



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS  
ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL POZOL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTAN:**

**ADRIANA RODRÍGUEZ NAVARRO  
BIANII VILLALVA FUENTES**



**MÉXICO, D. F.,**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**Presidente**      Ma. del Carmen Wacher Rodarte  
**Vocal**            Aurora Ortega Ávila  
**Secretario**      Beatriz de Guadalupe Serrano López  
**1er. Suplente**   Ruth Edith Martín Fuentes  
**2° Suplente**      Gloria Díaz Ruíz

**Sitio en donde se desarrolló el tema:**

Lab. 324, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Facultad de Química.

*Ma. del Carmen Wacher*

\_\_\_\_\_  
**Asesor:** Ma. del Carmen Wacher Rodarte

*Gloria Díaz Ruíz*

\_\_\_\_\_  
**Asesor técnico:** Gloria Díaz Ruíz

**Sustentantes:**

*Adriana Rodríguez Navarro*

\_\_\_\_\_  
Adriana Rodríguez Navarro

*Bianii Villalva Fuentes*

\_\_\_\_\_  
Bianii Villalva Fuentes

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM quien nos abrió las puertas para realizar uno de nuestros más grandes sueños, por convertirse en nuestra segunda casa, en donde hemos compartido experiencias y crecido como seres humanos.

A la Dra. Carmen Wachter por permitirnos trabajar en este proyecto y por su total apoyo.

A la Dra. Gloria Díaz por ser nuestra asesora técnica, por sus valiosas recomendaciones y apoyo incondicional en la realización de la tesis.

A Tere Flores por su paciencia, consejos y apoyo incondicional durante todo el proyecto.

Al Dr. Carlos Eslava por sus enseñanzas sobre el tema de adherencia y su apoyo en la realización de la prueba.

A Dra. Teresita Sainz por su apoyo en la realización de la prueba de resistencia a antibióticos.

A todos nuestros compañeros del laboratorio 324, por esas largas pláticas que amenizaron nuestra estancia en el laboratorio.

A la empresa Yakult por el reconocimiento y apoyo a nuestro trabajo de investigación, otorgándonos el Premio Minoru Shirota 2009.

## DEDICATORIAS

- A Dios Por permitirme realizar una de las metas más importantes de mi vida.
- A mis Padres **Elena y Salvador**, a quienes debo todo lo que soy, gracias por el cariño, confianza y esfuerzo que han realizado para que haya llegado hasta aquí, en verdad no ha sido en vano, los quiero.
- A Alfredo En quien siempre he encontrado confianza, amor y apoyo incondicional, este trabajo es resultado del esfuerzo de los dos, gracias.
- A Bianii Con quien compartí en cada momento los aciertos y desaciertos de este trabajo, gracias por ser mi compañera y amiga. Suerte en todo lo que emprendas.
- A mis Hermanos **Rosa, Juan, Carlos, Cristina, Teresa, Alberto y Lucina**, por el apoyo que cada uno me ha brindado gracias.
- A mis Sobrinos Especialmente a Jacqueline por ser un gran apoyo, los quiero.
- A mis Amigos Gracias a todos por su apoyo, confianza y los momentos que compartimos juntos. Ange lo logre gracias por todo.

---

---

## ÍNDICE

### PÁGINAS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. POZOL.....	2
2.1.1. Elaboración y lugares de consumo.....	2
2.1.2. Beneficios que se le atribuyen.....	2
2.1.3. Microbiota encontrada.....	4
2.2. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	4
2.3. PROBIÓTICOS.....	10
2.3.1. Concepto.....	10
2.3.2. Características que deben poseer.....	11
2.3.3. Microorganismos considerados probióticos.....	12
2.3.4. Beneficios atribuidos.....	13
2.3.5. Métodos utilizados para definir el carácter probiótico.....	13
2.3.6. Productos en los que se encuentran.....	15
2.4. ALIMENTOS FUNCIONALES.....	15
3. OBJETIVO.....	19
4. HIPÓTESIS.....	19
5. METODOLOGÍA.....	20
• Cepas a evaluar.....	21
• Reactivación de cepas.....	21
• Pruebas de pureza.....	21
5.1 Tolerancia a la acidez.....	22
5.2 Tolerancia a sales biliares.....	23
5.3 Resistencia a 0.4% de fenol.....	23
5.4 Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> como agente antimicrobiano.....	24
5.5 Resistencia a antibióticos.....	24

---

5.6 Resistencia al paso sucesito a través del tracto intestinal.....	26
5.7 Determinar factores que afectan la resistencia al paso a través del tracto intestinal.....	27
5.8 Adherencia a células del epitelio.....	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
6.1 Tolerancia a la acidez.....	31
6.2 Tolerancia a sales biliares.....	34
6.3 Resistencia a 0.4% de fenol.....	36
6.4 Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> como agente antimicrobiano.....	38
6.5 Resistencia a antibióticos.....	42
6.6 Resistencia al paso sucesito a través del tracto intestinal.....	48
6.7 Determinar factores que afectan la resistencia al paso a través del tracto intestinal.....	52
6.8 Adherencia a células del epitelio.....	57
7. CONCLUSIONES.....	69
8. BIBLIOGRAFÍA.....	71
9. ANEXO.....	78

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son aquellos microorganismos vivos que, al ser agregados como suplemento en la dieta, afectan en forma benéfica al desarrollo de la microbiota en el intestino.

El pozol es una bebida fermentada tradicional, ácida, no alcohólica hecha a base de maíz, de origen maya. A esta bebida se le atribuyen ciertos beneficios como son el control de diarreas y disminución de fiebre, entre otros.

Se utilizaron 8 cepas de bacterias ácido-lácticas aisladas del pozol, con el fin de identificar su potencial probiótico. Para esto deben cumplir con ciertos requisitos como son: resistir el paso a través del tracto gastrointestinal, producir sustancias antimicrobianas como  $H_2O_2$ , no poseer resistencia a antibióticos y adherirse a las células del epitelio intestinal, entre otras características.

De las ocho cepas probadas se encontró que todas resisten un medio con fenol al 0.4%, la presencia de sales biliares y valores de pH bajos. De igual manera, todas producen  $H_2O_2$  como agente antimicrobiano y son susceptibles al menos a un antibiótico. Además se encontró que, en general las cepas resisten de manera adecuada a las condiciones simuladas del tracto intestinal, sin embargo, no se encontró el factor que determina su supervivencia. Finalmente, se evaluó la adherencia de las cepas a las células epiteliales, utilizando como modelo células Hep-2, obteniendo como resultado la adherencia de todas las cepas a dichas células.

De acuerdo con los resultados obtenidos se comprobó la hipótesis planteada, pues se demostró que existen bacterias potencialmente probióticas en el pozol.

---

---

## 1. ANTECEDENTES:

### 1.1 POZOL

#### 2.1.1 Definición

Es una bebida fermentada no alcohólica, ácida y refrescante, preparada en nuestro país desde antes de la conquista, en algunos grupos étnicos es considerado como alimento básico (Cañas *et al.*, 1993; Wacher, 1993).

#### 2.1.2 Elaboración y lugares de consumo

Se elabora a partir de maíz nixtamalizado y es consumida en el sur de nuestro país (Cañas *et al.*, 1993), la figura 2.1.2.1 muestra los estados productores de esta bebida.



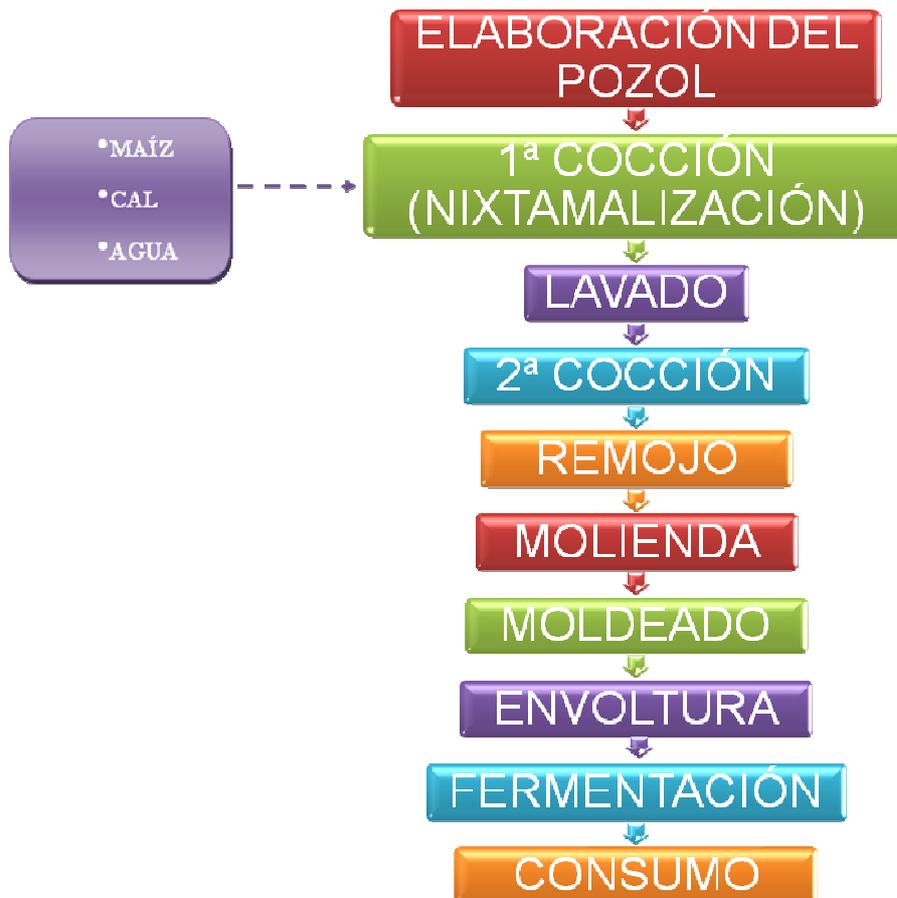
Figura 2.1.2.1 Zona de producción del pozol en la República Mexicana.

El pozol tiene origen prehispánico pero también es consumido por los mestizos, quienes a través de los años han realizado modificaciones en su elaboración. Por

ejemplo, en los Altos de Chiapas, la modificación consiste en la adición de una segunda cocción al maíz ya nixtamalizado (Wacher *et al.*, 2000).

Su preparación es relativamente fácil, y en general se ejemplifica en la figura 2.

1.2.2:



**Figura 2.1.2.2** Diagrama de elaboración del pozol (Cañas *et al.*, 1993).

Además la bebida puede ser adicionada de sal, azúcar, miel y chiles, modificaciones que se realizan principalmente en el pozol mestizo. Para asegurar la calidad del mismo, existe una opinión unificada entre productores y consumidores tanto indígenas como mestizos, de que el pozol descompuesto es aquel que “hace hilos” y consideran que esto puede deberse a un agriado “no natural”. Esto podría deberse al desarrollo de bacterias productoras de polímeros,

entre las cuales se encuentran algunas bacterias lácticas de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* y otras del género *Bacillus* (Cañas *et al.*, 1993).

### **2.1.3 Beneficios que se le atribuyen**

El pozol es utilizado no solo como bebida refrescante, sino que además se le atribuyen diversos beneficios. Por ejemplo, algunas personas llevan bolas de pozol como provisión para largos viajes o bien es utilizado con fines medicinales: se usa para controlar diarreas, adicionado con miel de abeja se usa para reducir la fiebre. Los mayas preparaban cataplasmas de pozol enmohecido para curar infecciones superficiales, de igual manera lo utilizaban como ofrenda en ceremonias relacionadas con el cultivo y la cosecha del maíz (Wacher, 1993).

### **2.1.4 Microbiota encontrada**

Los estudios previos han demostrado que cuenta con una microbiota compleja, la cual incluye hongos, levaduras y bacterias de diferentes tipos (Wacher *et al.*, 2000), encontrando principalmente bacterias ácido lácticas (BAL) (Escalante *et al.*, 2001) que son las primeras en actuar, y que son responsables por lo tanto de la acidez y el sabor característico del pozol. También se ha encontrado la presencia de *Escherichia coli*, bacteria patógena resistente a la acidez (Sainz *et al.*, 2001), además de diferentes especies del género *Bacillus*, tales como *B. lentus*, *B. circulans*, *B. cereus* y *B. mycoides*, los cuales se cree que actúan ayudando a romper el almidón presente en el maíz debido a su capacidad amilolítica (Rivera, 2001).

Se identificaron primero BAL mediante técnicas tradicionales de microbiología y se encontraron bacterias de los géneros *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Lactococcus* sp. Cuando se usaron métodos de ecología molecular (bibliotecas de clonas; Escalante *et al.* 2001; DGGE, Ampe *et al.* 1999), se detectaron bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* sp. y *Weissella* sp., que predominan durante la fermentación.

Ben Omar y Ampe (2000) en su estudio de la ecología de alimentos fermentados, encontraron la presencia de los siguientes microorganismos:

- *Acetobacter aceti*
- *Bifidobacterium minimum*
- *Lactococcus lactis*
- *Lactobacillus plantarum*
- *Lactobacillus casei*
- *Lactobacillus alimentarium*
- *Lactobacillus delbruekii*
- *Lactobacillus fermentum*
- *Lactobacillus reuteri*
- *Leuconostoc mesenteroides*
- *Streptococcus suis*
- *Weissella confusa*
- *Weissella paramesenteroides*

## **1.2 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)**

Las bacterias ácido lácticas constituyen un amplio conjunto de microorganismos capaces de producir ácido láctico como producto final del proceso de fermentación de la glucosa. Estas bacterias tienen como principales características (Carr *et al.*, 2002):

- Gram positivas
- No esporuladas

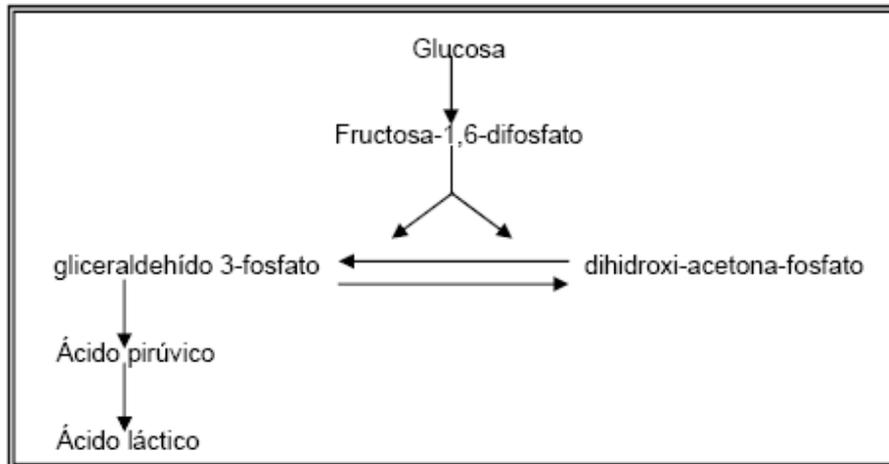
- Morfología de cocos o de bacilos
- Aerobios facultativos o anaerobios
- Catalasa, Oxidasa y Bencidina negativo, dada la ausencia de citocromos y porfirinas
- No reducen nitratos a nitritos
- No utilizan como sustrato el lactato
- Formación de isómeros D, L y DL del ácido láctico.

Las BAL se asocian generalmente a hábitats ricos en nutrientes, como productos alimenticios (leche, carne, vegetales, bebidas), pero algunas también son parte de la microbiota normal de la boca, del intestino y de la vagina de mamíferos.

La clasificación en diversos géneros de las bacterias ácido lácticas, se basa en gran medida en: la morfología, en el tipo de fermentación de la glucosa, el crecimiento a diversas temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la capacidad de crecer a altas concentraciones de sal y la tolerancia a la acidez o alcalinidad (Salminen *et al.*, 1998).

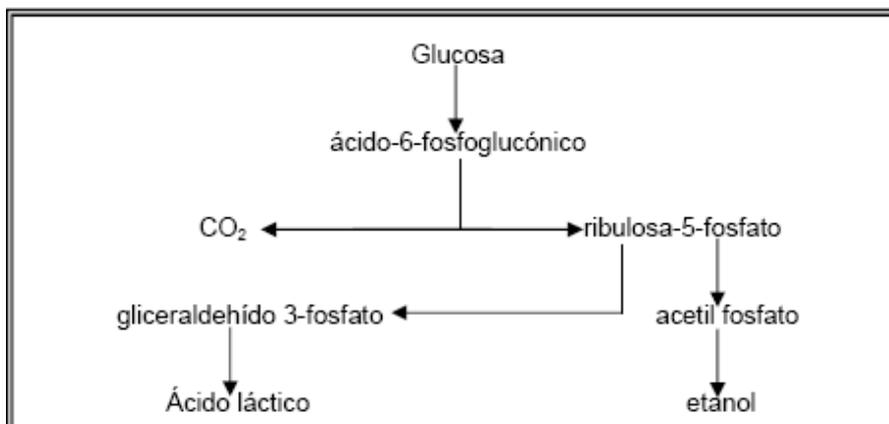
Orla-Jensen en 1919, clasificó a las bacterias ácido lácticas en dos grupos según el tipo de fermentación de glucosa: homofermentadoras y heterofermentadoras, dependiendo del producto final de la fermentación.

Las BAL homofermentadoras obtienen como producto principal el ácido láctico a partir de la fermentación de la glucosa. Dichos microorganismos tienen la enzima aldolasa que permite la obtención directa del ácido láctico (Figura 2.2.1).



**Figura 2.2. 1** Fermentación láctica homofermentativa (Cabeza, 2005).

Por otro lado, las BAL heterofermentadoras no solo producen ácido láctico, sino también dióxido de carbono, etanol y ácido acético. Estas bacterias no poseen la enzima aldolasa, por lo que convierten a la molécula de glucosa (6 carbonos) en una pentosa (5 carbonos) (Figura 2.2.2).



**Figura 2.2.2** Fermentación láctica heterofermentativa (Cabeza, 2005)

Dentro del grupo de las BAL homofermentativas encontramos algunas especies de *Streptococcus* y *Pediococcus*, y de las heterofermentativas algunas especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (Carr et al, 2002).

Las bacterias ácido lácticas de importancia en alimentos pertenecen a los géneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Carr *et al.*, 2002).

En la tabla 2.2.1 se muestran las principales características de las bacterias ácido lácticas:

Tabla 2.2.1 Características diferenciales de Bacterias Ácido Lácticas (Carr et al., 2002)

CARACTERÍSTICAS	BACILOS		COCOS						
	<i>Carnob.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lactoc. Vagoc.</i>	<i>Leucon. Oenoc.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tretragenoc.</i>	<i>Weissella</i>
Fermentación	Homo	Homo	Homo	Homo	Hetero	Homo	Homo	Homo	Hetero
Crecimiento a 10°C	+	±	+	+	+	±	-	+	+
Crecimiento a 45°C	-	±	+	-	-	±	±	-	-
Crecimiento a 6.5% NaCl	ND <sup>a</sup>	±	+	-	±	±	-	+	±
Crecimiento a 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Crecimiento a pH 4.4	ND	±	+	±	±	+	-	-	±
Crecimiento a pH 9.6	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Ácido láctico <sup>b</sup>	L	D, L, DL <sup>c</sup>	L	L	D	L, DL <sup>c</sup>	L	L	D, DL <sup>c</sup>
Formación tétradas	-	-	-	-	-	+	-	+	-

+ = positiva; - = negativa; ± = varía entre especies.

<sup>a</sup> = No determinado

<sup>b</sup> = Configuración del ácido láctico producido por glucosa

<sup>c</sup> = Producción de D, L, DL ácido láctico varía entre especie

El principal uso de las bacterias ácido lácticas, es como “cultivo iniciador” en la elaboración de productos lácteos y productos lácteos fermentados, tales como: leche ácida, quesos, yogurt, kefir, etc.

Las bacterias ácido lácticas son de gran importancia comercial, pues son utilizadas en el procesado de carnes (salchichas), bebidas fermentadas, bebidas alcohólicas (vinos y cerveza), salmueras, vegetales, etc. (Carr *et al*, 2002).

Las BAL son usadas como probióticos ya que son microorganismos viables que confieren un beneficio a la salud del hospedero cuando se ingieren (Mattila-Sandholm *et al.*, 1999).

## 1.3 PROBIÓTICOS

### 1.3.1 Concepto

Un probiótico es un suplemento de origen microbiano que afecta benéficamente la fisiología del huésped, modulando la inmunidad de la mucosa y sistémica, mejorando además el balance nutricional y microbiano en el tracto gastrointestinal (Iñiguez *et al.*, 2006). En general es definido como “un complemento alimenticio que a base de microorganismos vivos y vitales produce efectos benéficos en el intestino animal, mejorando el equilibrio microbiano intestinal” (Iñiguez *et al.*, 2006).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la FAO la definición de probiótico dice que **“son microorganismos vivos que al ser suministrados en cantidades adecuadas promueven beneficios a la salud del organismo huésped” (AAM, 2005).**

### 2.3.2 Características que deben poseer

En la figura 2.3.2.1 se muestran las características que deben ser consideradas para seleccionar los microorganismos que pudieran poseer propiedades probióticas y con esto garantizar de alguna manera aspectos como la seguridad y funcionalidad del mismo:



**Fig. 2.3.2.1** Propiedades deseables en una bacteria probiótica (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2002)

### 2.3.3 Microorganismos considerados probióticos

Por su parte algunos de los microorganismos considerados con características probióticas se encuentran en la tabla 2.3.3.1

**Tabla 2.3.3.1** Bacterias Ácido Lácticas más comunes en probióticos (Mejía *et al.*, 2007)

MICROORGANISMO	TIPO	FUENTE
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAL	Productos fermentados, microbiota natural de la vagina, saliva humana
<i>Lactobacillus plantarum</i>	BAL	Productos fermentados de yuca, saliva humana
<i>Lactobacillus fermentum</i>	BAL	Productos amiláceos fermentados
<i>Lactobacillus casei</i>	BAL	Leche y productos lácteos tradicionales
<i>Lactobacillus reuteri</i>	BAL	Intestino humano
<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium breve</i>	BAL	Heces de Lactantes
<i>Bifidobacterium animalis</i>	BAL	Azúcares fermentados
<i>Streptococcus faecium</i>		Queso panela
<i>Streptococcus salivarius</i>		Saliva humana

Prado *et al.* (2007) menciona que los microorganismos probiótico no son exclusivamente cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, sino que también se encuentran especies como: *Bacillus cereus*, *Clostridium botyricum*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus acidilactic* y *Saccharomyces boulardii*, entre otros.

### 2.3.4 Beneficios atribuidos

Los efectos y beneficios atribuidos a los microorganismos potencialmente probióticos son numerosos, algunos de los cuales se presentan en la tabla 2.3.4.1:

**Tabla 2.3.4.1** Beneficios atribuidos a los microorganismos potencialmente probióticos (Salminen *et al.*, 1998; Mattila *et al.*, 1999).

BENEFICIOS ATRIBUIDOS	OBSERVACIONES
Prevención y tratamiento de infecciones	Comprobado
Disminución de los niveles de colesterol	En estudio
Disminución de diarreas, ya sea por virus, bacterias o parásitos	Comprobado
Tratamiento de la intolerancia a la lactosa, actúa en su digestión	Comprobado
Estimulación del sistema inmune	En estudio
Exclusión o reducción de la adherencia patógena	Comprobado
Integración a la microbiota intestinal	Comprobado
Poseen efectos antimicrobianos	Comprobado
Poseen la habilidad de adherirse a las células del epitelio	Comprobado

Con esto se puede constatar la importancia que tiene el consumo de este tipo de microorganismos, siendo los alimentos un vehículo muy utilizado para su administración.

### 2.3.5 Métodos utilizados para definir el carácter probiótico

Además de conocer los microorganismos probióticos y los beneficios que se les atribuyen, también es importante considerar los métodos utilizados para su identificación, ya que estos deben cumplir con características particulares, como se ha venido mencionando a lo largo del presente trabajo. Estos métodos de igual manera son muchos y diferentes, por ejemplo es importante y básico que los microorganismos trabajados sean **tolerantes** a valores de **pH bajos** y a las **sales biliares** (Mejía *et al.*, 2007), pues la primera barrera que deben librar, es el paso a través de la boca, el estómago y los intestinos. Otra prueba que se debe realizar

es la **adherencia al epitelio intestinal** (Salminen *et al.*, 1998; Nousiainen *et al.*, 1998), esto con el fin de saber si estas cepas pueden ser capaces de colonizarlo y de esta manera actuar como parte de la microbiota propia del organismo huésped (organismo humano).

**Tabla 2.3.5.1** Pruebas adicionales para definir características probióticas

PRUEBA	CARACTERÍSTICAS
Efecto antimicrobiano (Nousiainen <i>et al.</i> , 1998)	<b>Para impedir la implantación y propagación de microorganismos patógenos y evitar infecciones</b>
Resistencia a antibióticos (Mattila <i>et al.</i> , 1999)	<b>Se pretende que los microorganismos probióticos no sean resistentes para evitar que de alguna manera transmitan esta resistencia a patógenos, si fuera el caso.</b>
Capacidad de coagulación de la leche (Mejía <i>et al.</i> , 2007)	<b>Importante si se pretende emplear en la elaboración de leches fermentadas.</b>
Reducción del colesterol (Vijendra <i>et al.</i> , 2005)	<b>Como ayuda a personas con colesterol alto, o bien evitar el aumento en su organismo</b>
Crecimiento en condiciones anaeróbicas (Gómez <i>et al.</i> , 1998)	<b>Debido a que algunos lactobacilos requieren una baja tensión de oxígeno y otros como las bifidobacterias son anaerobias.</b>
Acidez titulable (Mejía <i>et al.</i> , 2007)	<b>Deben producir gran cantidad de ácido para impedir el desarrollo de bacterias que provoquen enfermedades.</b>
Resistencia al fenol (Vizoso <i>et al.</i> , 2006)	<b>La presencia de este compuesto dentro del tracto intestinal puede tener un efecto bacteriostático contra los lactobacilos y otros microorganismos.</b>
Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Pascual <i>et al.</i> , 2005; Felten <i>et al.</i> , 1998)	<b>Sustancia producida por lactobacilos y otros microorganismos que tiene alta capacidad antimicrobiana.</b>

La mayoría de los microorganismos probióticos actuales han sido aislados de productos lácteos y se aplican en el mismo tipo de producto. Algunos investigadores han estudiado las bacterias ácido lácticas potencialmente probióticas **utilizando sustratos a base de cereales (cebada, malta y trigo)** (Charalampopoulos *et al.*, 2001); sin embargo, existe una gran variedad de productos fermentados a base de cereales cuya microbiota no ha sido estudiada con este objetivo y podría poseer características interesantes.

### **2.3.6 Productos en los que se encuentran**

Los microorganismos probióticos se pueden encontrar generalmente en productos fermentados. Se cuenta con estudios que indican que algunos de estos microorganismos se han aislados de productos fermentados de distintos orígenes, como la leche, productos lácteos, yogurt de soya, etc. También existen reportes de microorganismos encontrados en la producción de brandy en el sur de África (Du Plessis *et al.*, 2004), yuca fermentada, producto ampliamente consumido en países en vías de desarrollo (Kostinek *et al.*, 2007), leches fermentadas africanas Kwerionik y Kule naoto (Vizoso *et al.*, 2006) y bebidas bien conocidas como el Yakult, LC1 (Nestlé) y Actimel (Danone). Se han aislado incluso microorganismos probióticos de heces humanas (Vizoso *et al.*, 2006), heces de niños (Mejía *et al.*, 2007), queso Cheddar, queso Feta e inclusive en la leche bronca de vaca.

## **1.4 ALIMENTOS FUNCIONALES**

Los alimentos funcionales son aquellos que aportan al organismo componentes que ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de contraer enfermedades (Prado *et al.*, 2007).

El término alimento funcional, fue desarrollado durante la década de los 80's en Japón y en 1991 se publicó la reglamentación para los "Alimentos para uso específico de salud" (Foods for Specified Health Use" o FOSHU) que se refiere a aquellos alimentos procesados que contienen ingredientes que desempeñan una función específica en las funciones fisiológicas del organismo humano.

En los países occidentales, la aparición de este tipo de alimentos se remonta a las primeras prácticas de fortificación con vitaminas y minerales, así como también a

la práctica de incluir ciertos componentes en los alimentos procesados con el objeto de complementar alguna deficiencia de la población (Alvídrez *et al.*, 2002).

Entre algunos ejemplos de alimentos funcionales, destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra dietética, los alimentos a los que se ha añadido sustancias biológicamente activas, como son las fotoquímicas u otras con carácter de antioxidante; así como los probióticos, que tienen cultivos vivos de microorganismos benéficos.

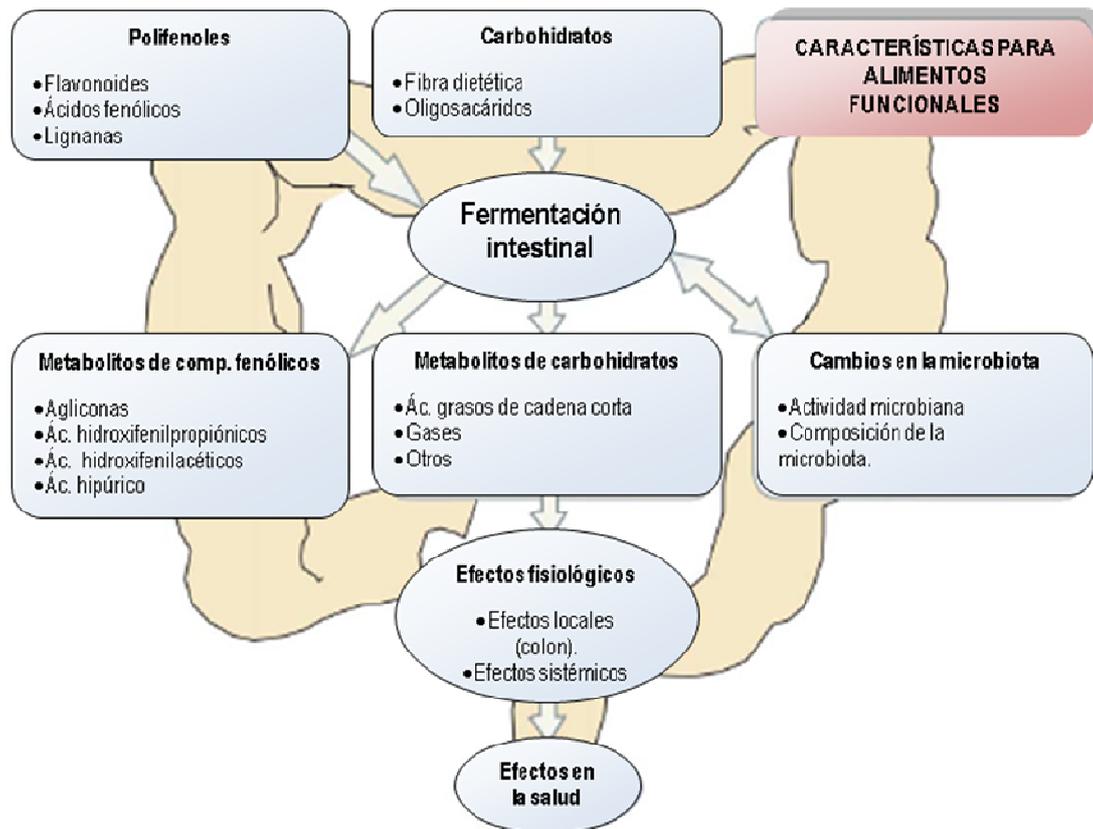
**Tabla 2.4.1** Ejemplos de Alimentos Funcionales (Alvídrez *et al.*, 2002).

<b>ALIMENTO FUNCIONAL</b>	<b>COMPONENTE ACTIVO</b>	<b>PROPIEDAD FUNCIONAL</b>
Yogurt	Probiótico	Mejora el funcionamiento intestinal
Margarinas	Esteres de esteroides de origen vegetal	Reducen niveles de colesterol LDL. Disminuyen el riesgo de padecer afecciones cardíacas
Huevos ricos en ácidos grasos esenciales Omega-3	Ácidos grasos Omega-3	Control de hipertensión, metabolismo de lípidos
Zanahoria	$\beta$ -Caroteno	Neutraliza los radicales libres que pueden dañar las células

En la actualidad, el desarrollo de nuevos productos para la industria alimenticia está enfocado a crear alimentos funcionales que confieran al consumidor una propiedad extra que beneficie su salud. Entre ellas están el buen funcionamiento del intestino, protección contra algunas enfermedades, etc.

En el intestino humano se llevan a cabo numerosas reacciones con el alimento, ya sea directamente con las células intestinales o con la microbiota presente tales el caso de los carbohidratos y polifenoles que sufren una fermentación dentro del intestino liberando metabolitos como agliconas de compuestos fenólicos y ácidos grasos de cadena corta a partir de algunos carbohidratos complejos. Además, constantemente se lleva a cabo un cambio en la microbiota presente y su

actividad, lo que deriva en efectos fisiológicos que finalmente ejercen un efecto sobre la salud del hospedero (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2002) como se esquematiza en la fig. 2.4.1



**Figura 2.4.1** Reacción de varios ingredientes alimenticios con la microbiota del colon con respecto a sus efectos sobre la salud (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2002).

Los probióticos presentan entre otras funciones, aquellas que se encuentran enfocadas a la salud del intestino; pues tienen efectos antagonistas, de competencia e incluso actúan sobre el sistema inmunológico por lo que en las últimas dos décadas se han incluido en fórmulas de yogurt y alimentos lácteos (Matilla-Sandholm *et al.*, 1999).

Con respecto al pozol, el conocer si las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes tienen características probióticas, se añadiría a los beneficios que se le atribuyen a la bebida y sería una razón adicional para comercializarla como una bebida tradicional y funcional de México. En la región donde se consume regularmente el pozol que es el sureste de México, los problemas de desnutrición y de diarreas infantiles son más graves que en otras regiones del país (Encuesta Nacional de Nutrición, 1999). Por lo que, el consumo de una bebida con estas características, pero producida en condiciones controladas, podría contribuir a disminuir los problemas mencionados.

Asimismo, el contar con esta información acerca de las bacterias probióticas del pozol en un futuro, podría permitir usarlas en la elaboración de nuevos productos funcionales.

---

### **3. OBJETIVO**

- Determinar el potencial probiótico de las bacterias ácido lácticas aisladas del pozol.

### **4. HIPÓTESIS**

Si las bacterias lácticas de alimentos fermentados poseen características de probióticos, entonces dentro de las bacterias lácticas aisladas del pozol se encontrarán algunas con estas características.

---

## 5. METODOLOGÍA

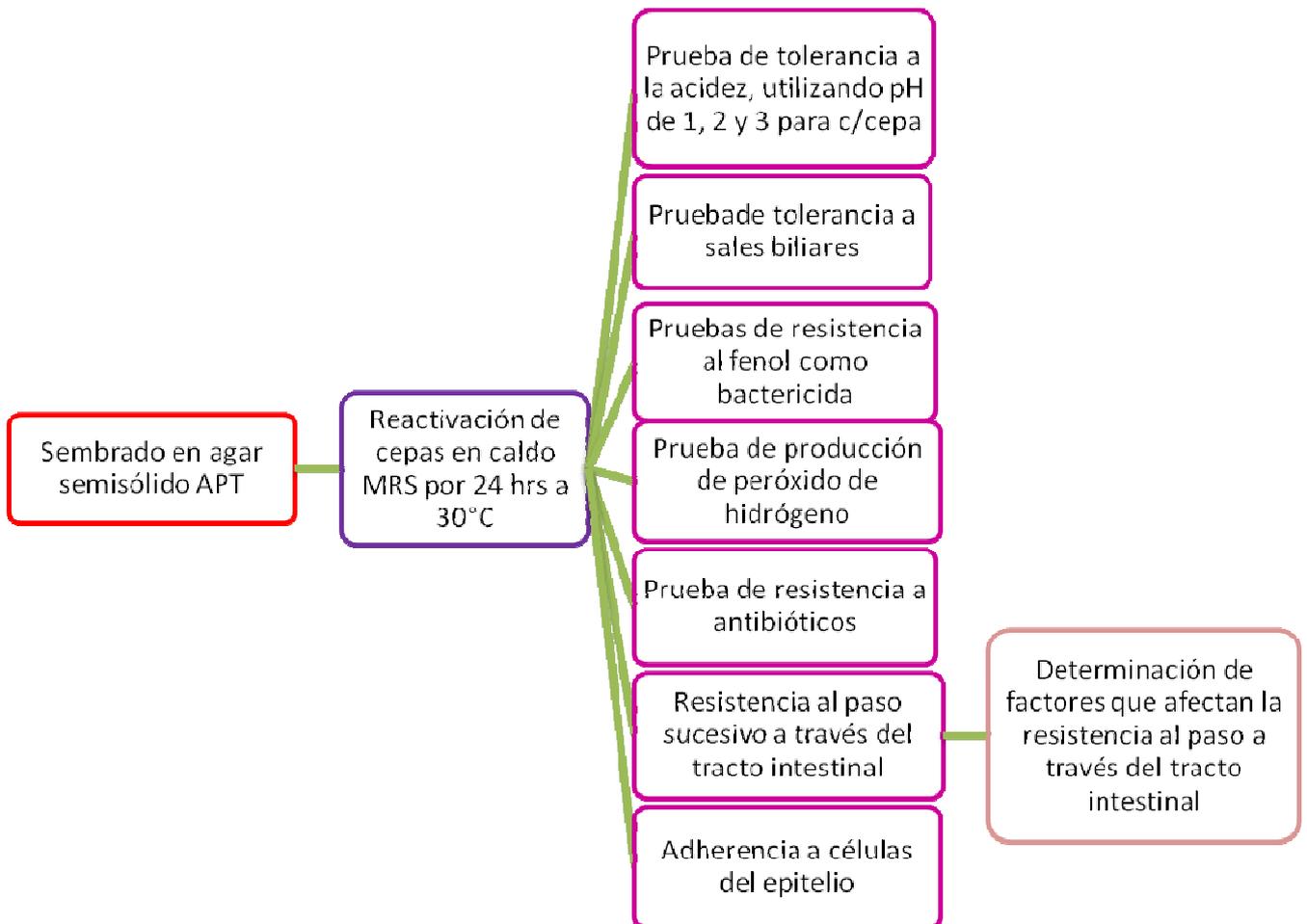


Fig. 5.1 Metodología para determinar el potencial probiótico de cepas de BAL aisladas del pozol.

- **Cepas a evaluar**

Las cepas con las que se trabajó fueron aisladas de pozol de Villahermosa, Tabasco. Las cepas se encuentran conservadas en glicerol al 20% y a temperatura de -70°C, el cual es un método de conservación a largo plazo.

Para su conservación a corto plazo, se utilizó medio APT semisólido, con el fin de evitar posibles contaminaciones de las cepas puras, siendo remplazado cada mes.

- **Reactivación de cepas**

Se tomaron 100 µl de cultivo conservado en glicerol, posteriormente se sembró en caldo MRS, incubando a 30°C por 24 horas.

- **Pruebas de pureza**

En primer lugar se realizó una tinción de Gram, identificando la correcta morfología de cada una de las cepas a utilizar, y posteriormente se sembraron en placas con agar MRS para observar la morfología colonial.

Tabla 5.1. Características de cada ensayo que se va a realizar

PRUEBA	CARACTERÍSTICA
<b>Tolerancia a la acidez</b> (Vijendra <i>et al.</i> , 2005)	Se realiza con el fin de conocer las cepas que pueden sobrevivir a los pH bajos que tiene el tracto gastrointestinal.
<b>Tolerancia a sales biliares</b> (Vizoso <i>et al.</i> , 2006)	Determina si las cepas utilizadas pueden sobrevivir en presencia de sales biliares, las cuales entran en contacto con el alimento para intervenir en el proceso de digestión (intestino).
<b>Resistencia al fenol</b> (Vizoso <i>et al.</i> , 2006)	En el organismo pueden producirse fenoles porque algunos aminoácidos aromáticos derivados de la dieta pueden ser desaminados por bacterias en el intestino, y estos pueden ejercer una acción bacteriostática contra los lactobacilos.
<b>Producción de peróxido de hidrógeno</b> (Whittenbury, 1963)	Algunos microorganismos tienden a producir H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> como agente antimicrobiano, por lo que se identificará si estas cepas lo producen como defensa en contra de microorganismos ajenos a ellos, incluidos los patógenos.
<b>Resistencia a antibióticos</b> (NCCLS, 1984)	Los microorganismos que son considerados probióticos no deben contar con resistencia a antibióticos, con el fin de evitar que transmitan dicha característica por medio de plásmidos.
<b>Resistencia al paso a través del tracto intestinal</b> (Vizoso <i>et al.</i> , 2006)	Se determina de manera <i>in vitro</i> que las cepas en estudio sean viables durante su paso por el tracto gastrointestinal, de tal manera que al simular características de los diferentes segmentos del aparato digestivo como son enzimas, pH y tiempos; éstas puedan sobrevivir adecuadamente.
<b>Adhesión a células epiteliales</b> (Sainz <i>et al.</i> , 2001; Mendoza, 2006)	Esta es una de las pruebas más importantes para considerar a un microorganismo como probiótico, ya que una vez al llegar a su destino deben ser capaces de pegarse a las células de la mucosa intestinal y evitar ser eliminadas por las secreciones y los movimientos peristálticos.

### 5.1 Tolerancia a la acidez

Las cepas se estudiaron a diferentes valores de pH, utilizando como control agua destilada, siguiendo la metodología de Vijendra *et al.* (2005). Se utilizaron 100 ml de agua destilada para preparar cada solución a pH 1, 2 y 3, que se ajustó con HCl. Se colocaron 10 ml de esta agua ajustada al pH indicado, en tubos de ensaye con rosca, se esterilizaron a 121°C por 15 min y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta ser utilizados. Posteriormente se adicionó una asada de las

bacterias (cultivo de 48 hrs en caldo MRS) y se agitó. Se toma 1 mL de las soluciones al tiempo 0 h, 1h, 2h y 3h y se realizó una dilución decimal utilizando solución salina estéril al 0.85 %. Por último se sembró 100 µl de cultivo por extensión en placas de agar MRS (Difco) y se incubó a 30°C por 72 h en condiciones aerobias. El crecimiento de colonias en este medio, indica la resistencia de los microorganismos a la acidez.

### **5.2 Tolerancia a sales biliares**

Se tomaron 100 µL del cultivo de 24 hrs de bacterias en caldo MRS (Difco) y se sembró por extensión en placa en medio MRS con 0.5% de ácido taurodesoxicólico (Sigma) y 0.37mg/mL de cloruro de calcio. Se incubaron a 30°C por 24h. Las cepas que crecen en este medio son consideradas como resistentes a las sales biliares (Vizoso *et al.*, 2006).

### **5.3 Resistencia al fenol**

Se inocularon 100 µL de un cultivo de 24 hrs de las bacterias lácticas en caldo MRS (Difco) con 0.4% de fenol (J. K. Baker). Se realizaron dos diluciones decimales en agua peptonada al 0.01%, se sembró en placas de agar MRS (Difco) y se incubó por 24 hrs a 30°C. Se realizó la cuenta en placa al momento de la inoculación ( $t_0$ ) y después de 24 hrs ( $t_{24}$ ). Se evaluó la inhibición mediante la comparación de la concentración de microorganismos presentes al iniciar y al terminar la prueba. Para obtener el valor de inhibición se utilizó la siguiente fórmula (Vizoso *et al.*, 2006):

$$\text{Inhibición} = \log \text{UFC/mL al } t_0 - \log \text{UFC/mL al } t_{24}$$

---

---

#### **5.4 Producción de Peróxido de Hidrógeno como compuesto antimicrobiano**

Se prepararon placas de Agar dióxido de manganeso siguiendo la metodología reportada por Whittenbury (1963). Se preparó un medio basal de agar glucosa (Anexo 1) y fue vertido en cajas petri desechables, al solidificarse el agar glucosa se vertió sobre él una capa muy delgada de agar glucosa con 0.4% de dióxido de manganeso (J. K. Baker). Se inocularon las placas por estría a partir de un cultivo de 24 h de las cepas de bacterias lácticas y se incubaron a 30°C por 72h.

La formación de peróxido de hidrógeno se observa por la aclaración del dióxido de manganeso alrededor y por debajo del crecimiento debido a la reacción de oxido-reducción generada por el peróxido de hidrógeno producido por las bacterias inoculadas.

#### **5.5 Resistencia a antibióticos**

Siguiendo el procedimiento reportado en el protocolo 23 de NCCLS (1984), con un asa metálica se tocó la superficie de 4 o 5 colonias bien aisladas de aspecto similar en un cultivo en placa de la cepa en cuestión y se transfirió a un tubo de ensaye que contenía de 4 a 5 mL de caldo MRS (Difco). Se incubaron a 30°C entre 18 y 24 horas, hasta alcanzar la turbidez del estándar (Tubo 5 de Mc Farland). Cuando fue necesario se agregó solución fisiológica estéril (Anexo 1) para obtener una turbidez equiparable a la del estándar. Dentro de los 15 minutos posteriores, se sumergió un hisopo de algodón estéril y se rotó varias veces con una presión firme sobre las paredes laterales del tubo, para eliminar el exceso de líquido. Se sembró la superficie seca de las placas de agar MRS (Difco), estriando

el hisopo tres veces sobre la totalidad de la superficie del agar y después de rotar la placa aproximadamente 60° para asegurar la distribución uniforme del inóculo. Se dejó secar 3-5 minutos sin exceder 15 minutos antes de poner los discos de antibióticos.

Se colocaron los discos sobre la superficie del agar con pinzas o aplicadores multidiscos, presionando con suavidad cada disco sobre la superficie del agar procurando que el contacto fuera uniforme. Es importante no mover el disco una vez que se haya puesto en contacto con el agar debido a que una parte del antibiótico se difunde casi inmediatamente. La distancia entre centro y centro de cada disco no debe ser menor a 24 mm. Finalmente se invirtieron las placas y se colocaron en una estufa a 29-30°C durante toda la noche (16-18h). Al terminar el tiempo de incubación, con una regla se midió los halos de inhibición generados por cada antimicrobiano, midiendo el diámetro de los mismos incluyendo el diámetro del disco y reportándolos en milímetros. Los antimicrobianos utilizados se muestran en la tabla 5.3.

**Tabla 5.3.** Antibióticos utilizados para la prueba de resistencia a antibióticos.

CLAVE	NOMBRE	CONCENTRACIÓN
C	Cloramfenicol	[30µg]
CX	Cloxacilina	[1µg]
E	Eritromicina	[15µg]
GM	Gentamicina	[10µg]
K	Kanamicina	[30µg]
N	Neomicina	[30µg]
NET	Netilmicina	[30µg]
P	Penicilina	[10µg]
TE	Tetraciclina	[30µg]
VA	Vancomicina	[30µg]

### **5.6 Resistencia al paso sucesivo a través del tracto intestinal**

Se simuló el paso de las bacterias lácticas encontradas en la muestra a través del tracto gastrointestinal. Se imitaron las temperaturas y tiempos reales durante la ingestión de los alimentos y se agregaron al medio las enzimas presentes en cada paso de la digestión para así conocer la resistencia de la bacteria a los distintos ambientes a los que es sometido durante este proceso.

La metodología seleccionada es la presentada por Vizoso *et al.* (2006). Se inoculó un medio de leche descremada reconstituida al 15% (Oxoid) con un inóculo de 24 h de la cepa de la bacteria láctica a analizar. Con el fin de evaluar su resistencia, se cuantifican los microorganismos sobrevivientes. Se tomó 0.5 mL para hacer diluciones sucesivas y realizar una cuenta en placa para conocer la carga microbiana inicial. Se diluyó la leche descremada inoculada 1:1 con solución electrolítica estéril (Anexo 1), se adicionaron 100 ppm de lisozima (Sigma) y se incubaron durante 5 min a 37°C (simulación del paso a través de la boca). Transcurrido este tiempo, se diluyó la mezcla 3:5 con fluido gástrico artificial (Anexo 1). Es importante mantener el pH a 2.5, por lo que si es necesario, se utiliza de nuevo HCl 5M y se incuba a 37°C durante una hora. Posteriormente se realizó una cuenta en placa tomando 0.5 mL del fluido gástrico artificial inoculado y se diluyó el restante 1:4 con secreción duodenal artificial (Anexo 1) ajustado a pH 7.2 y se incubó durante 2 y 3 horas. Realizando cuenta en placa transcurridos ambos tiempos.

### 5.7 Determinación de factores que afectan la resistencia al paso a través del tracto intestinal

Se empleó el diseño de Plackett-Burman reportado en Vizoso *et al.* (2006) para seleccionar los parámetros que pueden afectar la sobrevivencia de los probióticos durante el paso a través del tracto gastrointestinal.

La metodología reportada por Vizoso *et al.* (2006) indica la preparación de 8 corridas, las cuales se indican en la tabla 5.4:

**Tabla 5.4.** Corridas para el análisis de la resistencia al tracto gastrointestinal de acuerdo con el método de PB (Vizoso *et al.*, 2006)

CORRIDA	1	2	3	4	5	6	7	8
Leche descremada al 15% m/v	+	+	+	-	+	-	-	-
Medio de composición	MRS	*Solución Electrolítica	*Solución electrolítica	*Solución electrolítica	MRS	*Solución electrolítica	MRS	MRS
Lisozima (100 ppm)	-	-	+	+	+	-	+	-
pH	3	2.5	2.5	3	3	3	2.5	2.5
Pepsina (0.3%)	+	-	+	-	-	+	+	-

\* Solución electrolítica (6.2g/L NaCl, 2.2g/L KCl, 0.22g/L CaCl<sub>2</sub>, 1.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>)

Se diluyen las cepas hasta igualar al tubo 1 de Mc-Farland y se inocula cada una de las corridas con 100 µL de un cultivo de 24 h de las bacterias lácticas en estudio. Se realiza cuenta en placa al  $t_0$  y transcurrida 1 hora. Realizar el cálculo de la inhibición utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición} = \log \text{UFC/mL al } t_0 - \log \text{UFC/mL } t_{1\text{hr}}$$

---

---

### 5.8 Adherencia a las células del epitelio:

La prueba de adherencia consta de tres etapas:

1) Preparación de las células:

Se propagaron células HEp-2 en una botella para crecimiento celular de 250 mL en presencia de medio mínimo esencial (MEM) con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (penicilina, estreptomina, anfotericina  $\beta$ ). Se incubó la botella a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5% y 85% de humedad durante 24 hr hasta tener una confluencia prácticamente del 100%. Ya crecidas las células se eliminó el medio y se hicieron 2 lavados con PUKS (Anexo 1), incubando por 5 min para fomentar el desprendimiento de las células. Una vez desprendidas se les agregó 25 mL de medio MEM sin SFB ni antibióticos, pipeteando para homogenizar (Sainz *et al.*, 2001; Mendoza, 2006).

2) Crecimiento del cultivo bacteriano:

Se prepararon cultivos bacterianos de las 8 cepas de bacterias lácticas que se quieren probar y 3 controles positivos de *E. coli*. (EPEC, 042 pet y 49766). De las cepas usadas como controles se sembró 1 asada en agua con Triptona al 1% y D-Manosa 1%; de las cepas usadas para el ensayo se sembró 1 asada en caldo MRS con D-Manosa 1%, se incubaron con agitación a 200 rpm y 37°C por 24 horas.

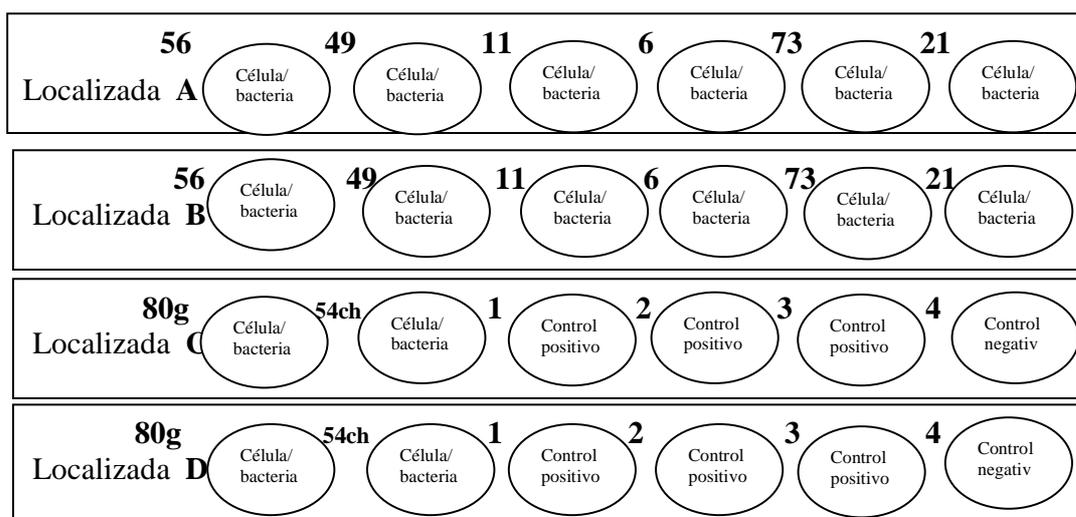
Después de 24 h se centrifugaron los tubos con los cultivos bacterianos a 2500 rpm durante 15 min, decantando el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de PBS utilizando vortex (Sainz *et al.*, 2001; Mendoza, 2006).

3) Ensayo de adherencia:

Se preparó una microplaca de propileno con 24 pozos, colocando una lenteja (cubreobjetos redondo estéril) en cada uno, posteriormente se llenaron los pozos con 1 mL del medio MEM con antibióticos y SFB al 10% y las células previamente propagadas, dejando en incubación por 24 horas en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Se revisaron los pozos de la microplaca para conocer la confluencia, e inmediatamente después se eliminó el medio con una pipeta Pasteur.

Se agregaron a cada pozo 950 µL de MEM con D-Manosa al 1% y 50 µL de inóculo resuspendido, colocándolos de la siguiente manera en la microplaca:



**Fig. 5.2** Disposición de las cepas de BAL a ensayar y de los controles en la microplaca.

La placa se incubó a 37°C, por 3 horas. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio y se lavó 3 veces con 1 mL de buffer de fosfato salino (PBS) con la finalidad de quitar el exceso de bacterias presentes. Se fijó la preparación con 1 mL de metanol por 1 min, posteriormente se tiñó con colorante GIEMSA por 20

min, se lavo cada pozo 3 veces con 1 mL de PBS para eliminar el exceso de colorante.

Se sumergieron las lentes en acetona e inmediatamente después en xilol, para eliminar exceso de colorante y deshidratar las células. Se fijaron las lentes a un portaobjetos con resina eliminando las burbujas presentes en la superficie, una vez secas (permanecieron toda la noche, a temperatura ambiente) se observaron en microscopio. Se capturaron las imágenes con una cámara fotográfica integrada al microscopio (Sainz *et al.*, 2001; Mendoza, 2006).

---

---

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Las características de cada cepa se encuentran en la tabla 6.1:

**Tabla 6.1.** Caracterización de las cepas utilizadas.

CLAVE DE LA CEPA	ESPECIE*	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	GRAM	CATALASA
6	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Cocos	+	-
11	<i>Streptococcus sp.</i>	Cocos	+	-
21	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Cocos	+	-
49	<i>Streptococcus sp.</i>	Cocos	+	-
54ch	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Cocos	+	-
56	<i>Streptococcus sp</i>	Cocos	+	-
73	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Cocos	+	-
80g	<i>Lactobacillus pentosus/Lactobacillus plantarum</i>	Bacilo corto	+	-

\* (Pilatasig, 2009; comunicación personal).

### 6.1 Tolerancia a la acidez

La resistencia a la acidez, es una de las barreras a superar por los microorganismos que actúan como probióticos; debido a que deben pasar y sobrevivir a través del tracto gastrointestinal el cual dependiendo la zona llega a tener pH muy bajos. Por ejemplo, en el estómago se tiene un pH de 1 a 3; mientras que, el intestino delgado cuenta con un pH de 5 a 7; y el intestino grueso con un pH de 8 (Ando *et al.*, 1994).

**Tabla 6.1.1** Tolerancia a la acidez de las bacterias lácticas del pozol a diferentes tiempos de incubación en medio MRS, pH ajustado HCl conc., a 30°C.

CEPA	pH	TIEMPO (h)			
		0	1	2	3
56	1	-	-	-	-
	2	+	-	-	-
	3	+	-	-	-
49	1	-	-	-	-
	2	+	+	+	+
	3	+++	++	++	+
11	1	-	-	-	-
	2	+	+	+	+
	3	++	++	++	++
6	1	-	-	-	-
	2	+	-	-	-
	3	++	++	++	++
21	1	-	-	-	-
	2	+	-	-	-
	3	+	+	-	-
73	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	+	+	+	+
80g	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	++	+	+	+
54ch	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	++	+	+	+

+++ Crecimiento Abundante; ++ Crecimiento moderado; + Poco Crecimiento; - Sin Crecimiento

En la tabla 6.1.1 se muestran los resultados obtenidos de la prueba de tolerancia a la acidez. Se puede observar que específicamente son 2 cepas (11 y 49) las que muestran una mayor resistencia a un pH de 2, durante el tiempo total de tratamiento (3 horas). Cabe señalar que las cepas 6, 21 y 56 crecen a un pH de 2 solo al T<sub>0</sub>. Por otro lado, también son 2 las cepas (56 y 21) que tienen la menor resistencia, ya que solo sobreviven a un pH de 3 al T<sub>0</sub> y un pH de 2 al T<sub>0</sub>. Las cepas 73, 80g y 54ch, presentan solo resistencia a pH de 3.

Las cepas 11 y 49 pueden ser consideradas como las que cuentan con mejor perfil de resistencia a la acidez, sin embargo, las otras cepas no se deben descartar, ya que son muchas las pruebas que se deben considerar para determinar el potencial probiótico y esta no es determinante para ello. Por otro lado, se considera como parámetro de resistencia un pH de 3 y una duración de 3 horas, que es el tiempo promedio de permanencia a través del estomago (O'Sullivan *et al.*, 2006).

En otras investigaciones se ha demostrado la resistencia a la acidez de bacterias lácticas. *Lactobacillus casei* no sobrevive a un pH de 1 en ningún periodo de tiempo (Mishra *et al.*, 2004), mientras que algunas cepas de *L. acidophilus* sobreviven hasta 60 min a pH de 2.5 y 30 min a pH 1.2. Por otro lado, *Bifidobacterium* sp. solo sobrevive 5 min a pH 2.5 (Dunne *et al.*, 2001). En estudios similares, Goldin *et al.* (1992) reportó que *Lactobacillus* GG sobrevive a pH 3.

## 6.2 Tolerancia a sales biliares

Es fundamental que todas las cepas crezcan en un medio con sales biliares, ya que para ejercer acción probiótica sobre el intestino, deben sobrevivir a la acción detergente de éstas.

**Tabla 6.2.1** Tolerancia a las sales biliares de las BAL del pozol

CEPAS	RESISTENCIA
56	+++
49	+++
11	+++
6	+++
73	+++
21	+++
80g	+++
54ch	+++

+++ Muy resistentes; ++ Moderada resistencia; + Poco resistentes

Como se puede observar en la tabla 6.2.1, las ocho cepas son capaces de crecer en el medio con sales biliares. Es importante resaltar que la concentración fisiológica de ácidos biliares en el intestino delgado es muy variable y depende de la zona. Por ejemplo, en el duodeno su concentración es de 15000  $\mu\text{M}$ ; en el jejunio es de 10000  $\mu\text{M}$ , mientras que en el ileon es de 4000  $\mu\text{M}$  (Marteau *et al.*, 1997) y la concentración utilizada en esta prueba fue de 0.5% de sales biliares, equivalente a 12, 255  $\mu\text{M}$  (Vizoso *et al.*, 2006).

Por otro lado, se sabe que algunas bacterias lácticas son capaces de hidrolizar el enlace amida de las sales biliares, liberando sales biliares con una menor capacidad detergente. Según las investigaciones realizadas por Moser y Savage (2001), se probaron algunas especies de lactobacilos como son *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. paracasei subsp. paracasei* y *L. reuteri*, entre otros, en su actividad

hidrolasa de las sales biliares, su resistencia a la toxicidad de éstas y se pudo observar que las cepas capaces de crecer en presencia de sales biliares no necesariamente producen la enzima hidrolasa de sales biliares. Aunque en otros experimentos con otras cepas como *L. plantarum*, ambas características están presentes y no se ha podido definir si una es independiente de otra, por lo que los autores concluyeron que se requieren otro tipo de experimentos para definir este cuestionamiento.

En la prueba que se realizó a las cepas del pozol, todas fueron capaces de crecer, pero no fueron capaces de hidrolizar el ácido taurodesoxicólico (TDCA), lo cual se identificaría como un precipitado alrededor de las colonias en la placa de Agar MRS+TDCA.

Se puede concluir entonces, que las cepas de este estudio son capaces de crecer en un medio con sales biliares, resistiendo su toxicidad a pesar de no tener la capacidad de hidrolizarlas. Gilliland y Speck (1976) explican que estas diferencias pueden ocurrir por variaciones en las condiciones de crecimiento, el tipo de sales biliares utilizadas en la prueba (taurocólico o glicólico) o bien el método utilizado para evaluar esta característica.

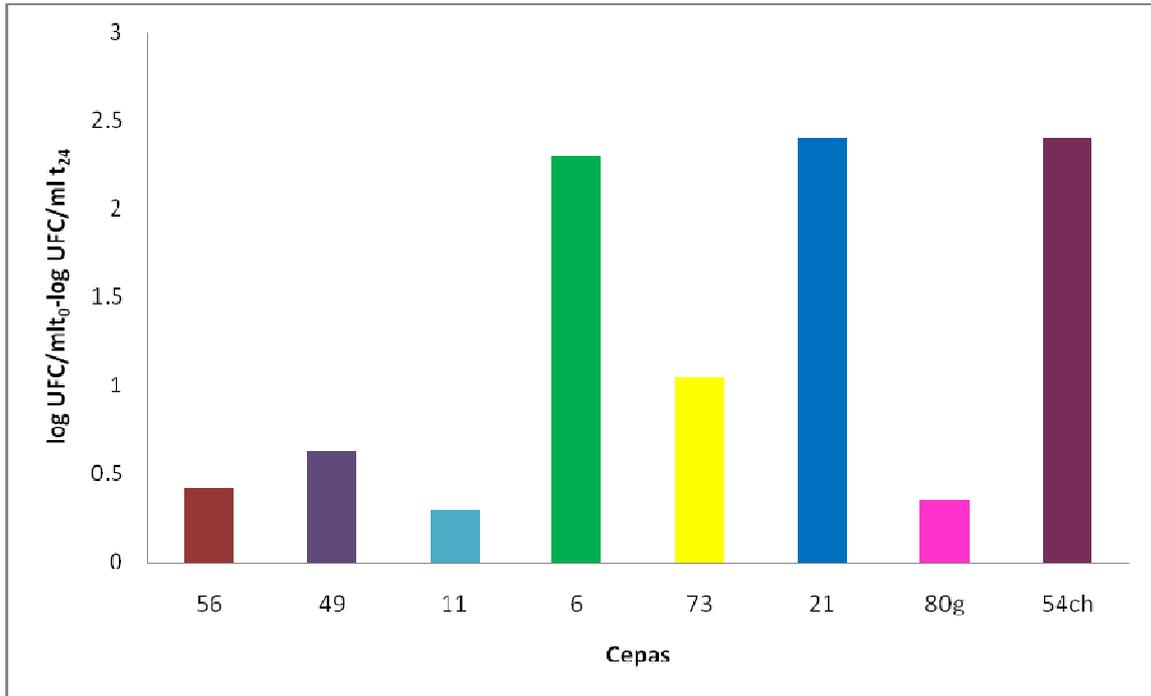
### 6.3 Resistencia al fenol

Esta característica es importante evaluar debido a que algunos aminoácidos aromáticos derivados de la dieta (producidos de manera endógena a partir de las proteínas), pueden ser desaminados en el intestino por bacterias, formando fenoles, los cuales pueden ejercer una acción bacteriostática contra lactobacilos y bacterias lácticas en general (Suskovic *et al.*, 1997). También se ha visto que la presencia de estos compuestos puede deberse al consumo de algunas bayas y alimentos vegetales, que poseen entre sus componentes, compuestos de carácter fenólico, como los flavonoides que pueden ser ingeridos al consumir dichos alimentos (Puupponen-Pimäs *et al.*, 2002).

**Tabla 6.3.1** Crecimiento de BAL del pozol en medio MRS con fenol al 0.4%

CEPAS	TIEMPO (h)		INHIBICIÓN* (log UFC/mL)
	0	24	
<b>56</b>	$8 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$	0.42
<b>49</b>	$3 \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^7$	0.63
<b>11</b>	$2 \cdot 10^9$	$10^9$	0.30
<b>6</b>	$4 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^6$	2.30
<b>73</b>	$9 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^7$	1.05
<b>21</b>	$2 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^6$	2.40
<b>80g</b>	$2 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^8$	0.35
<b>54ch</b>	$10^9$	$4 \cdot 10^6$	2.40

\*inhibición =  $\log \text{UFC/ml } t_0 - \log \text{UFC/ml } t_{24}$



**Fig. 6.3.1** Prueba de crecimiento en un medio con 0.4% de fenol de las cepas del pozol.

Como se puede observar en la figura 6.3.1 los resultados se expresan como inhibición, término que corresponde a la diferencia entre las unidades formadoras de colonias al inicio ( $t_0$ ) y las unidades formadoras de colonias a las 24 horas ( $t_{24}$ ).

Se puede ver en la tabla 6.3.1, que cuatro cepas (11, 80g, 56 y 49) son las resistentes a la presencia del fenol, pues su crecimiento a las 24 horas es ligeramente modificado comparado con el inicial, ya que presenta una inhibición menor a 1. En cuanto a las otras cepas (73, 6, 21 y 54ch) su crecimiento es en gran medida inhibido, por lo que se indica claramente su sensibilidad al fenol.

Algunos estudios recientes sobre actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos como flavonoides o ácidos fenólicos, tienen efectos en contra de bacterias Gram-negativas incluida *Salmonella* y bacterias Gram-positivas incluidas bacterias probióticas. Dichos efectos varían en sensibilidad dependiendo de la

especie y el tipo de compuesto fenólico que se utilice, además cabe señalar que son más marcados en contra de bacterias Gram-negativas, y en general no afecta a las especies de *Lactobacillus* (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2002).

#### 6.4 Producción de Peróxido de Hidrógeno como compuesto antimicrobiano

Las ocho cepas probadas fueron capaces de producir peróxido de hidrógeno como agente bactericida, aunque en diferentes niveles, figuras 6.4.1 y 6.4.2.

La prueba de producción de peróxido de hidrógeno arrojó los resultados indicados en la tabla 6.4.1, en donde se indica la presencia de un halo, el cual fue formado por aquellas cepas productoras de peróxido de hidrógeno, ya que al producir esta sustancia ocurre una aclaración alrededor y por debajo del crecimiento debido a la reacción de oxido-reducción generada.

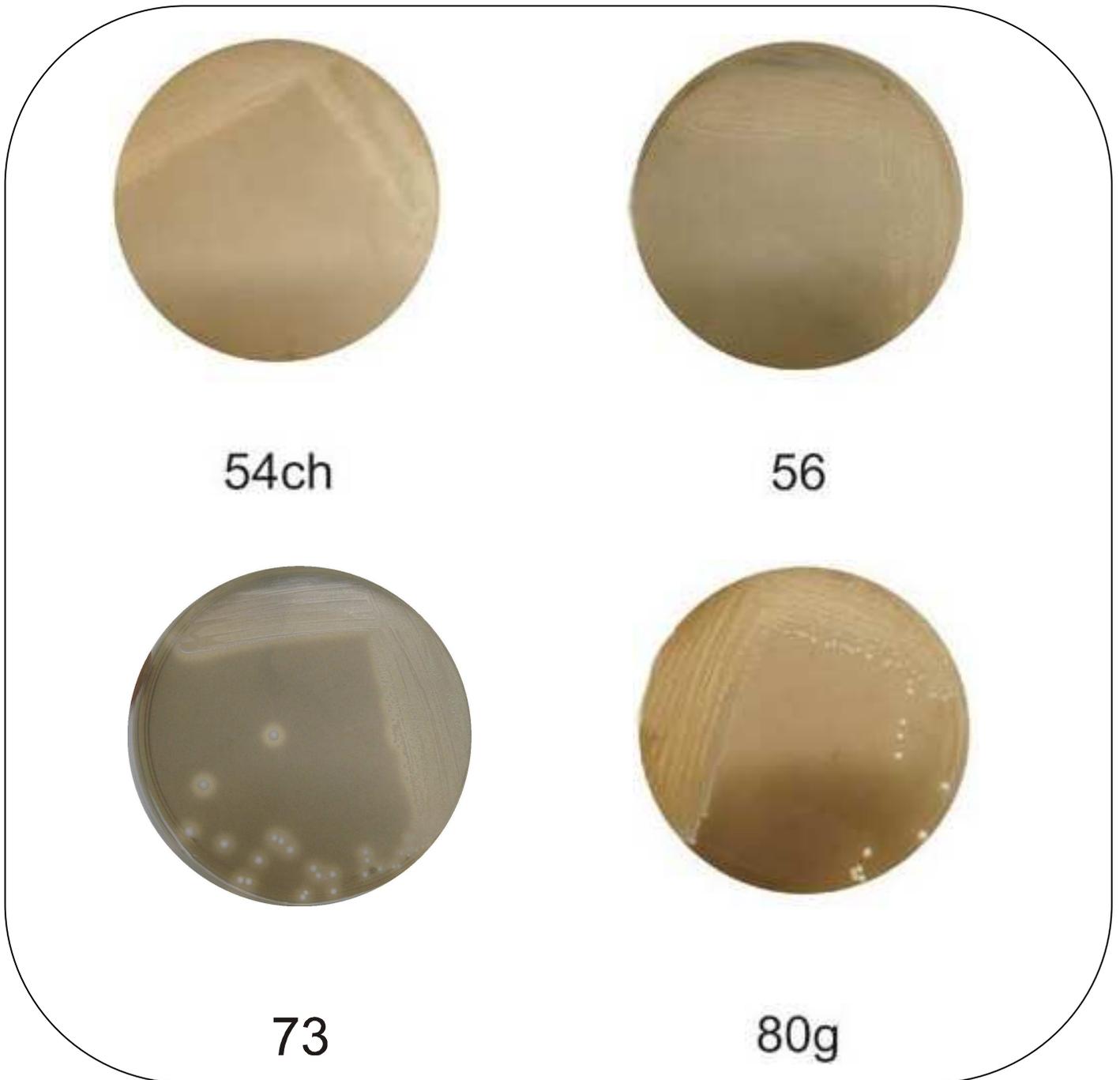
**Tabla 6.4.1** Producción de peróxido de hidrógeno de las BAL aisladas del pozol.

CEPAS	PRODUCCIÓN DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
56	++
49	+
11	+
6	+++
73	+++
21	++
80g	+
54ch	++

+++ Abundante; ++ Moderada; + Poca, indicándose el nivel de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por aclaración del medio alrededor y por debajo de la colonia.



**Fig. 6.4.1** Decoloración de medio por producción de peróxido de hidrógeno



**Fig. 6.4.2** Decoloración de medio por producción de peróxido de hidrógeno.

El ácido láctico es uno de los principales compuestos antimicrobianos que producen las bacterias lácticas, sin embargo la producción de peróxido de hidrógeno como forma de protección, se presenta en algunas cepas de de estas bacterias, principalmente en lactobacilos.

La producción de peróxido de hidrógeno se debe a que poseen flavoproteínas que catalizan la transformación del oxígeno en peróxido de hidrógeno, llevando a cabo una reacción de oxido-reducción entre los sustratos orgánicos (glucosa) y el oxígeno, de la siguiente forma:



R<sub>1</sub>: glucosa presente en el medio.

Aunado a lo anterior, es importante mencionar que las bacterias lácticas no poseen la hemoproteína catalasa, por lo que no pueden degradar el peróxido de hidrógeno generado (Callen *et al.*, 2000).

Felten *et al.* (1999) indica que los lactobacilos presentes en la vagina son productores de peróxido de hidrógeno. Se ha observado a nivel vaginal, que la producción de esta sustancia inhibe el crecimiento de *Gardenia vaginalis* y *Neisseria gonorrhoeae* (Pascual *et al.*, 2006).

Las cepas estudiadas y presentes en el pozol fueron capaces de producirlo, por lo tanto, podrían ejercer actividad bactericida contra algunos microorganismos patógenos en el intestino.

Si el peróxido de hidrógeno ejerce una acción bactericida en las condiciones del tracto gastrointestinal *in vitro*, existe una alta posibilidad de que durante la fermentación de la masa de maíz nixtamalizada (pozol) las BAL lo produzcan y éste actúe como antimicrobiano, en contra de microorganismos patógenos y/o exógenos

que pueden estar presentes, debido a que durante el proceso de elaboración no se cuenta con todas las medidas de inocuidad necesarias.

### 6.5 Resistencia a antibióticos

En la tabla 6.5.3 se presentan los resultados de resistencia a los diez antibióticos utilizados. Los resultados obtenidos en milímetros, correspondientes al diámetro del halo de inhibición fueron interpretados según la tabla reportada por Charteris *et al.* (1998), que indica según el diámetro de los halos de inhibición si corresponde a que la cepa es resistente (R), moderadamente susceptible (MS) o susceptible (S) al antibiótico probado. En tabla 6.5.1 se presentan los valores límite para la interpretación de los diámetros generados por los distintos antibióticos, y en la tabla 6.5.2 se encuentran los valores obtenidos en la medición de los halos de inhibición expresados en milímetros para las bacterias lácticas del pozol evaluadas.

**Tabla 6.5.1** Valores límites para la interpretación de los diámetros generados por los distintos antibióticos en la prueba de sensidiscos, en donde resistente (R), moderadamente susceptible (MS) o susceptible (S) (Charteris *et al.*, 1998).

ANTIMICROBIANO	CONCENTRACIÓN	DIÁMETROS DE ZONAS DE INTERPRETACIÓN (mm)		
		R	MS	S
Penicilina	10 µg	≤19	20-27	≥28
Vancomicina	30 µg	≤14	15-16	≥17
Gentamicina	10 µg	≤12	-	≥13
Kanamicina	30 µg	≤13	14-17	≥18
Netilmicina	30 µg	≤12	13-14	≥15
Tetraciclina	30 µg	≤14	15-18	≥19
Cloramfenicol	30 µg	≤13	14-17	≥18
Eritromicina	15 µg	≤13	14-17	≥18
*Cloxacilina	1 µg	≤18	19-20	≥21
*Neomicina	30 µg	≤12	13-14	≥15

\* Se usaron valores similares a los reportados por Charteris *et al.* (1998), para antibióticos de la misma familia, pues no se encontraron reportados valores para estos dos antibióticos

**Tabla 6.5.2** Diámetro expresado en milímetros de los halos de inhibición generados en la prueba de sensibilización para las bacterias lácticas aisladas del pozol.

CEPAS	SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS (mm)									
	VA	GM	NET	N	CX	C	E	K	P	TE
<b>56</b>	0	12	8	11	13	26	28	0	0	22
<b>49</b>	21	11	15	11	17	26	23	10	27	31
<b>11</b>	23	11	14	11	15	29	22	0	27	29
<b>6</b>	0	12	16	13	0	32	26	0	38	30
<b>73</b>	0	14	18	16	0	32	32	8	38	36
<b>21</b>	0	12	16	13	0	31	33	8	40	33
<b>80g</b>	0	0	8	0	0	25	25	0	18	19
<b>54ch</b>	21	8	8	0	12	30	28	8	34	35

Va= Vancomicina, GM=Gentamicina, NET= Netilmicina, N= Neomicina, CX= Cloxacilina, C= Cloramfenicol, E= Eritromicina, K= Kanamicina, P=Penicilina, TE= Tetraciclina.

**Tabla 6.5.3** Sensibilidad frente a antibióticos de las bacterias lácticas del pozol.

	SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS									
	VA	GM	NET	N	CX	C	E	K	P	TE
<b>56</b>	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
<b>49</b>	S	R	S	R	R	S	S	R	MS	S
<b>11</b>	S	R	MS	R	S	S	S	R	MS	S
<b>6</b>	R	R	S	MS	R	S	S	R	S	S
<b>73</b>	R	S	S	MS	R	S	S	R	S	S
<b>21</b>	R	R	S	MS	R	S	S	R	S	S
<b>80g</b>	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
<b>54ch</b>	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S

R= Resistente, MS= Medianamente susceptible, S= Susceptible. Antibióticos: VA= Vancomicina, GM=Gentamicina, NET= Netilmicina, N= Neomicina, CX= Cloxacilina, C= Cloramfenicol, E= Eritromicina, K= Kanamicina, P=Penicilina, TE= Tetraciclina.

Analizando los resultados de la tabla 6.5.3, se observa que todas las cepas presentan un perfil de inhibición distinto. De los antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared celular (penicilina y vancomicina), observamos que el 63% de las cepas fue resistente a vancomicina y el 25% a penicilina, mientras que el 50% fue susceptible a penicilina. Para los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas, 90% de las cepas fue resistente a cloxacilina, 90% a gentamicina, 40% a netilmicina, 63% a neomicina, 100% a kanamicina y ninguno resistente a cloramfenicol, eritromicina y tetraciclina.

Las mayores frecuencias de resistencia se detectaron con la kanamicina, cloxacilina y gentamicina y los demás antibióticos no presentaron una frecuencia de resistencia mayor al 63%, que corresponde a tres cepas.

Una propiedad importante que debe tener un probiótico es no poseer resistencia a antibióticos, ya que esta característica puede ser transmitida a otros microorganismos por medio de plásmidos, sin embargo, en algunos casos, la resistencia de la cepa a algún antibiótico deriva de la forma en que sintetiza su pared celular o las enzimas que utiliza, casos en los cuales la resistencia no puede ser transmitida.

Para poder observar con mayor claridad la importancia de que una cepa sea resistente o no a ciertos antibióticos, es importante conocer la razón por la cual tiene esta resistencia y en el caso de que la cepa no sea patógena, si tiene la posibilidad de transferir esta propiedad a un microorganismo patógeno.

La resistencia a antibióticos en la actualidad es un problema serio en el tratamiento de infecciones debido al uso indiscriminado en el humano y en los animales. La detección de cepas con un perfil de resistencia múltiple a antibióticos ha aumentado y es común en las cepas pertenecientes al tracto gastrointestinal (Horn *et al.*, 1992). La resistencia adquirida deriva de mutaciones genéticas o adquisición de ADN extraño de otra bacteria (Mattilla-Sandholm *et al.*, 1999).

Aunque las bacterias lácticas algunas veces están asociadas a infecciones, existen antibióticos para su tratamiento, por ejemplo la vancomicina es comúnmente utilizada en paciente con infecciones severas causadas por microorganismos gram positivos (Donohue *et al.*, 1998).

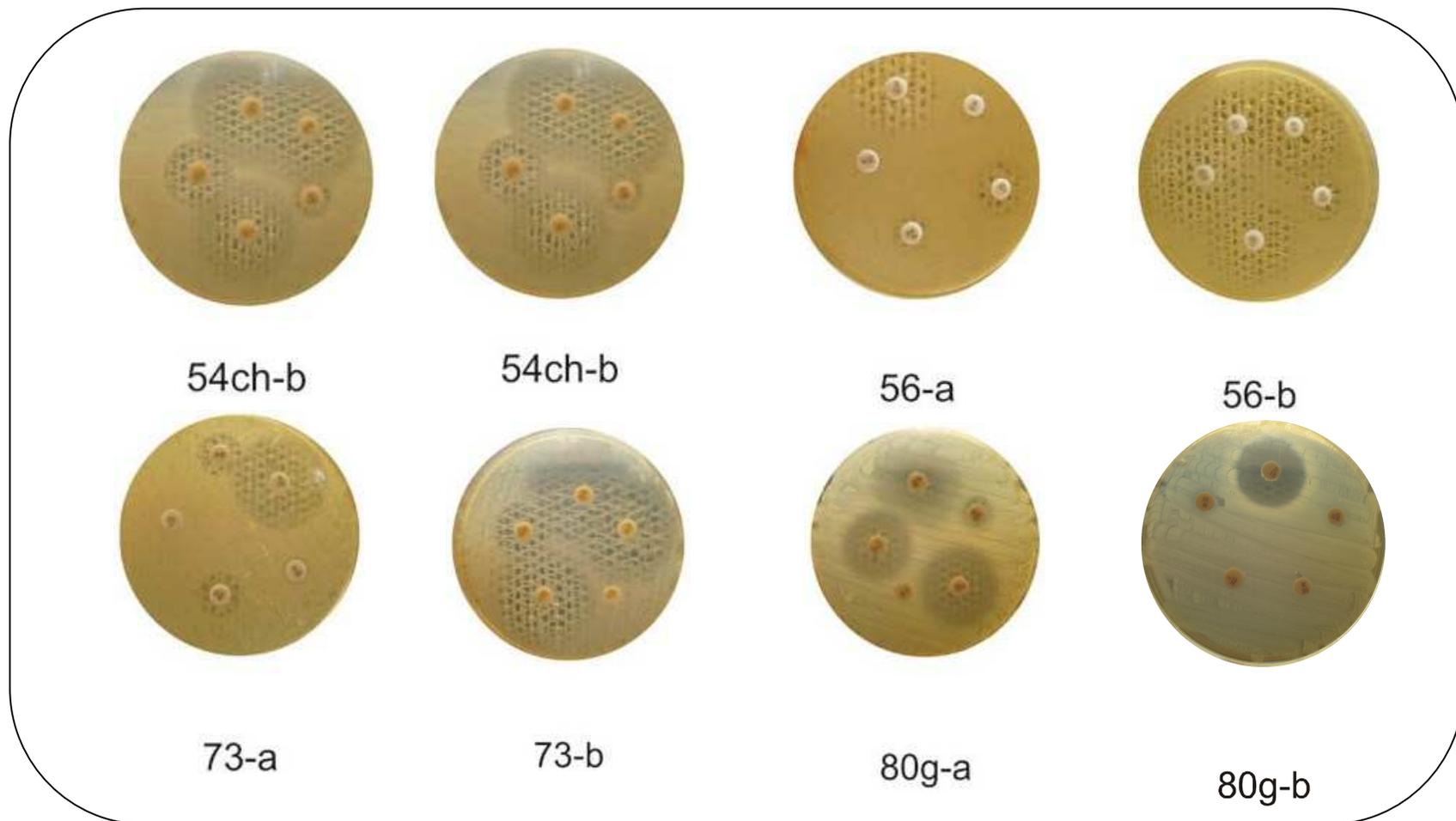
Como se observa en la tabla 6.5.3, las bacterias lácticas aisladas de pozol consideradas como probióticas son susceptibles al menos a un antibiótico.

Existen estudios de la transferencia natural de genes entre bacteria lácticas. Donohue *et al.* (1998) muestra que existe transferencia del plásmido pAM $\beta$ 1, que codifica para la resistencia a los antibióticos macrolido lincosamisa y estreptogramina B. Se observó que esto ocurría de *Lactobacillus reuteri* a *Enterococcus faecalis* en ratones. Otros estudios reportan la transferencia del plásmido que codifica para la resistencia a cloranfenicol de *Lactococcus lactis* a *E. faecalis* y a otros estreptococos anaerobios no identificados en ratones. Sin embargo, la transferencia de este plásmido a anaerobios estrictos como *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Peptostreptococcus* sp no fue observada (Igimi *et al.*, 1996).

En las figuras 6.5.1 y 6.5.2 se muestran los resultados de la inhibición de cada una de las cepas con los antibióticos utilizados.



**Fig. 6.5.1** Prueba de resistencia a antibióticos de las bacterias lácticas aisladas de pozol.



**Fig. 6.5.2** Prueba de resistencia a antibióticos de las bacterias lácticas aisladas de pozol.

### **6.6 Resistencia al paso sucesivo a través del tracto intestinal**

Se utilizaron las ocho cepas de bacterias lácticas aisladas del pozol para someterlas a las pruebas de resistencia al paso sucesivo a través del tracto gastrointestinal.

Los resultados obtenidos se encuentran expresados en forma gráfica en función del tiempo transcurrido durante la prueba. Las cuentas en placa realizadas fueron en cuatro tiempos: al inicio de la prueba en donde se utilizó leche descremada inoculada con la cepa, la segunda se realizó después de transcurrir una hora en un medio que simulaba las condiciones del estómago (pH= 2.5 o 3, y pepsina), mientras que las tercera y cuarta cuentas se realizaron a las dos y tres horas transcurridas en un medio que representaba el paso a través del intestino (secreciones duodenales, sales biliares y pancreatina).

Los datos finales se presentan en la figura 6.6.1 en donde se indican las cepas trabajadas a pH 2.5 y a pH 3, esta diferencia es debida a que el segundo grupo no crece a un pH menor a 3 (ver resultados de acidez). Se puede observar que la mayoría presentaron un porcentaje de sobrevivencia entre 73-75% (cepas 6, 11, 49, 54ch y 56), mientras que la cepa 80g se encuentra en un 68%. Respecto a las cepas 21 y 73 el porcentaje obtenido es el más alto de grupo total de cepas, 89% y 82% respectivamente, esto indica que son altamente resistentes a las condiciones presentes a lo largo del tracto gastrointestinal.

También se observa que la mayor reducción en la cuenta de microorganismos viables ocurre después de una hora de incubación con el jugo gástrico artificial y antes de la adición de la secreción duodenal. Esto indica que el pH bajo del estómago junto con la pepsina presente son factores importantes que influyen sobre la sobrevivencia de las cepas y su posterior paso al intestino, ya que al incubarse con la secreción duodenal artificial su reducción es menor e inclusive en la tercera hora de incubación en la mayoría de las cepas tiende a aumentar la cuenta de microorganismos viables.

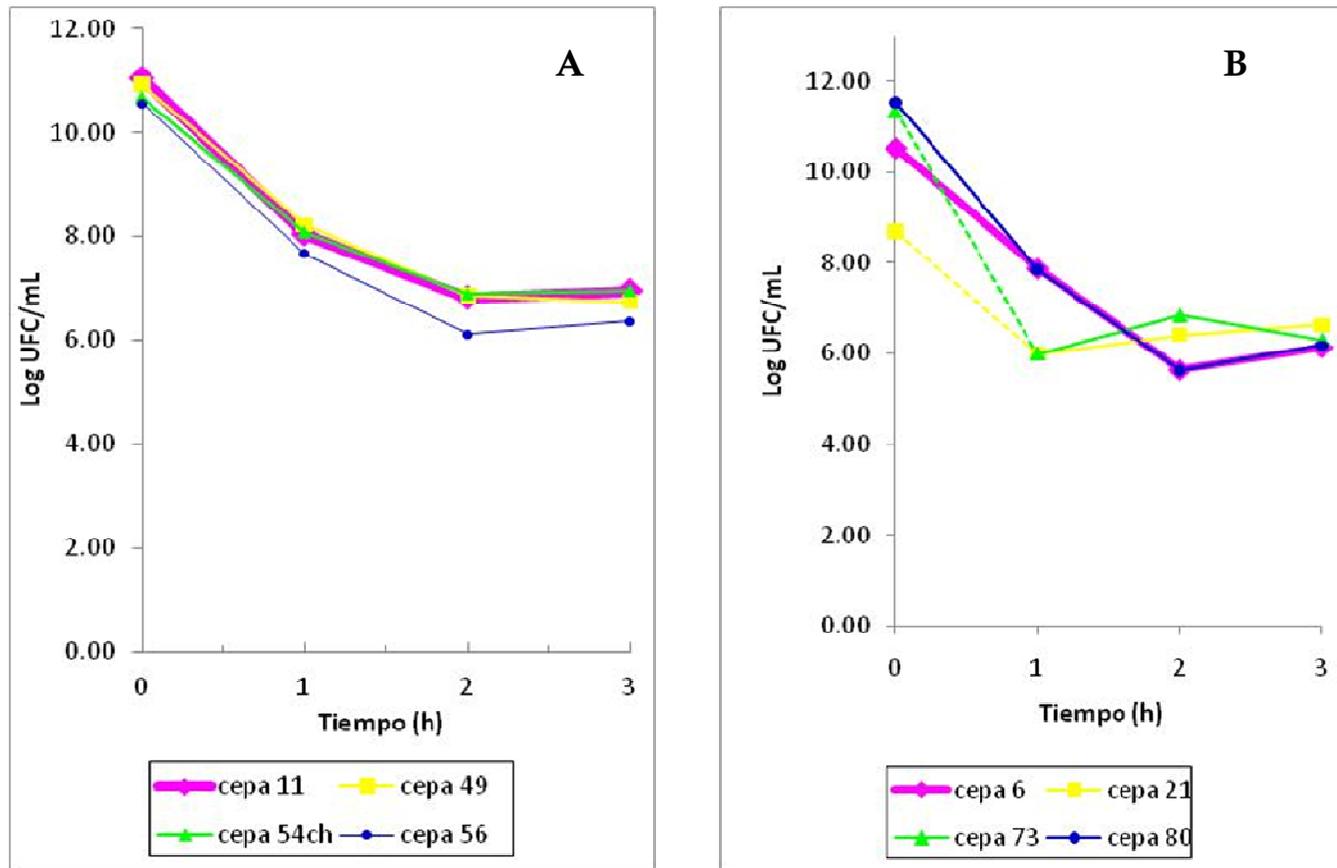


Fig. 6.6.1 Resultados de la prueba de resistencia al paso sucesivo a través del tracto gastrointestinal de las bacterias lácticas aisladas del pozol. (A) cepas trabajadas a pH=2.5. (B) cepas trabajadas a pH=3. En la primera hora se simula el paso a través del estómago en presencia de pepsina a pH=2.5 o 3, mientras que a las 2 y 3 horas se simula el paso a través del intestino en presencia de secreción duodenal y pancreatina.

En estudios previos realizados por Dunne *et al.* (2001) con cepas de *Lactobacillos* y *Bifidobacterium* se ha observado que la principal barrera que les afecta, al ser ingeridos, es el ambiente presente en el estomago, es decir las condiciones del jugo gástrico como el pH bajo. De acuerdo a sus resultados observaron que las bifidobacterias tenían una menor resistencia en comparación con los lactobacilos. En el caso de las cepas del pozol, se observó que existe relación entre las especies presentes y su comportamiento durante la prueba, como se observa en la fig. 6.6.1(A), en donde las cepas 11, 49 y 54ch son más resistentes en comparación con la cepa 56, por otro lado en la fig. 6.6.1 (B) se observó en general menor resistencia, en donde las cepas 6 y 80g mostraron mayor resistencia.

### 6.7 Determinación de factores que afectan la resistencia al paso a través de tracto intestinal

La finalidad de esta prueba consiste en determinar los factores que afectan la resistencia de las bacterias al paso del tracto intestinal, e identificar en la medida de lo posible, su potencial probiótico.

El cálculo de inhibición se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición} = \log \text{UFC/mL } t_0 - \log \text{UFC/mL } t_{60}$$

De acuerdo a los resultados obtenidos, las cepas presentan inhibición en la mayoría de las corridas realizadas; esto debido a la composición y pH de las mismas, lo cual se puede observar en la tabla 6.7.1.

**Tabla 6.7.1** Corridas para el análisis de la resistencia al tracto intestinal (Vizoso *et al.*, 2006).

CORRIDA	1	2	3	4	5	6	7	8
Leche descremada al 15% m/v	+	+	+	-	+	-	-	-
Medio de composición	MRS	Solución electrolítica	Solución electrolítica	Solución electrolítica	MRS	Solución electrolítica	MRS	MRS
Lisozima (100 ppm)	-	-	+	+	+	-	+	-
pH	3	2.5	2.5	3	3	3	2.5	2.5
Pepsina (0.3%)	+	-	+	-	-	+	+	-

(+) Presencia; (-) Ausencia

Graficando los resultados de la ecuación anterior, se observa que los valores positivos indican la inhibición de los microorganismos, mientras que los valores negativos se presentan al haber crecimiento.

Es importante mencionar que solo obtuvimos valores numéricos de 5 de las 8 cepas utilizadas, ya que en las cepas 6, 21 y 73 no obtuvimos reproducibilidad en los valores obtenidos durante la prueba.

La cepa que presenta una mayor inhibición es la 11 (fig. 6.7.1), principalmente en la corrida 6, esto debido a que no cuenta con una fuente de nutrientes que

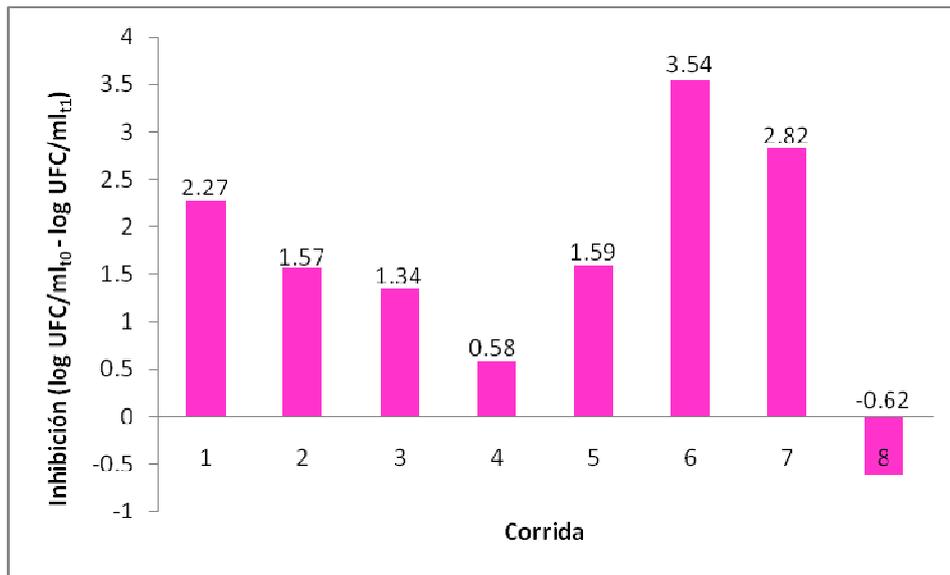
favorezcan su crecimiento, sin embargo se debe resaltar que en la corrida 8 que solo contiene MRS, se puede apreciar un leve aumento en la población microbiana, esto puede deberse a que este medio es el utilizado para la reactivación de estas bacterias.

En cuanto a las cepas 54ch (fig. 6.7.3) y 56 (fig. 6.7.4) en la corrida 4, se observó que no crecían después de permanecer una hora en incubación, por lo tanto no se pudo determinar el valor de inhibición. Sin embargo la cepa 56 presentó crecimiento en la corrida 1.

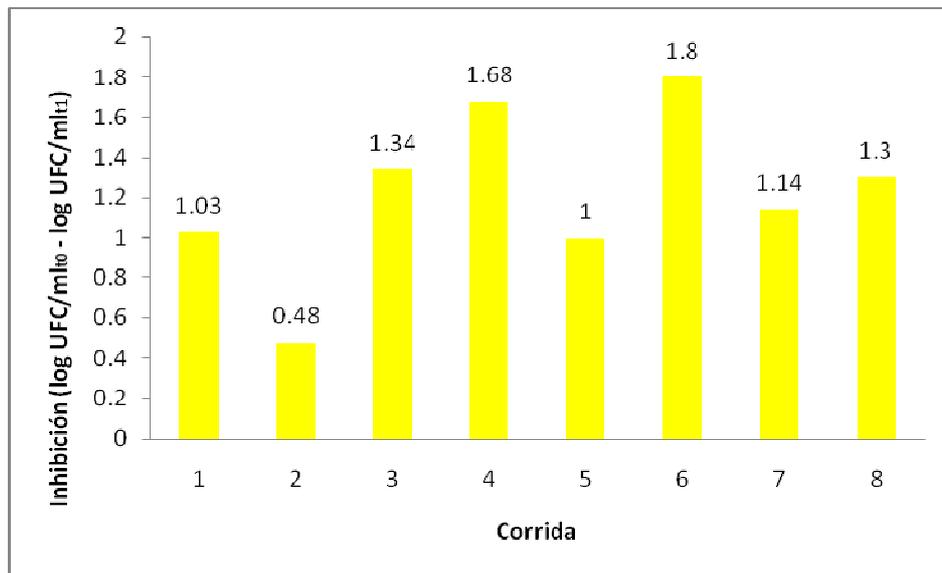
Por su parte la cepa 49, como se puede observar en la figura 6.7.2, tiene en la mayoría de las corridas una alta inhibición, independientemente de la composición de estas.

La cepa 80g (fig. 6.7.5) presentó los valores más bajos de inhibición, e inclusive en 3 de las 8 corridas hubo crecimiento (corridas 3, 5 y 7), por lo cual esta cepa no es afectada a pH bajos ni en presencia/ausencia de pepsina y/o lisozima.

En cuanto a la leche se esperaba que esta tuviera un efecto protector que beneficiara a las cepas, sin embargo se observó que en general no ejerce dicho efecto en estas cepas en particular, esto puede deberse al origen de las mismas, ya que fueron aisladas del pozol y este no tiene componentes parecidos a los de este alimento.



**Fig. 6.7.1** Resultados de determinación de factores que afectan la resistencia al paso a través de tracto intestinal en la cepa 11



**Fig. 6.7.2** Resultados de determinación de factores que afectan la resistencia al paso a través de tracto intestinal en la cepa 49.

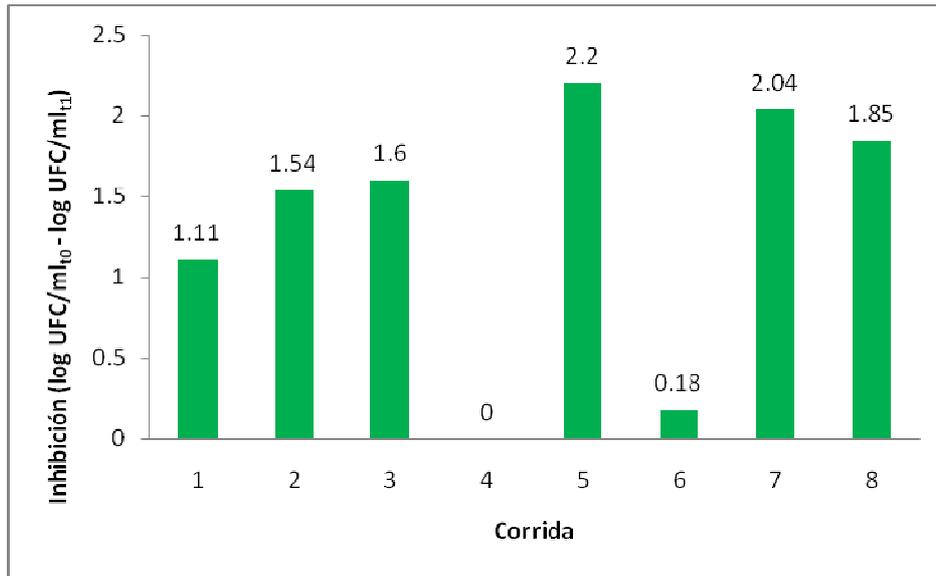


Fig. 6.7.3 Resultados de determinación de factores que afectan la resistencia al paso a través de tracto intestinal en la cepa 54ch

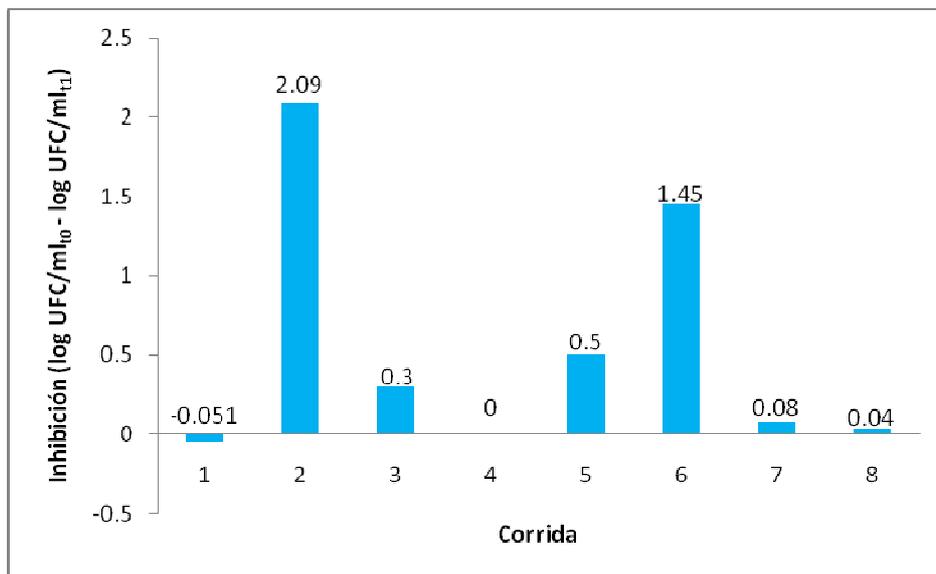
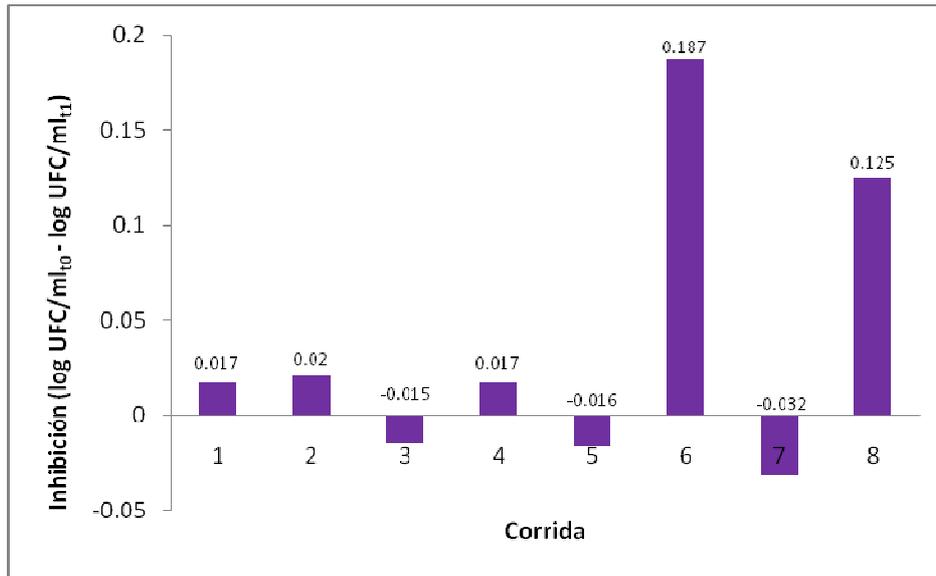


Fig. 6.7.4 Resultados de determinación de factores que afectan la resistencia al paso a través de tracto intestinal en la cepa 56



**Fig. 6.7.5** Resultados de determinación de factores que afectan la resistencia al paso a través de tracto intestinal en la cepa 80g

### **6.8 Adherencia a las células del epitelio:**

Esta es una de las pruebas más importantes para considerar que algún microorganismo tiene potencial probiótico, ya que además de llegar viva al intestino, debe permanecer viable e implantarse en la mucosa intestinal para formar parte de la microbiota normal y con esto poder proporcionar los beneficios atribuidos en cuanto a la mejora de la salud del huésped. De igual manera deben ser capaces de minimizar la proliferación de agentes patógenos compitiendo por un nicho o espacio físico en las paredes intestinales (Iñiguez *et al.*, 2006).

Las fotografías (fig. 6.8.2 a 6.8.9) muestran la adherencia obtenida al hacer interactuar cada una de las 8 cepas de BAL aisladas del pozol con cultivos de células Hep-2 (células epiteliales obtenidas de tumor laríngeo y que han sido utilizadas como modelo, ampliamente estudiado para adherencia de bacterias como *E.coli* con resultados confiables).

Los controles positivos utilizados se muestran en la fig. 6.8.1, y son 2 cepas de *E. coli* (O42 y 49763).

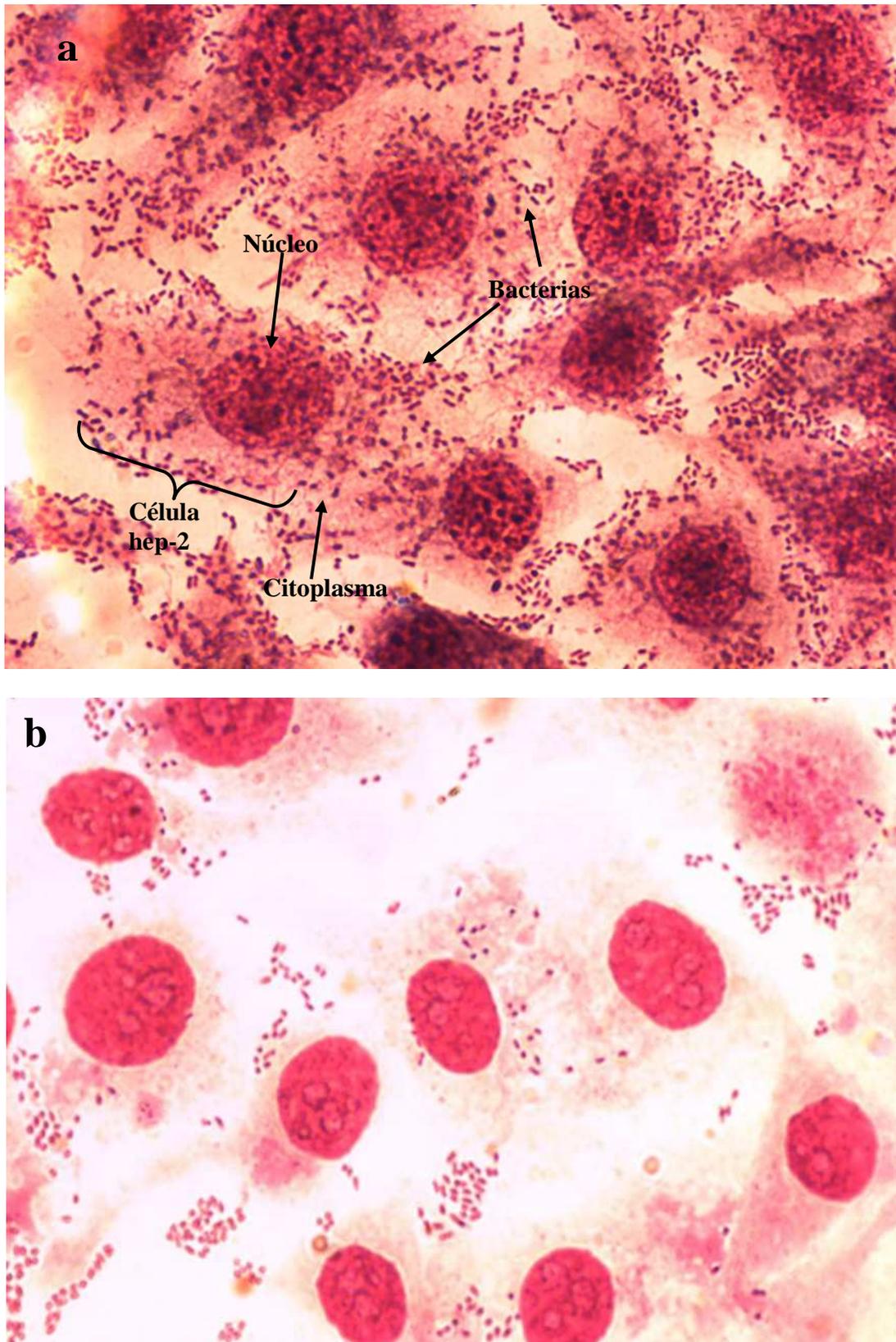


Fig. 6.8.1 Adherencia de *E. coli* como control + a células epiteliales Hep-2; cepas a) 49763; b) O42

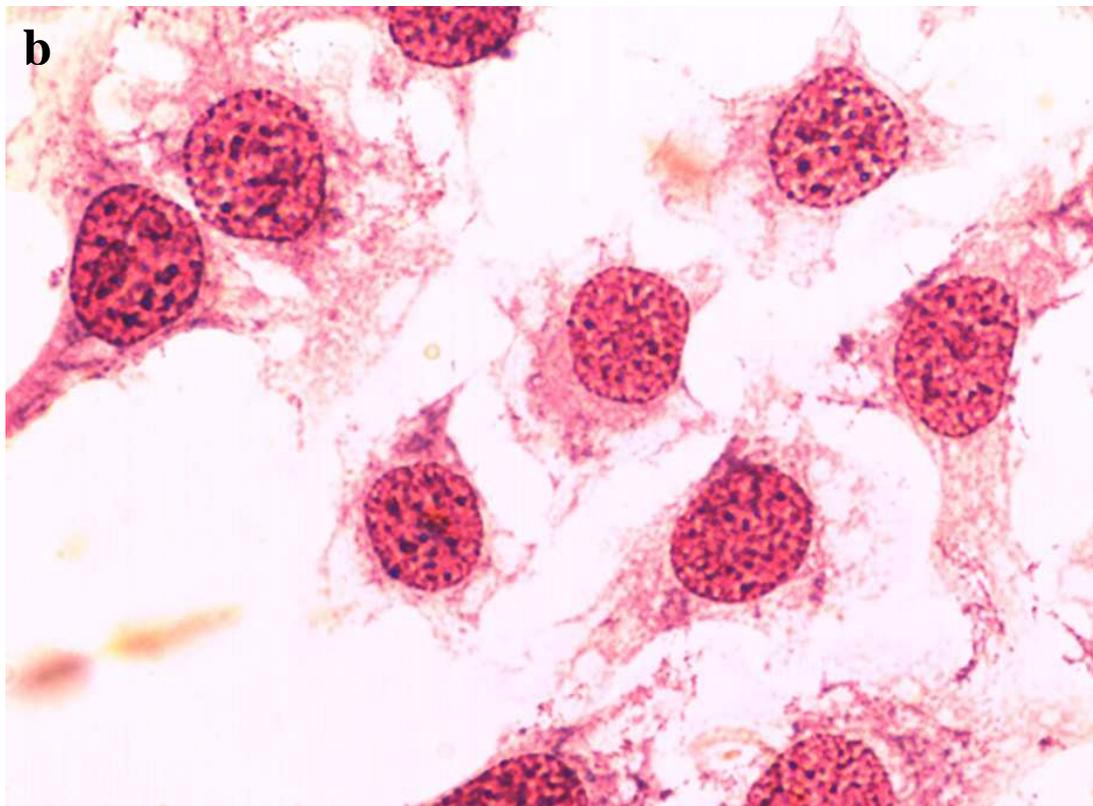
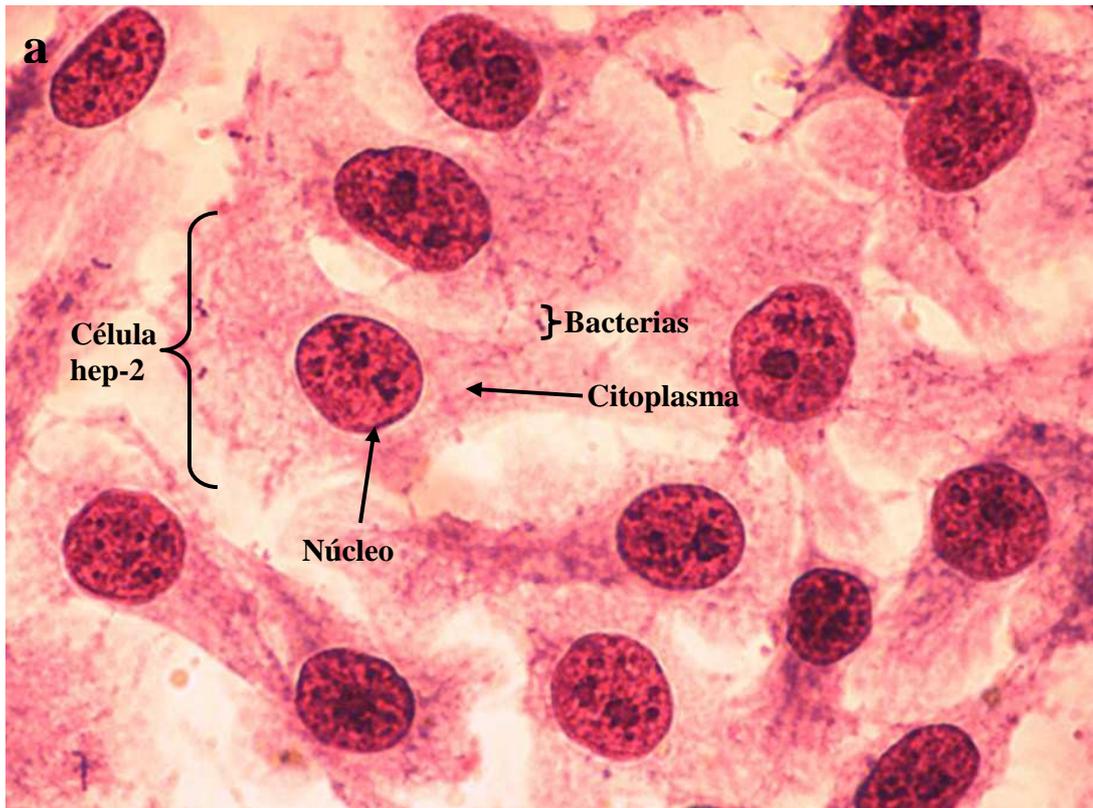


Fig. 6.8.2 Adherencia de bacterias ácido-lácticas del pozol a células epiteliales Hep-2. Cepas 56.

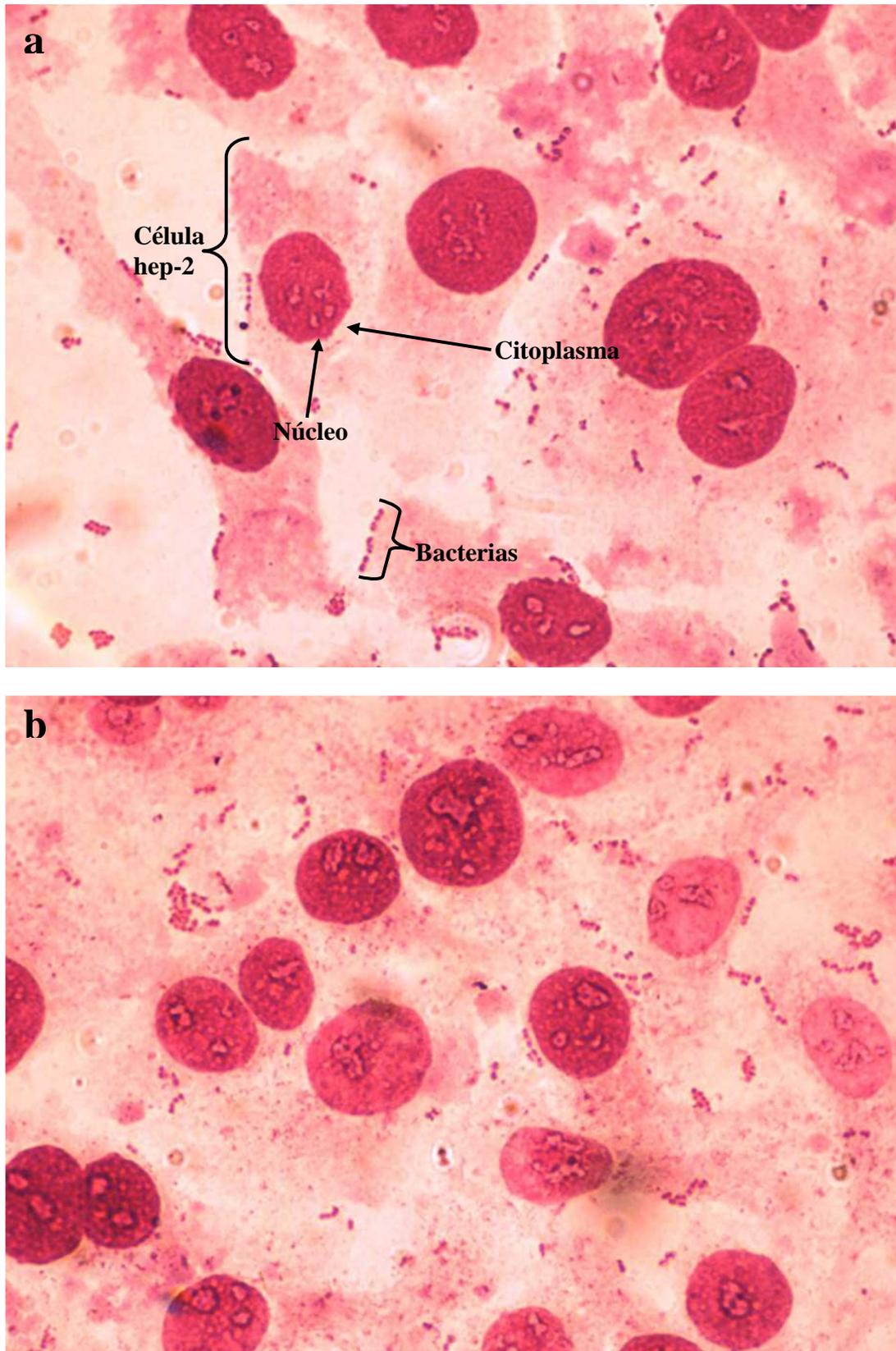


Fig. 6.8.3 Adherencia de bacterias ácido-lácticas del pozol a células epiteliales Hep-2. Cepa 49.

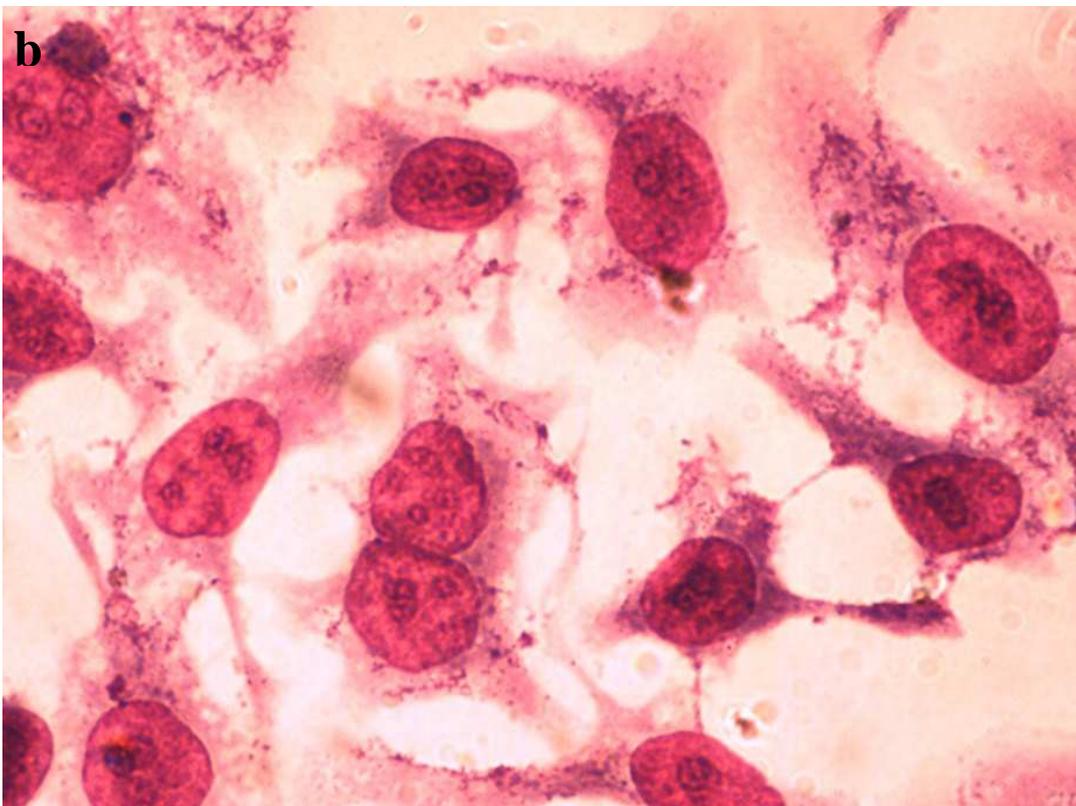
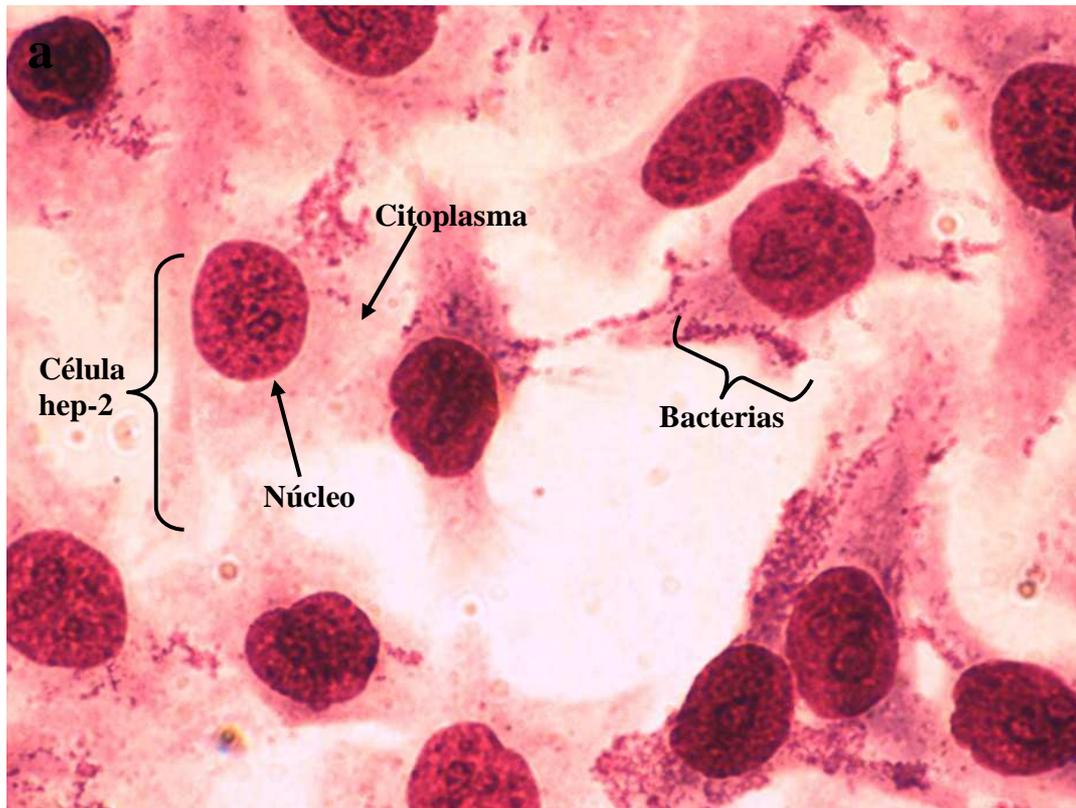


Fig. 6.8.4 Adherencia de bacterias ácido-lácticas del pozol a células epiteliales Hep-2. Cepa 11.

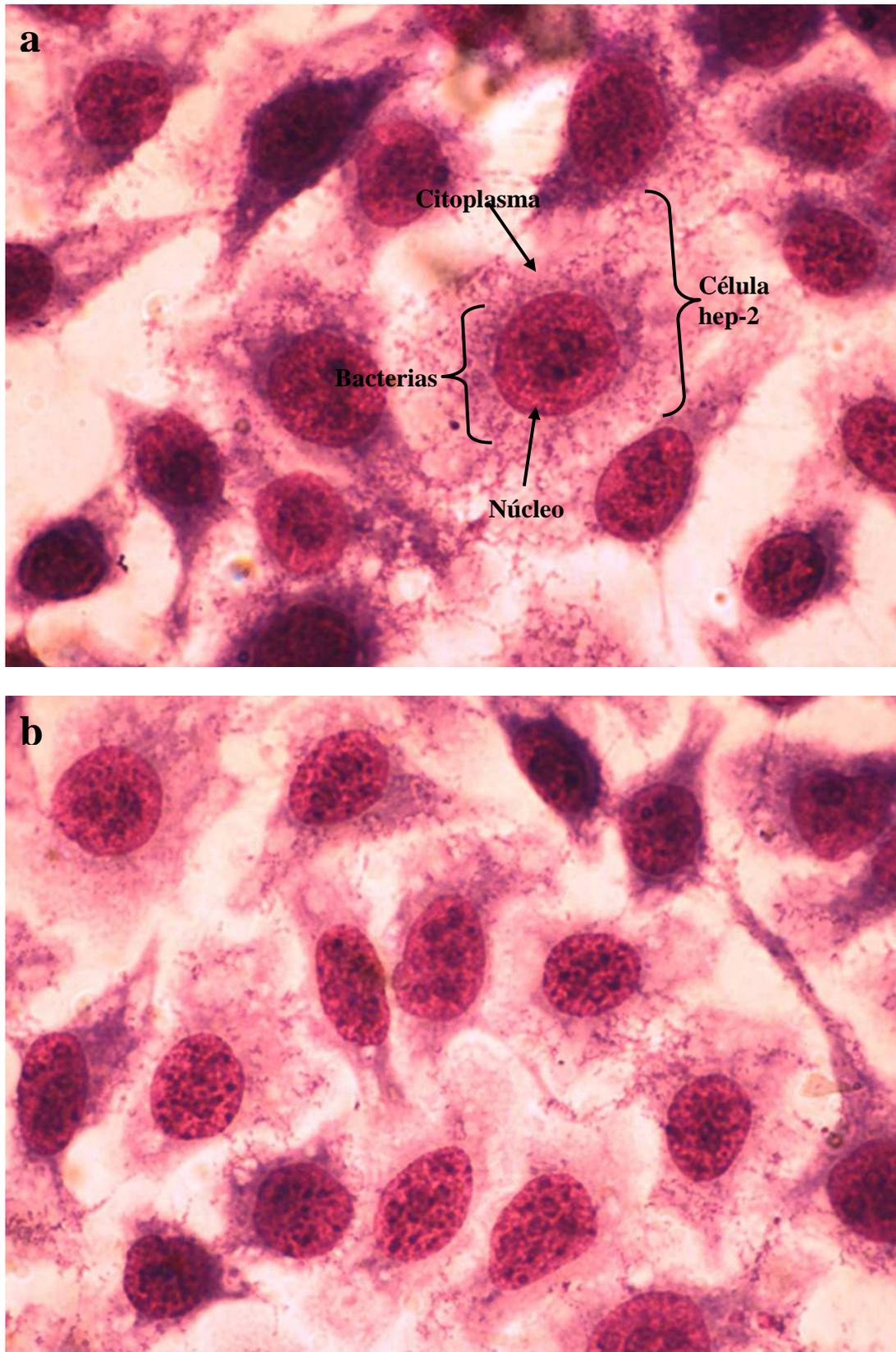


Fig. 6.8.5 Adherencia de bacterias ácido-lácticas del pozol a células epiteliales Hep-2. Cepa 6.

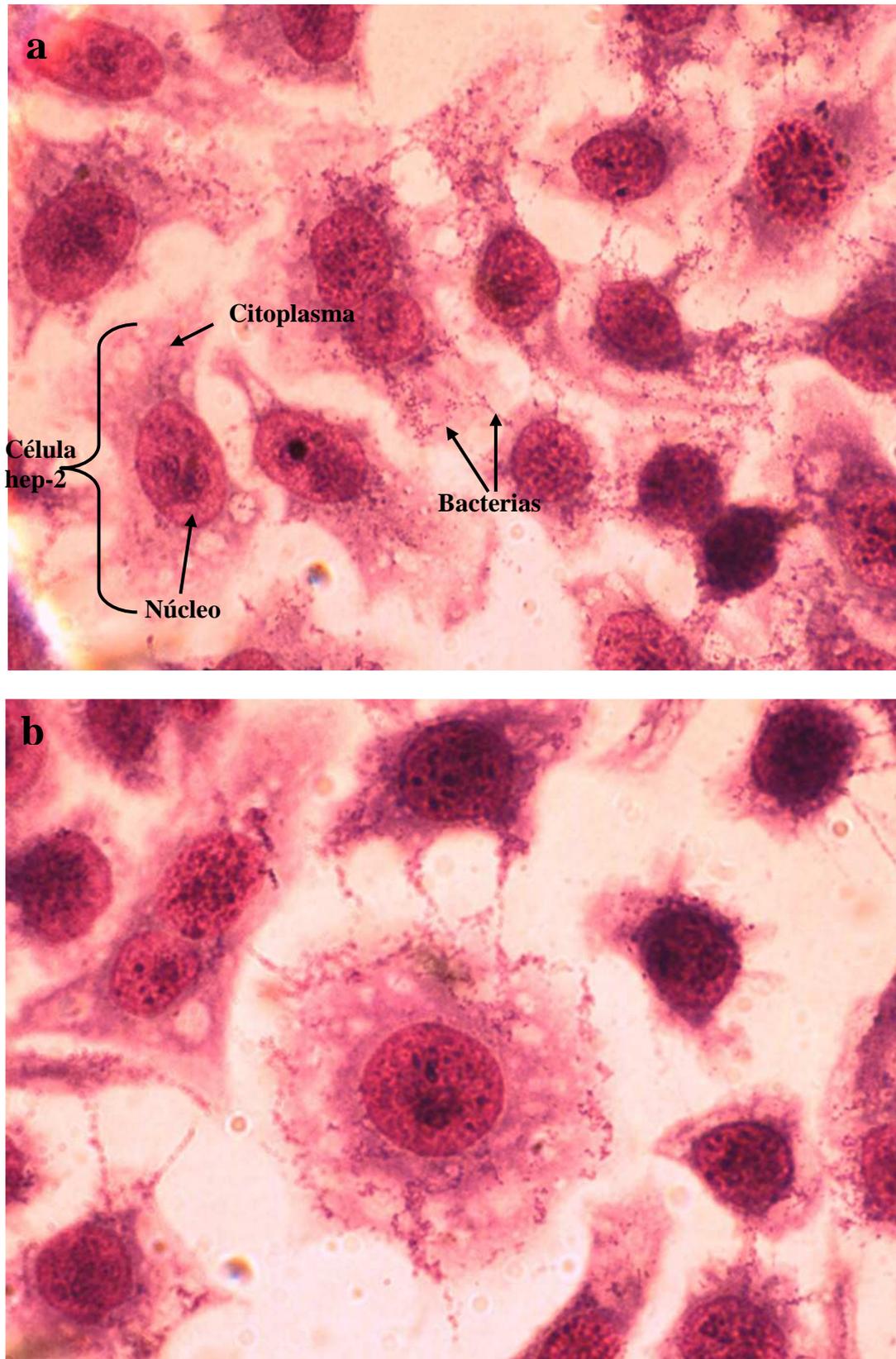


Fig. 6.8.6 Adherencia de bacterias ácido-lácticas del pozol a células epiteliales Hep-2. Cepa 73.

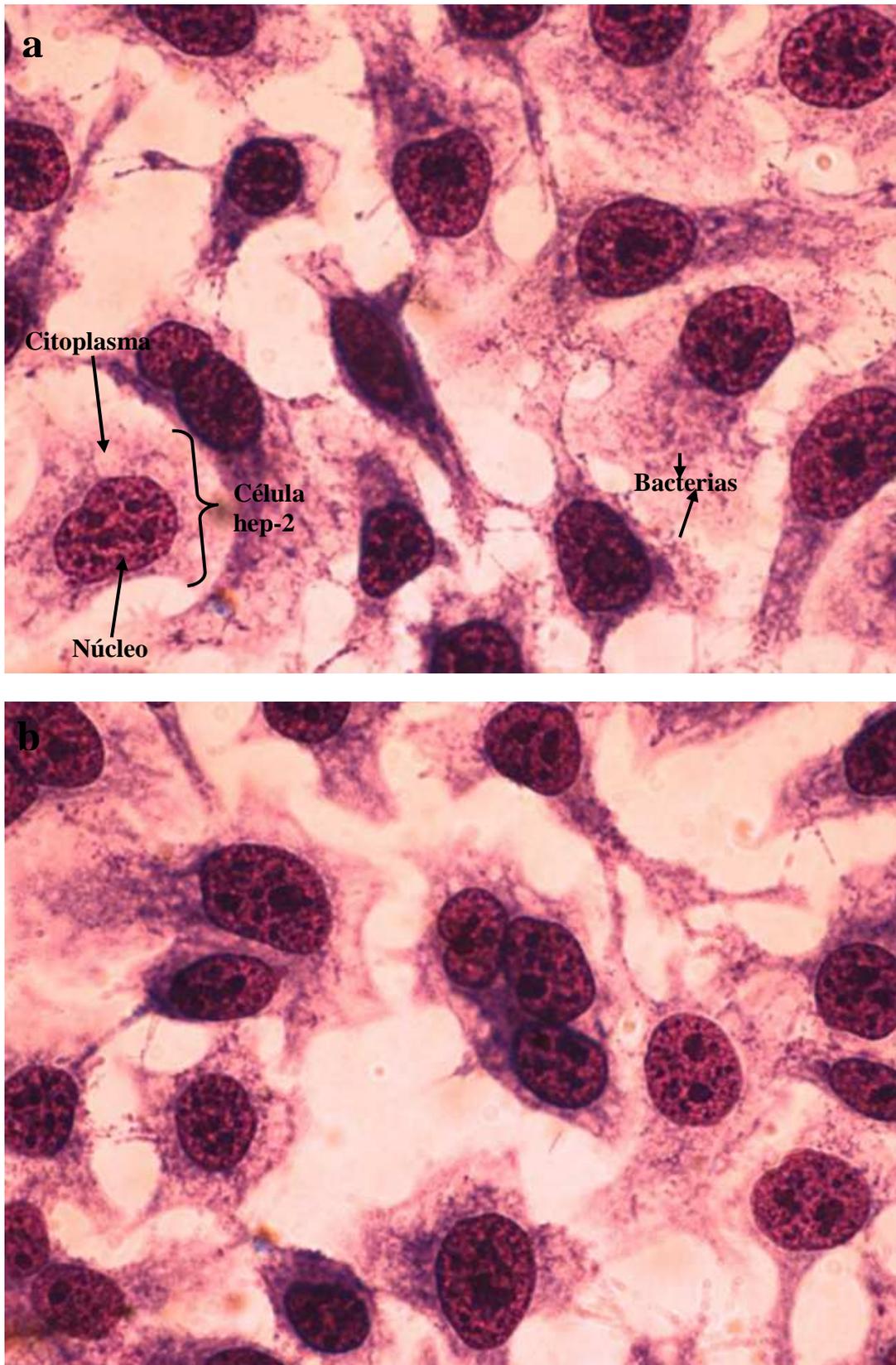


Fig. 6.8.7 Adherencia de bacterias ácido-lácticas del pozol a células epiteliales Hep-2. Cepa 21.

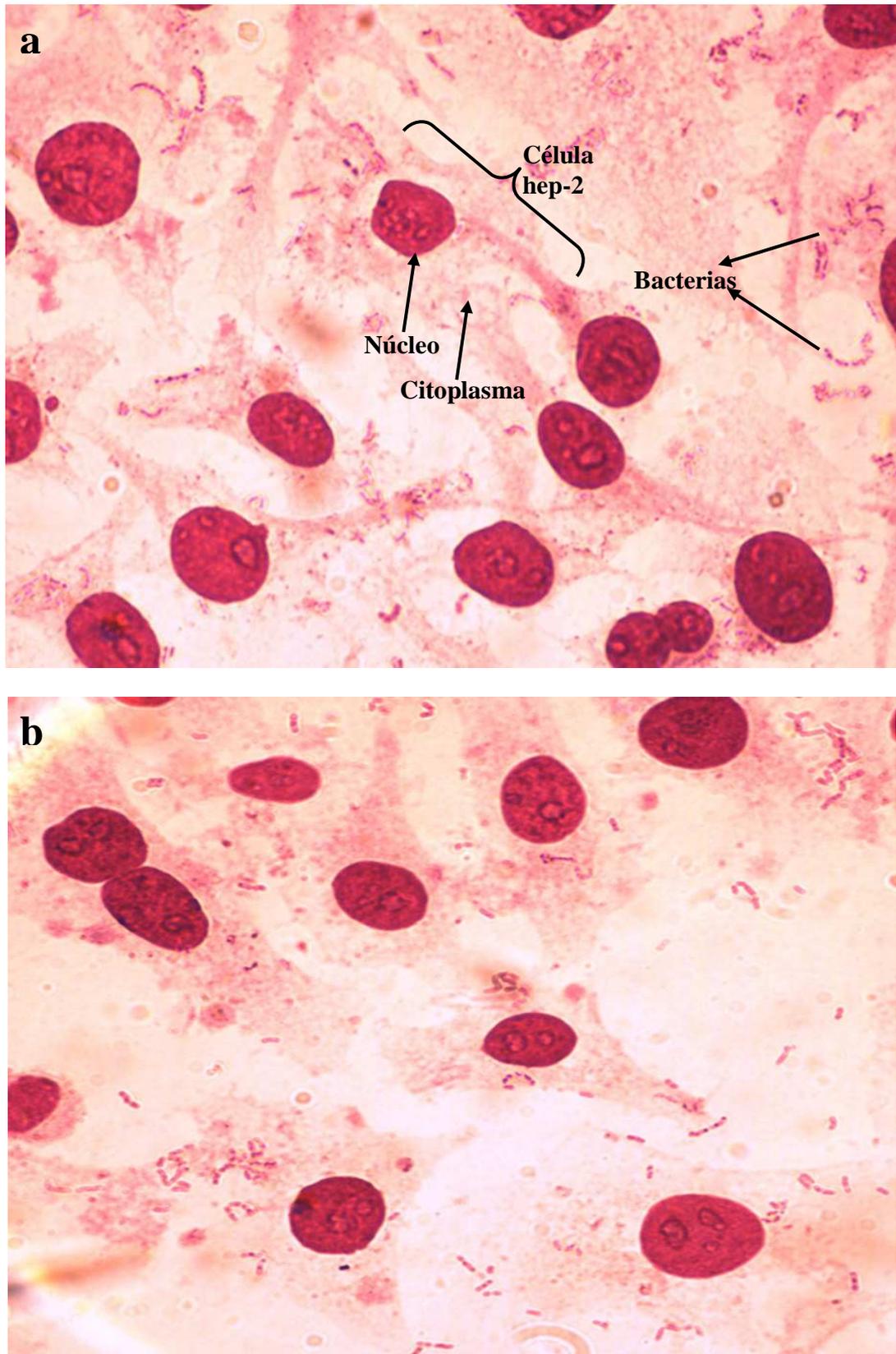


Fig. 6.8.8 Adherencia de bacterias ácido-lácticas del pozol a células epiteliales Hep-2. Cepa 80g.

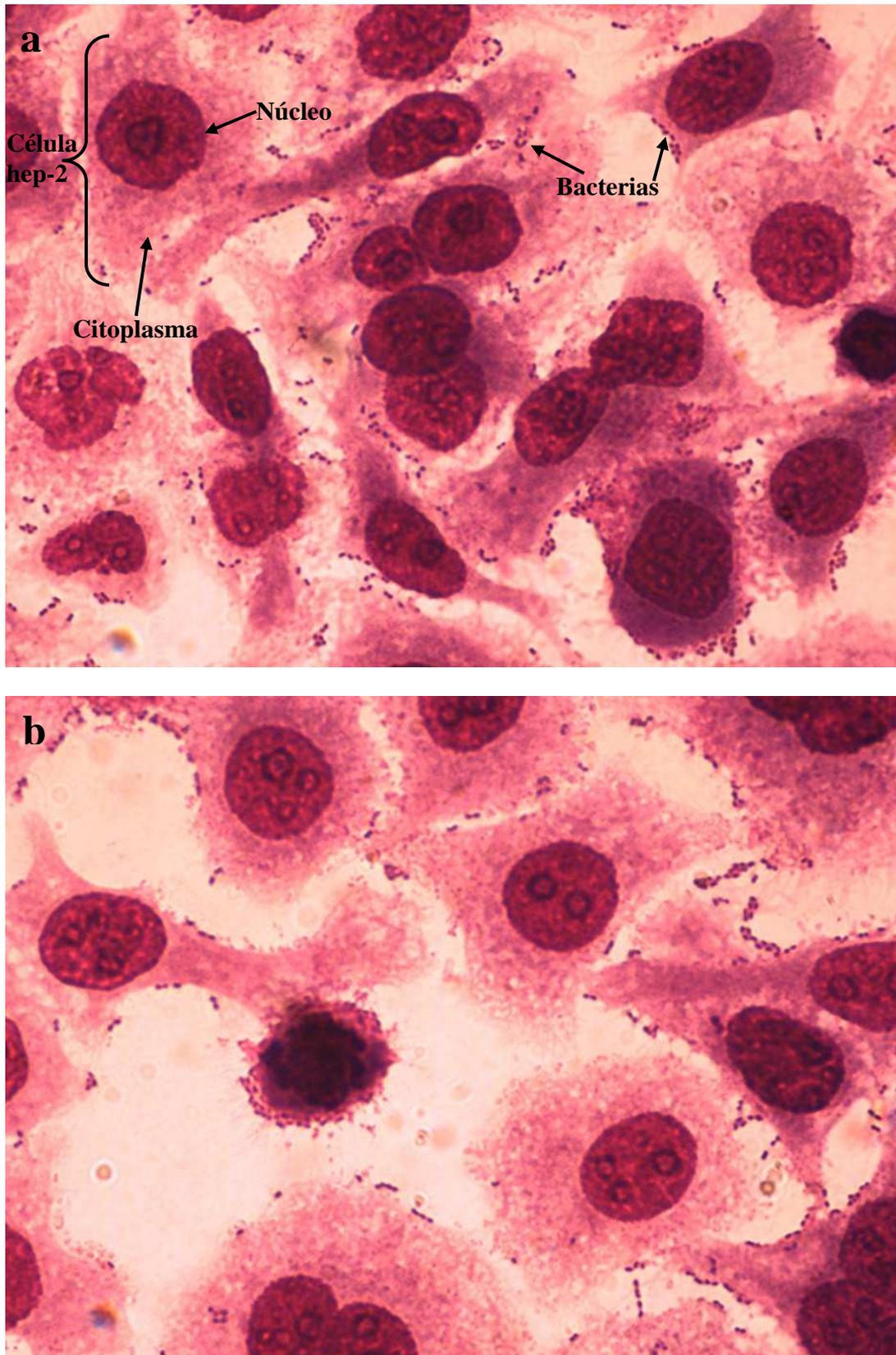


Fig. 6.8.9 Adherencia de bacterias ácido-lácticas del pozol a células epiteliales Hep-2. Cepa 54ch.

En general esta prueba se puede utilizar para la identificación de adherencia en bacterias de cualquier tipo, sin embargo es ampliamente utilizada para *E. coli*. Se busca tener como mínimo 10 bacterias por cada célula presente para definirla como prueba positiva. Además es importante mencionar que este tipo de bacterias presentaron 3 clases de patrones, los cuales son **adherencia agregativa** (en donde las bacterias se encuentran alrededor de la célula y/o núcleo), **adherencia difusa** (se encuentran bacterias sobre toda la superficie de la célula) y **adherencia localizada** (se observa adherencia en un polo de la célula principalmente) (Sainz *et al.*, 2001). La adherencia que presentaron los controles positivos (fig. 6.8.1) fue del tipo agregativa, la cual era la esperada.

Como se puede observar en las fotos anteriores, prácticamente todas las cepas muestran adherencia francamente positiva, con excepción de la cepa 56 (fig. 6.8.2), la cual tiene algunas bacterias unidas a las células, pero estas son muy pocas y por lo tanto no cumple con el requerimiento de poseer por lo menos 10 bacterias por cada célula.

El posible patrón de adherencia que se identificó en las BAL aisladas del pozol, es diverso y se tiene patrón difuso para las cepas 6, 73, 21 (fig. 6.8.5 a 6.8.7), un patrón agregativo para las cepas 49 y 54ch (fig. 6.8.3 y 6.8.9) y un patrón localizado para las cepas 11 y 80g (fig. 6.8.4 y 6.8.8). En la cepa 56 no se puede definir dicho patrón ya que esta no muestra una cantidad de bacterias aceptable (fig. 6.8.2).

En esta prueba en particular solo se observa y comprueba la adhesión de las cepas de BAL utilizadas, característica que como se mencionó antes, es importante para definir que posee propiedades probióticas.

No se realizó prueba alguna para definir el tipo de mecanismo de adherencia, sin embargo se considera importante conocer dicho mecanismo. En la literatura se mencionan diferentes tipos de adherencias; entre los más importantes son: presencia de adhesinas, proteínas de membrana y producción de polímeros, entre otros (Iñiguez *et al.*, 2006; Nousiainen *et al.*, 1998; Salminen *et al.*, 1998).

En estudios anteriores, se ha encontrado que bacterias del género *Bifidobacterium* presentan adherencia que se atribuye a ciertos componentes de tipo proteico (adhesinas), las cuales son capaces de reconocer carbohidratos de la mucosa y/o epitelio intestinal (Iñiguez *et al.*, 2006).

Por otro lado se han realizado pruebas de adherencia en intestino de cerdos, para cepas del género *Lactobacillus*, en las cuales se encontró presencia de complejos proteínicos ricos en ácidos lipoteicos, los cuales se asocian a la adherencia (Nousiainen *et al.*, 1998).

Otro estudio realizado por Kleeman *et al.* (1982) sobre diferentes especies de *Lactobacillus* y utilizando a una línea celular de intestino fetal humano (HFI), indica la presencia de dos mecanismos de adherencia, uno que no es específico y requiere iones calcio, el cual puede utilizarse para bacterias de intestino humano y exógenas, utilizando EDTA como quelante para inducir “puentes” entre el microorganismo y la carga de la superficie de las células epiteliales. El segundo tipo de adherencia que sugiere es referente a que existe una posible absorción entre el microorganismo y la superficie intestinal, sin embargo no muestra con exactitud el mecanismo que se lleva a cabo.

---

## 7. CONCLUSIONES

Mediante la realización de este proyecto, se buscó identificar si un conjunto de cepas de bacterias lácticas aisladas del pozol cuentan con capacidad probiótica.

En las pruebas realizadas para la determinación de la capacidad probiótica se encontró que el 50% de las cepas en estudio fueron inhibidas en diversas magnitudes en un medio con fenol al 0.4%, la totalidad de las cepas probadas crecieron en un medio con sales biliarias, lo que las hace resistentes a ellas y con respecto a la producción de sustancias antimicrobianas como el peróxido de hidrógeno, se observó que el 100% de las cepas fueron productoras de esta sustancia, aunque en diferentes proporciones.

Las cepas se sometieron a la prueba de resistencia a antibióticos, obteniendo que las mayores frecuencias de resistencia se detectaron con kanamicina, cloxacilina y gentamicina, ya que los demás antimicrobianos no presentaron una frecuencia de resistencia mayor al 63%, y esto corresponde solo a tres cepas. Esto indica que los antibióticos inhibidores de proteínas (eritromicina, cloranfenicol y tetraciclina) fueron los que mayormente inhibieron el crecimiento de las cepas estudiadas.

En la simulación del tracto intestinal se pudo observar que la primera hora de tratamiento (simulación de jugo gástrico) en las 8 cepas, disminuyó drásticamente la cuenta de microorganismos sobrevivientes, debido al pH bajo de 2.5 o 3; mientras que, en la simulación del intestino delgado (duodeno), había un ligero aumento del crecimiento en la mayoría de las cepas, excepto en la cepa 73 (*Leuconostoc pseudomesenteroides*), en la cual se observó un crecimiento en la primera hora y una tendencia de decaimiento a partir de la segunda hora.

Con respecto a los factores que afectan el paso a través del tracto intestinal, cada cepa mostró resultados diferentes, pero en general se puede atribuir al pH y a la composición del medio donde se inoculan, identificando además que en este caso la leche no ejerce efecto protector alguno, por lo que se podría modificar el factor protector tomando en consideración los componentes del pozol.

Finalmente se realizó el estudio para determinar la capacidad de adherencia de las cepas a las células epiteliales, en el cual se encontró que todas son francamente positivas, con excepción de la cepa 56 (*Streptococcus sp.*), se observó la adherencia de un número bajo de células, que no cumple con el requisito mínimo de 10 bacterias por célula para considerar positiva la prueba.

De acuerdo con los resultados obtenidos en general las cepas 11 (*Streptococcus sp.*) y 49 (*Streptococcus sp.*) son las que poseen un mayor potencial probiótico, seguidas de las cepas 6 (*Weissella paramesenteroides*) y 73 (*Leuconostoc pseudomesenteroides*); sin embargo no se pueden dejar a un lado las otras cepas ya que no son los únicos criterios de selección que se consideran para definir que son probióticas.

En conjunto, los resultados obtenidos comprueban la hipótesis planteada, pues se demostró que existen bacterias potencialmente probióticas dentro de la colección de bacterias ácido-lácticas obtenidas del pozol de Villahermosa, Tabasco.

---

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- » American Academic of Microbiology, (2005), Probiotic Microbes: The Scientific Basis, American Society For Microbiology, EUA.
- » Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., et al., (1999), Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations, Applied and environmental microbiology, 65 [12], (5464-5473).
- » Alcántara, A. T., (2009), Bebidas Fermentadas, recuperado el 15 de febrero de 2009, del sitio web:  
<http://sepiensa.org.mx/contenidos/fermentaciones/bebidas/fermenta3.htm>
- » Alvírez-Morales, A., González-Martínez, B., Jiménez-Salas, Z., (2002), Tendencias en la producción de Alimentos: Alimentos Funcionales, Revista Salud Pública y Nutrición, 3 (3).
- » Ando, T. & Oi R., (1994), Functions of the digestive tract, En A. Hosono & Y. Nakasawa (Eds.), Functions of fermented milk challenges for the health sciences, (pp 191-216), EUA, Elsevier applied science.
- » Ben Omar, N. & Ampe, F., (2000), Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol, Applied and environmental microbiology, 66 [9], (3664-3673).
- » Cabeza, H. E., (2005), Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos starter para la industria láctea y cárnica, Universidad de León, España.

- 
- » Callen, J. C, (2000), *Biología celular. De las moléculas a los organismos*, (pp 320-321), Francia, CECSA
  
  - » Cañas-Urbina, A.O., Barzana-García, E., David-Owens, J. & Wachter-Rodarte, C. (1993), La elaboración del pozol en los Altos de Chiapas, *Ciencia* 44, 219-229.
  
  - » Carr, J.F., Chill, D., Maida, N.,(2002), The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey, *Critical Reviews in Microbiology*, 28 (4): 281-370.
  
  - » Charalampopoulos, D., Pandiella, S. S. & Webb, C., (2001), Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates, *Journal of Applied Microbiology*, 92, 851-853.
  
  - » Charteris, W. P., Kelly, P.M., Morelli, L. & Collins, J.K., (1998), Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species, *Journal of food protection*, 61 (12), 1636-1643.
  
  - » Donohue, D.C., Salminen, S. & Marteau, P., (1998), Safety of probiotic bacteria. En S. Salminen y A. von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Funtional Aspects* (pp 369-381), EUA, Marcel Dekker, Inc.
  
  - » Dunne, C., O'Mahony, I., Morphy, L., et. al, (2001), In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 386S-392S .

- 
- » Du Plessis, H.W., Dicks, L.M.T., Preotrius ,I.S., Lambrechts, M.G., du Toit M. (2004). Identification of lactic acid bacteria isolated from South African Brandy base wines, *International Journal of Food Microbiology*, 91, 19-29.
  - » Early, R., et. al,(2000), *Tecnología de los productos lácteos*, 2a. ed., España, Editorial Acribia.
  - » Encuesta nacional de nutrición, 1999.
  - » Escalante, A., Wachter C. & Farrés A., (2001), Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis, *Journal of Food Microbiology*, 64, 21-26.
  - » Felten, A., Barreau, C., Bizet, C, et. al, (1999), *Lactobacillus* species identification, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status, *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (3), 729-733.
  - » Flores-Ramírez, E., Pozol: Una Bebida Fermentada Tradicional de México, en línea, Internet 12 de febrero de 2009, disponible en [www.cienciorama.unam.mx](http://www.cienciorama.unam.mx)
  - » Gilliland, S. E. & Speck, M. L., (1976), Deconjugation of bile acids by intestinal Lactobacilli, *Applied and Environmental Microbiology*, 33 (1), 15-18.
  - » Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Barakat, S., gauthieri, L., Salminen, S., (1992), Survival of Lactobacillus species (strain GG) in human gastrointestinal tract, *Dig. Dis Sci*, 37, 121-128.

- 
- » Gómez-Zavaglia A., Koctubinski G., Pérez, Pablo & De Antoni G., (1998), Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation, *Journal of Food Protection* 61, 865-873.
  - » Horn, R., Lavalley, J. & Robson, H., (1992), Susceptibilities of members of the *Bacteroides fragilis* group to 11 antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, 2051-2053.
  - » Igimi, S., Ruy, C.H., Park, S.H., Sasaki, Y. & Kumagei, S, (1996), Transfer of conjugative plasmid pAm $\beta$ 1 from *Lactococcus lactis* to mouse intestinal bacteria, *Letters in Applied Microbiology*, 23, 31-35.
  - » Iñiguez-Palomares, C. & Acedo-Felix, A., (2006), "Mecanismos de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de Bifidobacterias", *Revista Salud Pública y Nutrición*, 7 (2).
  - » Kleeman, E. G. & Klaenhammer, R.K., (1982), Adherence of *Lactobacillus* species to Human Fetal Intestinal Cells, *Journal of Dairy Science*, 65 (11), 2063-2069.
  - » Kostinek, M., Specht, I., Edward, V.A., Pinto, C., et. al (2007) Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures *International Journal of Food Microbiology*, 114, 342-35.
  - » Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R. & Huis In't Veld, J.H.J, (1997), Survival of Lactic Acid Bacteria in a Dynamic Model of the Stomach and Small

- 
- Intestine: Validation and the Effects of Bile, *Journal of Dairy Science*, 80 (6), 1031-1037.
- » Mattila-Sandholm, T., Mättö, J. & Saarela, M., (1999), Lactic Acid Bacteria with health claims-interactions and interferens with gastrointestinal floral, *Biotechnology and food Research*, 9, 25-35.
  - » Mattila-Sandholm, T., Blum, S., Collins, J.K., et. al, (1999), Probiotics: towards demonstrating efficacy, *Trends in Food Science and Technology*, 10, 393-399.
  - » Mejía-Rodríguez J.A., Chacón-Rueda Z., Guerrero-Cárdenas, B., et. al, (2007), "Obtención de cepas de *Lactobacillus*. Caracterización In-Vitro como potenciales probióticas", *Revista Científica*, 17, 178-185.
  - » Mendoza-Jönsh, E., (2006), Caracterización química de extractos de *Geranium* sp. que interfieren en la adherencia localizada de *E. coli* a células HEp-2, Tesis, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
  - » Morelli, L., Sarra, P. G. & Botazzi, V, (1988), In vivo transfer of pAM $\beta$ 1 from *Lactobacillus reuteri* to *Enterococcus faecalis*, *Journal of Applied Bacteriology*. 65, 371-375.
  - » Moser, S. A. & Savage, D. C., (2001), Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salt are unrelated properties in *Lactobacilli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (8), 3476-3480.
  - » NCCLS. 1984. National Comittee for Clinical Laboratoy Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests (approved

- 
- standard M2-A4) Villanova PA. National Comitte for Clinical Laboratory Standard.
- » Nousiaunen, J. & Setälä, J., (1998), Lactic Acid Bacteria as Animal Probiotic. En S. Salminen y A. von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Funtional Aspects* (pp 437-464), EUA, Marcel Dekker, Inc.
  - » O'Sullivan, D.J, (2006), Primary Source of Probiotic Culture. En I. Goktepe, V. K. Juneja, M. Ahmedna (Eds.), *Probiotics in Food Safety and Human Health*, (pp. 91-107), EUA, Taylor & Francis Group.
  - » Pascual L.M., Daniele, M.B., Pájaro, C. & Barberis, L., (2006), "Lactobabillus species isolated from vagina: identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance", *Contraception*, 73, 78-81.
  - » Prado, F.C., Parada L.J., Pandey, Ashok, Soccol, R. C. (2007), Trends in non-dairy Probiotic Beverages, *Food Research International*, 41, 111-123.
  - » Puupponen-Pimiä, R., Aura, A.M., Mattila-Sandholm, T., et.al, (2002), Development finctional ingredients for gut health, *Trends in food science and technology*, 13, 3-11.
  - » Rivera-Noriega, A., (2001), Efecto de la acción de microorganismos amilolíticos en la fermentación del pozol, Tesis, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
  - » Sainz, T., Wacher C., Espinoza, J., et. al, (2001), Survival of characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food, *Journal of Food Microbiology*, 71,169-176.

- 
- » Salminen, S., Deighton M. A., et. al, (1998), Lactic Acid Bacteria in Health and disease. En S. Salminen y A. von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Funtional Aspects* (pp 211-242), EUA, Marcel Dekker, Inc.
  - » Suskovic, J., Brkic, B., Matosic, S., Maric, V.1997. *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain. *Milchwissenschaft* 52:430-435
  - » Taranto M., Médici M. & Font de Valdez G., (2005), “Alimentos Funcionales Probióticos”, *Química viva*, 1, 28-31.
  - » Vijendra, M. & Prasad D. N, (2005), “Application of in Vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics”, *Journal of Food Microbiology*, 103, 110-112.
  - » Vizoso M. G., Franz Charles M.A.P., Schillinger, U. & Holzapfel, W. H, (2006), “*Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products”, *International Journal of Food Microbiology*, 109, 205-214.
  - » Wacher- Rodarte, C. (1993), Alimentos y bebidas tradicionales. En García-Garibay, M., Quintero-Ramírez, R. López-Munguía (Eds.), *Biotecnología Alimentaria* (pp. 313-349), México, Limusa.
  - » Wacher, C., Cañas, A., Barzana, E, et. al, (2000), “Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations”, *Journal of Food Microbiology*, 17, 251-256.
  - » Whittenbury, R., (1963), “The use of Soft Agar in the Study of Conditions Affecting the Utilization of Fermentable Substrates by Lactic Acid Bacteria”, *Journal of General Microbiology*, 32, 375-384.

---

## 8. ANEXO 1

### MEDIOS Y SOLUCIONES:

#### Agar MRS

El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas.

- 10g/L Proteosa peptona N° 3
- 8g/L Extracto de carne
- 4g/L Extracto de levadura
- 2g/L Glucosa
- 1ml Monoleato de sorbitán
- 2g/L Fosfato dipotásico
- 5g/L Acetato de sodio
- 2g/L Citrato de amonio
- 0.2g/L Sulfato de magnesio
- 0.05g/L Sulfato de manganeso
- 13g/L Agar
- pH final:  $6.4 \pm 0.2$

Suspender 64 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

### **Agar Glucosa**

- 0.5g/100mL de extracto de carne
- 0.5g/100mL de peptona
- 0.5g /100mL de extracto de levadura
- 0.05mL/100mL de Tween 80
- 1.5%(m/v) de agar bacteriológico
- 0.009%(m/v) de sulfato de manganeso monohidratado
- 0.5% (m/v) de glucosa.

Se esteriliza el medio sin glucosa en autoclave (121°C por 15 min.), posteriormente agregar la glucosa esterilizada por filtración con sistema Millipore (membrana de 0.45µm) en el medio ya estéril y se verter en cajas Petri desechables.

**Agar glucosa con dióxido de manganeso**

Se prepara de la misma manera que el anterior, solo se le agrega 0.4% de dióxido de manganeso, y se vierte una pequeña capa sobre el otro agar ya solidificado.

**Agua peptonada al 0.1%:**

- 0.01g de peptona bacteriológica
- 100 ml de agua destilada

Disolver la peptona en el agua, y esterilizar a 121°C por 15 min.

**Solución electrolítica:**

- 6.2g/L NaCl
- 2.2g/L KCl
- 0.22g/L CaCl<sub>2</sub>
- 1.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>

Disolver las sales en agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min, y dejar enfriar.

**Jugo gástrico artificial:**

- 6.2g/L NaCl
- 2.2g/L KCl
- 0.22g/L CaCl<sub>2</sub>
- 1.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>
- 0.3% pepsina

Disolver las sales en agua destilada, esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min, dejar enfriar y ajustar el pH a 2.5 con HCl 5M. Agregar la pepsina, esterilizada por filtración con membrana de poro 0.45 µm.

**Secreción duodenal artificial:**

- 1.28g/L NaCl
- 0.239g/L KCl
- 6.4g/L NaHCO<sub>3</sub>
- 0.5% de sales biliares
- 0.1% de pancreatina

Disolver las sales (incluidas las sales biliares) en agua destilada, esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min, dejar enfriar y ajustar el pH a 7.2 con HCl 5M, posteriormente agregar la pancreatina filtrada en membrana con poro 0.45 µm.

**Medio MEM con Suero al 10% y Antibióticos**

- 4.69 g de MEM sólido
- 500 ml de agua desionizada estéril
- 5 ml de Glutamina 100x para que este al 1%
- 5 ml de mezcla de antibióticos a 100x para llegar al 1%
- 5 ml Bicarbonato de sodio pH 7.1, para que este al 1%
- Hepes poner 1 ml por cada 100 ml
- 50 ml de suero fetal bovino (SFB) para llegar al 10%

Disolver el medio MEM en el agua estéril, agregar el resto de los otros reactivos.

Esterilizar por filtración (Millipore) y dejar 24 horas en prueba de esterilidad.

**PBS**

- 8 g de NaCl
- 0.2 g de KCl
- 1.15 g de Fosfato de sodio dibásico
- 0.2 g de Fosfato de potasio monobásico

Disolver los reactivos en 800 ml de agua desionizada en agitación, ajustar a pH 7.2 y posteriormente aforar a 1000 ml. Coloca en frascos y esterilizar en autoclave 15 min a 121°C.

**Colorante GIEMSA**

- 1 g de colorante Giemsa
- 54 ml de glicerol
- 84 ml de metanol

Agregar el colorante al glicerol, agitar por 1 hora. Agregar el metanol a la mezcla anterior y seguir agitando por 1 hora. Filtrar en frasco ámbar y almacenar.

**Triptona al 1%**

- 1 g de triptona
- 100 ml de agua destilada

Disolver la triptona en el agua y colocar 3 ml en viales o tubos con rosca, esterilizar a 121°C por 15 min y dejar en prueba de esterilidad por 24 horas a 37°C.

**Solución salina 0.85%**

- 8.5 g de NaCl
- 1 L de agua destilada

Disolver el NaCl en el agua y colocar en viales, esterilizar a 121°C por 15 min.

**PUKS**

- 1L de agua desionizada estéril
- 8 g de NaCl
- 0.4 g de KCl
- 0.35 g de NaHCO<sub>3</sub>
- 0.336 g de EDTA

Disolver las sales en el agua, esterilizar por filtración por membrana con poro de 0.22 µm y envasar en frascos estériles. Poner a prueba de esterilidad durante 24 h a 37°C.