



## Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: [www.riit.com.mx](http://www.riit.com.mx)

### Aislamiento e identificación molecular de microorganismos asociados con el fruto del tempequistle (*Sideroxylon palmeri*)

### Isolation and molecular identification of microorganisms associated with the tempequistle fruit (*Sideroxylon palmeri*)

Salazar-Smith J.<sup>a</sup>, Hernández-Rosas F.<sup>b</sup>, Sifuentes-Rincón A. M.<sup>c</sup>, Arellano-Vera W.<sup>c</sup>, Lara-Ruiz G.F.<sup>a</sup>, Pacheco-Contreras V. I.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Microbiología; Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio, C.P. 74949, Acatlán de Osorio, Puebla.

<sup>b</sup>Laboratorio de Biotecnología Microbiana Aplicada, Colegio de Postgraduados campus Córdoba, C.P. 94946, Córdoba, Veracruz.

<sup>c</sup>Laboratorio de Biotecnología Animal, Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, C.P. 88710, Reynosa, Tamaulipas.

vipc4@hotmail.com, Jerry\_10sas@hotmail.com, gabriela\_lara\_ruiz@yahoo.com.mx, fhrosas@colpos.mx, asifuentes@ipn.mx, warellano@ipn.mx

**Innovación tecnológica:** Caracterización molecular de bacterias ácido lácticas.

**Área de aplicación industrial:** Transformación de productos alimenticios.

Recibido: 28 Junio 2017.

Aceptado: 21 Febrero 2018.

### Abstract

Due to the importance of the use of lactic acid bacteria (LAB) in the food industry, the objective of this study was to isolate, characterize and identify microorganisms associated with the fruit of tempequistle from the mixteca region. A first macroscopic and biochemical characterization led to the identification of eight gram-positive cultures and seven gram-negative, in three phenological states of tempequistle and in the processing type brine. In green tempequistle fruit samples, microorganism growth was not observed. The molecular characterization of the cultures by 16S ribosomal region sequencing allowed the identification at genus and species level of the isolations. *Bacillus subtilis* was the most abundant microorganism of the lactic acid bacteria, this was isolated from the fruit of stained, mature and processed tempequistle, while *Leuconostoc mesenteroides* and *Bacillus amyloliquefaciens* were isolated from samples of mature and processed tempequistle. Results suggest that from tempequistle fruit lactic acid bacteria can be isolated, with biotechnological potential in foods for the improvement of

organoleptic and commercial characteristics in the food industry. The evaluation of the biotechnological potential of the isolated bacteria in the present study will be the objective for future research.

**Key Words:** Tempesquistle, lactic acid bacteria, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*.

## Resumen

Dada la importancia del uso de las bacterias ácido lácticas (BALs) en la industria alimentaria, el objetivo de este estudio fue aislar, caracterizar e identificar microorganismos asociados al fruto del tempesquistle de la región mixteca. Una primera caracterización macroscópica y bioquímica llevó a la identificación de ocho cultivos Gram positivos y siete Gram negativos en tres estados fenológicos del tempesquistle y en el procesado del tipo salmuera. En muestras de fruto de tempesquistle verdes, no se observó crecimiento de microorganismos. La caracterización molecular de los cultivos mediante secuenciación de la región 16S ribosomal permitió la identificación a nivel género y especie de los aislamientos. *Bacillus subtilis* fue el microorganismo más abundante de las bacterias ácido lácticas, estas fueron aisladas del fruto de tempesquistle pintón, maduro y procesado, mientras que *Leuconostoc mesenteroides* y *Bacillus amyloliquefaciens* fueron aislados de muestras de tempesquistle maduro y procesado. Los resultados sugieren que del fruto del tempesquistle pueden ser aisladas bacterias ácido lácticas, con potencial biotecnológico en alimentos para la mejora de las características organolépticas y comerciales en la industria alimenticia. La evaluación del potencial biotecnológico de las bacterias aisladas en el presente estudio, será el objetivo de trabajos futuros.

**Palabras clave:** Tempesquistle, bacterias ácido lácticas, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*.

## 1. Introducción

México posee una gran diversidad de árboles *Sideroxylon*, en el valle de Tehuacán – Cuicatlán predomina dos especies, denominadas *Sideroxylon capiri* (A.D.C) Pittier, localmente conocido como “cosahuico” y *Sideroxylon palmeri*, comúnmente conocido como tempesquistle (Smith, 1967). *Sideroxylon palmeri*, se distribuye en el pacífico, en el noroeste de los estados de Durango y Sinaloa, en el Golfo de México en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro,

Veracruz, Tabasco y Chiapas, en el centro de México en los estados de Oaxaca y Puebla (Pennington y Sarukhán, 1998; González y Casas, 2004). En Puebla, esta especie predomina en los municipios de Ajalpan, Caltepec, Coxcatlán y Tehuacán (Pennington, 1990; Pennington y Sarukhán, 1998) y en la región Mixteca Poblana, siendo el municipio de Acatlán de Osorio parte de esta región.

El fruto del tempesquistle es empleado principalmente como alimento a través de guisados y ensaladas, se comercializa en los

mercados regionales por costal y cuartillos (medidas locales de volumen/peso aproximadamente 1 kg) (Chaves *et al.*, 1995). Su valor nutricional radica en la fuente de energía (185.7 kcal/100 g), aporta entre el 30 y 50 % del requerimiento diario y por su alto contenido en fibra (Carrillo, 2004). Aunque el tempesquistle es muy popular en el valle de Tehuacán - Cuicatlán y en la región mixteca Poblana y Oaxaqueña, no ha sido estudiado a detalle.

El aislamiento de bacterias ácido lácticas en frutas y vegetales han sido reportados ampliamente (Bae *et al.*, 2006; Chambel *et al.*, 2006; Duangjitcharoen *et al.*, 2008; Trias *et al.*, 2008). Sin embargo, estudios sobre microorganismos asociados con el fruto del tempesquistle no han sido realizados. El uso de microorganismos, como las bacterias ácido lácticas en la industria alimentaria, han centrado especial interés por su contribución significativa en el sabor, olor y textura en alimentos fermentados, además por el gradiente de acidez alcanzado, que favorece prolongar la vida de anaquel del alimento (Chen *et al.*, 2010). El objetivo de este estudio fue aislar, caracterizar e identificar microorganismos del tipo ácido lácticas asociados al fruto del tempesquistle colectado en la región Mixteca Poblana.

## 2. Materiales y métodos

### Origen del material biológico

El monitoreo y colecta de frutos del tempesquistle se realizó en la comunidad las Adelfas, municipio de Acatlán de Osorio, estado de Puebla. Se recolectaron frutos verdes, pintón, maduros (color negro) y cocidos (tipo salmuera), estos últimos fueron adquiridos en mercados regionales. Las muestras fueron colectadas asépticamente y almacenadas en refrigeración a 4 °C hasta su procesamiento.

### Lugar experimental

La caracterización fisicoquímica, morfológica y bioquímica se realizó en el laboratorio de Biotecnología Microbiana Aplicada, del Colegio de Postgraduados (COLPOS), campus Córdoba, Veracruz; mientras que la caracterización molecular se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional ubicada en la ciudad de Reynosa, Tamaulipas.

### Caracterización fisicoquímica del fruto del tempesquistle

La caracterización fisicoquímica consistió en determinar sólidos solubles totales (°Brix) y pH en los tres estados fenológicos del tempesquistle. Para la determinación de sólidos solubles totales, se extrajo jugo del tempesquistle mediante maceración y 100 µl de jugo se colocó en el sensor del refractómetro Atago® previamente calibrado con agua destilada y las lecturas fueron reportadas como grados Brix. El pH se determinó en 30 mL de extracto de tempesquistle, utilizando un potenciómetro Denver Instrument® previamente calibrado con soluciones buffer de 4, 7 y 10. Las mediciones se realizaron por triplicado.

### Aislamiento y purificación de microorganismos del fruto del tempesquistle

Frutos de tempesquistle fueron desinfectados con hidróxido de sodio al 0.75 % (NaOH) y depositados en tubos Corning® (capacidad de 50 mL) que contenían 30 mL de agua destilada e incubados a 28 °C durante 24 horas para inducir la fermentación. Un mL de caldo fermentado fue colocado en un tubo Corning® (capacidad de 50 mL) que contenía 10 mL de solución tween 20 y

homogeneizado en vortex (Labnet International Inc®). Se realizaron diluciones decimales hasta  $10^{-5}$  utilizando tubos Eppendorf® y fueron sembradas por duplicado mediante la técnica vertido en placa, utilizando medio de cultivo Man Rogosa y Sharpe (MRS Difco®) adicionado con carbonato de calcio al 1 % ( $\text{CaCO}_3$ ) e incubadas bajo condiciones anaeróbicas a 37 °C durante 24 horas. Las colonias que presentaron textura cremosa; consistencia suave, forma puntiforme, círculo fusiforme; elevación convexa y planas y borde entero y ondulado fueron seleccionados y resembrados por la técnica de estriado y por duplicado en placas con MRS Difco® y en Agar Eosina y Azul de Metileno y en Agar Salmonella-Shigella para descartar la presencia de enterobacterias y salmonella-shigella, respectivamente. Las colonias fueron preseleccionadas y se les realizó la prueba de tinción de Gram, catalasa y oxidasa, solamente bacterias Gram positivas, catalasa negativa y oxidasa negativa fueron seleccionadas y almacenadas en refrigeración a 4 °C hasta su caracterización molecular.

### **Identificación mediante la región 16S ribosomal**

#### **Extracción y cuantificación de ADN**

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo estandarizado de un estuche comercial Wizard® Genomic DNA purification kit (Cat# A1120, Promega). La concentración de ADN se determinó en gel de agarosa al 1.5 % peso/volumen, utilizando como referencia concentraciones del bacteriófago lambda (50 y 100 ng de ADN). La visualización y cuantificación se realizó en el fotodocumentador Kodak Digital Science mediante el programa Gel Imagen de Kodak Digital Science 3.0.2.

### **Amplificación de secuencias ribosomales**

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizado para amplificar la región 16S ribosomal utilizando oligonucleótidos universales descritos por James *et al.*, (2010) 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' y 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3'. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl, el programa de amplificación consistió de 1 ciclo de desnaturalización por 95 °C por 2 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1:30 min. Finalmente se agrega in ciclo final de extensión a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1.5 % mezclando 5 µl del producto de PCR con 3 µl de Syber Gold™ 10X y visualizados en el fotodocumentador Kodak Digital Science mediante el programa Gel Imagen de Kodak Digital Science 3.0.2.

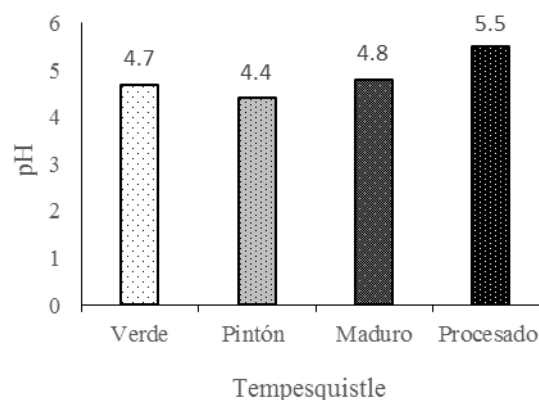
### **Secuenciación de la región 16S ribosomal**

Los productos de PCR obtenidos del ADN de los aislamientos fueron secuenciados en el secuenciador ABI Prism 3130 (Applied Biosystem Modelo 3130 EE. UU) utilizando el oligonucleótido antisentido 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3'. Secuencias parciales entre 315 pb y 517 pb fueron obtenidas. Secuencias homólogas fueron examinadas en el programa BLAST comparando secuencias obtenidas con la base de datos de secuencias de la región 16S Ribosomas de bacterias y arqueas del National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)). Finalmente el análisis de distancias genéticas se realizó usando el método UPGMA con bootstrap de 1000 repeticiones utilizando el programa MEGA V.7.

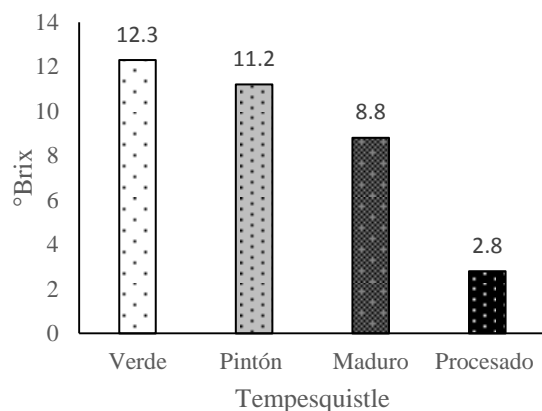
### 3. Resultados y discusión

La determinación de pH en el jugo de los frutos del tempesquistle mostró variaciones en este parámetro en los tres estados fenológicos. Mayor acidez se observó en el estado pintón (pH=4.4) e incrementa en el estado maduro (Figura 1). Sin embargo, se encontró que el pH durante la maduración del tempesquistle incluso en el procesado, es ácido. Esto indica que el fruto depende de la madurez o fermentación para el desarrollo de microorganismos como las bacterias ácido lácticas. El comportamiento observado, es similar a lo reportado en aceitunas verdes arbequinas (pH=4.5) por De la Torre *et al.*, (1993) en un estudio físicoquímico y microbiológico. Valores de pH similar fue reportado en tres tipos de aceitunas de mesa, aceitunas verdes estilo sevillano o español, aceitunas tipo negras y aceitunas negras naturales por Durán *et al.*, (1997).

A diferencia de la mayoría de los frutos, en los cuales la concentración de sólidos solubles totales (°Brix) incrementa durante los estados fenológicos, en el tempesquistle se observó un comportamiento descendente (Figura 2). Este resultado permite inferir que los azúcares durante la maduración sufren degradación o desdoblamiento. Los resultados observados en este estudio difieren con lo encontrado en frutos con característica ácida, como la gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) y curuba (*Passiflora mollisima* Bailey) en donde la concentración de sólidos solubles presenta un comportamiento ascendente durante la maduración (Fernández, 2001; Ceballos *et al.*, 2002; Del Pilar *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Valores de pH de frutos del tempesquistle en sus tres estados fenológicos y procesados del tipo salmuera.



**Figura 2.** Valores de °Brix de frutos del tempesquistle en sus estrados fenológicos y procesados del tipo salmuera.

Un total de 15 cepas fueron aisladas de muestras de tempesquistle pintón, maduro y procesado de acuerdo a forma, borde y elevación, característico de bacterias ácido lácticas (Tabla 1). En las muestras de fruto de tempesquistle verde no se observó crecimiento de microorganismos.

**Tabla 1.** Caracterización morfológica de aislamientos del fruto del tempequistle.

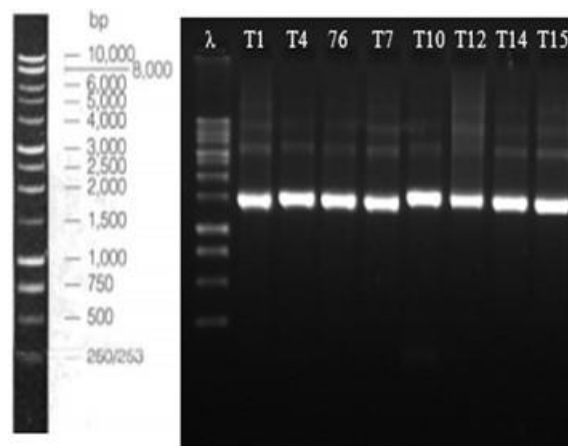
Muestra	Clave	Forma	Borde	Elevación
Pintón	T1	Puntiforme	Entera	Convexa
Pintón	T2	Circular	Entera	Convexa
Pintón	T3	Circular	Entera	Convexa
Maduro	T4	Puntiforme	Entera	Convexa
Maduro	T5	Circular	Entera	Convexa
Maduro	T6	Circular	Entera	Convexa
Maduro	T7	Fusiforme	Ondulada	Plana
Maduro	T8	Fusiforme	Lobulada	Plana
Maduro	T9	Puntiforme	Entera	Convexa
Procesado	T10	Circular	Entera	Convexa
Procesado	T11	Circular	Entera	Convexa
Procesado	T12	Puntiforme	Entera	Elevada
Procesado	T13	Irregular	Ondulada	Plana
Procesado	T14	Irregular	Encorvada	Plana
Procesado	T15	Irregular	Ondulada	Plana

La caracterización bioquímica (Tinción de Gram, Catalasa y Oxidasa) llevó a la identificación de 8 cultivos Gram positivos y 7 Gram negativos en tres estados fenológicos del tempequistle y en el procesado del tipo salmuera (Tabla 2).

**Tabla 2.** Caracterización bioquímica de aislados del fruto del tempequistle.

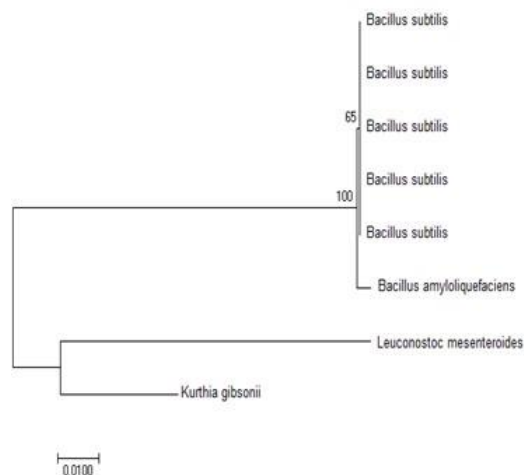
Muestra	Clave	Gram	Catalasa	Oxidasa
Pintón	T1	+	-	-
Pintón	T2	-	-	+
Pintón	T3	-	-	+
Maduro	T4	+	-	-
Maduro	T5	-	-	+
Maduro	T6	+	-	-
Maduro	T7	+	-	-
Maduro	T8	-	-	+
Maduro	T9	-	-	+
Procesado	T10	+	-	-
Procesado	T11	-	+	+
Procesado	T12	+	-	-
Procesado	T13	-	-	-
Procesado	T14	+	-	-
Procesado	T15	+	-	-

La identificación de los aislamientos Gram positivos de la región 16S ribosomal se realizó mediante amplificación por PCR y secuenciación (Figura 3). Los resultados moleculares llevaron a la identificación de *Bacillus subtilis* en muestras pintón, maduro y procesado, *Leuconostoc mesenteroides* en estado maduro del tempequistle y *Kurthia gibsonii* en muestra procesada (Tabla 3).

**Figura 3.** Amplificación de fragmentos de 1500 pb por PCR de aislamientos Gram positivos en muestras de tempequistle.**Tabla 3.** Identificación de los aislamientos Gram positivos por su secuencia ribosomal 16S utilizando el programa BLAST del NCBI.

Muestra	Clave	Accesión	Especie relacionada (NCBI)	Identidad %
Pintón	T1	NR 102783.1	<i>Bacillus subtilis</i>	100
Maduro	T4	NR 118557.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100
Maduro	T6	NR 102783.1	<i>Bacillus subtilis</i>	100
Maduro	T7	NR 102783.1	<i>Bacillus subtilis</i>	100
Procesado	T10	NR 117946.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98
Procesado	T12	NR 102783.1	<i>Bacillus subtilis</i>	95
Procesado	T14	NR 102783.1	<i>Bacillus subtilis</i>	100
Procesado	T15	NR 119002.1	<i>Kurthia gibsonii</i>	99

Obtenida la identidad de los aislamientos, se realizó un dendrograma de distancias genéticas, en el cual se observan tres grupos claramente definidos, bacterias del género *Bacillus*, *Leuconostoc* y *Kurthia* (Figura 4).



**Figura 4.** Dendrograma de distancias genéticas de la región 16S ribosomal de aislamientos en frutos del tempequistle, empleando el método UPGMA con un Bootstrap de 500 réplicas (MEGA V.7).

El tempequistle comúnmente conocido como “aceituna mexicana” (Chávez *et al.*, 1995) ha sido poco estudiado. Sin embargo en variedades de aceituna u oliva (*Olea europaea*) han sido aisladas bacterias ácido lácticas con potencial biotecnológico. Durán *et al.* (1997) en un estudio sobre el desarrollo de bacterias ácido lácticas en la elaboración de tres tipos de aceitunas de mesa, identificó *Streptococcus (Lactococcus) lactis* y *Pediococcus urinae-equi* y *Leuconostoc paramesenteroides* en aceitunas verdes estilo sevillano o español, los mismos autores en aceitunas tipo negras (y de color cambiante) identificaron *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus* sp. y en aceitunas negras naturales las especies encontradas fueron *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum*. Resultados similares fueron reportados por Rodríguez, (2012) al realizar un estudio microbiológico de los sistemas de fermentación industrial de aceitunas de mesa en la provincia de Córdoba, España, en el cual identificó *Pediococcus* sp., *Leuconostoc* sp (*leuconostoc mesenteroides*), *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*, siendo este último el que predominó durante el proceso de

fermentación mientras que *Leuconostoc* sp (*leuconostoc mesenteroides*) y *Pediococcus* sp. mostraron dominio al inicio de la fermentación. El uso de microorganismos, como las bacterias ácido lácticas en la industria alimentaria, han centrado interés en su aislamiento e identificación en frutos y vegetales como los reportados por Chen *et al.*, (2010) en Moras en estado maduro en el cual predomina *Lactobacillus plantarum*. La especie *Leuconostoc mesenteroides* identificada en el presente estudio coincide con lo encontrado en variedades de aceitunas y en frutos con característica ácida de igual forma con microorganismos del género *Lactobacillus*.

#### 4. Conclusión

Las condiciones de acidez encontradas durante las etapas fenológicas del fruto de tempequistle son ideales para el desarrollo de bacterias ácido lácticas, siendo *Bacillus subtilis* la más abundante en dos etapas fenológicas (pintón y maduro) y en el tempequistle procesado.

#### 5. Agradecimientos

Los autores agradecen al Colegio de postgraduados (COLPOS) campus Córdoba, Veracruz y al Centro de Biotecnología Genómica-IPN, por el desarrollo experimental del presente estudio.

#### 6. Referencias

1. Smith, C. E. 1966. Plant remains. In: Byers D, S. (Ed.). The prehistory of the Tehuacan Valley, Environment and Subsistence, Vol. I. University of Texas Press, Austin, TX, pp. 220-255.
2. Pennington. T. D. Surukhán. J. 1998. Árboles tropicales de México. Universidad

Nacional Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica, México 551 pp.

3. Gonzales, S. C. Casas, A. 2004. “Traditional management and domestication of tempesquistle, *Sideroxylon palmeri* (Sapotaceae) in the Tehuacán-Cuicatlán valley, Central México”. *Journal of Arid Environments* 59: 245-258.

4. Penning. T.D. 1990. Flora Neotropica: Sapotaceae. Ney York Botanical Garden, Ney York.

5. Chávez G. E. 1995. Etnobotánica del tempesquistle (*Sideroxylon* sp.) en los valles de Tehuacán, Puebla y Orizaba., con énfasis en la partición de la mujer. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados, México.

6. Carrillo S. R. 2004. Sistema agroforestal huerto familiar en Santiago Miahuatlán, PUEBLA. México. 53-59 P.

7. Chambel L.; Chelo I.M.; Zé-Zé L.; Pedro L.G.; Santos M.A.; Tenreiro R. 2006. “*Leuconostoc pseudoficulneum* sp. nov., Isolated from a ripe fig”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1375-1381.

9. Duangjitcharoen Y.; Katachote D.; Ongsakul M.; Poosaran N.; Chaiyasut C. 2008. “Selection of probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented plant beverages”. *Pakistan Journal Biological Scicens* 11: 652-655.

10. Trias R.; Bañeras L.; Montesinos E.; Badosa E. 2008. “Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi”. *International Microbiology* 11: 231-236.

11. Chen S.; Y. Wu.; C. H. Yanagida 2010. “Isolation and characteristics of lactic acid bacteria isolated from ripe mulberries in Taiwan” *Brazilian Journal of Microbiology* 41(4): 916-921.

12. NCBI (National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

13 De la Torre; E.J.; Moya R.E.; Bota E.; Sancho. J. 1993. “Estudio físico-químico y microbiológico de la fermentación de aceitunas verdes arbequinas”. *Grasas y Aceites* 44:274-278.

14. Duran Q.; Barranco R.; García G.P.; Balbuena B.M.; Fernández G.A. 1997. “Bacterias del ácido láctico en la fermentación de aceitunas de mesa”. *Grasas y Aceites* 48:297-31.

15. Fernández M.M. 2001. Determinación de índices de cosecha en el cultivo de curuba (*Passiflora mollissima* Bailey) en la región de Nuevo Colón, Boyacá. Colombia. 93p.

16. Del Pilar. P.M.I.; Fischer G.; Corredor. G. 2007. “Determinación de los estados de madurez del fruto de la galupa (*Passiflora edulis Sims*)”. *Agronomía Colombiana* 25(1): 83-95.