement on human gut microbiota, body composition and weight loss in obesity. *Nutrients*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/nu12010222>
- Serna, L., Valencia, L. J., & Rómulo, G. (2011). Lactic acid bacteria with antimicrobial activity. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(1), 97–104.
- Shafipour Yordshahi, A., Moradi, M., Tajik, H., & Molaei, R. (2020). Design and preparation of antimicrobial meat wrapping nanopaper with bacterial cellulose and postbiotics of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 321.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108561>
- Sikorska, H., & Smoragiewicz, W. (2013). Role of probiotics in the prevention and treatment of meticillin-resistant Staphylococcus aureus infections. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 42, Issue 6, pp. 475–481). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.08.003>
- Silva, D., Sardi, J. de C. O., Pitangui, N. de S., Roque, S. M., Silva, A. C. B. da, & Rosalen, P. L. (2020). Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: Current reality and

- future directions. *Journal of Functional Foods*, 73.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104080>
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. In *Nutrients* (Vol. 5, Issue 4, pp. 1417–1435). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu5041417>
- Ślizewska, K., & Chlebicz-Wójcik, A. (2020). Growth kinetics of probiotic lactobacillus strains in the alternative, cost-efficient semi-solid fermentation medium. *Biology*, 9(12), 1–13. <https://doi.org/10.3390/biology9120423>
- Soemarie, Y. B., Milanda, T., & Barliana, M. I. (2021). Fermented foods as probiotics: A review. In *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* (Vol. 12, Issue 4, pp. 335–339). Wolters Kluwer Medknow Publications.
https://doi.org/10.4103/japtr.japtr_116_21
- Suharman, Sutakwa, A., & Nadia, L. S. (2021). Effects of Sucrose Addition to Lactic Acid Concentrations and Lactic Acid Bacteria Population of Butterfly Pea (*Clitoria Ternatea* L.) Yogurt. *Journal of Physics: Conference Series*, 1823(1).
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1823/1/012038>
- Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 453, Issue 2, pp. 254–267). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.090>
- Sutikno, B. T., Rizal, S., & Marniza. (2013). Effects of sugar type and concentration on the characteristics of fermented turi (*sesbania grandiflora* (L.) poir) milk. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25(8), 576–584. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v25i8.15062>

- Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., Scott, K. P., Holscher, H. D., Azad, M. B., Delzenne, N. M., & Sanders, M. E. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 17, Issue 11, pp. 687–701). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2>
- Szajewska, H., Skórka, A., & Pieścik-Lech, M. (2015). Fermented infant formulas without live bacteria: a systematic review. In *European Journal of Pediatrics* (Vol. 174, Issue 11, pp. 1413–1420). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00431-015-2629-y>
- Talebi, A., Rizvanov, A. A., Haertlé, T., & Blatt, N. L. (2019). World Health Organization Report: Current Crisis of Antibiotic Resistance. *BioNanoScience*, 9(4), 778–788. <https://doi.org/10.1007/s12668-019-00658-4>
- Teame, T., Wang, A., Xie, M., Zhang, Z., Yang, Y., Ding, Q., Gao, C., Olsen, R. E., Ran, C., & Zhou, Z. (2020). Paraprobiotics and Postbiotics of Probiotic Lactobacilli, Their Positive Effects on the Host and Action Mechanisms: A Review. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.570344>
- Valadez-Blanco, R., Bravo-Villa, G., Santos-Sánchez, N. F., Velasco-Almendarez, S. I., & Montville, T. J. (2012). The Artisanal Production of Pulque, a Traditional Beverage of the Mexican Highlands. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(2), 140–144. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9096-9>
- Valdivia-Anistro, J. A., Eguiarte-Frutos, L. E., Delgado-Sapién, G., Márquez-Zacarías, P., Gasca-Pineda, J., Learned, J., Elser, J. J., Olmedo-Alvarez, G., & Souza, V. (2016). Variability of rRNA operon copy number and growth rate dynamics of bacillus

- isolated from an extremely oligotrophic aquatic ecosystem. *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01486>
- Verma, J., Bag, S., Saha, B., Kumar, P., Ghosh, T. S., Dayal, M., Senapati, T., Mehra, S., Dey, P., Desigamani, A., Kumar, D., Rana, P., Kumar, B., Maiti, T. K., Sharma, N. C., Bhadra, R. K., Mutreja, A., Nair, G. B., Ramamurthy, T., & Das, B. (2019). Genomic plasticity associated with antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(13), 6226–6231. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900141116>
- Wegh, C. A. M., Geerlings, S. Y., Knol, J., Roeselers, G., & Belzer, C. (2019). Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20194673>
- Wieërs, G., Verbelen, V., van den Driessche, M., Melnik, E., Vanheule, G., Marot, J. C., & Cani, P. D. (2021). Do Probiotics During In-Hospital Antibiotic Treatment Prevent Colonization of Gut Microbiota With Multi-Drug-Resistant Bacteria? A Randomized Placebo-Controlled Trial Comparing *Saccharomyces* to a Mixture of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Saccharomyces*. *Frontiers in Public Health*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.578089>
- World Economic Forum. (2019). *Global risks 2019: insight report* (114th ed.). World Economic Forum.
- Wu, C., Huang, J., & Zhou, R. (2017). Genomics of lactic acid bacteria: Current status and potential applications. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 43, Issue 4, pp. 393–404). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1179623>

- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 8(1).
<https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>
- Yılmaz, İ., Enver Dolar, M., & Özpınar, H. (2019). Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: A randomized controlled trial. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 30(3), 242–253.
<https://doi.org/10.5152/tjg.2018.18227>
- Yoon, J. S., Sohn, W., Lee, O. Y., Lee, S. P., Lee, K. N., Jun, D. W., Lee, H. L., Yoon, B. C., Choi, H. S., Chung, W. S., & Seo, J. G. (2014). Effect of multispecies probiotics on irritable bowel syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 29(1), 52–59.
<https://doi.org/10.1111/jgh.12322>
- Yusra, Y., Azima, F., Novelina, N., & Paeriyadnadi, P. (2014). Characterization of Antimicrobial Bacteriocin Produced by *Bacillus cereus* SS28 Isolates from Budu, a Traditionally Fermented Fish Product of West Sumatera. *Microbiology Indonesia*, 8(1), 24–32. <https://doi.org/10.5454/mi.8.1.4>
- Zhang, J., Bu, Y., Zhang, C., Yi, H., Liu, D., & Jiao, J. (2020). Development of a low-cost and high-efficiency culture medium for bacteriocin lac-b23 production by *Lactobacillus plantarum* j23. *Biology*, 9(7), 1–11. <https://doi.org/10.3390/biology9070171>
- Zhao, S., Jang, C., Liu, J., Uehara, K., Gilbert, M., Izzo, L., Zeng, X., Trefely, S., Fernandez, S., Carrer, A., Miller, K. D., Schug, Z. T., Snyder, N. W., Gade, T. P., Titchenell, P. M., Rabinowitz, J. D., & Wellen, K. E. (2020). Dietary fructose feeds

hepatic lipogenesis via microbiota-derived acetate. *Nature*, 579(7800), 586–591.

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2101-7>

Zheng, S., & Sonomoto, K. (2018). Diversified transporters and pathways for bacteriocin secretion in gram-positive bacteria. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 102, Issue 10, pp. 4243–4253). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8917-5>

Zi, X., Liu, Y., Chen, T., Li, M., Zhou, H., & Tang, J. (2022). Effects of Sucrose, Glucose and Molasses on Fermentation Quality and Bacterial Community of Stylo Silage. *Fermentation*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/fermentation8050191>

Żółkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczyński, M., & Feleszko, W. (2020). Postbiotics—a step beyond pre-and probiotics. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 8, pp. 1–17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12082189>