



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**INTERACCIONES ENTRE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
DEL ENSILADO DE PULPA DE *Agave salmiana* Y
PRODUCCIÓN DE LACTATO**

Por:

Carlos Mosqueda Hernández

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

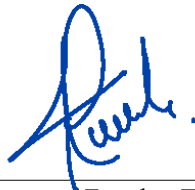
MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

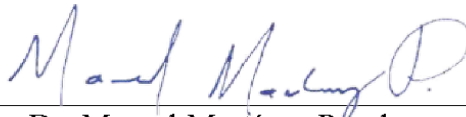
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Carlos Mosqueda Hernández la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dra. M. Mayra de la Torre Martínez
Directora de tesis



Dr. Jorge Gustavo Rocha Estrada
Co-director de tesis



Dr. Marcel Martínez Porchas
Integrante de comité de tesis



Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Interacciones entre Bacterias Ácido Lácticas del Ensilado de Pulpa de *Agave salmiana* y Producción de Lactato" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Carlos Mosqueda Hernández, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "GCJ", is written over a horizontal line.

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología, (CONHACYT) por su financiamiento al proyecto 1312404 “Ensilaje de la pulpa (Guishe) de pencas de agave: Dinámica e interacciones de las comunidades microbianas y efecto del ensilado en el microbioma del rumen”.

También agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Su respaldo ha sido fundamental para llevar a cabo esta investigación y ha sido una gran oportunidad para mi crecimiento académico y profesional.

Además, quiero aprovechar este espacio para expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que han sido parte fundamental en el desarrollo de mi tesis. Sin su apoyo y contribución, este logro no hubiera sido posible.

A mis padres y familiares, les estoy profundamente agradecido por su amor incondicional, su apoyo constante y su confianza en mí. Han sido mi mayor fuente de inspiración y motivación a lo largo de este camino. Su aliento y sacrificio han sido fundamentales para alcanzar este logro.

A mis asesores, en especial al Dr. Jorge Rocha y la Dra. Mayra de la Torre, quiero expresar mi más sincero agradecimiento por su guía, paciencia y dedicación. Su experiencia y conocimientos han sido invaluable en el desarrollo de mi tesis. Gracias por su apoyo constante y por brindarme la oportunidad de aprender de ustedes.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mis compañeros del Rochalab. Su colaboración, compañerismo y amistad han sido fundamentales en este proceso. Hemos compartido momentos de trabajo arduo, pero también de risas y camaradería. Gracias por estar siempre ahí y por hacer de este viaje una experiencia enriquecedora.

En resumen, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a CONHACYT, a mis padres y familiares, a mis asesores y a mis compañeros del Rochalab. Su apoyo y contribución han sido esenciales en el desarrollo de mi tesis. Estoy verdaderamente agradecido por su confianza, apoyo y por ser parte de este increíble viaje académico.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTUTICIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
CONTENIDO	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE CUADROS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	13
2.1. Productos y Usos del Maguey	13
2.1.1. Ventajas del Uso de Ensilajes	14
2.1.2. Ensilaje de Agave y sus Beneficios en la Conservación de Nutrientes	14
2.1.3. Variables y Factores que Afectan el Proceso de Ensilaje	15
2.2. Microbiota de Agave	16
2.2.1. Estudio de la Microbiota Durante el Ensilaje	17
2.2.2. Bacterias Ácido Lácticas como Grupo Principal Durante el Ensilaje	17
2.2.3. Determinantes Microbiológicos y Metabólicos en la Fermentación	18
2.2.4. Interacciones Benéficas entre Bacterias Ácido Lácticas	19
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	22
4.1. Objetivo General.....	22
4.2. Objetivos Específicos	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1. Medios de Cultivo	23
5.2. Aislamiento de BAL del Ensilado de Pulpa de Pencas de <i>A. salmiana</i>	23
5.3. Cepas de Colección Utilizadas	24
5.4. Identificación de Cepas Mediante Secuenciación Parcial del Gen 16S rRNA y Construcción del Árbol Filogenético.....	24
5.5. Caracterización del Tipo de Fermentación de las BAL.....	25
5.6. Crecimiento y Producción de Lactato en Medio con Extracto de Guishe (MEG)	25
5.7. Secuenciación Genómica de las Cepas y Ensamble de Genomas	25
5.8. Modelación de Rutas Metabólicas.....	26
5.9. Crecimiento de Cepas en Medio Acondicionado	26
5.10. Experimentos de Coinoculación.....	27
5.11. Construcción y Secuenciación de Vectores para Expresión de Proteínas Fluorescentes	27

CONTENIDO (continuación)

5.12. Transformación de BAL Seleccionadas	31
5.13. Expresión de Proteínas Fluorescentes con Promotores P _{tuf34} y P _{spac}	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1. Identificación de las Cepas Aisladas del Ensilado de Agave, Árbol Filogenético y Tipo de Fermentación Láctica	33
6.2. Crecimiento y Producción de Ácido Láctico en Medio a Base de Jugo Pulpa de Agave (MEG)	34
6.3. Anotación Funcional de Genes y Rutas Metabólicas de Cada Cepa.....	37
6.4. Complementación <i>in trans</i> Entre las BAL Aisladas del Ensilado de Guishe.....	39
6.5. Cepas Reporteras Fluorescentes	44
7. CONCLUSIONES	48
8. REFERENCIAS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diagrama general de la construcción de nuevos vectores para transformación de <i>Lactobacillus</i>	30
2. Caracterización morfológica, filogenética y tipo de fermentación de aislados de BAL obtenidas de pulpa de agave ensilada).....	34
3. Crecimiento y producción de lactato de BAL en diferentes medios.	35
4. Crecimiento y producción de lactato de cepas de BAL aisladas de ensilado de pulpa de agave y de suero de leche en diferentes medios.....	36
5. Comparación de genes y enzimas involucradas en rutas metabólicas de cepas de BAL..	38
6. Cinética de crecimiento de las cepas de BAL seleccionadas en medios frescos y condicionados..	40
7. Crecimiento de cepas de <i>Lactobacillus</i> seleccionadas en medio MEG-MES fresco y en una mezcla 1:1 de medio MEG-MES y el medio condicionado por la cepa CM6....	41
8. Efecto de la coinoculación sobre el crecimiento de las cepas de BAL en los medios MRS, MEG y MEG-MES.....	42
9. Producción de lactato de cuatro cepas de BAL aisladas de ensilado pulpa de agave en cultivos axénicos y en cocultivo en diferentes medios..	44
10. Fluorescencia de la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> CM9 transformada con el plásmido pLEM415 – IdhLRFP.	45
11. Expresión de diferentes proteínas fluorescentes en <i>Lactobacillus plantarum</i> CM9.. ...	46

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Lista de cepas de BAL de colección usadas en este estudio	24
2. Oligonucleótidos y plásmidos generados en este trabajo para construcción de nuevos vectores.....	28
3. Resumen de los datos obtenidos para el ensamble de los genomas de cuatro BAL aisladas de pulpa de agave.....	37
4. Lista de enzimas relacionadas a la producción de lactato y rutas metabólicas relacionadas	39

RESUMEN

En el estado de Hidalgo se utilizan las pencas del agave como alimento para ganado. Los ensilajes son una alternativa sustentable para conservar estas pencas; en este proceso, las bacterias ácido lácticas (BAL) metabolizan los azúcares a ácido láctico, contribuyendo a la conservación del alimento. Sin embargo, se desconocen el potencial metabólico de estas cepas, la dinámica y sus interacciones durante la fermentación. El objetivo del proyecto fue analizar estas comunidades de BAL a través del estudio de las interacciones entre cepas. Se aislaron 10 cepas de BAL de un ensilado espontáneo de pulpa de *Agave salmiana*, las cuales se identificaron mediante ARN 16S ribosomal, encontrando *Lactobacillus spp* en su mayoría. Se desarrolló un medio de extracto acuoso de agave (MEG), en el cual las cepas fueron capaces de crecer y producir ácido láctico. Se obtuvo la secuencia genómica de cuatro de las cepas (CM1, CM4, CM6, CM9), se analizaron sus genes codificantes y se generaron diagramas de posibles rutas metabólicas implicadas en la producción de lactato. En cuanto a las interacciones entre estas cepas, se observó que CM6, al crecer en MEG, podría producir metabolitos utilizables por CM1, CM4 y CM9; asimismo, en coinoculaciones con la cepa CM6 hubo una inducción del crecimiento e inducción del rendimiento de lactato. Finalmente, se desarrollaron cepas fluorescentes derivadas de la cepa CM9, que podrían ser usadas como herramientas para estudiar su dinámica durante el ensilaje y su establecimiento en el rumen del ganado alimentado con el ensilado que las contiene; sin embargo, es necesario introducir la construcción genética en el genoma bacteriano para favorecer su estabilidad. Nuestros resultados sugieren que las interacciones de complementación metabólica entre BAL impactan la producción de lactato durante el ensilaje de agave.

Palabras claves: Hidalgo, agave, pencas, ganado, ensilajes, bacterias ácido lácticas, conservación, metabolismo, dinámica, interacciones, cepas, ARN 16S ribosomal, *Lactobacillus spp*, medio de extracto acuoso de agave, secuencia genómica, rutas metabólicas, producción de lactato, coinoculaciones, cepas fluorescentes, rumen, construcción genética, estabilidad, complementación metabólica.

ABSTRACT

In the state of Hidalgo, agave leaves are used as feed. Silages are a sustainable alternative for preserving agave leaves for this purpose. In this process, lactic acid bacteria (LAB) metabolize sugars to lactic acid, contributing to the preservation of the feed. However, the metabolic potential of these strains, as well as the dynamics and interactions during fermentation, are not well understood. The objective of the project was to analyze these LAB communities by studying the interactions among strains. Ten LAB strains were isolated from a spontaneous silage of *Agave salmiana* pulp and identified as *Lactobacillus* spp. using 16S ribosomal RNA. An agave aqueous extract medium (MEG) was developed in which the strains were able to grow and produce lactic acid. Genomic sequences were obtained for four of the strains (CM1, CM4, CM6, CM9), and their encoding genes were analyzed, leading to the prediction of possible metabolic pathways involved in lactate production. Regarding the interactions between these strains, we found that strain CM6, when growing in MEG, could produce metabolites utilized by CM1, CM4, and CM9. Likewise, coinoculations with CM6 resulted in an induction of growth and lactate yield. Finally, fluorescent strains derived from the CM9 strain were generated, which could be useful as tools to study their dynamics during silage and their establishment in the rumen; however, these genetic constructions should be introduced into the bacterial genome to promote their stability. Our results suggest that metabolic complementation interactions among LAB impact lactate production during agave silage.

Key words: Hidalgo, agave, stalks, cattle, silages, lactic acid bacteria, conservation, metabolism, dynamics, interactions, strains, 16S ribosomal RNA, *Lactobacillus* spp, agave aqueous extract medium, genomic sequence, metabolic routes, lactate production, coinoculations, fluorescent strains, rumen, genetic construction, stability, metabolic complementation.

1. INTRODUCCIÓN

En las regiones áridas y semiáridas de México la escasez de forrajes es algo recurrente, principalmente por los largos periodos de sequía o la falta de agua para el riego de las plantas. Esto ha dado lugar a numerosos intentos para introducir forrajes no convencionales usando diversas fuentes como materia prima para la elaboración de ensilajes. Éstos son una forma de preservar las plantas y aseguran una calidad uniforme en los productos, además, su uso en la alimentación animal ha demostrado tener impacto positivo en la producción de leche y engorda del ganado bovino (Niderkorn & Jayanegara, 2021). En este proceso de conservación las bacterias ácido lácticas (BAL) son las más importantes, ya que utilizan los carbohidratos disponibles y lo convierten en lactato el cual acidifica el ensilado y a su vez actúa como conservador.

Entre algunas de las plantas no usadas comúnmente para ensilar destacan las del género *Agave*. Esto se debe principalmente a su alta productividad, incluso con poca disponibilidad de agua (Davis *et al.*, 2017) y a la gran cantidad de residuos producidos cuando el agave es utilizado en otros procesos como la elaboración de prendas y otros artículos a base de sus fibras como estropajos, cuerdas, cepillos, entre otros (Arellano-Plaza *et al.*, 2022; Pérez-Zavala *et al.*, 2020). Estas actividades generan grandes cantidades de pulpa (guishe) que son un residuo no aprovechado. Otra de las ventajas de la utilización del agave para ensilar reside en su microbiota nativa; en diversos estudios, han logrado ensilar pencas de agave y el guishe sin la necesidad de adicionar iniciadores lácticos u otros complementos como proteína para realizar la fermentación, obteniendo en el proceso grandes cantidades de ácido láctico (Reyes-Castro *et al.*, 2022; Soto-Alarcón *et al.*, 2022).

Aunque se sabe a grandes rasgos cuáles son las aportaciones de las BAL durante el ensilaje, aún se desconocen las interacciones de las diferentes especies de microorganismos que participan en el ensilaje, particularmente entre las BAL. En este trabajo se estudió la interacción de BAL seleccionadas de pulpa de agave, se obtuvo su secuencia genómica y se hicieron experimentos de crecimiento y producción de ácido láctico, para generar un panorama de lo que podría estar pasando durante el proceso de ensilaje. Para estudiar las interacciones entre las diferentes cepas de BAL homolácticas presentes al final del ensilado, se implementó un modelo experimental basado en el

uso de un medio de cultivo a base de pulpa de agave, con el objetivo de reproducir de forma más simple lo que ocurre durante el ensilado. Además, se transformó una de estas BAL con genes que codifican para proteínas fluorescentes. Estas cepas serán utilizadas en trabajos futuros para estudiar su dinámica en el ensilado y su establecimiento en rumiantes alimentados con el silo de pencas de agave o de guishe.

2. ANTECEDENTES

2.1. Productos y Usos del Maguey

El uso y consumo de productos provenientes de plantas de maguey ha ido cambiando de forma considerable en los últimos años. Aunque se tienen registros de sus formas de aprovechamiento desde la época precolonial (Ramírez-Manzano *et al.*, 2020), no fue sino hasta después de la llegada de los españoles y el establecimiento de nuevos asentamientos que se convirtió en un cultivo de alto valor, debido a la gran cantidad de productos obtenibles de la planta. En 2018 el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera dio a conocer la cifra de producción de maguey pulquero, donde Hidalgo aportó el 69.6% de la producción nacional, siendo este estado uno de los más importantes productores de maguey. El aumento en el consumo de esta planta se ha dado principalmente por los productos obtenidos, por ejemplo, el pulque, fibras y artesanías, entre otros, así como por su uso en agricultura de temporal en conjunto con el maíz y otros cultivos asociados en la milpa (Soto-Alarcón *et al.*, 2022). La alta productividad de esta planta incluso en épocas de baja precipitación, la cual llega a ser de hasta 40 toneladas de masa seca por hectárea, la convierten en un cultivo de importancia. Sin embargo, en la mayoría de las actividades donde se utiliza sólo se aprovecha una parte de la planta y se generan una gran cantidad de residuos (Vaca-Navarro *et al.*, 2019).

Actualmente se exploran diferentes aplicaciones o formas de aprovechar este residuo, entre algunas de ellas están su uso como materia prima para producción de hongos (Moreno, 2020) y como materiales para sustituir bolsas de plástico, cubiertos desechables y otros productos de uso diario (Pérez *et al.*, 2021). Dentro de estas alternativas también se encuentra su uso como alimento para ganado, aunque debido a que el producto entra en descomposición en poco tiempo, los estudios publicados sobre esta alternativa optan por la generación de ensilajes. Con este proceso se promueve a la conservación de la materia prima conservando casi en su totalidad la calidad del alimento.

2.1.1. Ventajas del Uso de Ensilajes

De forma general se han documentado varias ventajas con respecto al uso de ensilajes de las pencas de plantas de agave; por ejemplo, un efecto benéfico en cuanto al peso del ganado alimentado con este ensilado en comparación con otros forrajes convencionales (Reyes-Castro *et al.*, 2022). Esto convierte el uso de ensilajes de agave en una alternativa viable para introducción de forrajes no convencionales, principalmente en épocas de estiaje donde existe una escasez de alimento. Se han realizado diversos estudios para conocer el potencial forrajero de las pencas de agave tanto fresco como ensilado, evaluando especies como *Agave salmiana* (Zamudio *et al.*, 2009), *Agave sisalana* (D'Souza *et al.*, 2018), *Agave mapisaga* (Nizami & Murphy, 2011) y *Agave fourcroydes* (Reyes-Castro *et al.*, 2022), por mencionar algunas. Sin embargo, la mayoría de este conocimiento sigue siendo exploratorio y limitado, por tanto, los actuales estudios en el tema se enfocan a entender las bases del proceso de forma que se pueda mejorar su productividad y eficiencia.

2.1.2. Ensilaje de Agave y sus Beneficios en la Conservación de Nutrientes

La calidad nutricional de un forraje depende de tres elementos importantes: 1) la tasa y el nivel de consumo, 2) la digestibilidad y 3) la eficiencia de utilización de los nutrientes contenidos en el forraje. Estos factores sumados a la composición química de la materia prima son determinantes de la calidad nutricional del ensilado final (Zamudio *et al.*, 2009). El principal problema en la alimentación de rumiantes se encuentra en que los forrajes usados para ensilar contienen por lo general bajos niveles de nitrógeno y alto contenido en lignina, lo que interfiere con la digestibilidad y el aprovechamiento de nutrientes, que más tarde se refleja en la salud del ganado y trae consigo grandes pérdidas económicas (Zamudio *et al.*, 2009).

En general, los ensilajes de agave contienen bajas concentraciones de acetato, butirato y propionato al inicio de la fermentación, pero estos valores incrementan conforme avanza el proceso. La importancia de estos compuestos radica en que son absorbidos en las paredes del rumen y

proporcionan energía al animal. En algunos estudios (McDonald, 1981; Zamudio *et al.*, 2009), se ha encontrado que, a diferencia de los forrajes comunes, la madurez de la planta no afecta la producción de ácido láctico, ni la concentración de ácidos grasos volátiles. Además, el pH en el ensilado tiende a permanecer ácido, y es un buen indicador de la biosíntesis eficiente de ácido láctico. También, es importante resaltar que durante la fermentación se reducen las concentraciones de compuestos anti nutricionales como saponinas y oxalacetatos, que pudieran afectar la salud de los animales que los consumen (Zamudio *et al.*, 2009). De modo que además de lograr una conservación del forraje, se logra mejorar la calidad nutricional del alimento eliminando gran parte de estos compuestos dañinos.

2.1.3. Variables y Factores que Afectan el Proceso de Ensilaje

Entre las variables importantes en el proceso fermentativo se encuentran la temperatura y el pH, debido a que representan un factor importante en la eficiencia de los microorganismos durante la transformación de sustratos (Estévez Mosquera & Sierra Montaña, 2007). Otro factor importante es lo que llaman “calidad microbiológica”, la cual se refiere a los tipos de microorganismos presentes durante el proceso. En algunos estudios, se ha logrado controlar este factor utilizado iniciadores lácticos (bacterias ácido lácticas, BAL), e incrementando la temperatura para eliminar agentes patógenos causantes de enfermedades en el ganado (Triana *et al.*, 2014). Además, otro factor importante es la humedad; los cambios en el contenido de humedad pueden afectar en gran medida el crecimiento microbiano, la humedad adecuada es del 60 al 70% (Gobbetti *et al.*, 1994). Las hojas de maguey tienen una humedad promedio de 90% y un 10% de materia seca (MS), por lo que se ha intentado reducir este excedente de agua antes de ensilar o añadir un material que la absorba y permita ajustar el contenido de materia seca, tal como el rastrojo de maíz.

Debido a que se trata de un proceso biológico, los microorganismos presentes al inicio de la fermentación, su dinámica de crecimiento y sus interacciones son de gran importancia para el éxito y la calidad del ensilado. Por lo tanto, es necesario entender cómo funciona la fermentación y qué puntos son clave para mejorar la conservación, mantener las características del producto y su valor

nutritivo original. También es importante tener un mínimo de pérdidas en componentes importantes, como la materia seca, o evitar la producción de elementos que puedan ser tóxicos o perjudiciales para la salud de los animales alimentados con este forraje.

2.2. Microbiota de Agave

Existen pocos reportes sobre a microbiota nativa de las diferentes variedades de agaves; se ha encontrado que existen diferencias generales en cuanto la diversidad de microorganismos presentes entre las distintas variedades. Por ejemplo, se ha documentado que variedades seleccionadas y utilizadas para producción intensiva de *A. tequilana*, muestran una diversidad de microorganismos reducida en comparación con otras variedades silvestres de *A. deserti* y *A. salmiana*. Esta menor diversidad también se observó al analizar las funciones microbianas utilizando metagenómica. En particular, la filósfera de las plantas de *A. tequilana* presentó un número reducido de genes relacionados con el metabolismo del carbono, la biosíntesis de metabolitos secundarios y la degradación de xenobióticos (Flores-Núñez *et al.*, 2022). Sin embargo, aún falta por explorar si la adición de microorganismos clave podría mejorar la diversidad microbiana y si dicho aumento podría mejorar el proceso de ensilaje en general.

La composición, tanto química como microbiológica de la materia prima, es determinante para que se lleve a cabo una correcta fermentación, además de repercutir en la calidad del producto final. Los principales rasgos a evaluar en cuanto a calidad en productos alimentarios son las características bromatológicas, organolépticas y la sanidad del producto (Prieto *et al.*, 2008). Estas dependen, además de la composición química, de los microorganismos presentes en la materia prima y de cómo evoluciona la estructura del microbioma durante el ensilado. Estos procesos impactan en la transformación de los nutrientes a diferentes productos, principalmente lactato y otros ácidos orgánicos que le otorgan al ensilado distintas características sensoriales; además, contribuyen a mantener el pH en niveles bajos, lo que ayuda a que no proliferen microorganismos patógenos y a la conservación del ensilado (Villa *et al.*, 2010).

2.2.1. Estudio de la Microbiota Durante el Ensilaje

El proceso de fermentación durante el ensilaje está dominado por varios tipos de microorganismos, siendo un proceso complejo y dinámico que se ve afectado por muchos factores. Algunos de los más importantes son las condiciones anaeróbicas en el silo, los niveles de carbohidratos solubles, la abundancia y tipo de bacterias epífitas y la cantidad de materia seca (Jiang *et al.*, 2020). Cultivos iniciadores a base de BAL se usan comúnmente como estimulantes para mejorar la fermentación del ensilaje (Muck *et al.*, 2018). Sin embargo, estudios anteriores han informado que la efectividad de las BAL está influenciada por varios factores, incluidos el tipo de forraje, la especie y la cantidad de BAL (Blajman *et al.*, 2018; Weinberg *et al.*, 1988). Por lo tanto, la elaboración de perfiles de la comunidad microbiana del ensilaje y la dinámica de la estructura de la comunidad durante el proceso, puede mejorar nuestra comprensión de la fermentación y de la conservación del ensilaje.

2.2.2. Bacterias Ácido Lácticas como Grupo Principal Durante el Ensilaje

Existen ensilajes en donde la producción de ácido láctico es deficiente, por lo que se han llevado a cabo estudios como el de Ni *et al.* (2018), quien descubrió que la adición de melaza podría aumentar el contenido de ácido láctico e incrementar la población de *Lactobacillus* durante el proceso de ensilado de soja. Por lo que se utilizan inóculos microbianos cuando la abundancia de BAL es poca o nula; además al utilizar iniciadores lácticos se ahorra tiempo en el ensilado a gran escala. Sin embargo, algunos investigadores (Yang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015) proponen que las BAL aisladas de diferentes cultivos forrajeros y pastos en diferentes ambientes suelen tener diferentes efectos sobre la fermentación del ensilaje. En contraste, en un ensilado de maíz (Villa *et al.*, 2010) la abundante microflora fue compuesta principalmente por *Lactobacillus* y *Pediococcus* (homofermentativos), además de *Enterococos* y *Leuconostoc* (heterofermentativos). Las BAL heterofermentativas contribuyen a la acumulación de ácido butírico, cuya biosíntesis proviene de la condensación de moléculas de ácido acético (Queiroz *et al.*, 2013) y es indeseable, porque disminuye el valor nutricional del ensilado. Es por ello por lo que uno de los principales objetivos

es encontrar una materia prima vegetal que cumpla con el índice mínimo requerido de bacterias lácticas, y que esta población se desarrolle durante el ensilaje.

A pesar de la identificación de estos grupos bacterianos, a la fecha no se ha puesto mayor atención en el control del desarrollo de poblaciones microbianas durante el ensilaje y el producto final. Para ello, es crucial aplicar metodologías y tecnologías en el proceso que ayuden a minimizar las condiciones que son favorables para el crecimiento de bacterias no deseables y propicien el desarrollo de las BAL adecuadas.

2.2.3. Determinantes Microbiológicos y Metabólicos en la Fermentación

Se han desarrollado iniciadores lácticos para ensilajes con la función de asegurar la utilización rápida y eficiente de los carbohidratos solubles de un cultivo, seguida de una rápida disminución del pH y una producción intensiva de ácido láctico. Varios estudios han indicado las ventajas y desventajas de usar tales inoculantes (Mo & Saue, 1988; Weinberg *et al.*, 1988). Sugieren que es probable que la composición microbiológica de algunos inoculantes no sea adecuada para todo tipo de forrajes, ni para una variedad de condiciones ambientales. Además, el proceso de ensilado también puede mejorarse mediante la adición de enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular vegetal como celulasas, y hemicelulasas, y otras como pectinasas y amilasas. Las funciones atribuidas a estas enzimas son, en primer lugar, el aumento del aporte de carbohidratos fermentables y, en segundo lugar, la mejora de la digestibilidad del ensilado por hidrólisis parcial de la pared celular. Sin embargo, se ha reportado que las BAL nos sintetizan estas enzimas degradativas.

La estructura de la comunidad, la diversidad de especies y la función de los microorganismos son factores importantes que afectan la fermentación del ensilaje (C. Guan *et al.*, 2022; McEniry *et al.*, 2010). En un estudio de metagenómica de ensilaje de maíz (Du *et al.*, 2022) se encontró que las bacterias Gram-negativas *Pseudomonas*, *Pantoea* y *Acinetobacter* representaron la mayoría de las bacterias epífitas en la materia prima. Las especies de estos géneros son indeseables en el ensilaje

debido a la producción de compuestos tóxicos y a que algunas cepas son capaces de producir infecciones en humanos y animales.

En cuanto a las vías metabólicas presentes durante el proceso de fermentación, se ha encontrado que en general durante todo el proceso, las rutas predominantes son, la glucólisis hasta piruvato, la formación de lactato a partir de éste (BAL homolácticas), la formación de acetato y CO₂ (BAL heterolácticas) y la síntesis de butirato a partir del acetato. Estas vías metabólicas están relacionadas con una mayor calidad del ensilaje, mejor sabor y la aceptación del ensilado por los animales (Du *et al.*, 2022). Aunque estos estudios revelan información relevante en cuanto a las rutas metabólicas presentes en general, no proporcionan información específica sobre el metabolismo de todos los grupos de bacterias que llevan a cabo el proceso y cómo interactúan las mismas.

2.2.4. Interacciones Benéficas entre Bacterias Ácido Lácticas

Es ampliamente conocido que en la naturaleza ninguna cepa crece de forma aislada, por lo que los microorganismos se encuentran entrelazados e interactuando constantemente. Los estudios científicos actuales se centran en comprender los mecanismos subyacentes en estas interacciones, con la finalidad de entender mejor las comunidades microbianas y explotarlas en una gran variedad de bioprocesos.

Se han hecho grandes esfuerzos para comprender los mecanismos que afectan la asociación de microorganismos y sus interacciones para alterar un proceso. La necesidad de contacto directo (Zengler & Palsson, 2012), el uso de Quorum Sensing (QS) (Rul y Monnet, 2015), el intercambio de “bienes públicos” (Cavaliere *et al.*, 2017) y el intercambio de metabolitos (“crossfeeding”) (D’Souza *et al.*, 2018) se han descrito durante las últimas décadas como mecanismos para entender las interacciones entre las comunidades microbianas. Para estudiar muchas de estas interacciones se ha explorado el uso de cocultivos, principalmente en la producción de alimentos fermentados (Wang *et al.*, 2016; Zou *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha demostrado que los cocultivos pueden incrementar la productividad de compuestos como péptidos, aminoácidos (Gobbetti *et al.*, 1994),

ácidos orgánicos (Settachaimongkon *et al.*, 2014) y compuestos volátiles (Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2021), además que en alimentos fermentados contribuyen a un crecimiento microbiano más rápido en comparación con los monocultivos (Stadie *et al.*, 2013).

El uso de cocultivos de BAL ofrece nuevas oportunidades para la fermentación de alimentos en términos de resultados controlables, funcionalización del producto y optimización de recursos (Requena, 2018). Por tanto, la selección de las cepas a utilizar debe estar enfocado a criterios como: las funcionalidades específicas del producto final, la composición del medio y las condiciones abióticas. Así que, existe una necesidad en cuanto al desarrollo de herramientas y modelos experimentales que permitan el estudio de estas bacterias en diferentes condiciones. Una comprensión de las interacciones de las BAL, el desarrollo de bases de datos, el uso de modelos matemáticos y enfoques ómicos, permitiría desarrollar coinóculos de BAL adecuados para cada caso.

3. HIPÓTESIS

Existen interacciones entre las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en la comunidad microbiana del ensilaje de pulpa de agave (guishe) y estas tienen efectos positivos en el proceso que impactan la productividad.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Investigar las interacciones entre las comunidades de bacterias ácido lácticas presentes en el ensilaje de pulpa de agave (guishe).

4.2. Objetivos Específicos

1. Aislar cepas de BAL de pulpa de agave ensilada, caracterizarlas y determinar el tipo de fermentación láctica que realizan.
2. Implementar un modelo experimental utilizando pulpa de agave para evaluar *in vitro* el crecimiento y producción de ácido láctico de las cepas de BAL homolácticas seleccionadas.
3. Secuenciar los genomas completos de cepas de BAL homolácticas seleccionadas y obtener información sobre los genes de rutas metabólicas involucradas en la producción de lactato.
4. Investigar interacciones de cooperación entre las cepas de BAL seleccionadas.
5. Generar cepas fluorescentes de una de las cepas de BAL seleccionadas como una herramienta molecular para futuras investigaciones.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Medios de Cultivo

Medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS): peptona 10 g/L, extracto de levadura 8 g/L, 20 g/L de dextrosa, 5 g/L de acetato de amonio, 2 g/L de fosfato de dipotasio, 0.2 g/L de citrato de magnesio, 0.05 g/L de sulfato de manganeso y 1 g/L de Tween 80. Se utilizó para los cultivos en medio líquido; para elaborar el medio sólido se adicionaron 15 g/L de agar.

Medio con Extracto de Guishe (MEG): La pulpa obtenida de las pencas de *A. salmiana*, se molió en proporciones una parte en peso húmedo de pulpa con una parte de agua destilada utilizando una licuadora convencional, se filtró utilizando gasa y se centrifugó a 11,000 RCF por 10 min para eliminar la mayor cantidad de sólidos. El extracto obtenido se esterilizó en autoclave a 15 psi por 15 minutos. En caso de los experimentos en medio sólido se agregó agar al 1.5%. Se ajustó el pH a 6.5, añadiendo el amortiguador 2-etanosulfónico (Medio MEG-MES).

5.2. Aislamiento de BAL del Ensilado de Pulpa de Pencas de *A. salmiana*

Partiendo de muestras de pulpa de pencas de agave ensilada por un periodo de 30 días se tomó 1 g de muestra, el cual se homogeneizó con 9 mL de regulador de fosfato salino (PBS). Se prepararon diluciones seriadas (1:10), las cuales se sembraron en placas de medio MRS. Se incubaron a 37 °C por un periodo de 24 a 48 h y se seleccionaron colonias con morfología distinta. Se purificaron las cepas por pases sucesivos utilizando estría cruzada en medio MRS sólido y finalmente se crecieron en medio MRS líquido para preservarlas en 15% de glicerol en ultracongelación a - 80 °C.

5.3. Cepas de Colección Utilizadas

En algunos experimentos se incluyeron cepas de BAL aisladas de otros hábitats distintos a la pulpa de agave para comparar los resultados obtenidos con nuestros aislados en contraste con esas BAL. A continuación, se muestra un listado de esas cepas.

Cuadro 1. Lista de cepas de BAL de colección usadas en este estudio

ID de cepa	Hábitat donde se obtuvo	Taxonomía
ST	Leche de vaca	<i>Streptococcus thermophilus</i>
LR	Leche de vaca	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
S2	Suero ácido de quesería	<i>Lactobacillus</i> sp.
S5	Suero ácido de quesería	<i>Lactobacillus</i> sp.

5.4. Identificación de Cepas Mediante Secuenciación Parcial del Gen 16S rRNA y Construcción del Árbol Filogenético.

Se extrajo el ADN de las bacterias aisladas utilizando el kit Genomic DNA Mini Kit (PureLink). Se amplificó por PCR la región V4 del gen 16s utilizando los “primers” 515F (GTG YCA GCM GCC GCG GTAA) y 806R (GGA CTA CNV GGG TWT CTA AT) y la enzima DreamTaq (Thermo Scientific). Los productos de PCR resultantes se secuenciaron por el método Sanger como un servicio externo en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), Irapuato. Se compararon esas secuencias con las bases de datos de la NCBI y The Ribosomal Database Project (RDP) para determinar preliminarmente su identidad. También se elaboró un árbol filogenético de las secuencias de las cepas en el programa PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) con el método “maximum likelihood” para determinar la topología del árbol, las longitudes de las ramas y los parámetros del modelo evolutivo que maximizan la probabilidad de observar las secuencias en cuestión. Además, en este análisis se incluyó como cepas de referencia a *L. rhamnosus* GG (Capurso, 2019) y *Streptococcus thermophilus* (Midwinter & Pritchard, 1994).

5.5. Caracterización del Tipo de Fermentación de las BAL

Se determinó qué tipo de fermentación láctica realizaban las cepas de bacterias ácido lácticas seleccionadas. Dado que en la fermentación heteroláctica el CO₂ es uno de los productos metabólicos, la producción de este compuesto se detectó por medio de ensayos con campanas de Durham (Sun *et al.*, 2022). Se utilizó medio MRS líquido para crecer las cepas.

5.6. Crecimiento y Producción de Lactato en Medio con Extracto de Guishe (MEG)

Para comparar el crecimiento de las cepas aisladas, se crecieron las cepas durante 14 h en medio líquido MRS. A partir de este cultivo se realizaron diluciones seriadas (1:10) y se sembraron por triplicado en placas de medio MRS, del medio MEG y en MEG-MES. Para medir la producción de lactato se prepararon preinóculos tomando una colonia de cada cepa e incubándola en 10 mL de MRS líquido por 16 h a 37 °C, de ahí se inocularon tubos con medio líquido MRS o MEG, los tubos se incubaron a 37 °C por 4 días. Se midió el crecimiento de las cepas contando las CFU de cada tratamiento y midiendo la densidad óptica OD₆₀₀ de cada muestra. El lactato se cuantificó en un analizador bioquímico YSI 2700s con una membrana específica para L-lactato. Las mediciones se realizaron por triplicado y se realizaron diluciones cuando fue necesario.

5.7. Secuenciación Genómica de las Cepas y Ensamble de Genomas

El ADN extraído de las cepas seleccionadas se envió al servicio de secuenciación tipo DNBseq del Beijing Institute of Genomics, China. Las lecturas se procesaron de acuerdo con un protocolo publicado para ensamblar genomas bacterianos a partir de fragmentos de secuencias (Chivian *et al.*, 2023). De forma general, las lecturas pasaron por un control de calidad para eliminar fragmentos anormales, luego cada una se ensambló en contigs los cuales a su vez se unieron para

ensamblar los genomas completos de cada cepa, y, por último, los genes de cada cepa se anotaron según la base de datos de RAST y PROKA (Wilke *et al.*, 2016). La programación se realizó en la Plataforma KBase (Genomic Sciences Program U.S. Department of Energy, Office of Science, Office of Biological and Environmental Research).

5.8. Modelación de Rutas Metabólicas

A partir de la secuencia genómica de cada cepa se obtuvieron las regiones codificantes y se anotaron los genes involucrados en rutas metabólicas con la herramienta BlastKOALA de la base de datos del KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). KEGG recopila datos de secuencias genéticas y proteicas de diversas fuentes y utiliza herramientas de análisis para identificar genes en las secuencias de ADN, a los cuales les asigna funciones biológicas mediante comparación con funciones conocidas. De cada cepa se obtuvo una lista de identificadores correspondientes a enzimas identificadas pertenecientes a alguna ruta metabólica. También se generaron mapas metabólicos que muestran las interacciones entre genes y productos químicos en vías metabólicas específicas. Este proceso ayuda a comprender la función de sus genes y su participación en vías metabólicas.

5.9. Crecimiento de Cepas en Medio Acondicionado

Se generaron medios acondicionados a partir de las 4 cepas de las que se obtuvo su secuencia genómica, para lo cual cada una se creció en medio fresco MRS o MEG-MES por un periodo de 5 días a 37 °C y 200 rpm. El cultivo se centrifugó a 7,100 RCF por 10 min, el sobrenadante se esterilizó por filtración en membranas de tamaño de poro 0.45 µm. El medio acondicionado esterilizado se almacenó en tubos falcon en refrigeración hasta su uso.

Se realizó un experimento de crecimiento de las mismas cuatro cepas, en medio MRS fresco y

MRS acondicionado con cada una, así como en medio MEG-MES fresco y acondicionado. Para los experimentos en medio acondicionado, las cepas se cultivaron en MRS líquido por 14 h a 37 °C, se lavaron dos veces con PBS centrifugando a 7,100 RCF por 5 min y eliminando el sobrenadante. Diez- μ L de células lavadas ajustadas a OD₆₀₀ se inocularon en 250 μ L de medio condicionado en pozos de microplacas. Se midió la densidad óptica (OD₆₀₀) cada 2 h por un periodo de 48h. Como control se utilizó el medio MRS no acondicionado. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

5.10. Experimentos de Coinoculación

Se prepararon preinóculos en MRS líquido de las cepas de manera individual con colonias individuales de cada una incubadas a 37 °C por 16 h. Se lavaron las células dos veces con PBS centrifugando a 7,100 RCF en cada ocasión eliminando el sobrenadante y se ajustó la OD₆₀₀ a 1. Después se generaron combinaciones de las cepas CM1, CM4, CM6 y CM9. Las cepas se inocularon en medio fresco MRS, MEG y MEG ajustado diluyéndolas 1:1000 tanto de forma individual como en mezclas de modo que tanto las combinaciones como las cepas individuales tengan la misma OD₆₀₀. Se midió la producción de lactato a los 4 días después de la inoculación y se midió la densidad óptica del cultivo. Los resultados de coinoculaciones se normalizaron en base al crecimiento de las cepas y a la producción de cada cepa de forma individual. Esto es, el valor de inducción se obtuvo dividiendo el crecimiento o la producción de lactato de las cepas combinadas entre el crecimiento o la producción de lactato de la cepa individual con el valor correspondiente más alto.

5.11. Construcción y Secuenciación de Vectores para Expresión de Proteínas Fluorescentes

Todos los plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo se muestran en el Cuadro 2. Para la construcción de los plásmidos que expresan las diferentes proteínas fluorescentes se partió del

plásmido pLEM415-IdhL-mRFP, adquirido en Addgene (plasmid #99842; <http://n2t.net/addgene:99842>; RRID: Addgene_99842). En este plásmido, la expresión de la proteína RFP está dirigida por el promotor IdhL. Inicialmente, se utilizó este plásmido para transformar las cepas BAL y evaluar su fluorescencia. Adicionalmente, se generaron nuevos vectores utilizando los promotores P_{spac} (C. Guan *et al.*, 2022) y P_{tuf34} (Tauer *et al.*, 2014). Para el primer promotor se sintetizaron las hebras individuales sentido y antisentido de la secuencia del promotor con los sitios de restricción, ambas hebras se hibridaron en una mezcla con proporciones molares iguales de ambos oligos, se calentó la mezcla a 95 °C y se enfrió gradualmente hasta 25 °C. El segundo promotor se generó como ADN de doble cadena (gen sintético) insertado en el vector circularizado. Los dos promotores se insertaron en el plásmido pLEM415 utilizando las enzimas de restricción Sall y EcoRI, liberando el fragmento que contenía el promotor IdhL, y obteniéndose los plásmidos pLEM415–P_{spac} y pLEM415–P_{tuf34}. Las proteínas fluorescentes RFP, GFP, YFP y mCherry se amplificaron mediante PCR a partir de diferentes plásmidos (Greenwald *et al.*, 2018; Prax *et al.*, 2013), utilizando los oligos correspondientes (Cuadro 2). Los productos se insertaron entre los sitios de restricción XhoI y EcoRI obteniéndose en total 8 plásmidos.

Cuadro 2. Oligonucleótidos y plásmidos generados en este trabajo para construcción de nuevos vectores

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Descripción
XhoI – RFP FWD	CTC <u>CTCGAG</u> ATGGCCTCCTCCGAGGAC	Amplifica región RFP con sitio de restricción XhoI
RFP – EcoRI REV	GAAG <u>AATTC</u> TTAGGCGCCGGTGGAGTG	Amplifica región RFP con sitio de restricción EcoRI
XhoI – mCherry FWD	CTC <u>CTCGAG</u> ATGGTGAGCAAGGGCGAG	Amplifica región mCherry con sitio de restricción XhoI
mCherry – EcoRI REV	GAAG <u>AATTC</u> TTACTTGTACAGCTCGTC	Amplifica región mCherry con sitio de restricción EcoRI
XhoI – YFP FWD	CTC <u>CTCGAG</u> ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTT	Amplifica región YFP con sitio de restricción XhoI
YFP – EcoRI REV	GAAG <u>AATTC</u> TTATTTGTATAGTTCATCCATG	Amplifica región YFP con sitio de restricción EcoRI
GFP – EcoRI REV	GAAG <u>AATTC</u> GCTCGAATTCATTATTTGTAG	Amplifica región GFP con sitio de restricción EcoRI

		<i>XhoI</i>
<i>EcoRI</i> – GFP FWD	GAAGA <u>AATTC</u> GAAGAAGATATACATATGGCT	Amplifica región GFP con sitio de restricción <i>EcoRI</i>
<i>SalI</i> – P_{spac} – <i>XhoI</i> – <i>EcoRI</i> FWD	<u>TCGACTT</u> GACTTTATCTACAAGGTGTGGCATA ATGTGTGTAATTGTGAGCGGATAACAATTAAC <u>TCGAGATG</u>	Secuencia sentido de región promotora P_{spac} con sitios de restricción <i>SalI</i> , <i>XhoI</i> y <i>EcoRI</i>
<i>SalI</i> – P_{spac} – <i>XhoI</i> – <i>EcoRI</i> REV	<u>AATTCATCTCGAGT</u> TAAATTGTTATCCGCTCAC AATTACACACATTATGCCACACCTTGTAGATA AAGTCAAG	Secuencia antisentido de región promotora P_{spac} con sitios de restricción <i>SalI</i> , <i>XhoI</i> y <i>EcoRI</i>
<i>SalI</i> – P_{tuf34} – <i>XhoI</i> – <i>EcoRI</i>	GTC <u>GTCTCGAC</u> GATCAGGAAATTA AAA ATTGGTC TCATATAACTGAATTATTTTCGGAAAATAAAG GGAATCTGTTTACAAACATTACCAGTATCGAT ATAATACTTAAGGATTCTTCGAAAATTGACTA CTTTGTCTTTTCCAGAAGATGTAGTATAATAA CACTTAGAAATGCATTGATGCGAAATTGATGT AATTCTTGAAAACATGTACAAGGAGATTTTAC <u>TCGAGATGAATTC</u> TTC	Gen sintético con secuencia de promotor P_{tuf34} con sitios de restricción <i>SalI</i> , <i>XhoI</i> y <i>EcoRI</i>

Plásmido	Descripción	Referencia
pLEM415 – IdhL – mRFP	Plásmido para expresión de proteína fluorescente RFP bajo promotor de lactato deshidrogenasa	(Bao <i>et al.</i> , 2013)
pLEM415 – P_{spac} – RFP	Plásmido para expresión de proteína fluorescente RFP bajo promotor regulado por el operador lac y el represor lacI	Este estudio
pLEM415 – P_{spac} – GFP	Plásmido para expresión de proteína fluorescente GFP bajo promotor regulado por el operador lac y el represor lacI	Este estudio
pLEM415 – P_{spac} – YFP	Plásmido para expresión de proteína fluorescente YFP bajo promotor regulado por el operador lac y el represor lacI	Este estudio
pLEM415 – P_{spac} – mCherry	Plásmido para expresión de proteína fluorescente mCherry bajo promotor regulado por el operador lac y el represor lacI	Este estudio
pLEM415 – P_{tuf34} – RFP	Plásmido para expresión de proteína fluorescente RFP bajo promotor del factor de elongación EF-Tu	Este estudio
pLEM415 – P_{tuf34} – GFP	Plásmido para expresión de proteína fluorescente GFP bajo promotor del factor de elongación EF-Tu	Este estudio
pLEM415 – P_{tuf34} – YFP	Plásmido para expresión de proteína fluorescente YFP bajo promotor del factor de elongación EF-Tu	Este estudio
pLEM415 – P_{tuf34} – mCherry	Plásmido para expresión de proteína fluorescente mCherry bajo promotor del factor de elongación EF-Tu	Este estudio

Todos los oligonucleótidos del Cuadro 2 fueron elaborados en la empresa (T4 Oligo, Irapuato, México). Además, los plásmidos fueron secuenciados en MGH (Massachusetts General Hospital) CCIB DNA Core. Todas las construcciones obtenidas se generaron de acuerdo al diagrama de la Figura 1. Los plásmidos construidos se transformaron en células competentes de *E. coli* TOP10 para conservar y replicar los plásmidos. Se transformaron también en células de *E. coli* MC1061, de donde se extrajeron para transformar en *Lactobacillus*.

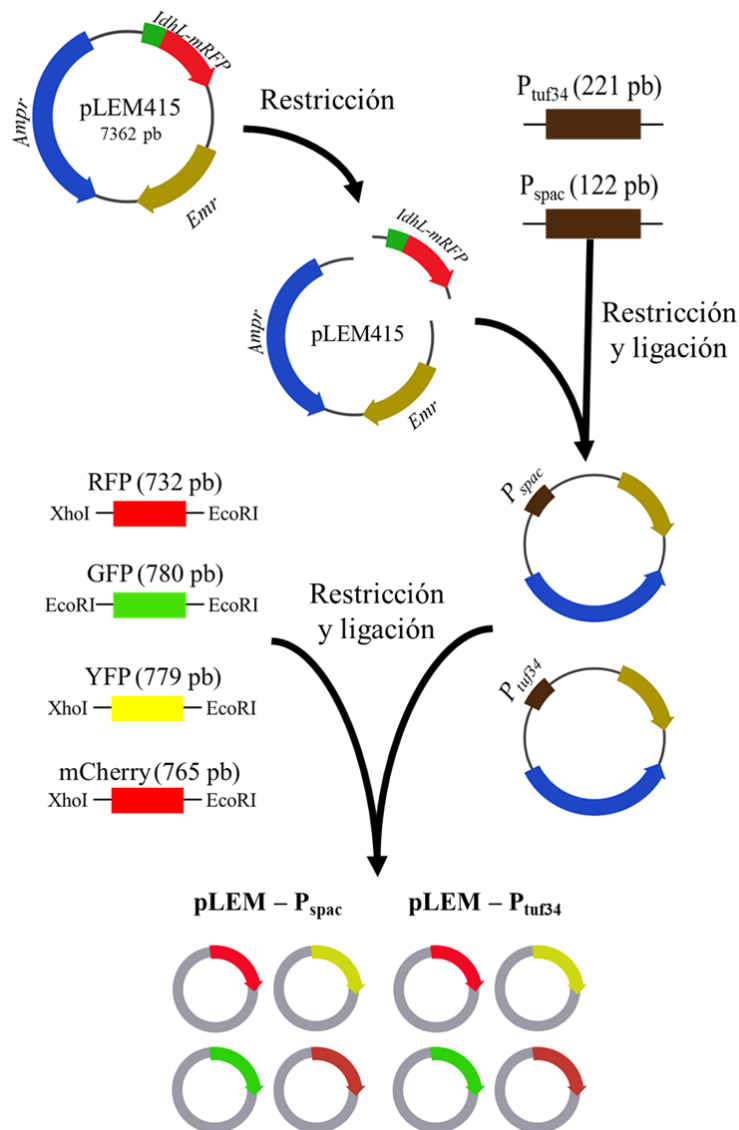


Figura 1. Diagrama general de la construcción de nuevos vectores para transformación de *Lactobacillus*. El esquema muestra el seguimiento general que se hizo para construir 8 plásmidos a partir de la estructura del plásmido pLEM415-IdhL-RFP, generando fusiones traduccionales entre los promotores P_{tuf34} y P_{spac} con las proteínas fluorescentes RFP, GFP, YFP y mCherry.

5.12. Transformación de BAL Seleccionadas

Para transformar las cepas de *Lactobacillus* se utilizó el protocolo de Holo y Nes (1989) realizando algunas modificaciones: partiendo de un cultivo líquido en medio MRS en fase estacionaria se inocularon 100 mL de medio MRS modificado (0.5 M sacarosa, 2% de glicina y 0.5% de glucosa adicionada). Las células se crecieron a 37 °C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar el crecimiento exponencial (OD₆₀₀ de 0.6 a 0.8). Los cultivos se lavaron tres veces en regulador SM (agua milli-Q 0.5 M sacarosa, 10% de glicerol y 2 mM de MgCl₂) y se concentraron 1/100 veces su volumen original en regulador SM. Se combinaron 100 µL de células concentradas con 1 µg de plásmido y se electroporaron en celdas de 2 mm (Biorad) a 2.5 kV, 25 µF y 200 Ω. Inmediatamente después del pulso, se recuperaron las células en 1 mL de MRS modificado (20 mM de MgCl₂ y 2 mM de CaCl₂ adicionado) y se incubaron a 37 °C por 3 horas. Como protocolo alternativo, se implementó un paso de preselección de las células transformadas. Para esto, las células electroporadas se utilizaron para inocular 5 mL de MRS fresco con eritromicina 1 µg/mL por una noche. Posteriormente se concentraron las células centrifugando a 7,100 RCF por 10 min y el paquete celular se suspendió en 200 µL de medio los cuales se sembraron en placas de MRS con eritromicina 5 µg/mL utilizando perlas de vidrio para distribuir las en la superficie y se incubaron a 37 °C por 48 h. Se comprobó la presencia del plásmido en las colonias transformadas por PCR de colonia y también su fluorescencia al microscopio.

5.13. Expresión de Proteínas Fluorescentes con Promotores P_{tuf34} y P_{spac}

Las cepas se incubaron en medio MRS o MEG por 72 h en tubos de 50 ml con 5 ml de medio a 37 °C y 200 rpm o en condiciones estáticas en tubos de 10 mL completamente llenos con el medio. Después de ese tiempo se hicieron preparaciones de células en portaobjetos y de cada muestra se tomaron 10 fotografías al azar, en un microscopio Axio Imager 2 Carl Zeiss S.A. de C.V. para determinar el porcentaje de células que presentaban fluorescencia. Para calcular el porcentaje, las fotografías se procesaron con el software ImageJ contando el número de células que presentaban

fluorescencia dividiéndolas entre el número de células totales en cada foto. Aunque no se realizaron mediciones de oxígeno disuelto en los medios, se consideraron como dos tratamientos distintos al momento de analizar los resultados.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Identificación de las Cepas Aisladas del Ensilado de Agave, Árbol Filogenético y Tipo de Fermentación Láctica

En el ensilado de la pulpa de las pencas de *A. salmiana*, la fermentación es llevada a cabo por bacterias nativas de la planta, por lo que se hizo un aislamiento dirigido a bacterias ácido lácticas (BAL) utilizando el medio selectivo MRS. Se seleccionaron 10 colonias con morfología distinta, considerando que cada una corresponde a una cepa diferente (Fig. 2a). A través de la secuenciación parcial del gen 16S rRNA, ocho de ellas fueron identificadas preliminarmente como *Lactobacillus*, una como *Leuconostoc* y otra como *Enterococcus*. Las cepas de *Lactobacillus* fueron homolácticas y el *Leuconostoc* heteroláctica (Fig. 2b), lo que corresponde a lo reportado para estos géneros (Khalid, 2011). En los ensilados, es preferible la presencia de bacterias homolácticas, ya que en las heterolácticas se producen además de lactato, acetato y CO₂; el acetato se puede condensar para dar lugar a butirato, el cual puede ocasionar desequilibrios en el ambiente ruminal y tener efectos negativos en la salud y el rendimiento de los animales (Carvalho *et al.*, 2021). Dado que la mayoría de las bacterias aisladas pertenecen al género *Lactobacillus*, nuestros esfuerzos de aislamiento indican que este grupo es importante para llevar a cabo la conversión de carbohidratos disponibles a ácido láctico durante el ensilado.

Con el propósito de contribuir al conocimiento de las interacciones entre las cepas de BAL homolácticas aisladas, para los siguientes experimentos se seleccionaron bacterias representativas que estuvieran separadas en el árbol filogenético (Fig. 2b) y fueran homolácticas, las seleccionadas fueron las cepas CM1, CM4 y CM9. Se añadió también la cepa CM6 con fermentación heteroláctica como control para los experimentos posteriores.

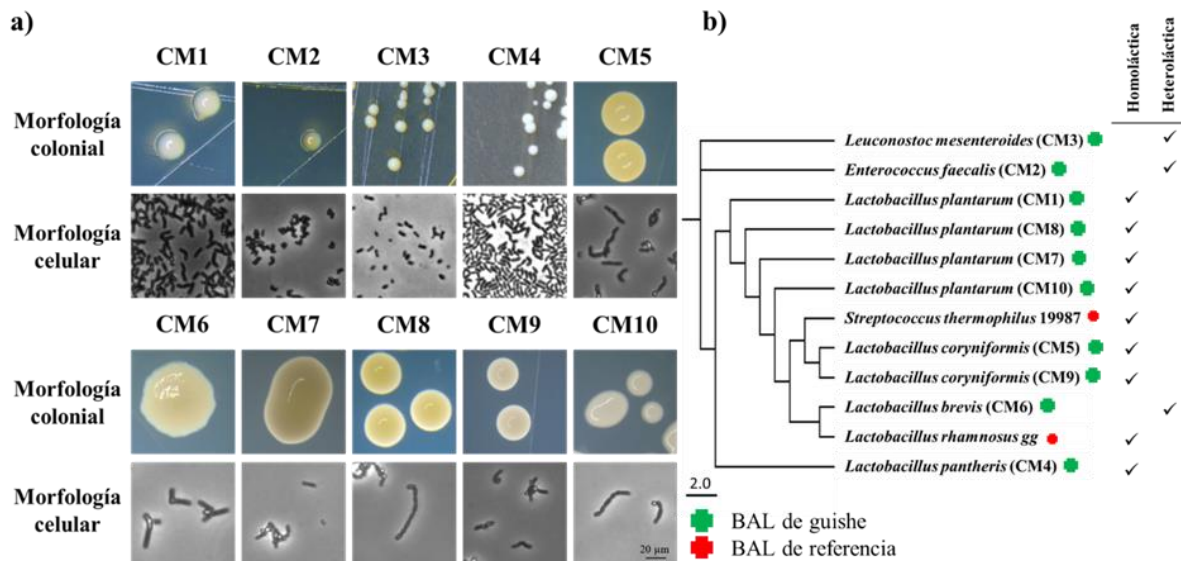


Figura 2. Caracterización morfológica, filogenética y tipo de fermentación de aislados de BAL obtenidas de pulpa de agave ensilada. a) Morfología colonial y celular de 10 aislados de bacterias obtenidos. b) Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16s y cuadro que muestra el tipo de fermentación (homoláctica o heteroláctica) de cada aislado. Se incluyen dos aislados de BAL de leche como referencia (identificador rojo).

6.2. Crecimiento y Producción de Ácido Láctico en Medio a Base de Jugo Pulpa de Agave (MEG)

Un factor importante del estudio de las interacciones bacterianas es el medio donde se desarrollan estas interacciones. Puesto que la pulpa de las pencas utilizada para el ensilado es una matriz sólida compleja, en este trabajo se generó un sistema experimental que consiste en un entorno simplificado de lo que ocurre en el proceso de ensilaje. Para esto, se generó un medio de cultivo a base de un extracto líquido acuoso de la pulpa de las pencas (MEG). Primero, se evaluó el crecimiento de las cepas seleccionadas tanto en el medio MRS como en MEG. Para esto, se crecieron primero las cepas en MRS de donde se sembraron diluciones en ambos medios para comparar su crecimiento en las dos condiciones (Fig. 3a). De igual manera se sembraron las cepas en medio líquido MRS y MEG de donde se cuantificó su producción de lactato (Fig. 3b). Se utilizaron también cepas de colección *Streptococcus thermophilus* (ST) y *Lactobacillus rhamnosus* (LR).

En el primer ensayo, encontramos que solamente las cepas aisladas de pulpa de agave presentaron crecimiento en MEG similar al observado en MRS, a excepción de la cepa CM4 (Fig. 3a). Sin embargo, la baja producción de ácido láctico observada en MEG por todas las cepas (Fig. 3b) sugirió que el ácido láctico acidifica el medio, lo cual resultaría en un menor crecimiento en el medio MEG en las cepas de referencia (Fig. 3a). Por lo tanto, se repitió el experimento en el medio MEG-MES que está regulado a pH 6.5.

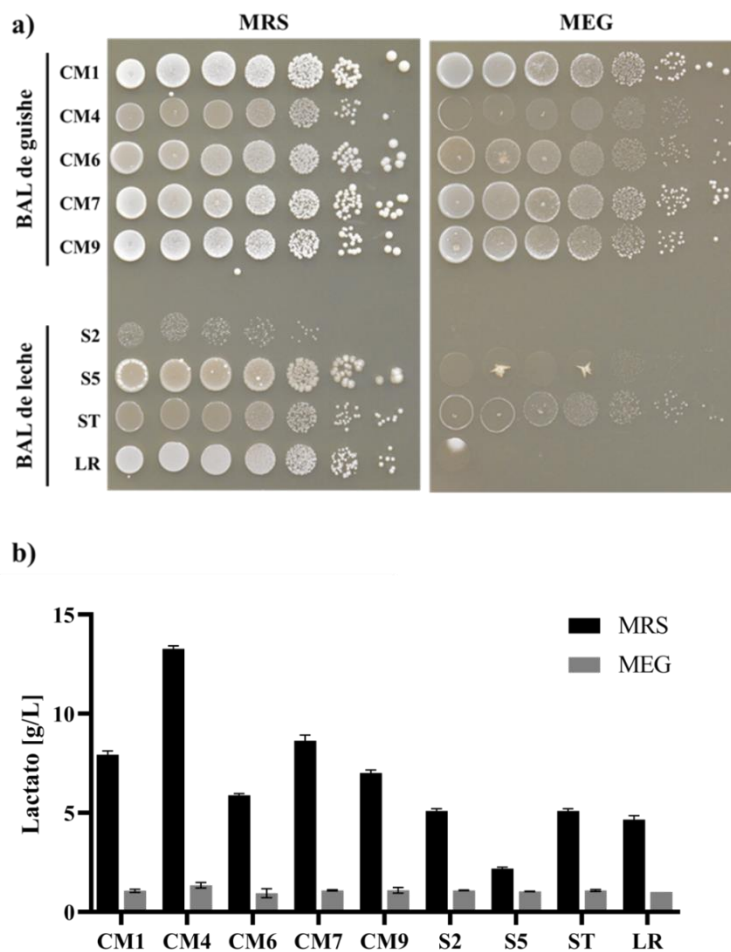


Figura 3. Crecimiento y producción de lactato de BAL en diferentes medios. a) Diluciones seriadas de distintas cepas crecidas en medio MRS y MEG. b) Producción de lactato. Cepas enlistadas en Cuadro 1.

Al evaluar nuevamente el crecimiento de las cepas en el medio MEG-MES, encontramos que el crecimiento de todas las cepas fue similar al del medio MRS (Figura 4a). Además, todas las cepas

producen lactato en ambos medios en un rango de concentraciones desde 2.5 a 12.5 g/L en MRS y de 2 a 5 g/L en MEG (Figura 4b). El mejor rendimiento de lactato y el mejor rendimiento específico (lactato normalizado por unidad de célula) fue el de la cepa *Lactobacillus pantheris* CM4 en MRS (Fig. 4b). Estos resultados indican que el extracto acuoso de la pulpa de las pencas del agave puede soportar el crecimiento de las cepas de BAL aisladas del ensilado, así como de las cepas de referencia *S. thermophilus* y *L. rhamnosus*. Por lo tanto, resulta interesante investigar la adaptación de las BAL al maguey para tolerar las saponinas y otros componentes que pudieran inhibir su capacidad de crecimiento y de producción de lactato.

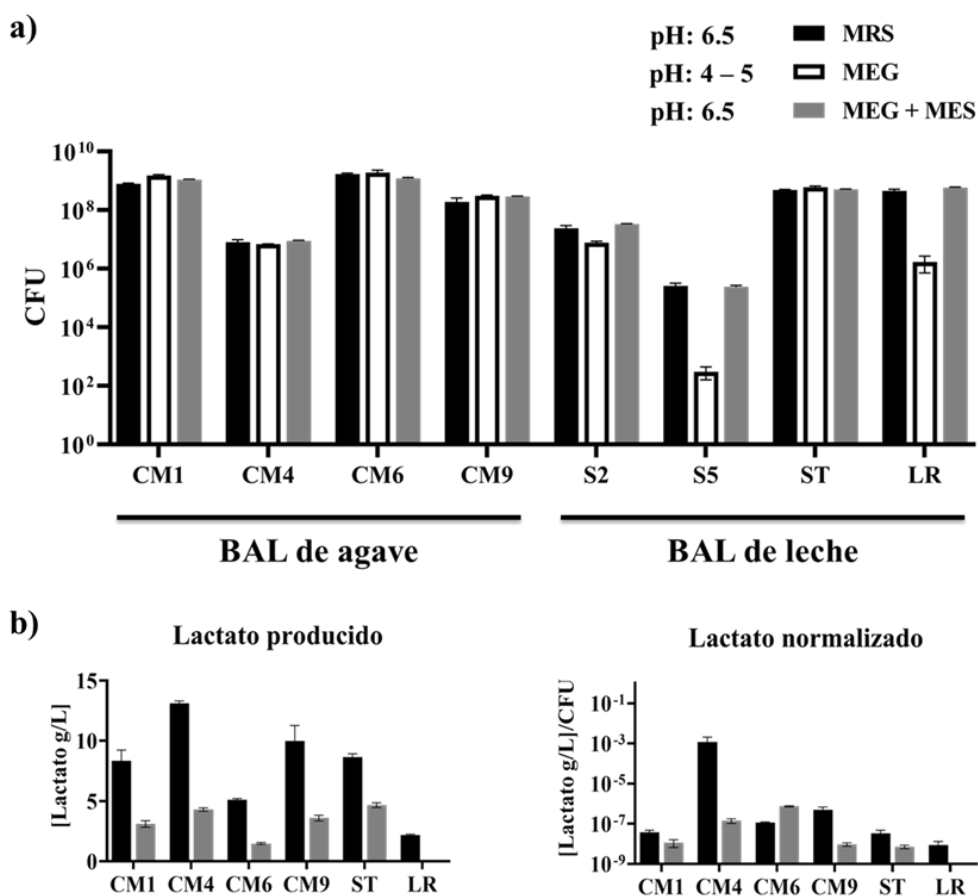


Figura 4. Crecimiento y producción de lactato de cepas de BAL aisladas de ensilado de pulpa de agave y de suero de leche en diferentes medios. a) Crecimiento de cuatro cepas de BAL aisladas de pulpa de agave y cuatro aisladas de leche en tres medios distintos: MRS, MEG (Medio Extracto Guishe) y MEG + MES (MEG con pH ajustado con 2-etanosulfónico, MES). b) Producción de lactato de cuatro cepas BAL de pulpa de agave (CM) y dos de leche (LR-*Lactobacillus rhamnosus* y ST-*Streptococcus thermophilus*) en los mismos medios, así como gráfica de producción de lactato normalizada por el crecimiento (dividiendo la concentración de lactato entre el número de unidades formadoras de colonias, CFU).

6.3. Anotación Funcional de Genes y Rutas Metabólicas de Cada Cepa

Como un acercamiento para intentar entender las bases genéticas de las posibles interacciones entre las bacterias aisladas se secuenciaron y ensamblaron los genomas de BAL de pulpa de agave (Cuadro 3). Las secuencias están disponibles en GenBank con los números de acceso CP129567 (CM1), CP129566 (CM4), CP129565 (CM6) y CP129564 (CM9).

Cuadro 3. Resumen de los datos obtenidos para el ensamble de los genomas de cuatro BAL aisladas de pulpa de agave.

CARACTERÍSTICA	CM1	CM4	CM6	CM9
NUCLEÓTIDOS	3.1 Mb	2.6 Mb	3.4 Mb	3.1 Mb
COBERTURA	100%	99.5%	98%	99%
COMPLETITUD	99.07%	99.5%	98%	99%
GENES	3123	2653	3468	3065
CODIFICANTES				
REGIONES NO	95	269	194	81
CODIFICANTES				
ARN NO	67	43	72	62
CODIFICANTE				

Las secuencias genómicas mostraron que las cepas CM1 y CM9 son muy cercanas y pertenecen a la especie *Lactobacillus plantarum*, a pesar de que en la identificación preliminar fueron designadas como especies diferentes (Fig. 2). Por otro lado, la cepa CM6, que también es *Lactobacillus plantarum* presenta diferencias notorias en el tamaño de genoma y número de genes; y la cepa CM4 es la cepa con diferencias más grandes del grupo, siendo *Lactobacillus pantheris*. Estos resultados confirmaron que las comunidades de BAL del ensilado de guishe incluyen diferentes especies del género *Lactobacillus*, entre las cuales se podrían establecer interacciones ecológicas.

Se hizo la anotación funcional de los genes y las rutas metabólicas con base a la similitud de las secuencias con proteínas de las bases de datos, con el objetivo de buscar diferencias entre las cepas CM1, CM4, CM6 y CM9. Las cepas CM4 y CM6 son las que poseen el mayor número de genes exclusivos, con 383 y 206, respectivamente (Fig. 5a). De igual forma, de las enzimas de

Cuadro 4. Lista de enzimas relacionadas a la producción de lactato y rutas metabólicas relacionadas

No. ID	Enzima	Sustrato	Producto	Rutas metabólicas
2.7.1.40	Piruvato cinasa	ATP, Piruvato	ADP, Fosfoenolpiruvato	Glucólisis, gluconeogénesis, metabolismo de piruvato
1.1.1.27	L-lactato deshidrogenasa	Piruvato, NADH	L-lactato , NAD	Glucólisis, gluconeogénesis, metabolismo de cisteína y metionina, metabolismo de piruvato
1.2.1.22	D-lactato deshidrogenasa	Piruvato, NADH	D-lactato , NAD	Metabolismo de piruvato
4.4.1.5	Glioxalasa I	Glutación	D-lactoil-glutación	Glucólisis, metabolismo de piruvato, metabolismo de cisteína, glutamina y glicina
3.1.2.6	Glioxalasa II	D-lactoil-glutación	Glutación, D-lactato	Glucólisis, metabolismo de piruvato, metabolismo de cisteína, glutamina y glicina
5.1.2.1	Lactato racemasa	D-lactato	L-lactato	Metabolismo de piruvato
1.1.1.283	Metilglioxal reductasa	Piruvalehído, NADPH	L-lactaldehído, NADP	Metabolismo de piruvato
1.2.1.22	Lactaldehído deshidrogenasa	L-lactaldehído, NAD	L-lactato , NADH	Metabolismo de piruvato

6.4. Complementación *in trans* Entre las BAL Aisladas del Ensilado de Guishe

Se hipotetiza que la presencia de una diversidad de cepas de BAL en el ensilado, así como las diferencias metabólicas entre ellas, podría permitir que estas tengan interacciones que impactan su crecimiento y la producción de lactato. Para explorar estas interacciones, realizamos experimentos con medios condicionados provenientes del cultivo de cada cepa; esta estrategia ha sido utilizada para mostrar interacciones entre cepas de bacterias que permiten el intercambio de metabolitos que afecta su crecimiento y la formación de biofilms (Du *et al.*, 2022). Las cuatro cepas (CM1, CM4, CM6 y CM9) se cultivaron en medio fresco (MRS y MEG-MES) o en el medio condicionado con cada una de las cepas, y se siguió la cinética de crecimiento (Figura 6). Todas las cepas crecieron

en los medios frescos, pero ninguna fue capaz de crecer en los medios condicionados por la misma cepa; este era un resultado esperado ya que la cepa puede agotar los sustratos utilizables, y también puede producir metabolitos que inhiben su crecimiento (Pufall & Graves, 2002; Hayes, 2009). En cuanto a los tratamientos con medios condicionados por cepas diferentes, encontramos que solamente el medio MEG–MES condicionado por la cepa CM6 permitió el crecimiento de las otras tres cepas (Fig. 6). Es importante recalcar que los medios condicionados por las cepas CM1, CM4 y CM9, no permitieron el crecimiento de otra cepa. Estos resultados sugieren que, al utilizar los sustratos solubles en agua de la pulpa de agave, la cepa CM6 produce moléculas que inhiben su propio crecimiento o agota los nutrientes que es capaz de metabolizar; y que las otras cepas pueden crecer porque utilizan otros sustratos o bien metabolitos excretados por la cepa CM6 que ella misma no puede utilizar.

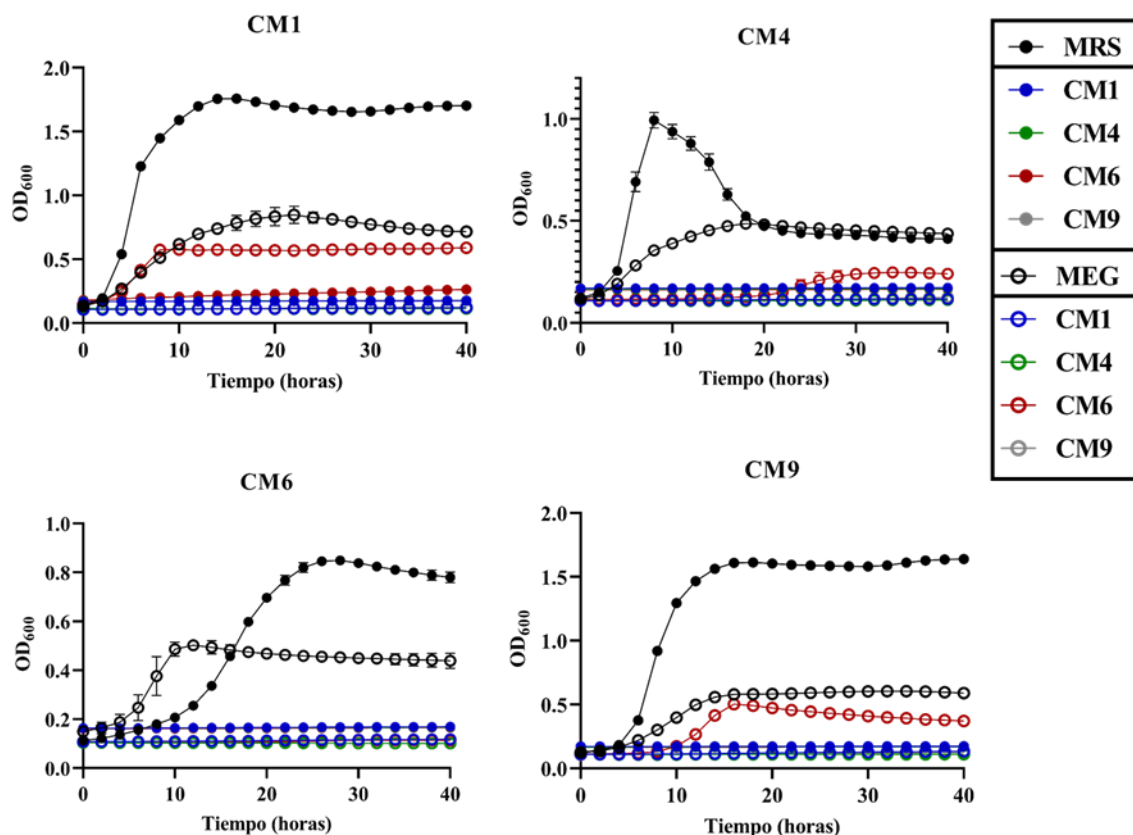


Figura 6. Cinética de crecimiento de las cepas de BAL seleccionadas en medios frescos y condicionados. Medios MRS (círculos con relleno) y MEG (Medio Extracto Guise) (círculos sin relleno). Azul – condicionados por CM1. Verde – condicionados por CM4. Rojo – condicionados por CM6. Gris – condicionados por CM9. Negro – medios frescos sin condicionar.

Con el fin de dilucidar los fenómenos involucrados en el resultado anterior, se comparó el crecimiento de cada una de las cepas creciendo en MEG-MES fresco vs. el crecimiento en un medio mezclado, combinando una parte de MEG-MES con una parte del medio condicionado por CM6. En caso de que existan nuevas moléculas, se espera un crecimiento mayor en el medio mezclado, comparado con el medio fresco (Evans *et al.*, 2020; Fritts *et al.*, 2021; Smith *et al.*, 2019). Notablemente, la cepa CM6 no fue capaz de crecer en el medio mezclado, sugiriendo que en la fase estacionaria la bacteria produce metabolitos que inhiben su propio crecimiento (Fig. 7). Por otro lado, las cepas CM1, CM4 y CM9 presentaron un mayor crecimiento (Fig. 7). En las cinéticas de crecimiento de las cepas CM1 y CM9 se observa un crecimiento diáuxico en el medio mezclado, pero no en el medio fresco, lo que indica que las bacterias utilizan los nutrientes del medio fresco y después los del medio condicionado. En el caso de la cepa CM4, la fase *Lag* fue mucho más corta en el medio mezclado, lo que sugiere que existen metabolitos que hacen que la cepa se adapte más rápido a ese medio; asimismo, la pendiente de la curva de crecimiento es mayor (Fig. 7), por lo que la velocidad específica de crecimiento también lo es, por lo que estos metabolitos pudieran ser factores de crecimiento requeridos por esta cepa. Aun es necesario realizar más experimentos para identificar y cuantificar los metabolitos que se consumen y los que se producen.

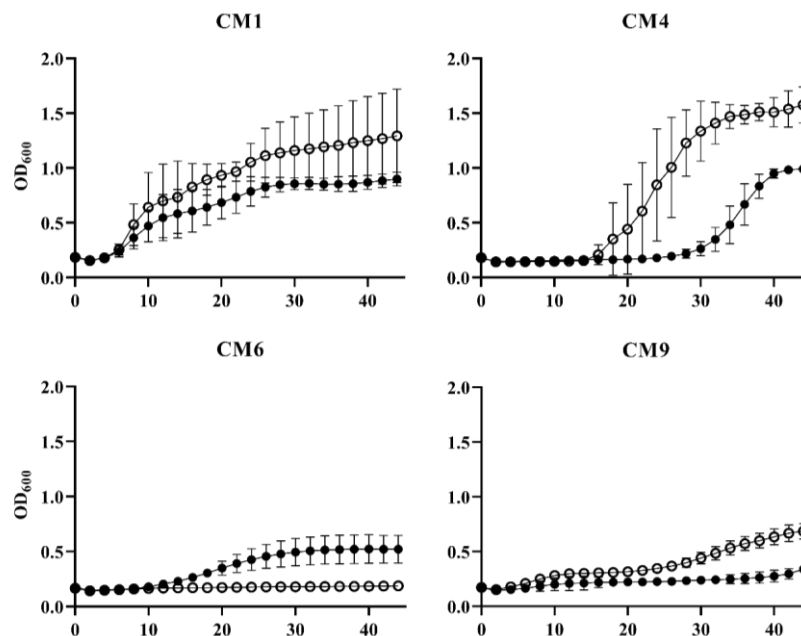


Figura 7. Crecimiento de cepas de *Lactobacillus* seleccionadas en medio MEG-MES fresco y en una mezcla 1:1 de medio MEG-MES y el medio condicionado por la cepa CM6. Círculos rellenos – Medio fresco. Círculos sin relleno – Medio fresco más medio condicionado de cepa CM6.

A continuación, evaluamos si esta interacción positiva se mantiene en experimentos de coinoculación en los medios MRS, MEG y MEG-MES (Figura 8). Se inocularon las cepas CM1, CM4 y CM6 de manera individual, por pares y las tres cepas combinadas. Se evaluó el crecimiento de las cepas después de 72 h. Las cepas individuales y en cocultivo presentaron en los medios MEG y MEG-MES un 50% del crecimiento que tuvieron en el MRS. La cepa que presentó mayor crecimiento fue la CM1 tanto en cultivo individual como en las mezclas (Figura 8a). Encontramos además que las cepas CM4 y CM6 tanto en cultivo puro como en el cocultivo de ambas, crecieron menos en MRS (Figura 8b). Sin embargo, existe una inducción del crecimiento entre estas cepas (CM4 y CM6) en el cocultivo en los medios con MEG (Fig. 8b), pero no cuando se cultivan CM4+CM6+CM1. Estos resultados indican que existe una interacción positiva entre las cepas CM4 y CM6.

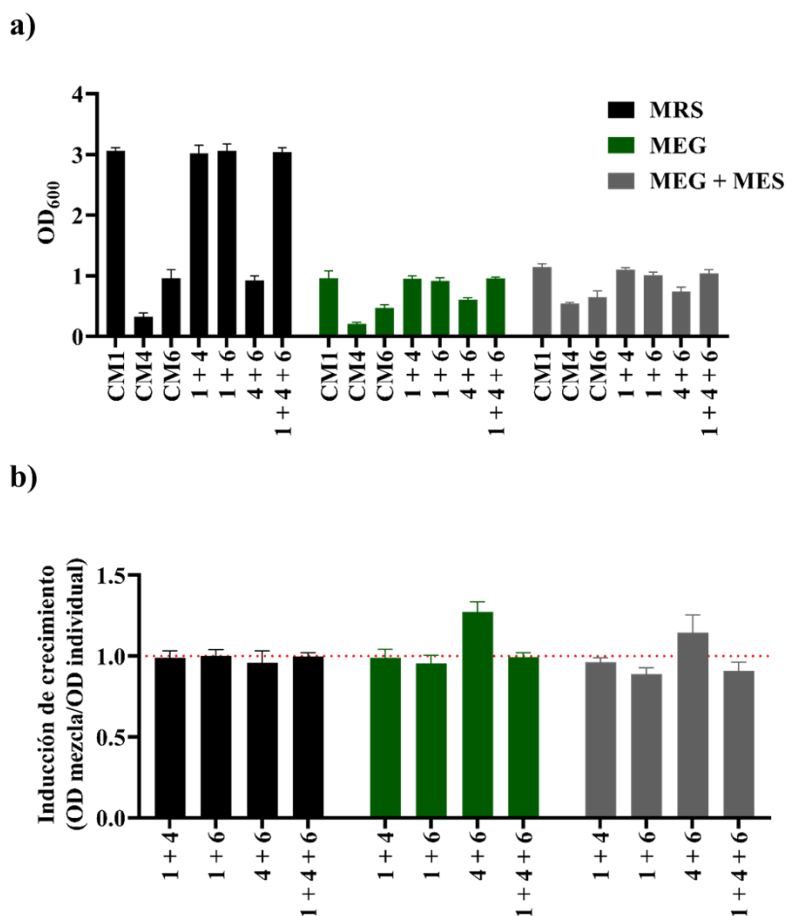


Figura 8. Efecto de la coinoculación sobre el crecimiento de las cepas de BAL en los medios MRS, MEG y MEG-MES a) Crecimiento de las cepas a las 72 h b) Inducción de crecimiento.

También se evaluó la producción de lactato en los cocultivos, comparándola con la producción en los cultivos individuales. De forma individual en MEG-MES, la cepa que produjo más lactato fue la CM4 (Fig. 9a), con una concentración de 9.58 g/L, y también la que tuvo el mayor rendimiento específico, es decir que produjo la mayor cantidad de lactato por unidad de crecimiento (Fig. 4c). Sin embargo, la producción de lactato fue mayor en el cocultivo CM4+CM6+CM1 (16.7 g/L), seguido por la producción del cocultivo CM4+CM6 (15.4 g/L) (Fig. 4b). Solo en el medio MEG – MES se produjo más lactato por unidad de crecimiento en los cocultivos CM1+CM6, y en CM4+CM6, en comparación con la producción individual; es decir, hubo una inducción (Fig. 4d).

Las interacciones en cocultivos de bacterias del género *Lactobacillus* juegan un papel crucial en la producción de lactato (H. Guan *et al.*, 2018). Estas interacciones pueden ocurrir tanto entre diferentes especies de *Lactobacillus* como entre *Lactobacillus* y otras bacterias presentes en un ambiente determinado. En trabajos anteriores, se ha mostrado que los cocultivos de especies de *Lactobacillus* puede promover una mayor producción de lactato y otros ácidos orgánicos a través de la formación de sinergias metabólicas al ser coinoculadas en medio rico (Lüders *et al.*, 2003; Mar *et al.*, 2020). Por ejemplo, ciertas especies pueden proporcionar precursores metabólicos o eliminar subproductos que podrían inhibir la producción de lactato en otras especies.

En este trabajo caracterizamos preliminarmente interacciones que impactan de manera positiva el crecimiento de las cepas y la producción de lactato. Estas interacciones se observaron exclusivamente en el medio MEG, que contiene un extracto soluble en agua de la pulpa de agave. Entonces, nuestros hallazgos son, en primer lugar, de gran importancia biotecnológica para optimizar y controlar la producción de lactato. Asimismo, nuestro estudio tiene relevancia ecológica dado que se desarrolló un sistema experimental de especies interactúan entre sí en un ambiente que simula su hábitat natural. A partir de esta información, es importante resaltar que no conocemos las dinámicas de crecimiento de las cepas individuales. Esta información es útil para conocer el efecto específico en cuanto a crecimiento cuando dos o más cepas son inoculadas en conjunto.

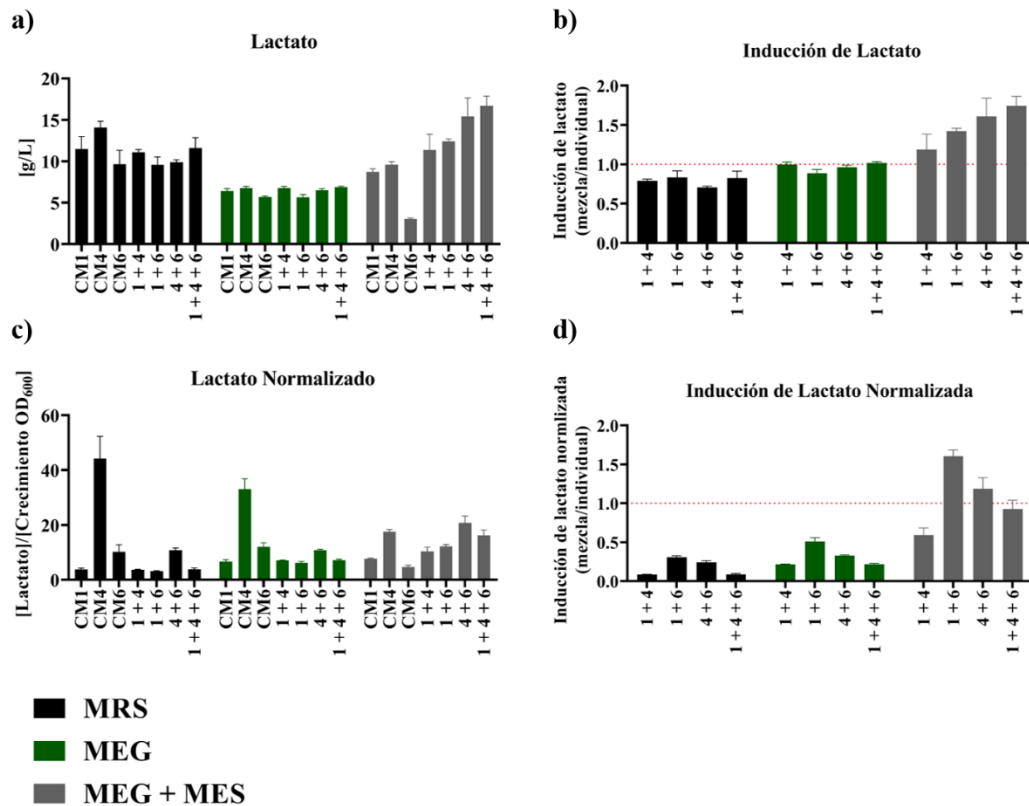


Figura 9. Producción de lactato de cuatro cepas de BAL aisladas de ensilado pulpa de agave en cultivos axénicos y en cocultivo en diferentes medios. a) Gráfica de lactato producido por cada cepa de forma individual o en combinación de dos o tres cepas. b) Gráfica de inducción de lactato en cada combinación de dos o tres cepas de BAL c) Producción de lactato de las cepas por el crecimiento de cada una de forma individual y en cocultivos. d) Inducción de lactato de las cepas normalizadas con el crecimiento de cada una.

6.5. Cepas Reporteras Fluorescentes

A pesar de que el género *Lactobacillus* es un grupo de bacterias sumamente estudiadas por su importancia industrial, de forma general existen pocas herramientas moleculares que faciliten su estudio (Fan *et al.*, 2021). En este trabajo se implementó un sistema basado en la expresión de proteínas fluorescentes para estudiar las dinámicas de cepas específicas en distintos ambientes relevantes como el ensilado o el rumen. Utilizando diferentes proteínas fluorescentes es posible diferenciar cepas distintas en cocultivo, para determinar exactamente sus proporciones y dinámica. Sin embargo, una limitación es tener una región promotora que dirija la expresión de estas proteínas fluorescentes de forma constitutiva (Rud *et al.*, 2006) y que el nivel de expresión sea alto, para que

la fluorescencia pueda ser detectable por diferentes métodos. Otra limitación importante es la transformación de aislados naturales de BAL con los plásmidos.

En este trabajo, se logró transformar la cepa *Lactobacillus plantarum* CM9 con el plásmido pLEM415 – IdhLRFP. Se ha reportado que la expresión de la proteína fluorescente RFP es constitutiva bajo el promotor IdhL en cepas de *Lactobacillus* (Bao *et al.*, 2013). Sin embargo, al analizar la expresión de fluorescencia de la cepa transformada de *Lactobacillus plantarum* CM9 se encontró que, en condiciones aerobias, tanto en MRS como en MEG), solo 10 – 15% de las células expresaban la proteína fluorescente. Por el contrario, en condiciones de limitación de oxígeno, la expresión fue de hasta 90% en ambos medios (Fig. 10). Estos resultados indican que esta cepa podría ser útil para seguir su dinámica durante todo el proceso de ensilaje e incluso verificar su prevalencia en el rumen al ser alimentado el ganado, dado que son procesos con condiciones microaerofílicas o anaerobias (Nizami & Murphy, 2011; Nordberg *et al.*, 2007). Sin embargo, fue necesario cultivar las bacterias en condiciones de oxígeno mínimas para lograr una alta expresión de la proteína, por lo cual no se puede considerar un sistema de expresión constitutiva, y su uso puede estar limitado en otras condiciones experimentales.

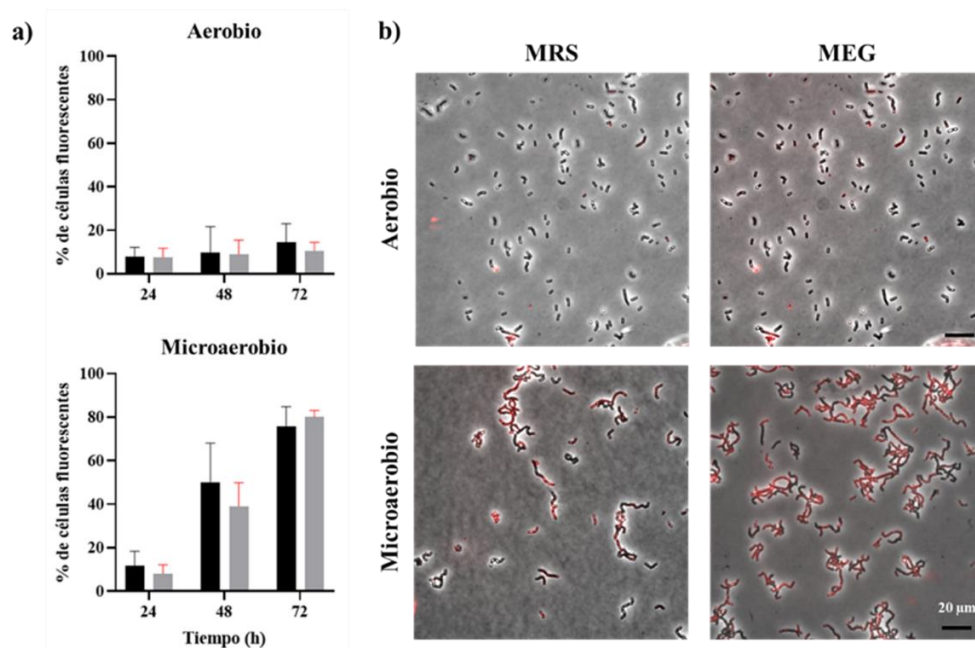


Figura 10. Fluorescencia de la cepa *Lactobacillus plantarum* CM9 transformada con el plásmido pLEM415 – IdhLRFP. a) Porcentaje de células fluorescentes bajo condiciones aerobias y microaerofílicas en los medios MRS (barras negras) y MEG (barras grises). b) Fotografías al microscopio en medio MRS y MEG bajo condiciones aerobias y microaerofílicas

Se generaron nuevas construcciones con proteínas fluorescentes bajo el control de dos promotores: P_{tu34} , el cual ha sido reportado en *Lactobacillus* como un promotor constitutivo al dirigir la expresión de un factor de elongación transcripcional (C. Guan *et al.*, 2022). El otro promotor P_{spac} pertenece al operón Lac de *E. coli* y en *Bacillus subtilis* (Nguyen *et al.*, 2005). Se obtuvieron variantes de la cepa CM9 transformada con los plásmidos generados (Figura 11), estas cepas nos permitieron probar 1) el efecto de diferentes promotores en la expresión de RFP, y 2) la expresión de diferentes proteínas fluorescentes bajo un mismo promotor (Fig. 11). Al comparar el porcentaje de células fluorescentes se encontró que el mayor número de estas células se obtuvo con el promotor IdhL en condiciones microaerófilas sin importar el medio en el que crecieran (85%). Mientras que, en general la expresión de la fluorescencia con los otros promotores probados fue baja, 5 a 20% en ambos medios, a excepción de la fusión Ptuf34 – YFP, donde se obtuvieron porcentajes de fluorescencia de 21% en MRS y 50% en MEG. Estos resultados indican que el promotor más adecuado para seguir dinámica de las bacterias BAL homolácticas en el ensilaje es el IdhL.

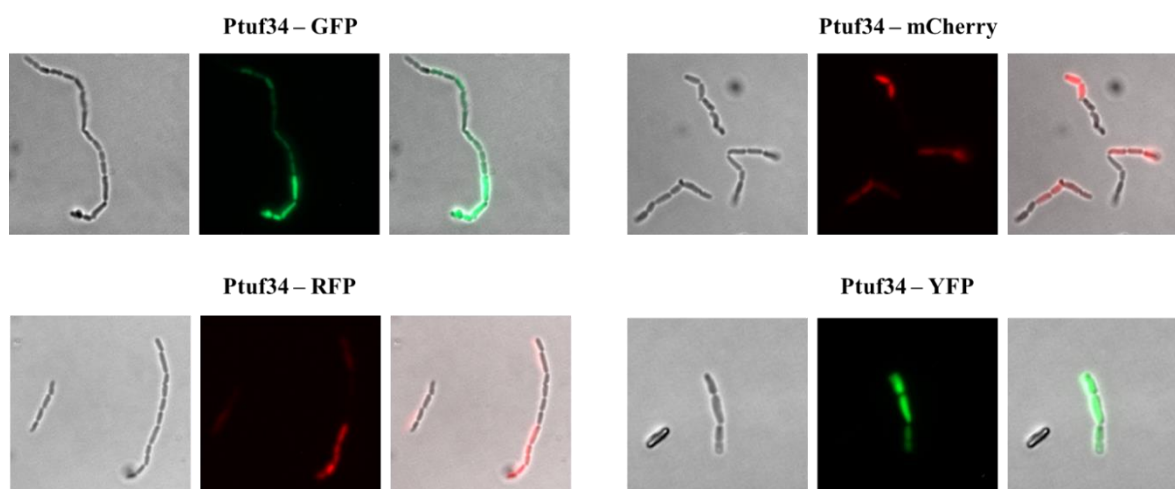


Figura 11. Expresión de diferentes proteínas fluorescentes en *Lactobacillus plantarum* CM9. En cada grupo se muestran tres fotografías: visible (izquierda), fluorescente de acuerdo al filtro requerido (centro) y un traslape de ambas (derecha).

Los resultados muestran que no se logró obtener una expresión constitutiva de los promotores probados como se esperaba en las condiciones utilizadas, dado que esperábamos tener el 100% de

las células expresando la proteína fluorescente. Sin embargo, aún es posible utilizar esos plásmidos generados para medir la expresión de fluorescencia en otros contextos; por ejemplo, en un análisis detallado del genoma de la cepa transformada CM9, se encontró que existen genes que codifican para proteínas similares al represor LacI, por tanto, es posible que la expresión del promotor P_{spac} necesite ser inducida. Los plásmidos inducibles permiten controlar de manera precisa la expresión de las proteínas fluorescentes. Esto significa que se puede regular la cantidad de proteína producida en función de las necesidades experimentales, lo que facilita el estudio de los efectos de diferentes niveles de expresión en las bacterias ácido lácticas. Esto permite investigar diferentes aspectos del metabolismo y la fisiología de las BAL (Gomes *et al.*, 2020).

En este trabajo se obtuvieron también las secuencias genómicas de las cepas que se transformaron, por lo que es posible generar plásmidos recombinantes para introducir las proteínas fluorescentes junto con la región promotora en el genoma de las bacterias y de esta forma poder expresar la fluorescencia sin necesidad de estar en presencia de algún antibiótico (Kolodner *et al.*, 1985; Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2021). Esto resulta ventajoso en experimentos donde se requiera detectar la presencia de las cepas sin alterar el microbioma presente previamente y donde la presencia de esos otros microorganismos sea necesaria como el caso del ensilaje.

7. CONCLUSIONES

Este estudio ha logrado profundizar en un aspecto esencial de los procesos de fermentación natural, específicamente en el ensilaje de pulpa de *A. salmiana*, a través de la implementación de un modelo simplificado de ensilaje utilizando el medio MEG y cepas BAL homolácticas representativas de las presentes en los ensilados. Utilizando este modelo, se estudiaron los efectos de interacciones colaborativas. A pesar de estos avances, resulta crucial profundizar en la caracterización de los metabolitos mediadores de estas interacciones para entender los mecanismos subyacentes. Así mismo, es importante conocer la estructura de la comunidad microbiana del guishe y como esta se modifica en el transcurso del ensilaje, ya que existen además de las BAL homolácticas otros grupos de bacterias, que seguramente interactúan entre sí para dar como resultado las características del producto final.

Además de los hallazgos mencionados, en este trabajo se generaron cepas bacterianas fluorescentes, mediante la utilización de diversos promotores y proteínas fluorescentes. Aunque no se logró obtener un plásmido que resultara en la expresión constitutiva de proteínas fluorescentes con los promotores probados, la metodología establecida para la transformación del BAL abre la puerta al empleo de BAL fluorescentes como herramientas moleculares. Esto permitirá investigar de manera más detallada y precisa las dinámicas de interacción entre los cocultivos, y así generar conocimiento sobre estos procesos microbianos complejos.

Las contribuciones de esta investigación no solo se limitan a la esfera del ensilaje de pulpa de agave, sino que se proyectan como un recurso valioso para la exploración de sistemas similares y para la utilización de herramientas moleculares en la investigación biotecnológica. Este estudio se erige, por tanto, como un sólido fundamento para futuras investigaciones que busquen desentrañar las intrincadas relaciones microbianas y su influencia en procesos de fermentación con implicaciones prácticas y científicas significativas.

Las perspectivas futuras incluyen continuar explorando las interacciones entre las cepas BAL, así como de estas con otros grupos presentes en el proceso de fermentación del ensilado. Además, se

deben realizar más investigaciones sobre las bacterias poco estudiadas, como *L. panteris*, para comprender mejor su papel en la producción de lactato y en el proceso en general, y el metabolismo de las BAL y su regulación. Finalmente, la cepa CM9 podría ser utilizada para seguir su dinámica durante el ensilaje y su prevalencia en el rumen como probiótico.

Como recomendación, se sugiere ampliar el uso de herramientas moleculares, como las bacterias fluorescentes, para estudiar las interacciones bacterianas en diferentes sistemas de fermentación láctica. Además, se deben realizar estudios más completos sobre los genomas y capacidades metabólicas de las cepas de *Lactobacillus* para aprovechar al máximo su potencial en la producción de lactato y mejorar los procesos de fermentación. De igual forma, con los genomas secuenciados de las cepas es posible generar nuevos plásmidos con otras secuencias promotoras que permitan una expresión 100% constitutiva, además de poder insertarse en el genoma de la bacteria. O bien, para evaluar el efecto de expresión de determinados genes, por ejemplo que les permitan utilizar diferentes fuentes de nitrógeno, expresión de bacteriocinas y de otros ácidos orgánicos de importancia a parte del lactato.

8. REFERENCIAS

- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., & Di Ilio, C. (2009). Glutathione transferases in bacteria. *The FEBS Journal*, 276(1), 58–75.
- Arellano-Plaza, M., Paez-Lerma, J. B., Soto-Cruz, N. O., Kirchmayr, M. R., & Gschaedler Mathis, A. (2022). Mezcal production in Mexico: Between tradition and commercial exploitation. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 832532.
- Bao, S., Zhu, L., Zhuang, Q., Wang, L., Xu, P.-X., Itoh, K., Holzman, I. R., & Lin, J. (2013). Distribution dynamics of recombinant *Lactobacillus* in the gastrointestinal tract of neonatal rats. *PloS One*, 8(3), e60007.
- Blajman, J. E., Paez, R. B., Vinderola, C. G., Lingua, M. S., & Signorini, M. L. (2018). A meta-analysis on the effectiveness of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for corn silage. *Journal of Applied Microbiology*, 125(6), 1655–1669.
- Capurso, L. (2019). Thirty years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: a review. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 53, S1–S41.
- Carvalho, B. F., Sales, G. F. C., Schwan, R. F., & Ávila, C. L. S. (2021). Criteria for lactic acid bacteria screening to enhance silage quality. *Journal of Applied Microbiology*, 130(2), 341–355.
- Cavaliere, M., Feng, S., Soyer, O. S., & Jiménez, J. I. (2017). Cooperation in microbial communities and their biotechnological applications. *Environmental Microbiology*, 19(8), 2949–2963.
- D'Souza, G., Shitut, S., Preussger, D., Yousif, G., Waschina, S., & Kost, C. (2018). Ecology and evolution of metabolic cross-feeding interactions in bacteria. *Natural Product Reports*, 35(5), 455–488.
- Davis, S. C., Kuzmick, E. R., Niechayev, N., & Hunsaker, D. J. (2017). Productivity and water use efficiency of *Agave americana* in the first field trial as bioenergy feedstock on arid lands. *Gcb Bioenergy*, 9(2), 314–325.
- Du, Z., Sun, L., Lin, Y., Chen, C., Yang, F., & Cai, Y. (2022). Use of Napier grass and rice straw hay as exogenous additive improves microbial community and fermentation quality of paper mulberry silage. *Animal Feed Science and Technology*, 285, 115219.
- Estévez Mosquera, R., & Sierra Montañó, J. R. (2007). *Diseño y modelamiento de un sistema para la conservación de forrajes por medio del ensilaje*.
- Evans, C. R., Kempes, C. P., Price-Whelan, A., & Dietrich, L. E. P. (2020). Metabolic heterogeneity and cross-feeding in bacterial multicellular systems. *Trends in Microbiology*, 28(9), 732–743.
- Fan, X., Bai, Y., Fan, T.-P., Zheng, X., & Cai, Y. (2021). A single point mutation engineering for changing the substrate specificity of D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus fermentum*. *LWT*, 151, 112209.

- Flores-Núñez, V., Camarena-Pozos, D., Chávez-González, D., Alcalde-Vázquez, R., Vázquez-Sánchez, N., Hernández-Melgar, A., Xool-Tamayo, J., Moreno-Ulloa, A., & Partida-Martínez, L. (2022). *Microbiome-inspired phyllospheric synthetic communities increase microbial diversity and productivity of field-grown plants of Agave tequilana*.
- Fritts, R. K., McCully, A. L., & McKinlay, J. B. (2021). Extracellular metabolism sets the table for microbial cross-feeding. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(1), e00135-20.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., & Rossi, J. (1994). The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 275–279.
- Gomes, L., Monteiro, G., & Mergulhão, F. (2020). The impact of IPTG induction on plasmid stability and heterologous protein expression by *Escherichia coli* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 576.
- Greenwald, E. C., Mehta, S., & Zhang, J. (2018). Genetically encoded fluorescent biosensors illuminate the spatiotemporal regulation of signaling networks. *Chemical Reviews*, 118(24), 11707–11794.
- Guan, C., Yuan, Y., Ma, Y., Wang, X., Zhang, C., Lu, M., Gu, R., & Chen, D. (2022). Development of a novel expression system in lactic acid bacteria controlled by a broad-host-range promoter PsrfA. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 1–10.
- Guan, H., Yan, Y., Li, X., Li, X., Shuai, Y., Feng, G., Ran, Q., Cai, Y., Li, Y., & Zhang, X. (2018). Microbial communities and natural fermentation of corn silages prepared with farm bunker-silo in Southwest China. *Bioresource Technology*, 265, 282–290.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321.
- Jiang, F., Cheng, H., Liu, D., Wei, C., An, W., Wang, Y., Sun, H., & Song, E. (2020). Treatment of whole-plant corn silage with lactic acid bacteria and organic acid enhances quality by elevating acid content, reducing pH, and inhibiting undesirable microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 11, 593088.
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci*, 1(3), 1–13.
- Kolodner, R., Fishel, R. A., & Howard, M. (1985). Genetic recombination of bacterial plasmid DNA: effect of RecF pathway mutations on plasmid recombination in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 163(3), 1060–1066.
- Lüders, T., Birkemo, G. A., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., & Nes, I. F. (2003). Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1797–1799.
- Mar, M. J., Andersen, J. M., Kandasamy, V., Liu, J., Solem, C., & Jensen, P. R. (2020). Synergy at work: linking the metabolism of two lactic acid bacteria to achieve superior production of 2-butanol. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 1–10.
- McDonald, P. (1981). *The Biochemistry of Silage*. (Ed) John Wiley & Sons. New York, United States.
- McEniry, J., O’Kiely, P., Clipson, N. J. W., Forristal, P. D., & Doyle, E. M. (2010). Assessing the

- impact of various ensilage factors on the fermentation of grass silage using conventional culture and bacterial community analysis techniques. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), 1584–1593.
- Midwinter, R. G., & Pritchard, G. G. (1994). Aminopeptidase N from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* NCDO 573: purification and properties. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(3), 288–295.
- Mo, M., & Saue, O. (1988). Recent developments in feed conservation. *Proceedings of the 12th General Meeting of the European Grassland Federation, Dublin-Ireland*, 126–143.
- Moreno, B. A. C. (2020). *Cultivo de Hongos comestibles Pleurotus djamor y Pleurotus ostreatus sobre sustrato de bagazo de Agave tequilana*.
- Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., & Kung Jr, L. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3980–4000.
- Nguyen, H. D., Nguyen, Q. A., Ferreira, R. C., Ferreira, L. C. S., Tran, L. T., & Schumann, W. (2005). Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. *Plasmid*, 54(3), 241–248.
- Niderkorn, V., & Jayanegara, A. (2021). Opportunities offered by plant bioactive compounds to improve silage quality, animal health and product quality for sustainable ruminant production: A review. *Agronomy*, 11(1), 86.
- Nizami, A.-S., & Murphy, J. D. (2011). Optimizing the operation of a two-phase anaerobic digestion system digesting grass silage. *Environmental Science & Technology*, 45(17), 7561–7569.
- Nordberg, Å., Jarvis, Å., Stenberg, B., Mathisen, B., & Svensson, B. H. (2007). Anaerobic digestion of alfalfa silage with recirculation of process liquid. *Bioresource Technology*, 98(1), 104–111.
- Pérez-Zavala, M. de L., Hernández-Arzaba, J. C., Bideshi, D. K., & Barboza-Corona, J. E. (2020). Agave: a natural renewable resource with multiple applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(15), 5324–5333.
- Pérez, G. P., Sereno, Y. L. S., & Izquierdo, Y. B. (2021). Una segunda vida para los residuos de la industria mezcalera. *Inventio, La Génesis de La Cultura Universitaria En Morelos*, 17(43), 8.
- Prax, M., Lee, C. Y., & Bertram, R. (2013). An update on the molecular genetics toolbox for staphylococci. *Microbiology*, 159(Pt 3), 421.
- Prieto, M., Mouwen, J. M., López Puente, S., & Cerdeño Sánchez, A. (2008). Concepto de calidad en la industria Agroalimentaria. *Interciencia*, 33(4), 258–264.
- Queiroz, O. C. M., Arriola, K. G., Daniel, J. L. P., & Adesogan, A. T. (2013). Effects of 8 chemical and bacterial additives on the quality of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 96(9), 5836–5843.
- Ramírez-Manzano, S. I., Bye, R., García-Moya, E., & Romero-Manzanares, A. (2020). Aprovechamiento del maguey pulquero en Nanacamilpa, Tlaxcala, México. *Etnobiología*, 18(1).

- Requena, T. (2018). *Bacterias lácticas en la alimentación y en la salud*.
- Reyes-Castro, S., Valencia-Posadas, M., Gutiérrez-Arenas, D. A., De la Luz Ruiz, G. M., Gutiérrez-Chávez, A. J., Isidró-Pérez, M. F., & Núñez-Palenius, H. G. (2022). Uso del ensilado de Agave tequilana weber cv. azul en la alimentación de ovinos en crecimiento. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 5(2), 2137–2148.
- Rodríguez-Beltrán, J., DelaFuente, J., Leon-Sampedro, R., MacLean, R. C., & San Millan, A. (2021). Beyond horizontal gene transfer: the role of plasmids in bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 19(6), 347–359.
- Rud, I., Jensen, P. R., Naterstad, K., & Axelsson, L. (2006). A synthetic promoter library for constitutive gene expression in *Lactobacillus plantarum*. *Microbiology*, 152(4), 1011–1019.
- Rul, F., & Monnet, V. (2015). How microbes communicate in food: a review of signaling molecules and their impact on food quality. *Current Opinion in Food Science*, 2, 100–105.
- Settachaimongkon, S., Nout, M. J. R., Fernandes, E. C. A., Hettinga, K. A., Vervoort, J. M., van Hooijdonk, T. C. M., Zwietering, M. H., Smid, E. J., & van Valenberg, H. J. F. (2014). Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 29–36.
- Sheppard, S. K., Guttman, D. S., & Fitzgerald, J. R. (2018). Population genomics of bacterial host adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 19(9), 549–565.
- Smith, N. W., Shorten, P. R., Altermann, E., Roy, N. C., & McNabb, W. C. (2019). The classification and evolution of bacterial cross-feeding. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 153.
- Soto-Alarcón, J. M., González-Gómez, D. X., Olivares, L. G. G., & Ovando, A. C. (2022). Hacer comunes con el maguey pulquero en Hidalgo. *Hatso-Hnini. Revista de Investigación de Paisajes y Espacio Construido*, 1(2), 1–18.
- Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2013). Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiology*, 35(2), 92–98.
- Sun, X., Xu, Z., Xie, J., Hesselberg-Thomsen, V., Tan, T., Zheng, D., Strube, M. L., Dragoš, A., Shen, Q., & Zhang, R. (2022). *Bacillus velezensis* stimulates resident rhizosphere *Pseudomonas stutzeri* for plant health through metabolic interactions. *The ISME Journal*, 16(3), 774–787.
- Triana, E., Leal, F., Campo, Y., & Lizcano, H. (2014). Evaluación de ensilaje a partir de dos subproductos agroindustriales (cáscara de naranja y plátano de rechazo) para alimentación de ganado bovino. *Alimentos Hoy*, 22(31), 33–45.
- Vaca-Navarro, D., Gutiérrez-Vaca, C., Rucoba-García, A., Hernández-Ruíz, J., Hernández-Ruíz, J., & Villafaña-Aguilera, A. (2019). Estudio de viabilidad económica y comercial para el prototipo de una cosechadora troceadora de agave. *Revista Tecnología En Marcha*, g-12.
- Villa, A. F., Meléndez, A. P., Carulla, J. E., Pabón, M. L., & Cárdenas, E. A. (2010). Study of microbiological and nutritional quality of corn silage in two Colombian ecosystems. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23(1), 65–77.

- Wang, E.-X., Ding, M.-Z., Ma, Q., Dong, X.-T., & Yuan, Y.-J. (2016). Reorganization of a synthetic microbial consortium for one-step vitamin C fermentation. *Microbial Cell Factories*, *15*(1), 1–11.
- Weinberg, Z. G., Ashbell, G., & Azrieli, A. (1988). The effect of applying lactic bacteria at ensilage on the chemical and microbiological composition of vetch, wheat and alfalfa silages. *Journal of Applied Bacteriology*, *64*(1), 1–7.
- Wilke, A., Bischof, J., Gerlach, W., Glass, E., Harrison, T., Keegan, K. P., Paczian, T., Trimble, W. L., Bagchi, S., & Grama, A. (2016). The MG-RAST metagenomics database and portal in 2015. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D590–D594.
- Yang, J., Cao, Y., Cai, Y., & Terada, F. (2010). Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *Journal of Dairy Science*, *93*(7), 3136–3145.
- Zamudio, D. M., Pinos-Rodríguez, J. M., González, S. S., Robinson, P. H., García, J. C., & Montañez, O. (2009). Effects of Agave salmiana Otto Ex Salm-Dyck silage as forage on ruminal fermentation and growth in goats. *Animal Feed Science and Technology*, *148*(1), 1–11.
- Zengler, K., & Palsson, B. O. (2012). A road map for the development of community systems (CoSy) biology. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(5), 366–372.
- Zhang, Q., Yu, Z., & Wang, X. (2015). Isolating and evaluating lactic acid bacteria strains with or without sucrose for effectiveness of silage fermentation. *Grassland Science*, *61*(3), 167–176.
- Zou, W., Liu, L., & Chen, J. (2013). Structure, mechanism and regulation of an artificial microbial ecosystem for vitamin C production. *Critical Reviews in Microbiology*, *39*(3), 247–255.