



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

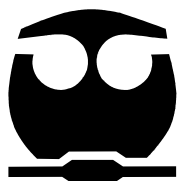
**CUANTIFICACIÓN DIFERENCIAL DE BACTERIAS LÁCTICAS
DEL POZOL A PARTIR DE CULTIVOS MIXTOS.**

T E S I S

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

PRESENTA

GIRASOL LISSET OLIVA GALICIA



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: DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE.

VOCAL: QFB. NORMA CASTELLANOS CHÁVEZ.

SECRETARIO: DRA. GLORIA DÍAZ RUIZ.

1er. SUPLENTE: DR. JORGE ABURTO ANELL.

2° SUPLENTE: QFB. MÓNICA HERAS ECHEVERRIA.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LAB. 324, EDIF. E, DEPARTAMENTO DE
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE.

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. GLORIA DÍAZ RUIZ.

SUSTENTANTE: GIRASOL LISSET OLIVA GALICIA.

ASESOR DEL TEMA

SUPERVISOR TÉCNICO

SUSTENTANTE

DRA. MARÍA DEL CARMEN
WACHER RODARTE

DRA. GLORIA DÍAZ RUIZ

GIRASOL LISSET OLIVA
GALICIA

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, proyecto 49687-2, por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por su apoyo para la realización de este proyecto, dentro del Subprograma 127 "*Formación básica en la investigación*".

AGRADECIMIENTOS

A las Dras. **Carmen Wachter** y **Gloria Díaz** por la dedicación, la confianza y el apoyo que me brindaron durante la realización de esta tesis.

A la Biol. **Teresa Flores** por sus consejos y amistad.

A todos los compañeros y amigos del laboratorio 324 del Depto. de Alimentos y Biotecnología del conjunto E de la Facultad de Química que me acompañaron durante este trayecto, gracias por su comprensión y consejo.

Y a todos aquellos que me brindaron apoyo incondicional a lo largo de mi formación profesional, mil gracias.



A mis padres y hermanas:

Gracias por el apoyo incondicional que me han brindado en el transcurso de mi vida; especialmente durante el trayecto de mi formación profesional.

Gracias por estar en los momentos difíciles y felices de mi vida.

Gracias por estar siempre allí.



La ciencia tiene una característica maravillosa, y es que aprende de sus errores, que utiliza sus equivocaciones para reexaminar los problemas y volver a intentar resolverlos, cada vez por nuevos caminos.

Ruy Pérez Tamayo.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	página
Índice general.....	i
Lista de tablas.....	v
Lista de figuras.....	vi
Resumen.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. El pozol y su elaboración.....	3
2.2. Microbiología del pozol.....	3
2.2.1. Bacterias acidolácticas (BAL)	6
Definición y características	
Clasificación	
Hábitat	
2.2.2. Principales géneros de bacterias ácido lácticas en el pozol.....	8
Género: <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Weissella</i> , <i>Leuconostoc</i> y <i>Lactococcus</i>	
2.2.3. Dos especies de BAL de interés en el proceso de fermentación del pozol.....	15
<i>Weissella confusa</i>	
<i>Streptococcus infantarius</i>	
2.3. Comunidades e interacciones microbianas en alimentos.....	18
2.4. Estudio de las comunidades microbianas.....	20

2.4.1. Técnicas microbiológicas.....	22
2.4.1.1 Medios de cultivo.....	22
Definición y clasificación	
Aplicación	
2.4.2. Técnicas moleculares.....	25
2.4.2.1 PCR en tiempo real	
Aplicación	
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	29
4.1. Objetivo general	
4.2. Objetivos particulares	
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. Microorganismos.....	30
5.2. Activación de cepas.....	30
5.3. Pureza de las cepas.....	30
Prueba de catalasa	
Tinción de Gram	
5.4. Desarrollo de un método para la cuantificación diferencial de las cepas....	32
5.4.1. Estrategias para la diferenciación de las cepas.....	32
Determinación del pH mínimo de crecimiento.....	32
a. En medio líquido	
b. En medio sólido	
c. Incorporación de indicadores de pH en el medio sólido MRS	
Determinación de la actividad amilolítica.....	34
Evaluación de la producción de polímero extracelular.....	35

5.4.2. Estrategias para cuantificación de las cepas.....	35
Cinética de crecimiento.....	35
Determinación de la cuenta en placa en el medio MASSW.....	36
Preparación de inóculo	
Preparación de la muestra y siembra	
Incubación	
Comparación de la cuenta en placa en MRS y MASSW	
Análisis estadístico	
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
6.1. Confirmación de la pureza de las cepas.....	40
6.2. Características de las cepas.....	40
6.2.1. pH mínimo de crecimiento.....	41
6.2.1.1. Incorporación del indicador púrpura de bromocresol en el medio MRS.....	46
6.2.2. Actividad amilolítica.....	48
6.2.3. Producción de polímero extracelular.....	50
6.2.3.1. Variación de la concentración de sacarosa en el medio MRS-A.....	53
6.3. Medio de cultivo diferencial MASSW.....	56
6.3.1. Composición y elaboración.....	57
6.3.2. Características de las cepas sobre el medio MASSW y sus condiciones óptimas de incubación.....	57
6.3.3. Condiciones óptimas de incubación para diferenciar a <i>Streptococcus</i> <i>infantarius</i> 25124 de <i>Weissella confusa</i> L9.....	59
6.4. Cuantificación diferencial de los microorganismos en el medio MASSW...	66

6.4.1. Cinética de crecimiento de cultivos puros.....	66
6.4.2. Comparación de las cuentas obtenidas en MASSW con las obtenidas en el medio MRS.....	68
6.4.3. Determinación de la cuenta mínima detectable de cada bacteria en cultivo mixto.....	70
7. DISCUSIÓN GENERAL.....	74
8. CONCLUSIONES.....	80
9. ANEXO A.....	81
A1. Preparación de medios de cultivo	
A2. Preparación de reactivos	
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE TABLAS

Número	Título	página
Tabla 1.	Clasificación de los medios de cultivo y su aplicación.	23
Tabla 2.	Mezclas de inóculos para determinar la cuenta en placa en el medio MASSW.	37
Tabla 3.	Parámetros de incubación del medio MASSW.	38
Tabla 4.	Descripción microscópica de las cepas.	40
Tabla 5.	Crecimiento de <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 y <i>Weissella confusa</i> L9 en caldo MRS a diferentes valores de pH inicial después de 24h de incubación a 30°C.	43
Tabla 6.	Crecimiento de <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 y <i>Weissella confusa</i> L9 a diferentes valores de pH inicial en agar MRS después de 24h de incubación a 30°C.	43
Tabla 7.	Indicadores ácido/base.	48
Tabla 8.	Determinación de la actividad amilolítica de <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 y <i>Weissella confusa</i> L9 en MRS-A a 30°C.	49
Tabla 9.	Resumen de las características evaluadas en <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 y <i>Weissella confusa</i> L9 para el diseño del medio de cultivo diferencial.	56
Tabla 10.	Descripción de <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 y <i>Weissella confusa</i> L9 a distintos tratamientos de incubación.	60
Tabla 11.	Número de colonias en los medios MRS y MASSW, y concentración de las cepas al tiempo cero de fermentación en los medios MRS-A (<i>Streptococcus infantarius</i> 25124) y MRS (<i>Weissella confusa</i> L9) a 30°C.	69
Tabla 12.	Número de colonias en los medios MRS y MASSW, y concentración de las cepas al tiempo 24h de fermentación en los medios MRS-A (<i>Streptococcus infantarius</i> 25124) y MRS (<i>Weissella confusa</i> L9) a 30°C.	69
Tabla 13.	Cuenta en placa de la mezcla de <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 (Si) y <i>Weissella confusa</i> L9 (Wc) en MASSW (2mL).	71
Tabla 14.	Cuenta en placa de la mezcla de <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 (Si) y <i>Weissella confusa</i> L9 (Wc) en MASSW (3mL).	72

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	página
Figura 1.	Efecto del pH en el crecimiento de <i>Weissella confusa</i> L9 y <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 en caldo MRS ajustado a diferentes valores de pH inicial.	44
Figura 2.	Crecimiento de <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 en caldo MRS ajustado a diferentes valores de pH.	45
Figura 3.	Crecimiento de <i>Weissella confusa</i> L9 en caldo MRS ajustado a diferentes valores de pH.	45
Figura 4.	Crecimiento de <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 y <i>Weissella confusa</i> L9 en agar MRS a pH 6.0 y 5.5.	46
Figura 5.	Prueba de actividad amilolítica para <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 y <i>Weissella confusa</i> L9 en medio MRS-A después de 24h a 30°C.	49
Figura 6.	Producción de polímero extracelular en el medio MRS por <i>Weissella confusa</i> L9 y <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 después de 24h a 30°C.	53
Figura 7.	<i>Streptococcus infantarius</i> 25124 en agar MRS con indicador púrpura de bromocresol a distintas proporciones de almidón/sacarosa después de 24h de incubación a 30°C.	55
Figura 8.	Medio MASSW sin inocular.	58
Figura 9.	Medio MASSW inoculado con <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 y <i>Weissella confusa</i> L9 después de 24h a 30°C.	59
Figura 10.	Crecimiento de <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 y <i>Weissella confusa</i> L9 en MASSW después de 24h a 30°C.	63
Figura 11.	Crecimiento de <i>Weissella confusa</i> L9 en MASSW después 48h a 30°C más 48h a 5°C.	63
Figura 12.	Crecimiento de <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 y <i>Weissella confusa</i> L9 en MASSW después 72h a 30°C.	63
Figura 13.	Medio MASSW inoculado con <i>Weissella confusa</i> L9 y <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 después de 72h a 30°C y 48h a 5°C (En cultivos puros).	65
Figura 14.	Medio MASSW inoculado con <i>Weissella confusa</i> L9 y <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 después de 72h a 30°C y 48h a 5°C (En mezcla).	65
Figura 15.	Cinética de crecimiento de <i>Weissella confusa</i> L9 en MRS a 30°C.	67
Figura 16.	Cinética de crecimiento de <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 en MRS-A a 30°C.	68
Figura 17.	Cuenta en placa del tiempo cero de fermentación de los medios MRS-A (<i>Streptococcus infantarius</i> 25124) y MRS (<i>Weissella confusa</i> L9) a 30°C en	

	el medio diseñado MASSW y el medio comercial MRS, incubados ambos a 48h a 30°C y 24h a 5°C .	70
Figura 18.	Cultivos en mezcla al 50%. (A) Volumen de mezcla 3MI (B) Volumen de mezcla 2mL. [<i>Streptococcus infantarius</i> 25124] / [<i>Weissella confusa</i> L9].	72
Figura 19.	Cultivos de la mezcla de <i>Weissella confusa</i> L9 y <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 a la concentración adecuada para su cuantificación (10^2 UFC/mL).	73

RESUMEN

El pozol es una bebida fermentada tradicional, elaborada a partir de masa de maíz nixtamalizado. La microbiota participante en la fermentación de la masa es natural por lo que resulta compleja. Estudios realizados sobre la microbiota indican que las bacterias ácido lácticas son el grupo predominante, destacando de entre ellas géneros como *Streptococcus* y *Weissella*. La predominancia de estos géneros supone interacciones entre la microbiota debido a la capacidad o incapacidad de hidrolizar el almidón, el carbohidrato principal en la masa. Es por eso que se han realizado estudios acerca de estas posibles interacciones, comenzando con los microorganismos *Weissella confusa* L9 y *Streptococcus infantarius* 25124. Sin embargo, la similitud fenotípica entre ellos en medios de cultivo disponibles para bacterias lácticas ha dificultado su cuantificación diferencial en cultivo mixto, necesaria para realizar un estudio detallado del papel que ambas desempeñan en la fermentación del pozol. De allí que el presente estudio haya tenido por objeto el desarrollo de un medio de cultivo diferencial para la cuantificación de *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9 a partir de cultivos mixtos, que pudiera ayudar más adelante al estudio de su interacción. El medio de cultivo diferencial diseñado, MASSW, se basó en el medio MRS, que es uno de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de bacterias lácticas. De éste medio MRS, se modificó la fuente de carbono y se le incorporó un indicador de pH; los cuales permitieron la aparición de características propias de las cepas (actividad amilolítica y/o acidez y/o producción de polímero extracelular) que favorecieron la distinción entre ellas; y por lo tanto, el desarrollo del nuevo medio de cultivo. La comparación realizada entre el

medio MRS y el medio MASSW, mostró que en el medio MASSW se recupera el mismo número de ambas bacterias que en el medio MRS, lo cual muestra que el nuevo medio no inhibe a las bacterias estudiadas. Así también, dicha comparación, mostró que la diferencia en la concentración de las cepas para poder diferenciarlas en el nuevo medio de cultivo no es mayor de un ciclo logarítmico.

1. INTRODUCCIÓN

En México, al igual que en muchos otros países del resto del mundo, existe una gran variedad de productos fermentados de origen tradicional. Uno de estos productos es el pozol. El pozol es una bebida ácida, no alcohólica obtenida a partir de la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado; consumida principalmente en el sureste de México y Guatemala desde tiempos prehispánicos como parte importante de la dieta de diferentes grupos étnicos (Ulloa *et al.* 1987).

El proceso fermentativo que da lugar a dicha bebida es natural, ya que no se añade ningún inóculo; lo que permite el desarrollo de comunidades microbianas complejas. Wachter-Rodarte (1995) y Ampe *et al.* (1999) mencionan una amplia variedad de microorganismos que ya han sido identificados y/o aislados de esta fermentación, entre los cuales están los hongos, levaduras, mesófilos aerobios, bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias no ácido lácticas (NBAL); siendo las bacterias ácido lácticas la microbiota activa y predominante en la masa fermentada de maíz. Asimismo, Ampe *et al.* (1999) destacan que los miembros más abundantes de las BAL son los géneros *Streptococcus* (entre el 25-50% de la microbiota), *Enterococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*.

De allí que estudios previos como los de Ben Omar y Ampe (2000) y Díaz *et al.* (2003), hayan enfocado su trabajo sobre los organismos dominantes. Los resultados de estos trabajos sugieren la existencia de interacciones entre los distintos géneros y biotipos de estos organismos. Para probar estas interacciones, se han realizado fermentaciones en sustratos estériles inoculados con cultivos puros y mixtos de

cepas seleccionadas. Sin embargo, ha resultado difícil la cuantificación de cada uno de los microorganismos cuando están en cultivo mixto, debido a que las colonias que forman son muy parecidas. Es por ello, que la diferenciación y cuantificación de los principales géneros de bacterias lácticas resulta de gran interés.

Ya investigaciones previas mencionan que la determinación cuantitativa y diferencial de los microorganismos presentes en los alimentos fermentados, así como también, en otro tipo de muestras, difícilmente puede ser analizada por los métodos tradicionales; lo que ha llevado a los investigadores a la búsqueda de nuevas metodologías. Sin embargo, con el presente estudio se muestra que la metodología tradicional aún resulta de gran utilidad y aún le resta mucho por aportar a la investigación microbiana; pues con base en los métodos tradicionales se ha desarrollado un medio de cultivo diferencial para las especies *Weissella confusa* L9 y *Streptococcus infantarius* 25124.

El medio de cultivo diferencial, denominado como MASSW, se ha elaborado con base en las características manifestadas por cada cepa en medios como MRS, MRS almidón o MRS sacarosa. El medio al estar compuesto por dos fuentes de carbono, almidón y sacarosa, en una proporción 90:10 por ciento, respectivamente; permite que *Streptococcus infantarius* 25124 exponga su producción de polímero así como su actividad amilolítica mientras que *Weissella confusa* L9 exhibe su incapacidad para hidrolizar almidón. El medio además, tiene incorporado un indicador de pH, púrpura de bromocresol, que hace posible la visualización de la disminución del pH del medio, como consecuencia de la actividad metabólica de las cepas, especialmente la de *Streptococcus infantarius* 25124.

2. ANTECEDENTES

2.1. El pozol y su elaboración.

El pozol es una bebida ácida no alcohólica, resultante de la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado; consumida principalmente en la región sureste de México (Tabasco, Chiapas) y Guatemala desde tiempos prehispánicos como parte importante de la dieta de diferentes grupos étnicos (Ulloa *et al.* 1987). El procedimiento de elaboración del pozol consiste en la limpieza del maíz, la cocción alcalina del grano y su lavado, el remojo y la molienda; obteniéndose de esta última la masa que es repartida en pequeñas bolas en hojas de plátano o bolsas de plástico, con las que una vez envueltas se deja fermentar a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo variable, que puede ser desde varias horas hasta días; para luego resuspender la masa fermentada en agua para obtener la bebida de sabor ácido, a la que se le puede adicionar azúcar, sal, miel, chiles secos o diversos tipos de saborizantes (Ulloa *et al.* 1987; Cañas *et al.* 1993). El proceso puede presentar algunas variaciones dependiendo de la región o clase social, pero básicamente consiste en lo mismo.

2.2. Microbiología del pozol.

Al igual que en otros alimentos fermentados (por ejemplo, el Ogi y kenkey de África) hechos a base de sustratos amiláceos como los cereales, la microbiota del pozol es compleja. Ya Wachter *et al.* (1993) han demostrado el desarrollo de esta microbiota compleja en el proceso fermentativo del pozol, resaltando el origen de ésta como

natural; esto debido a que no se incorpora ningún inóculo a la masa que da origen al pozol; sino más bien indican que la diversidad microbiana presente en dicha masa es aquella adquirida durante los procesos de remojo y molienda del maíz nixtamalizado que dan lugar a la obtención de ésta.

Los estudios realizados por Wachter *et al.* (1993) y por Nuraida *et al.* (1995) con técnicas de cultivo tradicional, indican que la microbiota del pozol está conformada por diversos grupos microbianos, entre los que destacan los hongos, levaduras, mesófilos aerobios y bacterias ácido lácticas (BAL), siendo ésta últimas el grupo dominante en la masa fermentada de maíz, y por lo tanto, también en la bebida.

En investigaciones posteriores efectuadas por Ampe *et al.* 1999; Ben Omar y Ampe, 2000; Escalante *et al.* 2001; y en las cuales se hace uso principalmente de técnicas moleculares (RAPD, DGGE, análisis de secuencias parciales o totales de ADNr 16S), se ha corroborado que las BAL constituyen la microbiota predominante del pozol, así como también, que éstas conforman entre el 90 a 97% de la microbiota activa del mismo y, que los miembros de los géneros *Streptococcus* (25-50% de la microbiota), *Enterococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* – todos ellos pertenecientes a las BAL- son los que se encuentran en forma más abundante y activa. De allí que el crecimiento de este grupo de bacterias y su abundancia - a lo largo de toda la fermentación - así como, el desarrollo de otras tantas especies no ácido lácticas, sugiriera la existencia de interacciones entre los distintos géneros y biotipos de la microbiota del pozol.

Hasta ahora muchas han sido las especies, tanto bacterianas como levaduras y fúngicas, que han sido identificadas del pozol (*Candida guilliermonddi* var *guilliermondi*, *Geotrichum candidum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium* sp., por Ulloa et al. (1987); *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactococcus raffinolactis* por Nuraida et al. (1995); *Bacillus subtilis*, *Acetobacter* sp., *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus pentosus* y *Weissella paramesenteroides* por Ampe et al. (1999); *Bacillus minimum*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Bifidobacterium minimum*, *Sphingomonas* sp., *Enterococcus sacharolyticus* y *Lactobacillus delbruecki* por Ben Omar y Ampe (2000); *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debariomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*, *Phoma glomerata*, *Phoma fimeti* y *Penicillium fellatanum* por Wachter et al. (2000); *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* y *Bacillus lentus* por Rivera (2001); *Clostridium* sp. por Escalante et al. (2001), diferentes serotipos de *E. coli* por Sainz et al. (2001); y *Streptococcus bovis*/*Streptococcus infantarius*, *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus* por Díaz et al. (2003). No obstante a ello, la predominancia de las BAL sobre algunas especies ha llevado a la realización de estudios más detallados de estas en el pozol. Es por ello que hasta hace poco tiempo, en la búsqueda por determinar la diversidad de las bacterias ácido lácticas amilolíticas y el papel que desempeñan durante la fermentación del pozol y con la diversidad microbiana en el mismo (Díaz et al. 2003) se determinó que *Streptococcus bovis* (actualmente *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*) es la especie dominante entre las cepas de bacterias lácticas amilolíticas del pozol; confirmándose nuevamente la profusión del género *Streptococcus* y la importancia de la actividad

amilolítica de las cepas de BAL para el resto de la microbiota (Ben Omar y Ampe, 2000).

2.2.1. Bacterias ácido lácticas (BAL).

Definición y características.

Hoy en día el papel que desempeñan las bacterias acidolácticas en un gran número de alimentos fermentados, como los hechos a base de cereales (maíz, sorgo, trigo, etc.), ha cobrado gran interés debido a los beneficios nutricionales y tecnológicos que aportan al alimento, de allí que el estudio del pozol y la relación con estas bacterias, no sea la excepción para darles la importancia que tienen.

El estudio de estas bacterias, principalmente enfocado a la industria de productos lácteos, data de hace algunos años. Estos estudios, que en la actualidad parte de ellos siguen estando vigentes, las definen como un grupo de bacterias gram positivo unificadas por un conjunto de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas (Axelsson, 1998). Con base en ello, la descripción clásica de las mismas es que son generalmente inmóviles, ácido tolerantes, no esporuladas, catalasa negativas, oxidasa negativas, generalmente nitrato reductasa negativa; y su capacidad de biosíntesis es débil, lo que explica su poliauxotropía para diversos aminoácidos, bases nitrogenadas, minerales, carbohidratos, vitaminas y ácidos grasos, pero también su metabolismo fermentativo: incapaces de sintetizar el núcleo hemo de las porfirinas, están normalmente desprovistas de citocromos y en consecuencia son incapaces para realizar cualquier respiración aerobia o anaerobia. La descripción

actual no sólo está enfocada en las características fenotípicas y bioquímicas, sino también, en la composición de su pared celular, el contenido de G + C en su ADN, la presencia de quinonas isoprenoides, la composición de los ácidos grasos y la movilidad electroforética de la lactato deshidrogenasa, entre otras características celulares (Axelsson, 1998).

Clasificación.

Si bien, la taxonomía clásica de las BAL en principio estuvo basada en las características fenotípicas y bioquímicas descritas por Orla-Jensen (1919); hoy en día las técnicas filogenéticas han permitido nuevas clasificaciones para los géneros que conforman a dicho grupo. Y conforme a esto último, Axelsson *et al.* (2004), han sugerido que el grupo de BAL está constituido de géneros bacterianos dentro del phylum Firmicutes, el cual abarca alrededor de 20 géneros, siendo los miembros principales: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*.

Una clasificación más de las BAL que comúnmente es considerada, está basada en la vía de fermentación de los carbohidratos que llevan a cabo los géneros pertenecientes al grupo. Esta clasificación divide a los géneros en dos grupos: a) *Bacterias homofermentativas*, producen más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa; b) *Bacterias heterofermentativas*, producen solamente 50% de ácido láctico y algunos otros productos, como ácido acético, etanol y CO₂.

Hábitat.

Ya desde los estudios realizados por Orla-Jensen (1919) era conocido que las BAL ocupaban una gran variedad de hábitats. Actualmente, se sabe que los nichos ecológicos de las BAL van desde alimentos (carnes maduradas, vegetales, frutas, bebidas y productos lácteos), cavidades de animales y humanos (tracto respiratorio, intestinal y genital) hasta aguas residuales y plantas de materiales. Por ejemplo, se ha reportado que algunas especies, como *Lactobacillus plantarum*, son capaces de crecer en diferentes ambientes y están asociadas a numerosos ecosistemas variando desde superficies de plantas hasta tractos digestivos de humanos (Kleerebezem, 2003); mientras que otras especies como *L. lactis* son menos ubicuas y parecen haberse adaptado a un nicho en particular, como una especie de planta o leche (Van Hylckama *et al.* 2006).

2.2.2. Principales géneros de bacterias acidolácticas en el pozol:

Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus, Weissella y Leuconostoc.

Género *Streptococcus*.

El género *Streptococcus* fue descrito a principios de 1884 por Rosenbach, y más tarde, Sherman (1937) lo dividió en cuatro grupos: los enterococos, los estreptococos 'lácticos', los estreptococos 'viridans' y los estreptococos 'pyogenicos'. La identificación y clasificación de los estreptococos, de acuerdo a las técnicas serológicas, se mantuvo durante largo tiempo hasta que surgieron nuevos datos fisiológicos y bioquímicos que permitieron a Jones (1978) ampliar y modificar la

propuesta inicial de Sherman. Jones mantuvo el nombre de los estreptococos 'pyogenic' y 'lactic' pero remplazo los nombres de 'virididans' y 'enterococci' por 'oral' y 'faecal', respectivamente; y añadió los grupos 'pneumococci', 'anaerobic' y 'otros' estreptococos. Posteriormente, estudios basados en el gen rRNA 16S permitieron modificar y clasificar nuevamente a los estreptococos en tres géneros distintos: *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* y *Lactococcus* (Vuyst y Vandamme, 1994).

Las especies del género *Streptococcus* son células cocoides o cocobacilos que forman pares o cadenas largas. No producen gas ni esporas y tienen requerimientos nutricionales complejos. Son anaerobias facultativas o aerotolerantes primordialmente, aunque ciertas especies requieren de CO₂ para su crecimiento. Algunas especies producen cápsulas, ácido hialurónico o un tipo específico de polisacárido. Crecen, generalmente, entre 20-42°C. *Streptococcus pyogenes* es la especie típica del género (Gobbetti y Corsetti, 1999).

Los estreptococos constituyen parte de la microbiota patógena de humanos y animales (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*); o bien, están relacionados con tecnología alimentaria como *Streptococcus thermophilus*. Se les ubica en boca (*Streptococcus mutans*) e intestinos de humanos y animales (*Streptococcus faecalis*), en leche bronca y productos lácteos y en plantas (Axelsson *et al.* 2004).

Género *Enterococcus*.

La historia de los enterococos comenzó cuando Thiercelin (1899) utilizó por primera vez el término para indicar el origen intestinal de un diplococo gram positivo. El nuevo género *Enterococcus* fue propuesto por Thiercelin y Jouhaud en 1903. Más tarde, Andrewes y Horter (1906) cambiaron el nombre de “entérocoque” propuesto por Thiercelin por el de *Streptococcus faecalis*, pues se asumía que esta cepa aislada de un paciente con endocarditis provenía del intestino humano. En estudios posteriores, basados en técnicas serológicas, se colocó a los enterococos como un grupo inmerso en el género *Streptococcus* inicialmente; sin embargo, cuando Schleifer y Kilpper-Bälz (1984) propusieron que los enterococos deberían de ser separados del género *Streptococcus*, el género *Enterococcus* fue establecido oficialmente (Doming *et al.* 2003).

Según los criterios fisiológicos de Sherman (1937), los enterococos son capaces de crecer a temperaturas entre 10 y 45°C, a pH de 9.6 y en presencia de 6.5% (w/v) de NaCl, son bacterias homofermentativas y anaerobias facultativas.

El hábitat natural de la gran mayoría de especies de enterococos es el tracto gastrointestinal de humanos y animales; pero puede también encontrarse en el suelo, agua, plantas, productos lácteos y alimentos de origen animal. No son considerados particularmente importantes en tecnología alimentaria, sin embargo, juegan un papel dominante en varios productos fermentados gracias a su habilidad para sobrevivir en el medio ambiente y su capacidad de resistencia a la temperatura,

lo cual permite su distribución casi ubicua. Su importancia radica en su procedencia de origen entérico, lo que los hace útiles como indicadores de contaminación fecal en la industria alimentaria, o bien, como posibles portadores patogénicos (por ejemplo, *Enterococcus faecalis*) lo que es de interés en salud pública (Reuter, 1992).

Género *Weissella*.

El género *Weissella* fue nombrado por Norbert Weiss, un microbiólogo alemán conocido por sus cuantiosas contribuciones a las bacterias ácido lácticas. La filogenia de las bacterias que integran al género *Weissella* fue aclarada por Collins *et al.* (1990) cuando realizaron un análisis filogenético que comparó las secuencias del gen rRNA 16S de algunas especies del grupo de los leuconostoc y algunos lactobacilos heterofermentativos parecidos a ellos. Más tarde, otros estudios de análisis comparativo de secuencias rRNA 16S y rRNA 23S realizados por el mismo Collins *et al.* (1993) y Martínez *et al.* (1993) revelaron que los organismos unificados en el análisis previo, en efecto, representaban un nuevo género, en el cual se agrupaba a *Leuconostoc paramesenteroides* y otros lactobacilos heterofermentativos: *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor* y *Lactobacillus viridescens*; y que además se proponía la adición de una nueva especie al género, *Weissella hellenica*. Actualmente, se han incorporado más especies al género, conformándolo por un total de doce especies: *Weissella paramesenteroides*, *Weissella confusa*, *Weissella halotolerans*, *Weissella kandleri*, *Weissella minor*, *Weissella viridescens*, *Weissella hellenica*, *Weissella thailandensis* (Tanasupawat *et al.* 2000), *Weissella cibaria* ó *kimchii* (Björkroth *et al.*

2002; Choi *et al.* 2002; Ennahar y Cai, 2004), *Weissella koreensis* (Choi *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002), *Weissella soli* (Magnusson *et al.* 2002) y *Weissella ghanensis* (De Bruyne *et al.* 2008), y aún sin confirmar, *Weissella hanii* (Jeong *et al.* 2002) la cual se encuentra listada en la página de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomihome.html/>, último acceso julio 2009) como probable nueva especie.

Las especies del género *Weissella* son no móviles, forman pares o cadenas cortas de bacilos cortos con extremos afilados o cocos de forma aislada, heterofermentativas obligadas, productoras de los isómeros D o DL del ácido láctico, no formadoras de endosporas, no producen citocromos, son quimiorganotrofas y acidúricas. Crecen desde 15°C pero no a 45°C (con excepción de algunas cepas de *W. confusa*). Algunas cepas de algunas especies hidrolizan la arginina. El peptidoglucano de la pared celular está conformado por lisina, el puente de interpeptido contiene alanina o serina y alanina, como constituyentes típicos. El contenido de guanina-citosina del DNA es de 37-47% mol. La especie típica es *W. viridescens* (Collins *et al.* 1993).

Las especies de *Weissella* han sido aisladas de diversas fuentes: hierba (Villani *et al.* 1997), pescado y productos cárnicos (Tanasupawat *et al.* 2000), sangre y heces humanas (Olano *et al.* 2001; Walter *et al.* 2001), contenidos intestinales de patos (Kurzat *et al.* 1998), y principalmente, de alimentos fermentados de vegetales y granos (Ampe *et al.* 1999; Collins *et al.* 1993).

Género *Leuconostoc*.

El género *Leuconostoc* fue descrito por vez primera por Van Tieghem en 1878. Al inicio, la mayoría de las investigaciones respecto al género enfocaban su interés en la determinación de sabor que impartía en las fermentaciones en las que participaba más que en su taxonomía, así que fue hasta el estudio realizado por Garvie (1960) donde se dividió al género en cuatro especies: *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc dextransicum* y *Leuconostoc mesenteroides*.

El género *Leuconostoc* fue definido inicialmente como un grupo diverso de cocos gram positivo, catalasa negativa, heterofermentativo, productor únicamente de D-lactato de la fermentación de glucosa y no productor de amonio a partir de arginina; el cual compartía varias características en común con el género *Lactobacillus* y otras bacterias acidolácticas. Sin embargo, como la diferenciación por criterios fenotípicos de las especies de leuconostocs de los lactobacilos heterofermentativos, comúnmente resultaba muy complicada, más adelante se determinó mediante estudios de secuencias de los genes rRNA 16S, rRNA 23S y rpoC (gen que codifica para la subunidad-β de la RNA polimerasa dependiente de DNA) que el género *Leuconostoc* comprendía tres líneas genéticamente distintas: el género *Leuconostoc sensu stricto*, el grupo de *Leuconostoc paramesenteroides* y las especies de *Leuconostoc oenos*; los cuáles más tarde serían clasificadas como tres géneros distintos: *Leuconostoc*, *Weissella* y *Oenococcus*, respectivamente (Lonvaud-Funel, 1999).

Las especies del género *Leuconostoc* son anaerobios facultativos heterofermentativos (Garvie, 1986), asporogenas, no móviles y requieren de un medio rico de factores complejos de crecimiento y un pH mayor o igual a 4.5. Algunas de las cepas, como *Leuconostoc mesenteroides*, son productoras de polisacáridos, los cuales son responsables de la textura de varios productos alimenticios (pulque, productos cárnicos, sauerkraut, y remolacha azucarera).

El hábitat natural de los leuconostoc son los vegetales, de allí que sea el género más abundantemente aislado en este tipo de productos, y la especie predominante sea *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Aunque también se les ha aislado de frutas, productos lácteos y cárnicos (Stiles y Holzapfel, 1997). Azar *et al.* (1977) señalaron que su presencia asociada a lactobacilos podría ser considerada muy importante en la fermentación de la masa de trigo requerida para elaborar el pan iraní “*sangak*” debido a la producción de compuestos que imparten un sabor agrio en ella.

Género *Lactococcus*.

(lac.to.co'cus, L.n. *lac*, lactis de leche, Gr.n. *coccus*, un grano o baya, M.L. masc.n. *Lactococcus* leche coccus). El género *Lactococcus* fue propuesto por Schleifer (1985). La mayoría de sus miembros pertenecieron a los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus* (Batt, 1999).

Son bacterias de forma cocoide, crecen en pares ó cadenas cortas, homofermentativas, no móviles. No forman esporas. Su crecimiento óptimo es a

30°C, pueden crecer a 10°C pero no a 45°C. No crecen en 0.5% de NaCl (Batt, 1999).

Los lactococos se han aislado de diversas plantas: maíz, pepinos, frijoles, coles, lechuga, chícharos, trigo, papas, trébol, hierba, calabazas y melón; sin embargo, a algunas especies, como *Lactococcus lactis*, se les reconoce como hábitat los productos lácteos a pesar de ser aislados de vegetales. No se les ha encontrado en materia fecal ni en suelos (Sandine *et al.* 1972).

2.2.3. Dos especies de BAL de interés en el proceso de fermentación del pozol.

Weissella confusa.

(L. part. fem. adj. *confusa*, confuso, alusión por su confusión con *Leuconostoc*). Se sabe que las especies del género *Weissella* tienen una gran diversidad de hábitats. *Weissella confusa*, no siendo la excepción, se le ha encontrado en hábitats tales como: alimentos fermentados, azúcar de caña, hojas de plátano, ajos, jugo de zanahoria, y poco frecuente, en leche bronca y aguas residuales (Klander y Weiss, 1984; Ampe *et al.* 1999; Paludan-Muller *et al.* 1999). Pero además, se ha aislado de muestras de animales y humanos de origen clínico como: heces de niños (Green *et al.* 1990), transplantes de hígado (Green *et al.* 1991), fluidos peritoneales y paredes abdominales (Riebel y Washington, 1990), especímenes con necropsia (Björkroth *et al.* 2002; Vela *et al.* 2003), un absceso de pulgar (Bantar *et al.* 1991) y sangre (Olano *et al.* 2001), lo que sugiere que el hábitat de *Weissella confusa* no está restringido a fuentes alimentarias. Esto ha permitido conocer, haciendo uso de técnicas

moleculares (empleando al gen rRNA 16S, ribotipos *Hind* III y *Clal* y análisis numérico de proteínas de pared celular) y análisis bioquímico en los aislados de *Weissella confusa* obtenidos de diversas fuentes, que *Weissella confusa* posee una similitud de hasta un 99.2% con la especie *Weissella cibaria* (Björkroth *et al.* 2002); y que además, *Weissella confusa* únicamente puede diferenciarse por la ausencia de serina (L-Lys-L-Ala-L-Ala (peptidoglucano tipo A3 α)) en el puente interpéptido de la pared celular (Collins *et al.* 1993) y, mediante pruebas bioquímicas, por la capacidad de producción de ácido a partir de ribosa y galactosa pero no de L-arabinosa (Björkroth *et al.* 2002). Ahora se sabe que *Weissella confusa* pudiera ser potencialmente un patógeno oportunista (Vela *et al.* 2003), por lo que su presencia, principalmente en alimentos, se sugiere que sea estudiada más a detalle.

Streptococcus infantarius.

(in.fan.ta'ri.us L. adj. *infantarius* relacionado a infantes, la fuente de la cepa tipo). Los estudios de hibridación de DNA:DNA desarrollados por Farrow *et al.* (1984) entorno al complejo heterogéneo “*S. bovis* / *S. equinus*”, definieron que éste se conformaba por seis grupos (1,2,3,4,5 y 6) con homología genética entre un 40-60%. Años más tarde, análisis filogenéticos e hibridaciones DNA:DNA efectuados por Bouvet *et al.* (1997) en cepas, provenientes de heces de bebés y productos alimenticios, relacionadas con el grupo 4 establecido por Farrow *et al.* (1984), indicaron que éstas cepas se distinguían de las especies *S. bovis* y *S. equinus* por su incapacidad para producir *B*-glucosidasa e hidrolizar esculina por lo que conformaban una nueva genespecie y propusieron para ellas el nombre de *Streptococcus infantarius*.

Posteriormente, Schlegel *et al.* (2000) a través de estudios bioquímicos, de ribotipificación e hibridación DNA:DNA en cepas de origen humano y alimenticio, describieron una nueva especie la cual correspondía a la propuesta años antes por Bouvet *et al.* (1997), y además, delinearon dos subespecies diferentes: *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* y *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*; mismas que serían reclasificadas y renombradas posteriormente por Poyart *et al.* (2002) mediante el uso del gen *sodA*, que codifica para la superóxido dismutasa. Hace poco tiempo, con la descripción de nuevas especies adicionales al complejo heterogéneo, Schlegel *et al.* (2003) han propuesto revalorar la clasificación de Farrow *et al.* (1984) señalando que se requieren de métodos polifásicos para establecer una clasificación o identificación bacteriana.

La descripción asignada a las especies *Streptococcus infantarius* por Schlegel *et al.* (2000), las señala como cocos gram positivos, agrupados en pares o cadenas cortas, catalasa negativa. Con crecimiento en MRS, sin producción de gas. No producen exopolisacáridos en medio con 5% de sacarosa. Resultan positivas para las pruebas Voges-Proskauer y leucina aminopeptidasa. Producen ácido de lactosa, maltosa y sacarosa, pero hay resultados variables con glucógeno, pululano y almidón.

Recientemente, un estudio realizado a un producto lácteo fermentado (*Gariss*) ha revelado que la subespecie *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* es un patógeno potencial, y que dicho fermentado, puede considerarse como hábitat para la subespecie (Abdelgadir *et al.* 2008). En años pasados, la patogenicidad de la subespecie *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* ya se había tomado en

cuenta por Schlegel *et al.* (2000) debido a su alta incidencia en aislamientos bacterianos en sangre y endocarditis; y por Biarc *et al.* (2004) al detectar propiedades carcinogénicas en sus proteínas. Sin embargo, en este estudio de Abdelgadir *et al.* (2008) se le ha considerado ya como tal no sólo por dichos antecedentes, sino además, por la detección del gen *gtf* en el 77% de las especies analizadas en su investigación, siendo de interés este último por conocerse que codifica para la glucosiltransferasa, lo que lo considera como factor de virulencia en infecciones sistémicas, así como también, responsable de la biosíntesis de la cápsula productora de polisacárido extracelular (Heraief *et al.* 1982). El hábitat de los *Streptococcus infantarius* no ésta restringido a septicemias humanas sino también se les ubica en productos alimenticios, por lo cual el considerarlos como inóculos en productos alimenticios reconocidos como su hábitat resulta cuestionable.

2.3. Comunidades e interacciones microbianas en alimentos.

Bajo condiciones naturales, un microorganismo rara vez existe aislado. Aún cuando una célula microbiana única sea exitosamente aislada en el laboratorio, ésta se multiplicará y formará un grupo (clon) de individuos similares, llamado población. Por lo tanto, en un ambiente natural, numerosas poblaciones de diferentes características coexisten. Estas poblaciones microbianas que viven juntas en un lugar en particular, denominado hábitat, interactúan entre sí para formar una comunidad. Las interacciones que se dan en la comunidad pueden ser positivas (comensalismo, sinergismo y mutualismo) y negativas (competición y amensalismo), o bien, positivas y negativas (Atlas *et al.* 1993).

El estudio de las comunidades microbianas en los alimentos y las interacciones que hay entre ellas tuvo sus cimientos desde 1857, cuando Pasteur estudió un inóculo mixto en un medio líquido. Sin embargo, la aplicación de los principios ecológicos a la microbiología alimentaria no cobró mayor importancia hasta la década de los años 30 y 40, cuando el inglés Haines estudió la flora alterante de los alimentos proteicos frescos y la holandesa Westerdijk acuñó el término “*asociación microbiana*” para la microbiota de alteración característica de un determinado alimento (Mossel, 2003).

Hasta la fecha, se han llevado a cabo una gran variedad de estudios referentes a las interacciones en comunidades microbianas y los beneficios o perjuicios que éstas conllevan en un alimento (Addis *et al.* 2001; Rojas *et al.* 2003; Boutrou *et al.* 2006; Folkenberg *et al.* 2006; Mendoza *et al.* 2009).

Un campo ampliamente estudiado es el de las interacciones de bacterias ácido lácticas entre sí ó con otros grupos microbianos (levaduras, hongos, patógenos, etc.) en diversos alimentos, principalmente aquellos de tipo lácteo. De estas investigaciones se han descrito mayoritariamente interacciones positivas, como el caso reportado recientemente por Bergamini *et al.* (2009), en el cual un cultivo mixto de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* y *Bifidobacterium lactis* permitió la obtención de un mayor número de compuestos nitrogenados de menor tamaño, y por tanto, se dio la aceleración de la maduración en un queso semiduro como consecuencia de un efecto sinérgico en el crecimiento de las cepas y su actividad proteolítica. O bien, como el caso puntualizado por Folkenberg *et al.* (2006) acerca de las interacciones entre cepas de *Streptococcus*

thermophilus productoras de exopolisacáridos y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en yogurt, las cuales resultaron benéficas para las propiedades reológicas del mismo. Pero también existen casos reportados de interacciones negativas, por ejemplo, el revisado por Vinderola *et al.* (2002), en donde resaltan no solo los beneficios que se obtienen de un cultivo mixto de cultivos iniciadores de BAL con bacterias probióticas usado para fermentar productos lácteos; sino también, el antagonismo entre ellas. De esto indican, que las interacciones encontradas en el estudio (estimulación, disminución e inhibición de crecimiento y ningún efecto) permitirán seleccionar las mejores combinaciones entre cepas para optimizar el proceso de elaboración de productos lácteos y su almacenamiento. Así también, existen estudios de interacciones de BAL con microorganismos patógenos de alta incidencia en alimentos, como el citado por Schellenberg *et al.* (2006) y Charlier *et al.* (2009) que describen nuevos métodos y perspectivas para la comprensión de la exclusión competitiva entre *Staphylococcus aureus* y cepas de BAL.

2.4. Estudio de las comunidades microbianas.

En la búsqueda por determinar la dinámica de la comunidad microbiana durante la producción del pozol Ampe *et al.* (1999) así como Ben Omar y Ampe (2000) indicaron que el pozol al ser una matriz alimentaria proveniente de una fuente natural permite el desarrollo de comunidades microbianas complejas, y por ende, interacciones entre ellas; corroborando lo que en años pasados Mossel (2003) señalara acerca de los alimentos frescos o naturales, es decir, que suelen contener una población microbiana mixta y que la velocidad de crecimiento de cada organismo

de esta población dependía de muchos factores (intrínsecos, extrínsecos, de procesado o tratamiento e implícitos), los cuales influenciarían de modo notable el carácter de la población que finalmente predominara en el alimento. Así también, sugieren que los estudios de ecología microbiana, no sólo del pozol sino de cualquier otro alimento, requieren del uso conjugado de métodos dependientes e independientes de cultivo, como así también lo plantearan más tarde Miambi *et al.* (2003) para un estudio de masa fermentada de yuca.

Actualmente, se buscan nuevas metodologías que permitan un estudio más detallado, tanto cualitativo como cuantitativo, de las comunidades microbianas; pues aún no existe un método único que permita tal estudio. Hasta ahora se han combinado, en general, las técnicas moleculares (DGGE, secuenciación del gen ribosomal 16S, etc.) con las técnicas tradicionales de cultivo (medios de cultivo diferenciales y selectivos), como así lo han detallado Ampe *et al.* (1999); Ben Omar y Ampe (2000); Díaz *et al.* (2003) para el caso específico del pozol y sus BAL. O bien, como en otras investigaciones, se han empleado nuevas metodologías; como la llevada a cabo por Schellenberg *et al.* (2006) para conocer la comprensión de las interacciones entre BAL y una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, en donde utilizaron técnicas de inmunofluorescencia, citometría de flujo y microscopía fluorescente, en conjunto también, con las técnicas de cultivo tradicional. Y aunque en dicho estudio se señala que éstas técnicas empleadas pueden sustituir a las técnicas tradicionales de cultivo debido al tiempo mínimo que se requiere para obtener resultados equivalentes (cuantificación, identificación, etc.), se aclara que la

aplicación combinada de diversas técnicas favorece el estudio de la ecología microbiana.

2.4.1. Técnicas microbiológicas.

El estudio de las comunidades microbianas durante mucho tiempo estuvo basado en el uso de las técnicas microbiológicas, sin embargo, en años recientes se ha descrito que éstas resultan insuficientes para dicho estudio ya que se ha determinado que más del 90% de los microorganismos de los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando metodologías tradicionales (Amann *et al.* 1998). No obstante a esto, siguen estando vigentes y se recomienda incluirlas en los métodos de identificación de microorganismos; además de que existe una aplicación masiva de ellas en áreas como alimentos, aguas y clínica; debido a la practicidad y costo que éstas tienen.

2.4.1.1. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo son una de las herramientas utilizadas en las técnicas microbiológicas a la cual se recurre continuamente para el estudio, tanto cualitativo como cuantitativo, de las comunidades microbianas. De allí que el número de medios de cultivo siga en incremento hoy en día, ya sea por la reformulación de sus componentes o la introducción de nuevas formulaciones. De hecho, se considera de gran importancia lograr el cultivo de las cepas que han sido descritas por métodos independientes de cultivo.

Definición y clasificación.

Se denomina como *medio de cultivo* al conjunto de sustancias nutritivas preparadas en el laboratorio para el crecimiento de microorganismos. Los microorganismos que crecen y se multiplican dentro o sobre un medio de cultivo constituyen lo que se denomina como *cultivo microbiano* (Tortora, 1993). Un cultivo microbiano puede estar constituido por bacterias capaces de crecer satisfactoriamente en prácticamente cualquier medio de cultivo, o bien, bacterias que requieran de medios de cultivo especiales. Es por ello, que se han diseñado diversos medios de cultivo, los cuáles se han clasificado en: diferenciales y/o selectivos, de enriquecimiento, químicamente definidos y complejos (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los medios de cultivo y su aplicación (Tortora, 1993).

Tipo de medios	Aplicación
DIFERENCIALES	Permiten distinguir las colonias de los microorganismos buscados de otras colonias que crecen en la misma placa.
SELECTIVOS	Inhiben el crecimiento de bacterias indeseables y facilitan el de los buscados.
DE ENRIQUECIMIENTO	Similar a los selectivos, pero diseñados para aumentar el número de microorganismos buscados hasta niveles detectables.
QUIMICAMENTE DEFINIDOS	Cultivo de quimioautótrofos, fotoautótrofos y para ensayos microbiológicos.
COMPLEJOS	Para la mayoría de los microorganismos quimioheterótrofos.

Aplicación.

La primera noticia que se tiene de la aplicación de un medio de cultivo data de los años 1850-1860 con el botánico y micólogo alemán Julius Oscar Brefeld (<http://www.ilmyco.gen.chicago.il.us/Authors/Brefeld671...>, último acceso julio 2009) el cual consiguió aislar y cultivar esporas de hongos en medios sólidos elaborados a base de gelatina. Sin embargo, no fue hasta el año 1878 que el inglés Joseph Lister popularizó un método enfocado al cultivo puro de bacterias basado en diluciones seriadas en un medio líquido (Walter, 2008).

Décadas más tarde, aún siguen siendo muchas las aplicaciones de los medios de cultivo en diversos campos (alimentos, clínica, investigación, agua). Por ejemplo, la industria alimentaria es uno de los campos con mayor aplicación y desarrollo de medios de cultivo ya sea para el aislamiento, diferenciación y/o cuantificación de microorganismos. De ésta, el sector lácteo destaca notablemente por las diversas investigaciones efectuadas, principalmente referentes a BAL y bifidobacterias, las cuales, en su mayoría, revelan el requerimiento del diseño de medios de cultivo pues gran parte de los productos lácteos fermentados, como es el caso del yogurt y las leches fermentadas, presentan una microbiota mixta que requiere ser cuantificada y/o analizada con la finalidad de conocer, establecer o mantener ciertas características físico-químicas u organolépticas (Ramakanth *et al.* 1998; Payne *et al.* 1999; Vinderola *et al.* 2000; Roy, 2001; Tharmaraj y Shah, 2003; Talwalkar *et al.* 2004; Van de Castele *et al.* 2006; Tabasco *et al.* 2007, Lee y Lee, 2008). Por ejemplo Tabasco *et al.* (2008), recientemente describieron un procedimiento para

diferenciar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas empleando medios de cultivo selectivos libres de antibióticos; en el que indican que se han desarrollado diversos medios de cultivo diferenciales y/o selectivos, basados en el uso de antibióticos o en las diferentes condiciones de crecimiento de las especies en estudio (Reuter, 1985; Charteris *et al.* 1997); sin embargo, resaltan que muchos de ellos carecen del análisis de los diferentes parámetros que permiten la validación de los métodos desarrollados y/o los estudios necesarios para la confirmación de la autenticidad de los resultados obtenidos, que ellos si proponen.

2.4.2. Técnicas moleculares.

Las técnicas moleculares han cobrado auge en los últimos años, puesto que permiten el estudio de microorganismos no cultivables y cultivables, a diferencia de las técnicas microbiológicas que únicamente se enfocan en los cultivables. Pese a ello, estas técnicas no necesariamente resultan exitosas al momento de aplicarlas puesto que también tienen limitaciones. Por ejemplo, los métodos de extracción de ácidos nucleicos de una muestra, que son requeridos en ciertas de estas técnicas, no aseguran la lisis de todos los microorganismos presentes ni la recuperación de los ácidos nucleicos intactos; por lo que en ocasiones, de ser posible, se recomienda aplicar las técnicas microbiológicas en conjunto con éstas técnicas.

2.4.2.1 PCR en tiempo real.

Una de las técnicas moleculares con mayor auge en la actualidad para el estudio de comunidades microbianas es la PCR en tiempo real (q-PCR, en inglés), que fue

introducida por Higuchi *et al.* (1992). La tecnología de la PCR en tiempo real está basada en la habilidad para detectar y cuantificar los productos de PCR, o amplicones, a medida que los ciclos de reacción progresan, como consecuencia de la inclusión de un marcador fluorescente que se une al amplicon cada vez que se duplica (Maurer, 2006).

Aplicación.

Esta técnica que puede considerarse una innovación de la técnica de PCR punto final, no sólo reduce la cantidad de trabajo y el tiempo de análisis de las muestras, sino también, evita el manejo post-PCR de las mismas, lo que elimina riesgos de contaminación cruzada que pueden adquirirse durante un manejo post – PCR, como suele ocurrir comúnmente en la PCR punto final (Omiccioli *et al.* 2009). Así que éstas y algunas otras ventajas son las que la han llevado a un sin fin de aplicaciones.

En el campo alimentario, la aplicación de la PCR en tiempo real ha cobrado gran importancia debido a la identificación y cuantificación rápida de microorganismos de interés en salud pública. De allí que diversas investigaciones enfocadas en el tema hayan sido descritas en los últimos años. Entre las múltiples investigaciones, están las realizadas por Yang *et al.* (2003), quienes reportan la aplicación de la PCR en tiempo real para la detección de *Campylobacter jejuni* en carnes, leche y agua ambiental; y resaltan la supresión del paso de preenriquecimiento de la muestra requerido en la PCR, así como también, el tiempo requerido y la estimación de un valor mínimo de detección (1 UFC) que puede lograrse con la técnica aplicada. Por

otro lado, Wolffs *et al.* (2004) en su estudio de cuantificación de *Yersinia enterocolitica* en muestras de origen porcino, proponen como nueva metodología para ser utilizada en la PCR tiempo real la aplicación de flotación en el pretratamiento de la muestra, que tiene como fundamento el gradiente de densidad de la misma; asimismo señalan los beneficios que la aplicación de ésta conllevan en un PCR tiempo real.

3. HIPÓTESIS

Si cada una de las bacterias lácticas a cuantificar muestra diferencias como el pH óptimo de crecimiento, el pH mínimo en el cual se puede desarrollar ó la producción de polisacáridos extracelulares, será posible diseñar medios de cultivo que permitan su cuantificación diferencial en cultivo mixto.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Diseñar un medio de cultivo que permita diferenciar a *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9 como parte de un cultivo mixto, con base en las características fisiológicas de cada microorganismo.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- A. Determinar si existen diferencias entre las dos bacterias en cuanto a: pH mínimo de crecimiento, producción de polímero extracelular y actividad amilolítica.
- B. Formular un medio de cultivo en el que ambas bacterias se puedan diferenciar, de acuerdo con los parámetros mencionados.
- C. Determinar qué condiciones de incubación permiten distinguir de mejor manera las dos cepas, en el medio de cultivo diseñado.
- D. Cuantificar el crecimiento de cada una de las bacterias lácticas tanto en cultivo puro como en cultivo mixto.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Microorganismos.

Se seleccionaron para el experimento las cepas *Streptococcus infantarius* 25124 (Si) y *Weissella confusa* L9 (Wc) por su redundante presencia en la fermentación del pozol. Ambas provienen de la colección criogénica de microorganismos aislados de muestras de pozol de Villahermosa, Tabasco; que se encuentra en el laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM. Las cepas se conservan inmersas en glicerol (20% glicerol y 80% cultivo en caldo MRS) y almacenadas a una temperatura de -70°C.

5.2. Activación de cepas.

Para la activación en medio líquido, se tomaron 30µL de la cepa congelada y se inoculó en viales con 4mL de caldo MRS (OXOID®) estéril; se incubó a 30°C durante 24h. La activación en medio sólido consistió en tomar una asada de cultivo activado en medio líquido para, inmediatamente después, distribuírsele sobre agar MRS (OXOID®) estéril e incubársele a 30°C durante 24h.

5.3. Pureza de las cepas.

La pureza de cada una de las cepas se verificó mediante dos pruebas:

Prueba de catalasa.

Se requirió de la previa activación de ambas cepas en caldo MRS (OXOID®). De los cultivos activados, se tomó una asada y se sembró por agotamiento sobre agar MRS (OXOID®) estéril. El medio inoculado se incubó a 30°C durante 24h. Una vez que se tuvieron colonias, se eligieron aquéllas que se encontraban de forma aislada y se les vertió una gota de solución de peróxido de hidrógeno (ó agua oxigenada) al 30% de tal manera que fueran cubiertas en su totalidad con dicha solución. El desprendimiento de burbujas por parte de la colonia se consideró como indicativo de prueba positiva.

Tinción de gram.

Se usaron cultivos activados en caldo MRS o en agar MRS. La prueba se realizó tomando una asada de los cultivos activados, se les colocó en un portaobjetos limpio, se les fijó a la flama del mechero y se le vertió los siguientes reactivos en el orden que se describen: cristal violeta (1min.), agua destilada, lugol (solución yodo-yoduro al 4%) (1min.), alcohol-acetona, safranina (1min.) y agua destilada. Se dejó secar el frotis a temperatura ambiente y se observó al microscopio a 100X.

5.4. Desarrollo de un método para la cuantificación diferencial de las cepas.

5.4.1. Estrategias para la diferenciación de las cepas.

Determinación del pH mínimo de crecimiento.

a. En medio líquido.

El caldo MRS (OXOID®) fue preparado según instrucciones de manufactura. Se distribuyó en volúmenes de 4mL en viales y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Se incubó durante 24h a 30°C para corroborar su esterilidad. Posterior a la prueba de esterilidad, se le adicionó al medio solución estéril al 50% de ácido láctico conforme se requirió para el ajuste de pH a valores de 6.0-6.5, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0 y 3.7 (Jenway 3020 pH meter, anexo A), seguido de una leve agitación manual, para luego inocularse con 40µL de cepa activa e incubársele a 30°C por 24h. La presencia de turbidez en el medio, acidificado e inoculado, después de transcurridas 24h de incubación a 30°C, se consideró como indicativo de crecimiento, en caso contrario, la prueba se consideró como de no crecimiento.

En ciertos casos, la presencia de turbidez en el medio debida al crecimiento llega a confundirse con alguna precipitación en el mismo, por lo que si fuese el caso, se requiere diluir el cultivo de 24h a 30°C del medio acidificado (0.5mL) en agua peptonada al 0.1% (4.5mL), se homogeneiza y se toma de esta dilución 0.1mL, para sembrarla por extensión en agar MRS estéril e incubar a 30°C durante 24-48h. La

aparición de colonias características sobre el agar MRS inoculado, indica crecimiento al pH del medio líquido acidificado del cual se partió.

b. En medio sólido.

El medio de cultivo, agar MRS (OXOID®), fue preparado y esterilizado conforme lo indican las instrucciones de manufactura. Posterior a su esterilización, se esperó a que el medio alcanzara una temperatura aproximada de 50°C para que le fuera incorporada la solución estéril al 50% de ácido láctico, de acuerdo al ajuste de pH a valores de 6.0-6.5, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0 y 3.7 (Jenway 3020 pH meter, anexo A), y luego, homogeneizado manualmente. Finalmente, se vertió el medio en cajas petri, se esperó a que solidificara y se incubó 24h a 30°C para corroborar la esterilidad del mismo. La inoculación, en este caso, se llevó a cabo con la técnica de extensión en placa, para ello se prepararon series de diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-5} , siendo la dilución 10^{-5} la depositada sobre el medio acidificado. Se incubó a 30°C durante 24h. El crecimiento sobre el medio ajustado al valor de pH más bajo se consideró como indicativo del pH mínimo de crecimiento de la cepa.

En ambos medios, caldo y agar, la prueba fue realizada por duplicado.

c. Incorporación de indicadores de pH en el medio sólido MRS.

Se preparó agar MRS (OXOID®) según instrucciones de manufactura, se añadió el indicador de pH a ensayar a 0.05g/L, se esterilizó a 121°C durante 15 min., se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta alcanzar aproximadamente 50°C y se vertió en

cajas petri. Se dejó incubar 24h a 30°C como prueba de esterilidad para finalmente ser utilizado.

Determinación de la actividad amilolítica.

Una vez activadas cada una de las cepas (como en la sección 5.2) se procedió a inocularlas, por separado, en cajas petri con medio sólido MRS-almidón (MRS-A, J.T. BAKER®) según la técnica de agotamiento, se incubaron a 30°C durante 24h y 48h. La actividad amilolítica a las 24h se reveló al verter sobre colonias aisladas solución de yodo-yoduro al 4% y observar una decoloración alrededor de las mismas; o bien, al observar la formación de un halo translúcido alrededor de las colonias después de transcurridas 48h de incubación a 30°C.

La determinación de la actividad amilolítica a pH mínimo de crecimiento consistió únicamente en variar el valor de pH del medio sólido MRS-A (pH 6.75-6.8). Para ello, al medio MRS-A (J.T. BAKER®) se le acidificó con una solución de ácido láctico al 50%, conforme se explicó anteriormente en el apartado 5.4.1. (pH mínimo de crecimiento) para el medio sólido MRS, hasta que adquirió el valor de pH mínimo de crecimiento de cada una de las cepas. El medio MRS-AA (MRS almidón acidificado, anexo A) resultante fue inoculado con las cepas mediante la técnica de agotamiento e incubado a 30°C por 24h. La actividad amilolítica se evaluó de manera equivalente como en el medio MRS-A no acidificado.

Las pruebas se realizaron por duplicado para ambos casos.

Evaluación de la producción de polímero extracelular.

Para evaluar la producción de polímero extracelular se emplearon los medios: MRS, MRS-A (almidón PROLABO), MRS-AS (MRS almidón-sacarosa) y MRS-AI (MRS-almidón con indicador). La composición y elaboración de los medios es descrita en el anexo A. Cuando los medios, MRS, MRS-A, MRS-AS y MRS-AI estuvieron listos y las cepas previamente activadas como en el apartado 5.2; éstas últimas fueron inoculadas sobre dichos medios por la técnica de agotamiento, e inmediatamente después, el medio inoculado se incubó a 30°C durante 24h. La producción de mucosidad en el entorno de la colonia o el crecimiento de colonias mucosas en los medios fue considerada como prueba positiva de producción de polímero extracelular. La prueba se realizó por duplicado.

5.4.2 Estrategias para la cuantificación de las cepas.

Cinética de crecimiento.

Se inocularon 10mL de caldo MRS-A (anexo A) estéril con 1mL de la cepa *Streptococcus infantarius* 25124 conservada en glicerol, así como de caldo MRS con 1mL de *Weissella confusa* L9 conservada de la manera ya descrita; y se dejó incubar durante 3h a 30°C. Transcurrido el tiempo de incubación se tomaron en condiciones estériles, agitando previamente en vórtex, 6mL de cada uno de los cultivos y se vertieron en 60mL de caldo MRS-A ó MRS, según fuera el caso. Se homogeneizó el medio inoculado y se tomó 1mL de éste para leer el valor de absorbancia (Spectronic 21D) al t=0, e inmediatamente, se llevó a incubar a 30°C. Posteriormente, se tomaron

muestras de 1mL cada hora hasta transcurridas 12h, y en cada caso, se le leyó su valor correspondiente de absorbancia. Finalmente, una muestra a las 24h después de haber iniciado el experimento fue tomada y leída su absorbancia. Los blancos utilizados fueron los medios de cultivo estériles que fueron empleados para el crecimiento de cada microorganismo. La prueba se realizó por duplicado.

Determinación de la cuenta en placa en el medio MASSW.

La cuenta en placa en el medio de cultivo diferencial diseñado, se realizó conforme a lo siguiente:

Preparación de inóculo.

Para preparar el inóculo necesario para la determinación de la cuenta en placa fue necesario seguir el siguiente procedimiento:

- A. *Activación de cepas.* Se realizó tomando, en ambiente estéril, 1mL de la cepa en glicerol y se vertió este en 10mL de caldo MRS-almidón (MRS-A, anexo A) estéril para el caso de *Streptococcus infantarius* 25124 ó en caldo MRS (OXOID®) para *Weissella confusa* L9. Se dejó incubar estáticamente a 30°C durante 8-9h. Se realizó por triplicado.

- B. *Reactivación de cepas.* Se llevó a cabo inoculando con 2.5mL de *Streptococcus infantarius* 25124 ó *Weissella confusa* L9, previamente

activados, 25mL de caldo MRS-A ó MRS, respectivamente; y se dejaron incubar estáticamente a 30°C por 12h. La prueba se realizó por triplicado.

Preparación de la muestra y siembra.

Se realizaron por triplicado diluciones seriadas hasta 10^{-7} para cada microorganismo. Para ello, se tomó 0.5mL de cada uno de los inóculos de las cepas reactivadas y se le vertió en viales con 4.5 mL de agua peptonada estéril al 0.1%, agitando en vórtex en cada pase. Después, de las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} resultantes de cada microorganismo, se tomó un volumen equitativo (1mL ó 1.5mL) de cada una de ellos, según el siguiente recuadro:

Tabla 2. Mezclas de inóculos para determinar la cuenta en placa en el medio MASSW.

Microorganismo	Mezcla A	Mezcla B	Mezcla C	Mezcla D
<i>Streptococcus infantarius</i> 25124	10^{-6}	10^{-6}	10^{-7}	0
Volumen *	1mL	1mL	1mL	1mL
<i>Weissella confusa</i> L9	0	10^{-7}	10^{-7}	10^{-6}
Volumen *	1mL	1mL	1mL	1mL
Vol final de mezcla**	2mL	2mL	2mL	2mL

* El volumen puede ser de 1mL ó de 1.5mL. ** Puesto que el volumen a tomar de las diluciones varía el volumen final de mezcla puede ser de 2 ó 3mL, según sea el caso.

Se colocaron en viales previamente estériles, se homogeneizaron en vórtex con agitación a velocidad media, y finalmente, se tomó de esta mezcla 100 μ L que fueron depositados y distribuidos por extensión mediante una varilla metálica - flameada precedentemente con etanol para lograr su esterilización - sobre el medio MASSW estéril.

Incubación.

Una vez que el medio se inoculó, se incubó en las siguientes condiciones:

Tabla 3. Parámetros de incubación del medio MASSW.

Tratamiento	1°	2°	3°	4°
Temperaturas (5°C, 30°C)				
	0h,24h	0h,48h	0h,72h	0h,96h
Tiempo (h)	24h,24h	24h,48h	NA	NA
	48h,24h	48h,48h	48h,72h	NA

NA: No aplica.

Después de cada tratamiento de incubación, se realizaron observaciones de la apariencia de las colonias respecto a las modificaciones en el medio.

Comparación de la cuenta en placa en MRS y MASSW.

En una cinética aparte, pero cuyo procedimiento de realización fue equivalente a la cinética descrita en párrafos anteriores, se determinó el número de UFC de cada microorganismo sobre el medio comercial MRS (OXOID®) y el medio de cultivo diseñado (MASSW) para los tiempos 0 y 24h de monitoreo, determinando al mismo tiempo la densidad óptica de la muestra para dichos tiempos. Para determinar la cuenta en placa, se procedió de la siguiente manera: se tomaron de los medios de cultivo inoculados y homogeneizados en vórtex 0.5mL, se vertieron en 4.5mL de agua peptonada al 0.1% y nuevamente se homogeneizaron; y así sucesivamente, hasta obtener una dilución de 10^{-6} . De la dilución resultante, se tomaron 0.1mL de

muestra previamente homogeneizada y se distribuyeron sobre los medios sólidos MRS y MASSW estériles mediante la técnica de extensión, haciendo uso de una varilla metálica flameada con etanol. Los medios de cultivo inoculados se incubaron a 30°C durante 24h. La prueba se realizó por triplicado.

Análisis estadístico.

Los experimentos fueron realizados por triplicado en dos diferentes fechas, sin embargo, debido a la similitud entre ellos sólo se presentan los últimos datos obtenidos. Los datos se analizaron estadísticamente mediante la prueba de razón F ($F = s_1^2/s_2^2$) con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ y una $H_0 = \sigma_1^2 = \sigma_2^2$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Confirmación de la pureza de las cepas.

Para corroborar la pureza de los microorganismos de trabajo se realizó la prueba de catalasa y la Tinción de Gram; encontrándose los resultados que se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Descripción microscópica de las cepas.

Cepa	<i>Streptococcus infantarius</i> 25124	<i>Weissella confusa</i> L9
Morfología	Cocos	Bacilos cortos
Agrupación	racimos o cadenas	Sin agrupación o en pares
Gram	+	+
Catalasa	-	-

Estos resultados, junto con la uniformidad en la morfología colonial concordaron con investigaciones previas de Bolaños (2005, datos no publicados), quien trabajó con las mismas cepas. Así como también, con descripciones realizadas por otros investigadores para dichas especies (Bouvet *et al.* 1997; Schlegel *et al.* 2000; Bantar *et al.* 1991; Collins *et al.* 1993). Por lo tanto, se confirmó la pureza de las cepas.

6.2. Características de las cepas.

Puesto que estudios previos realizados por Bolaños (2005, comunicación personal) mostraron que el crecimiento de *Weissella confusa* L9 y *Streptococcus infantarius* 25124 sobre medios de cultivo diseñados para su desarrollo, como el MRS, resultaba

en colonias con morfología similar para ambos microorganismos, y por lo tanto, traía consigo dificultades para cuantificarlos mediante técnicas de cultivo tradicional; se requirió del diseño de un medio de cultivo diferencial que hiciera posible cuantificar cada microorganismo en el cultivo mixto. Para ello, se evaluaron las características de pH mínimo de crecimiento, actividad amilolítica y producción de polímero extracelular de cada una de las cepas, y con base en estos resultados, se desarrolló el medio de cultivo diferencial. Los resultados de cada evaluación se describen a continuación:

6.2.1. pH mínimo de crecimiento.

El pH mínimo de crecimiento de los microorganismos ha sido uno de los parámetros más importantes para el diseño de medios de cultivo selectivos y diferenciales (Tabasco *et al.* 2008). De allí que en la presente investigación, se haya probado el crecimiento de *Weissella confusa* L9 y *Streptococcus infantarius* 25124 a diferentes valores de pH en el medio MRS, que es un medio de cultivo para bacterias ácido lácticas.

Los resultados obtenidos de la determinación del pH mínimo de crecimiento de *Weissella confusa* L9 y *Streptococcus infantarius* 25124 en caldo y agar MRS a 30°C por 24h, se encuentran resumidos en las tablas 5 y 6, respectivamente. En ambos casos, estos resultados demuestran que *Weissella confusa* L9 es capaz de crecer en ambientes más ácidos (hasta un valor de pH de 4.0) que *Streptococcus infantarius* 25124 (hasta un valor de pH de 4.5); como ya había sido reportado en estudios

previos sobre el comportamiento del género *Streptococcus* (Reuter, 1985; Hardie y Whiley, 1995).

La determinación, llevada a cabo en caldo MRS, que se presenta en las figuras 1, 2 y 3, dejó ver el crecimiento de *Weissella confusa* L9 y *Streptococcus infantarius* 25124 a valores de pH ácido. La turbidez -considerada como parámetro de crecimiento microbiano- en los medios ajustados a valores de pH de 4.0 y 3.7, tanto para *Weissella confusa* L9 como *Streptococcus infantarius* 25124, se produjo principalmente por la precipitación de algún componente del medio a consecuencia del ajuste de un pH muy bajo, y no al crecimiento microbiano, como fue verificado para el medio ajustado a pH de 4.0 y 3.7. Fue entonces que se evaluó el crecimiento microbiano sobre agar MRS, acidificado éste a valores de pH equivalentes a los del medio líquido. Estos resultados mostraron que ambos microorganismos tienen un pH mínimo de crecimiento de 5.5 sobre agar MRS, siendo este un valor de pH menos ácido con respecto al obtenido para el medio líquido. Así también, estos resultados exhibieron que el tamaño de la colonia de cada microorganismo (figura 4) disminuía cuando estos eran crecidos a valores de pH ácidos. En todos los casos las colonias de *Weissella confusa* L9 fueron de mayor tamaño que las de *Streptococcus infantarius* 25124, lo que sugiere posiblemente una mayor resistencia por parte de *Weissella confusa* L9 a pH ácidos ó condiciones de estrés.

Tabla 5. Crecimiento de *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9 en caldo MRS a diferentes valores de pH inicial después de 24h de incubación a 30°C.

pH	<i>Streptococcus infantarius</i> 25124	<i>Weissella confusa</i> L9
3.7	NC	NC
4.0	NC	+
4.5	++	+++
5.0	+++	++++
5.5	++++	++++
6.0	++++	++++

NC: Nulo +/++ Escaso crecimiento +++/++++ Abundante crecimiento

Tabla 6. Crecimiento de *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9 a diferentes valores de pH inicial en agar MRS después de 24h de incubación a 30°C.

pH	<i>Streptococcus infantarius</i> 25124	<i>Weissella confusa</i> L9
3.7	NC	NC
4.0	NC	NC
4.5	NC	NC
5.0	NC	NC
5.5	++++	++++
6.0	++++	++++

NC: Nulo crecimiento ++++ Abundante crecimiento (Incontable)

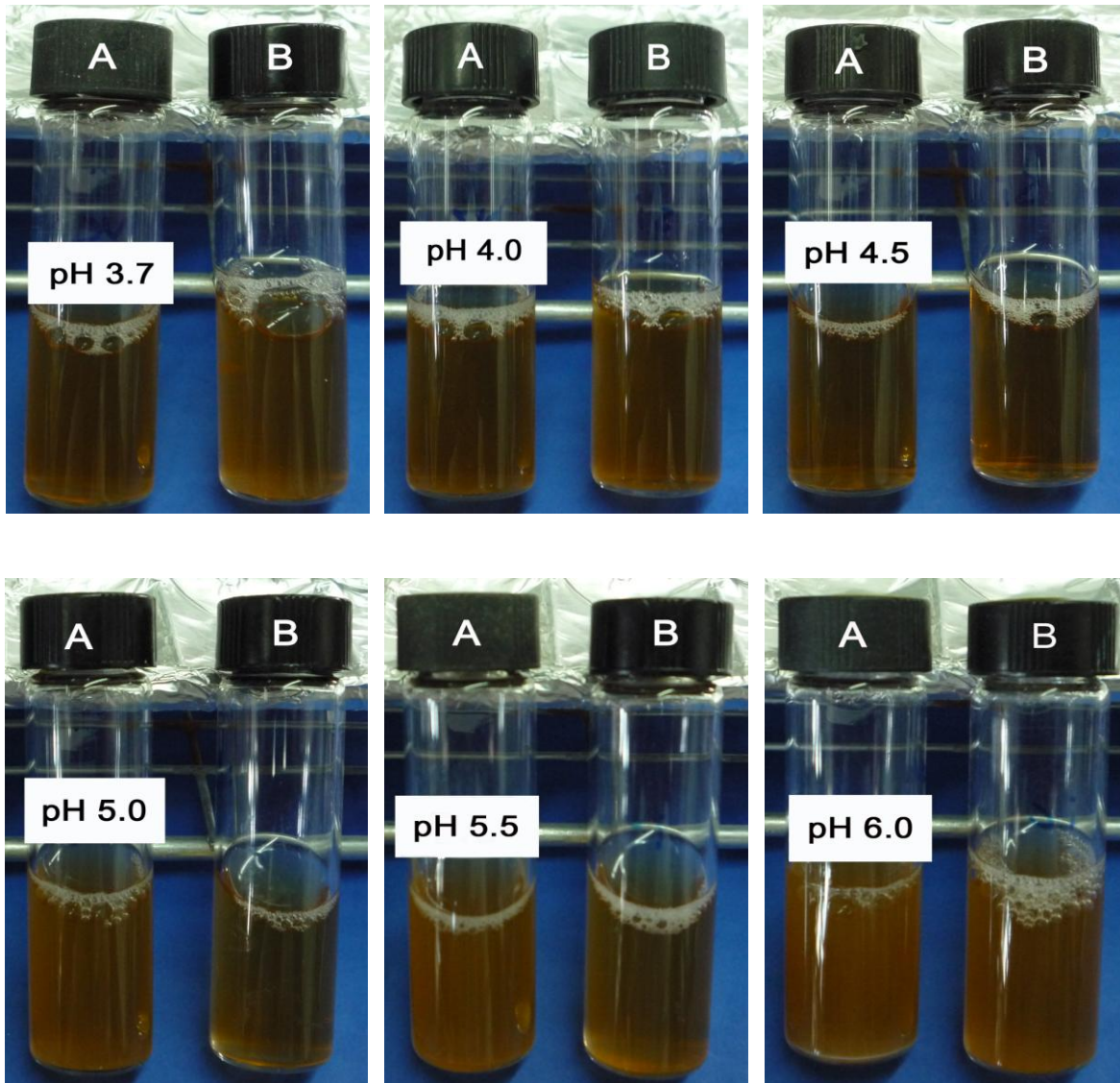


Figura 1. Efecto del pH en el crecimiento de *Weissella confusa* L9 (A) y *Streptococcus infantarius* 25124 (B) en caldo MRS ajustado a diferentes valores de pH inicial.

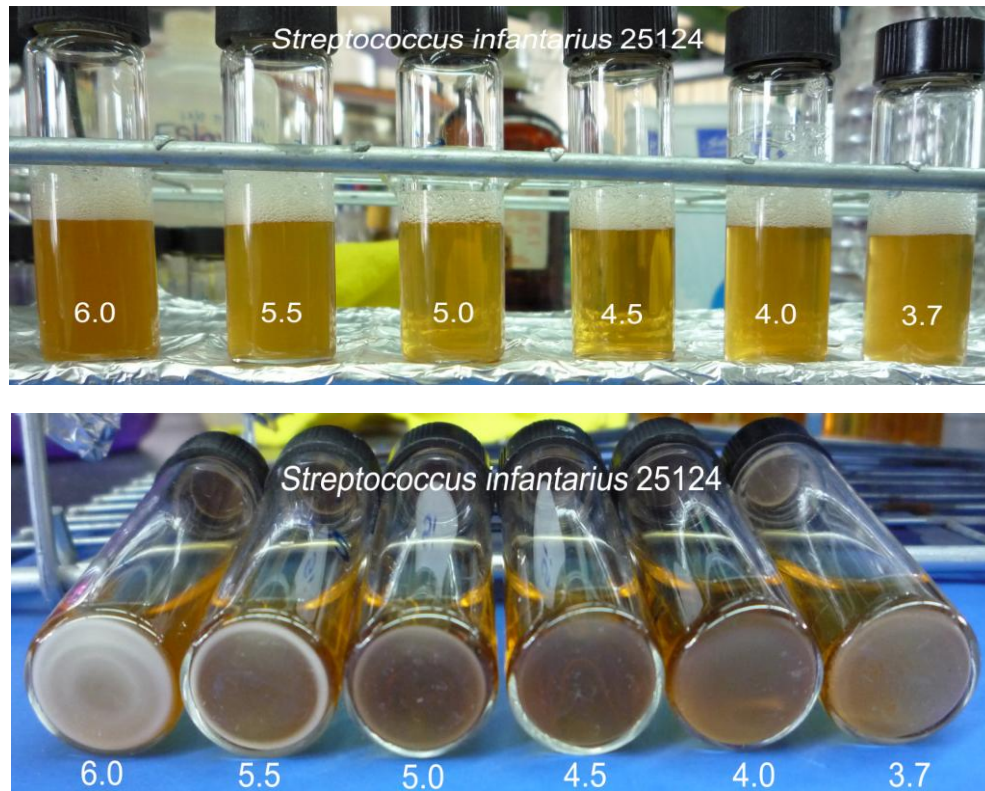


Figura 2. Crecimiento de *Streptococcus infantarius* 25124 en caldo MRS ajustado a diferentes valores de pH.

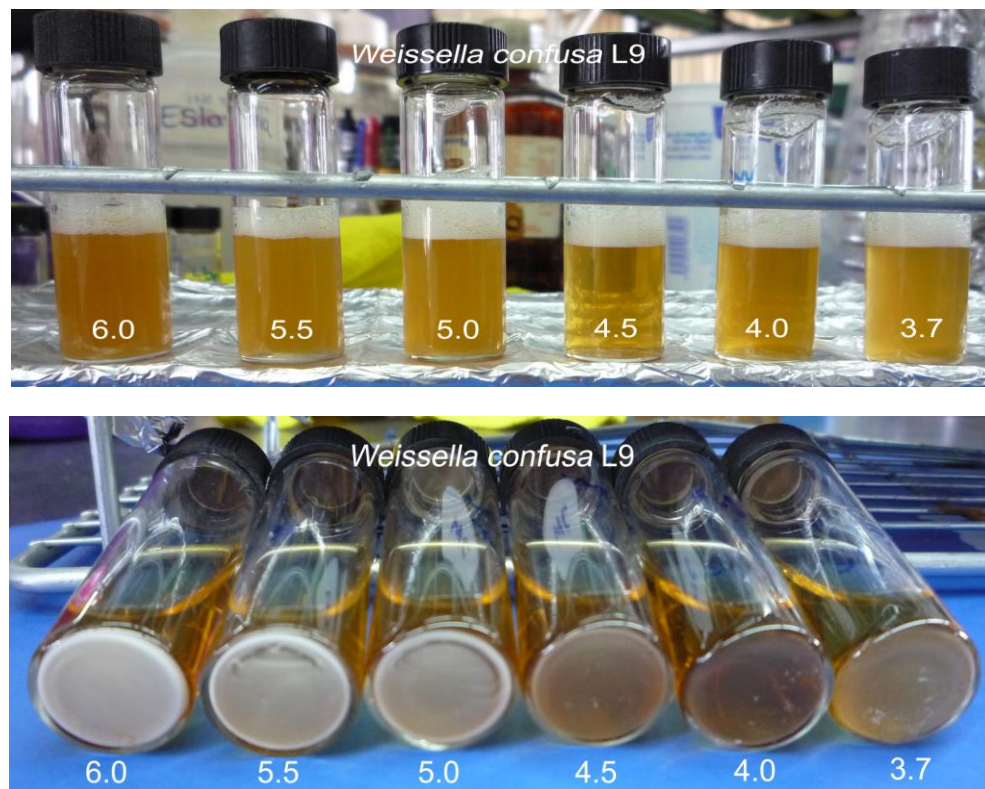


Figura 3. Crecimiento de *Weissella confusa* L9 en caldo MRS ajustado a diferentes valores de pH.

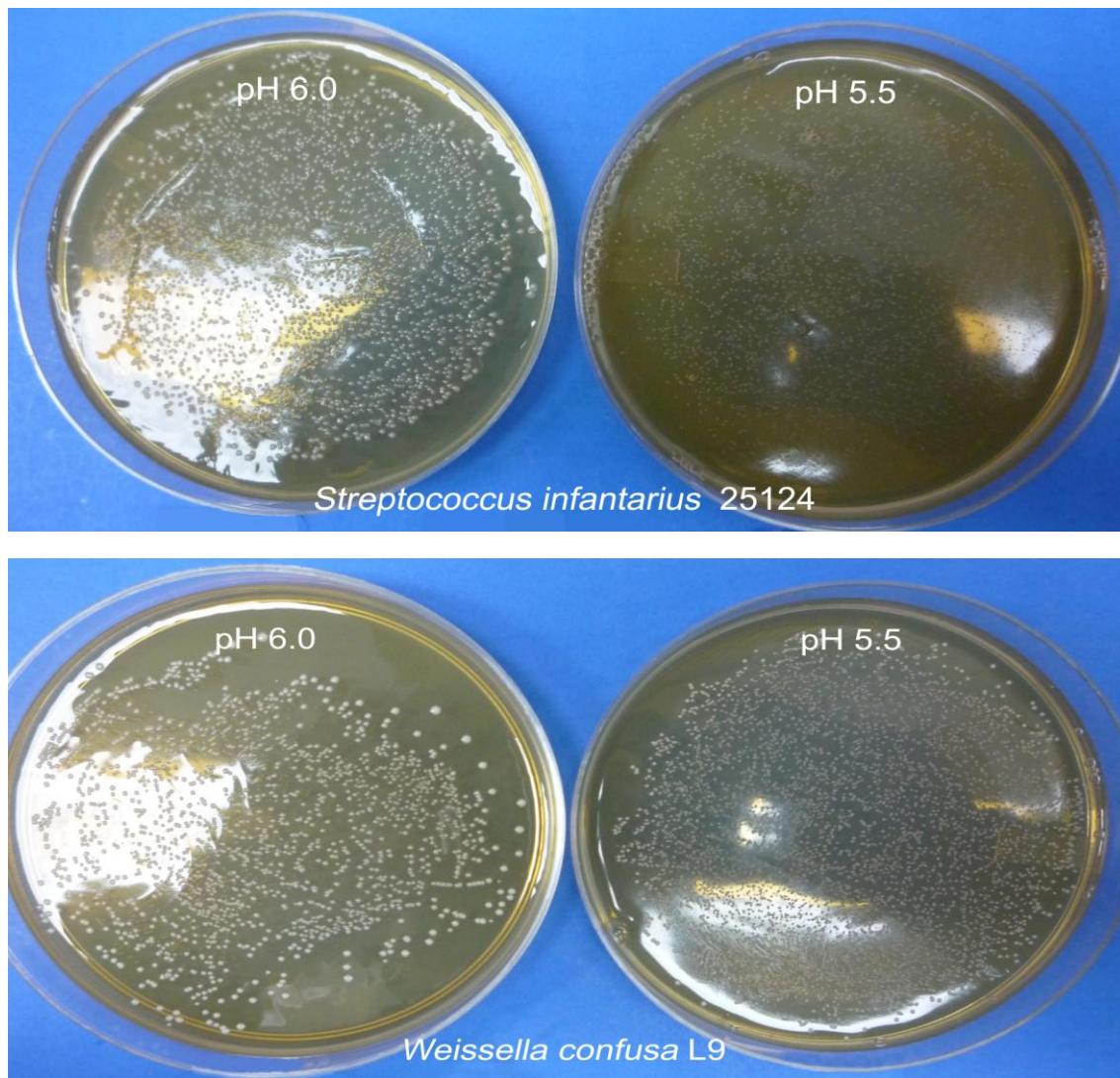


Figura 4. Crecimiento de *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9 en agar MRS a pH 6.0 y 5.5.

6.2.1.1. Incorporación del indicador púrpura de bromocresol en el medio MRS.

Publicaciones anteriores referentes al desarrollo de medios de cultivo diferenciales para bacterias ácido lácticas mencionan el uso de indicadores de pH, como el púrpura de bromocresol (Hartemink *et al.* 1997; Bujalance, 2008) ó el azul de bromocresol (Lee y Lee, 2008) para diferenciarlas. De allí que fuera propuesto en

este trabajo el uso de algunos indicadores, como el rojo de metilo, el rojo congo, el azul de bromocresol y el púrpura de bromocresol para ser incorporados al medio MRS (tabla 7).

No todos los indicadores propuestos resultaron adecuados para ser incorporados al medio de cultivo agar MRS ya que su vire ocurre a un valor de pH diferente al pH mínimo de crecimiento de las cepas en medio sólido, por lo que algunos de ellos fueron descartados; utilizando únicamente el indicador rojo de metilo y púrpura de bromocresol. Inicialmente, el indicador rojo de metilo fue utilizado en el medio pues su intervalo de vire permitía el crecimiento de las dos cepas, sin embargo, debido a que a las 24h de incubación a 30°C no se observaron variaciones del indicador incorporado en el medio, por el cambio en el valor de pH causado por el crecimiento de los microorganismos, sino que únicamente se observaba la tinción de las colonias por el indicador, se descartó su uso. En cambio, cuando se empleó el indicador púrpura de bromocresol en el agar MRS a las mismas condiciones de incubación que las utilizadas para el rojo de metilo, se observó que las colonias de *Streptococcus infantarius* 25124 se tiñen de amarillo con un punto en su centro de color naranja-café muy tenue, y hacen virar a su alrededor al indicador de pH de una coloración inicial púrpura a una amarilla; mientras que las colonias de *Weissella confusa* L9 se tornan de color blanquizco y viran muy ligeramente, casi imperceptible, al indicador de pH a un color amarillo pálido.

Tabla 7. Indicadores ácido/base (Skoog, 2000).

Nombre común	Intervalo de transición, pH	Cambio color
Amarillo de metilo	2,9-4,0	Rojo-amarillo
Naranja de metilo	3,1-4,4	Rojo-naranja
^c Rojo Congo	3,2-5,0	Azul violeta-amarillo/naranja
^a Rojo de metilo	4,2-6,3	Rojo-amarillo
^b Púrpura de bromocresol	5,2-6,8	Amarillo-púrpura
Azul de bromotimol	6,2-7,6	Amarillo-azul
Rojo de fenol	6,8-8,4	Amarillo-rojo

^{a,b,c} Indicadores de pH utilizados para el desarrollo del medio diferencial.

6.2.2. Actividad amilolítica.

Se ha reportado que las bacterias ácido lácticas amilolíticas han sido aisladas de diferentes alimentos fermentados amiláceos, preparados principalmente de yuca y cereales (Reddy *et al.* 2008). Por lo que se consideró que el pozol, al tener como sustrato al maíz que es rico en almidón (entre 50-70% de su composición), muy probablemente poseería BAL amilolíticas. De allí que basándose en ello y en estudios realizados previamente por Díaz Ruiz *et al.* (2003) y Bolaños (2005, datos no publicados) con la cepa *Streptococcus infantarius* 25124, se determinó evaluar la actividad amilolítica de dicha cepa y la de *Weissella confusa* L9 a pH de 6.0 y 5.5 a 30°C a las 24h y 48h, en el medio MRS-A.

Los resultados de esta evaluación (tabla 8), confirmaron la capacidad de *Streptococcus infantarius* 25124 de hidrolizar almidón (figura 5), descrita

previamente. Así mismo, mostraron la capacidad de *Weissella confusa* L9 de crecer en el medio de cultivo con almidón pero sin la capacidad de hidrolizarlo.

Tabla 8. Determinación de la actividad amilolítica de *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9 en MRS-A a 30°C.

pH del medio	<i>Streptococcus infantarius</i> 25124		<i>Weissella confusa</i> L9	
	24h	48h	24h	48h
6.0	++	+++	NA	NA
5.5	+	++	NA	NA

Nivel de actividad amilolítica: + Bajo ++Medio +++ Abundante NA: Sin actividad

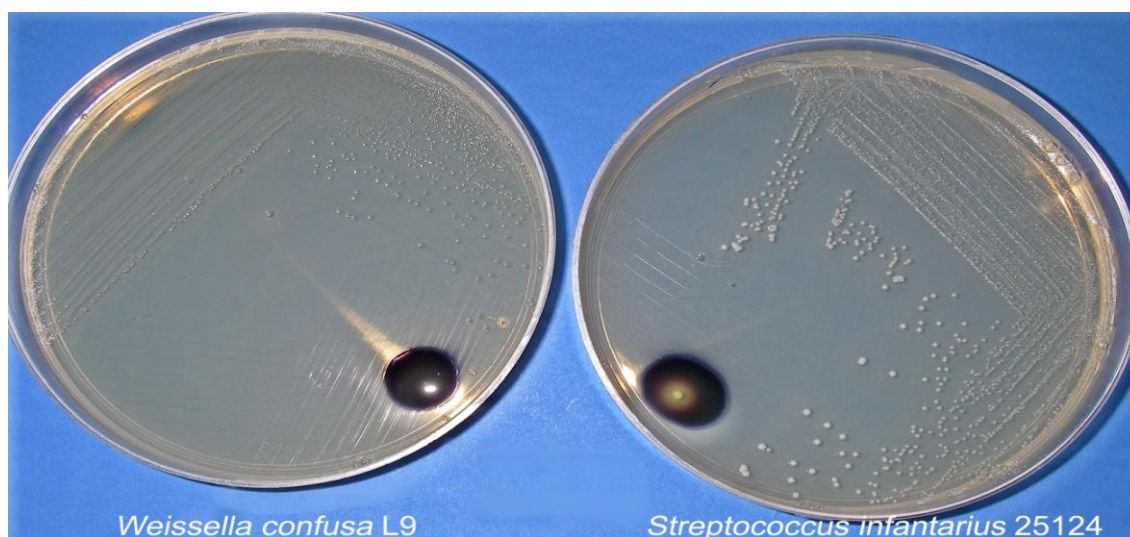


Figura 5. Prueba de actividad amilolítica para *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9 en medio MRS-A después de 24h a 30°C. Se agregó una gota de lugol a una colonia de cada cepa. Se observa halo alrededor de la colonia de *Streptococcus infantarius* 25124 y no alrededor de *Weissella confusa* L9.

Cuando la actividad amilolítica de la cepa *Streptococcus infantarius* 25124 fue evaluada al valor de pH mínimo de crecimiento determinado para medio sólido (5.5), se encontró que la capacidad de hidrólisis de la cepa se ve reducida (tabla 8) aproximadamente en un 50% al medir el diámetro de hidrólisis, con respecto a la

encontrada a un pH cercano a la neutralidad (6.0); y difícilmente, se ve regularizada al transcurrir el tiempo; pues se observa que el halo de hidrólisis de 3mm que se forma a las 24h de incubación a pH de 6.0 disminuye a 1.5mm cuando el pH es de 5.5, mientras que a las 48h de incubación se ve reducido de 6mm a 3mm para los respectivos valores de pH de 6 y 5.5. Esto, que concordó con los resultados obtenidos de la estabilidad de la amilasa de *Streptococcus infantarius* 25124 a valores de pH cercanos a la neutralidad y su mayor actividad en el rango de temperaturas de 30°C a 37 en la investigación referente a BAL amilolíticas del pozol realizada por Díaz Ruiz *et al.* (2003); y la ausencia de hidrólisis de almidón por parte de *Weissella confusa* L9, muestran que la característica de actividad amilolítica puede ser utilizada para diferenciar a las cepas de trabajo.

6.2.3. Producción de polímero extracelular.

Se evaluó la producción de polímero extracelular por *Weissella confusa* L9 y *Streptococcus infantarius* 25124 sobre los medios MRS y MRS-A a 30°C. Los polisacáridos extracelulares son producidos comúnmente por bacterias y microalgas, y menos frecuentemente, por levaduras y hongos (van Hijum *et al.* 2006). Algunas especies de bacterias ácido lácticas, principalmente aquellas pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Weissella*, son capaces de producir polisacáridos extracelulares (Sidebotham *et al.* 1974; Collins *et al.* 1993). De allí que para fines de esta investigación, la producción de polímero extracelular haya resultado de interés como característica fenotípica que posibilitara la diferenciación entre las cepas de trabajo.

Un exopolisacárido (EPS, por sus siglas en inglés) es un término general que se refiere a dos tipos de polisacáridos secretados; los cuales difieren únicamente en el lugar en el que son segregados. Así, el primer tipo de polisacárido se encuentra adherido a la pared celular como una cápsula (CPS, por sus siglas en inglés), mientras que el segundo es excretado al exterior (EPS) (Degeest *et al.* 2001). Dependiendo de su composición y mecanismo de biosíntesis, los polisacáridos extracelulares (EPS) son divididos en dos clases: homopolisacáridos (HoPS) y heteropolisacáridos (HePS). Los EPS de las especies del género *Leuconostoc*, *Weissella*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*, de acuerdo a Maina *et al.* (2008), están constituidos principalmente por dextranos (α -glucanos con estructura lineal, constituidos de enlaces α -(1 \rightarrow 6) unidos a D-glucopiranosil).

Recientemente, Maina *et al.* (2008) en su estudio sobre exopolisacáridos reportó que la especie *Weissella confusa* E392 produce dextranos con una estructura casi lineal pues solo presenta un 4.1% de cadenas ramificadas α (1 \rightarrow 3). Mientras que, Abdelgadir *et al.* (2008) en su investigación del producto fermentado Gariss; al detectar el gen *gtf* en la especie *Streptococcus infantarius*, sugieren que la enzima para la cual codifica dicho gen (glucosiltransferasa) lleva a cabo la biosíntesis del polisacárido extracelular del tipo CPS, como anteriormente, había sido sugerido por Heraief *et al.* (1982) para otras especies de *Streptococcus*. Por lo anterior, se presume que el polisacárido producido por las especies *Weissella confusa* L9 y *Streptococcus infantarius* 25124 de este trabajo esté compuesto, principalmente, por dextranos.

Hace algunos años, Degeest *et al.* (2001) indicaron que el tipo y el rendimiento total de exopolisacáridos producidos por BAL dependían de la composición del medio (fuentes de carbono y nitrógeno) y de las condiciones a las cuales crecía la cepa (por ejemplo temperatura, pH, tensión de oxígeno y tiempo de incubación). Así que en principio, la producción de polímero extracelular se probó en agar MRS y MRS-A a 30°C por 24h, para ambas cepas. De estos resultados, se determinó que ninguna de las fuentes de carbono presentes en estos medios de cultivo, glucosa y almidón, respectivamente; permitió la activación de la producción de polímero extracelular por parte de *Weissella confusa* L9 y *Streptococcus infantarius* 25124. Por lo que de acuerdo con investigaciones realizadas por Díaz *et al.* (2003) y Wachter *et al.* (1993) que indican que después del almidón, la sacarosa es el carbohidrato presente en mayor concentración (0.1-0.7%) en la masa nixtamalizada para pozol; y las investigaciones efectuadas por Maina *et al.* (2008) respecto a la producción y análisis espectroscópico de RMN (resonancia magnética nuclear) del polímero de *Weissella confusa* E392 en medio MRS suplementado con 2% de sacarosa a 30°C; se precisó la sustitución del almidón del medio MRS-A por sacarosa. Esta sustitución dejó ver la producción de una sustancia opaca y viscosa sobre el medio de cultivo que cubrió totalmente el crecimiento microbiano a las 24h de incubación a 30°C, corroborando de esta manera, que ambos microorganismos son capaces de producir polímero en presencia de sacarosa (figura 6). Sin embargo, como la producción de polímero en el medio con sacarosa resultó excesiva para ambos microorganismos, se incluyeron tanto la sacarosa (que permitiría observar la producción de polímero) como el almidón (para mostrar la actividad amilolítica) en el

medio MRS-A, con la finalidad de controlar la producción de polímero y posibilitar la diferenciación entre ellos.

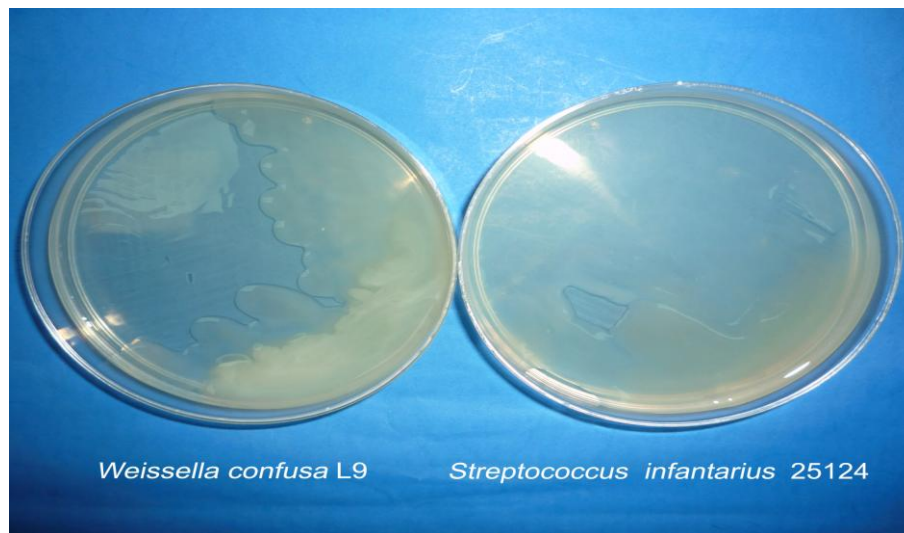


Figura 6. Producción de polímero extracelular en el medio MRS por *Weissella confusa* L9 y *Streptococcus infantarius* 25124 después de 24h a 30°C (aquí la glucosa (20g/L) del medio fue sustituida en su totalidad por sacarosa).

6.2.3.1. Variación de la concentración de sacarosa en el medio MRS-A.

La adecuada concentración de sacarosa en el medio se logró probando distintas proporciones de ésta y almidón, solamente para lograr el crecimiento de *Streptococcus infantarius* 25124. Las proporciones utilizadas variaron desde 1% de sacarosa y 99% de almidón hasta 75% de sacarosa y 25% de almidón. De estas variaciones, se encontró que a mayor concentración de sacarosa la cantidad de polímero producido era mayor, únicamente cuando la sacarosa es adicionada en proporciones menores del 35% (figura 7). Esto dejó ver que *Streptococcus infantarius* 25124 produce mayor cantidad de polímero extracelular que *Weissella confusa* L9; y que la adecuada proporción de almidón y sacarosa necesaria para diferenciar a

Streptococcus infantarius 25124 de *Weissella confusa* L9 es de 90% de almidón y 10 % de sacarosa; correspondientes a 18g de almidón y 2g de sacarosa por litro de medio preparado.

Y así como la cantidad de polímero extracelular resultó variar conforme a la concentración de sacarosa añadida al medio, la apariencia de las colonias también se vio modificada, como se ilustra en la figura 7. Para una concentración alta de sacarosa (75% equivalente a 15g/L), las colonias presentaron una apariencia muy abultada y brillante ó tendieron a deformarse hasta prescindir de una forma definida debido a la gran cantidad de polímero que ellas mismas produjeron, mientras que a una concentración más baja (35% equivalente a 7g/L) tendieron a adquirir una forma circular más definida pero aún con bastante cantidad de polímero a su alrededor que las exhibía cóncavas y brillantes. Las concentraciones menores de 7g/L (4, 3 y 2g/L correspondiente a 20, 15 y 10%) de sacarosa pero mayores a 1g/L permitieron mostrar colonias con una apariencia circular más definida y no tan cóncava como se presentó a concentraciones altas del carbohidrato, fue posible observar colonias separadas y se mantuvo el brillo debido al polímero. A la concentración de un gramo por litro (5%), la apariencia de las colonias cambió notablemente de las anteriores puesto que las colonias no fueron tan brillantes, su forma circular fue definida pero sin abultamiento ni mostraron polímero a su alrededor. En todos los casos las colonias presentaron una coloración amarilla similar, a excepción de cuando se probó el medio con 15g de sacarosa, en donde resultaron de un amarillo bastante intenso.

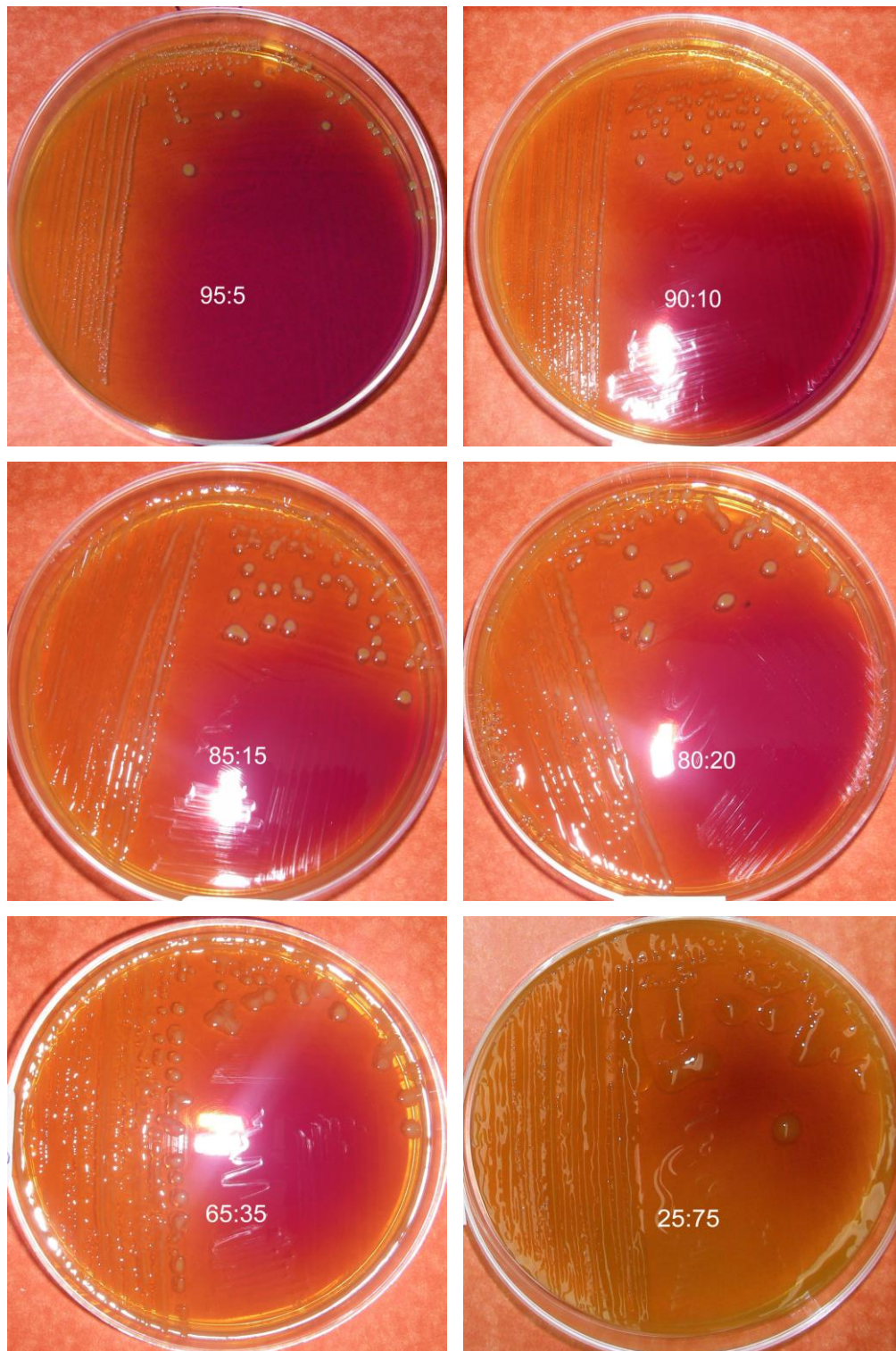


Figura. 7. *Streptococcus infantarius* 25124 en agar MRS con indicador púrpura de bromocresol a distintas proporciones de almidón/sacarosa después de 24h de incubación a 30°C.

6.3. Medio de cultivo diferencial MASSW.

Cuando las diversas características postuladas para la diferenciación de las cepas fueron evaluadas, se encontró que la actividad amilolítica y la producción de polímero extracelular, aunadas a la producción de acidez; resultaban ser las características idóneas para el desarrollo del medio de cultivo diferencial (tabla 9), y éste a su vez, al expresar dichas características, permitiría la diferenciación de las cepas.

Tabla 9. Resumen de las características evaluadas en *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9 para el diseño del medio de cultivo diferencial.

Característica	<i>Streptococcus infantarius</i> 25124	<i>Weissella confusa</i> L9
pH mín de crecimiento en el medio MRS a 30°C a las 24h.	5.5 Colonias de menor tamaño	5.5 Colonias de mayor tamaño
Actividad amilolítica en el medio MRS-A a 30°C a las 24h.	+	-
Polímero extracelular en el medio MRS-AS a 30°C a las 24h.	+++	+
Vire del indicador en el medio MRS a las 24h a 30°C.	++++	-

Manifestación de la característica: (+) Deficiente (++) Moderada (++++) Prominente (-) No la presenta

De allí que al considerar los resultados de dichas características, el medio de cultivo diferencial fue desarrollado y evaluado para el crecimiento de las cepas en estudio.

El medio fue nombrado como MASSW por las iniciales del medio MRS, las fuentes de carbono y las cepas utilizadas.

6.3.1. Composición y elaboración.

El medio de cultivo diferencial se formuló con los siguientes componentes: 10g peptona pancreática de caseína (OXOID®), 10g extracto de carne (OXOID®), 5g extracto de levadura (OXOID®), 18g almidón (PROLABO®), 2g sacarosa (SIGMA®), 2.17g citrato diamoniaco (J.T. BAKER®), 5g acetato de sodio (J.T. BAKER®), 0.207g sulfato de magnesio heptahidratado (SIGMA®), 0.056g sulfato de manganeso (SIGMA®), 2.62g fosfato dipotásico (MALLINCKRODT®), 0.05g púrpura de bromocresol (SYNTHETICAL LABORATORIES®) y 15g agar bacteriológico (OXOID®). Todos ellos fueron mezclados y disueltos en 1L de agua destilada, y finalmente, la mezcla resultante se esterilizó a 121°C durante 15 min. El pH final del medio fue de 6.8.

Se observó que para tener resultados satisfactorios, el medio debe utilizarse antes de 72h de su preparación y almacenarse a 5°C.

6.3.2. Características de las cepas sobre el medio MASSW y sus condiciones óptimas de incubación.

El medio diferencial MASSW antes de ser inoculado fue poco translúcido y semirígido, debido a la presencia de almidón, y presentó una coloración púrpura debida al indicador de pH que le fue añadido (figura 8). Posteriormente, cuando el

medio de cultivo fue inoculado con cultivos puros de cada una de las cepas, se observó variación en el color del indicador, de color purpura inicial a color amarillo. También, se observó producción de polímero extracelular y tinción colonial amarilla, únicamente por *Streptococcus infantarius* 25124. Mientras que *Weissella confusa* L9 solamente se tiñó de color blanco y no provocó ningún cambio en el vire del indicador.

Al final, se procedió a determinar las condiciones óptimas de incubación que permitieran posibilitar la diferenciación de cada una de las cepas cuando el medio fuera inoculado con ellas. De esto, se encontró que las condiciones óptimas de incubación del medio son 24-72h a 30°C cuando se inoculan cultivos puros (figura 9).

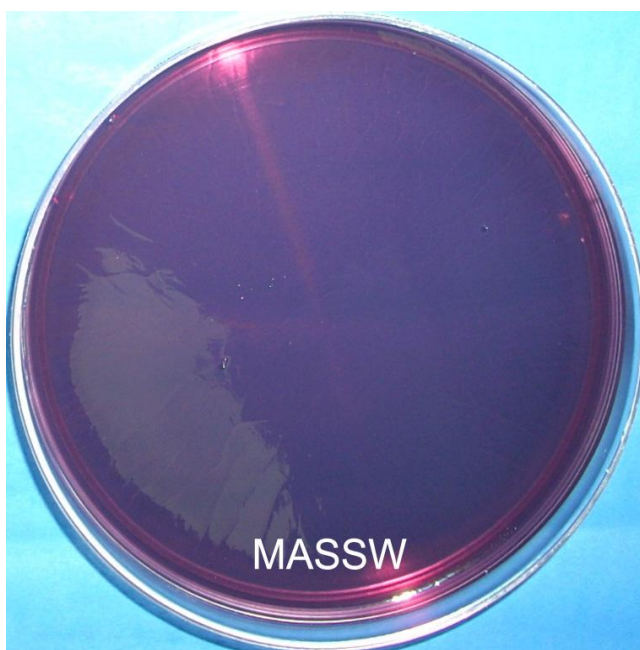


Figura 8. Medio MASSW sin inocular.

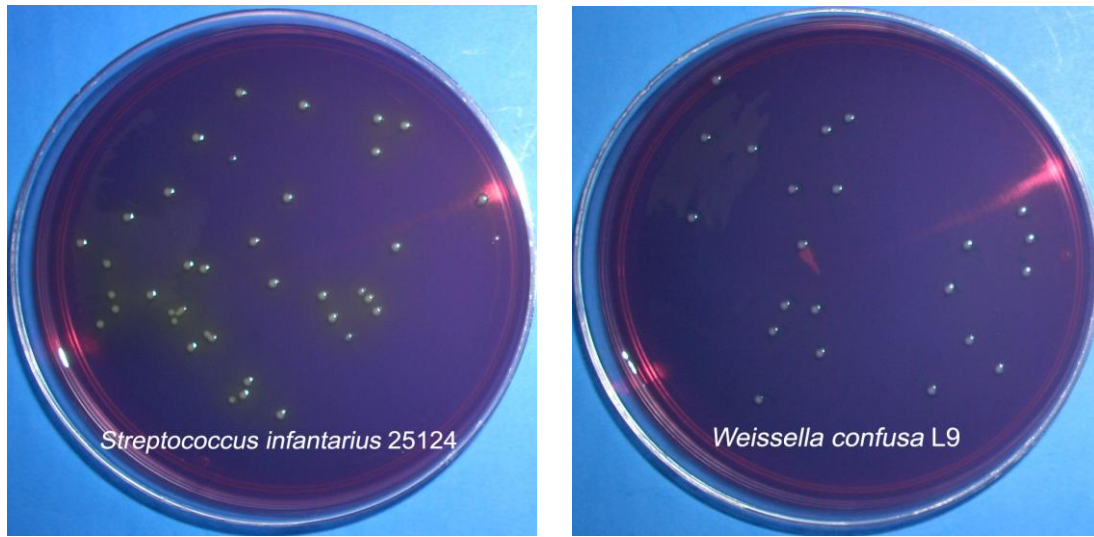


Figura 9. Medio MASSW inoculado con *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9 después de 24h a 30°C.

6.3.3. Condiciones óptimas de incubación para diferenciar a *Streptococcus infantarius* 25124 de *Weissella confusa* L9.

Una vez que fueron establecidas las condiciones óptimas de incubación de los cultivos puros, se procedió a determinar las condiciones óptimas de incubación para la mezcla de ambos microorganismos. Para esto, se monitorearon las características que las cepas presentaron a diferentes condiciones de incubación (tabla 10):

Tabla 10. Descripción de *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9 a distintos tratamientos de incubación.

Condiciones de incubación					Microorganismo	Característica			Descripción
30°C			5°C			Actividad amilolítica	Producción de polímero	Vire indicador	
24h	48h	72h	24h	48h					
x					<i>Streptococcus infantarius</i> 25124	-	+	++	Las colonias no pudieron diferenciarse en estas condiciones. <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 produjo poco polímero, y no causó apreciablemente el vire del indicador de pH, así como tampoco, su colonia fue muy amarillenta. <i>Weissella confusa</i> L9 formó colonias de color blanquizco y no viró el indicador de pH (figura 10).
					<i>Weissella confusa</i> L9	-	-	-	
x			x		<i>Streptococcus infantarius</i> 25124	-	+	++	Incrementó muy poco su polímero y sus colonias no fueron más pigmentadas que las obtenidas a 30° durante 24h.
					<i>Weissella confusa</i> L9	-	+	-	Produjo poco polímero, continuó con la misma tonalidad y sin decolorar el medio de cultivo.
x				x	<i>Streptococcus infantarius</i> 25124	+	+	++	Mostró una mínima hidrólisis de almidón poco visible. La coloración amarillenta del medio, como consecuencia de la producción de acidez, se vio reducida y la producción de polímero fue escasa. La colonia del microorganismo fue amarilla en su totalidad.
					<i>Weissella confusa</i> L9	-	+++	-	Mantuvo la pigmentación blanca en sus colonias, no decoloró el medio y hubo aumento en la producción de polímero.

Tabla 10. (Continuación)

Condiciones de incubación					Microorganismo	Característica			Descripción
30°C			5°C			Actividad amilolítica	Producción de polímero	Vire indicador	
24h	48h	72h	24h	48h					
	x				<i>Streptococcus infantarius</i> 25124	-	+	+++	Ambos microorganismos pudieron ser diferenciados en estas condiciones de incubación debido a la pigmentación de las colonias y el vire del indicador. La actividad amilolítica de <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 y la producción de polímero de <i>Weissella confusa</i> L9 no fueron visibles en estas condiciones.
					<i>Weissella confusa</i> L9	-	-	-	
	x			x	<i>Streptococcus infantarius</i> 25124	++	+	+++	Su actividad amilolítica se detectó claramente. Las colonias fueron amarillas con un centro de color café (apreciable desde las 48h a 30°C). Se produjo poco polímero por este microorganismo.
					<i>Weissella confusa</i> L9	-	+++	-	<i>Weissella confusa</i> L9 mantuvo la coloración inicial blanquizca pero la producción de polímero fue notable (figura 11).

Tabla 10. (Continuación)

Condiciones de incubación					Microorganismo	Característica			Descripción
30°C			5°C			Actividad amilolítica	Producción de polímero	Vire indicador	
24h	48h	72h	24h	48h					
		x			<i>Streptococcus infantarius</i> 25124	-	+	++++	El vire del indicador de pH contenido en el medio se observa más apreciablemente que a las 48h de incubación a 30°C. <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 mantuvo la cantidad de polímero producido a las 24h de incubación a 30°C. No se detectó hidrólisis de almidón. <i>Weissella confusa</i> L9 continuó sin producir polímero y se mantuvo con la coloración blanquizca inicial (figura 12).
					<i>Weissella confusa</i> L9	-	-	-	
		x		x	<i>Streptococcus infantarius</i> 25124	+++	+	++++	Prácticamente se observan las mismas características que las adquiridas a las 48h de incubación a 30°C y 48h a 5°C, la única variante es la intensidad del vire del indicador de pH del medio.
					<i>Weissella confusa</i> L9	-	+++	-	

En vire del indicador: +++++ Intenso +++ Mediano ++ Mínimo - Nulo

En actividad amilolítica: +++ Abundante ++ Escasa + Mínima - Nula

En producción de polímero: +++ Abundante + Escaso - Nulo

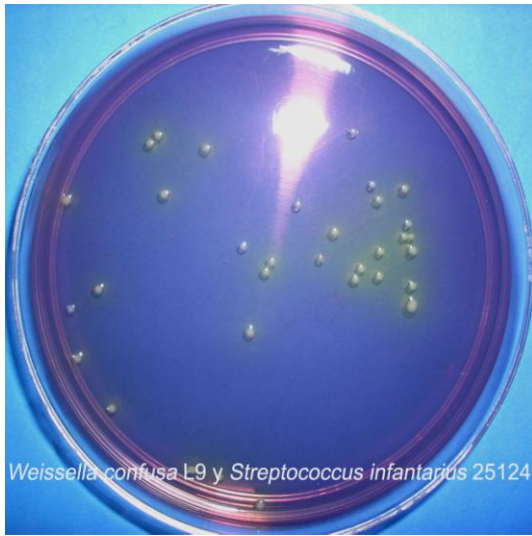


Figura 10. Crecimiento de *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9 en MASSW después de 24h a 30°C.

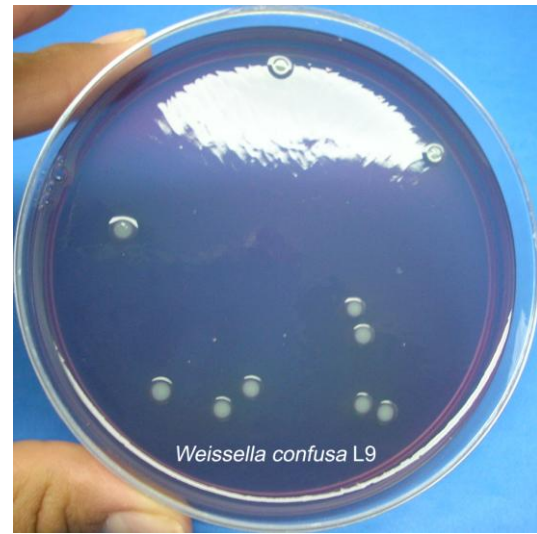


Figura 11. Crecimiento de *Weissella confusa* L9 en MASSW después de 48h a 30°C más 48h a 5°C.

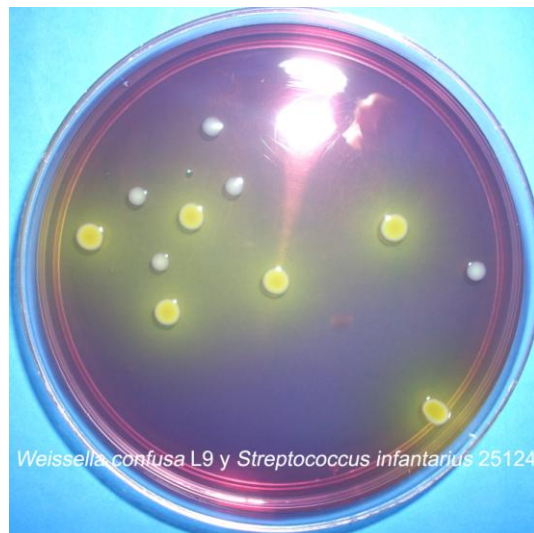


Figura 12. Crecimiento de *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9 en MASSW después de 72h a 30°C.

Finalmente cuando se tuvo la descripción de las características a las diferentes condiciones de incubación se determinó que las condiciones óptimas de incubación para la mezcla de cultivos puros de las cepas, y posiblemente cultivos mixtos de las mismas, son de 48-72h a 30°C y 48h a 5°C; las cuales denotan las siguientes características sobre el medio:

- a) La coloración purpúrea inicial viró a color amarillo y fue posible observar la producción de polímero extracelular por *Streptococcus infantarius* 25124 después de 48h a 30°C mientras que *Weissella confusa* L9 lo decoloró tenuemente ó mantuvo la coloración purpúrea inicial y no produjo polímero a las mismas condiciones de crecimiento.
- b) Cuando el medio inoculado fue mantenido a 30°C durante 48-72h, y posteriormente, sometido a 48h a 5°C se observó un ligero incremento en la producción del polímero extracelular y visibilidad de actividad amilolítica en el medio por parte de *Streptococcus infantarius* 25124, entre tanto *Weissella confusa* L9 comenzó a producir en cantidades considerables su polímero extracelular, que pudo ser percibido sobre el medio (figura 13 y 14).

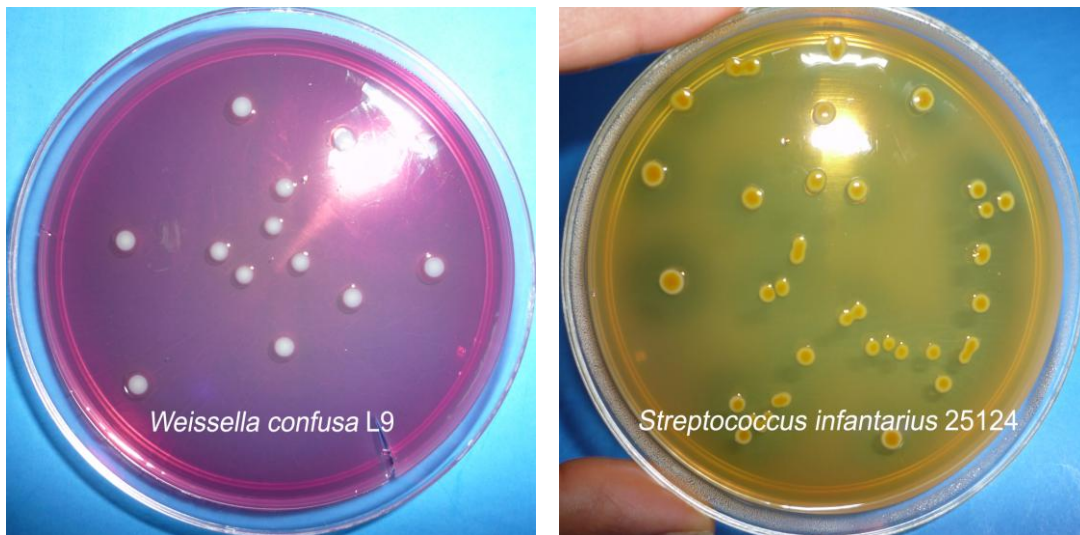


Figura 13. Medio MASSW inoculado con *Weissella confusa* L9 (izq.) y *Streptococcus infantarius* 25124 (der.) después de 72h a 30°C y 48h a 5°C (En cultivos puros).



Figura 14. Medio MASSW inoculado con *Weissella confusa* L9 y *Streptococcus infantarius* 25124 después de 72h a 30°C y 48h a 5°C (En mezcla).

6.4. Cuantificación diferencial de los microorganismos en el medio MASSW.

6.4.1. Cinética de crecimiento de cultivos puros.

Se determinó la cinética de crecimiento de *Weissella confusa* L9 y de *Streptococcus infantarius* 25124 como cultivos puros (figura 15 y 16). Para ello, se midió su crecimiento, como absorbancia a 600nm, a intervalos de una hora en el medio líquido MRS para *Weissella confusa* L9, y en el medio líquido MRS-A para *Streptococcus infantarius* 25124; durante 24h. En éstas se observó que el comportamiento cinético de ambos microorganismos fue similar, pues ambos alcanzaron su fase logarítmica (1h) y estacionaria (5h), prácticamente en el mismo intervalo de tiempo. Sin embargo, los resultados obtenidos de velocidad de crecimiento, μ , mostraron que *Weissella confusa* L9 ($\mu = 0.77 \text{ h}^{-1}$) creció más rápidamente que *Streptococcus infantarius* 25124 ($\mu = 0.59 \text{ h}^{-1}$), lo que no fue concordante con los resultados previos obtenidos por Bolaños (2005, datos no publicados) con las mismas cepas, ni lo expuesto por Díaz *et al.* (2003) para *Streptococcus infantarius* 25124; pues en ambas investigaciones se indica que *Streptococcus infantarius* 25124 presenta una $\mu = 0.90 \text{ h}^{-1}$ y 0.94 h^{-1} en el medio MRS-A a 30°C , que resulta ser un valor mayor del obtenido en este estudio. Esto quizá se debió a la preparación del inóculo, pues a pesar de haberse manejado prácticamente las mismas condiciones de crecimiento e incubación que en dichas investigaciones, la variante del tiempo de incubación (3h a 30°C) de su preinóculo realizada en este estudio, modificó notablemente los resultados de la velocidad de crecimiento.

Por otro lado, *Weissella confusa* L9 a pesar de que también presentó la variante del preinóculo descrita en el párrafo anterior, no mostró un valor de μ tan alejado del determinado por Bolaños (2005, datos no publicados) para ésta misma en el medio MRS, ni del determinado por otros investigadores que han estudiado los parámetros cinéticos para la misma especie en medios distintos al MRS, como Gaggiano *et al.* (2007), quienes reportan un valor de $\mu = 0.75 \text{ h}^{-1}$ para *Weissella confusa* DPPMA20 en la fermentación de una masa de trigo a 37°C por 4h.

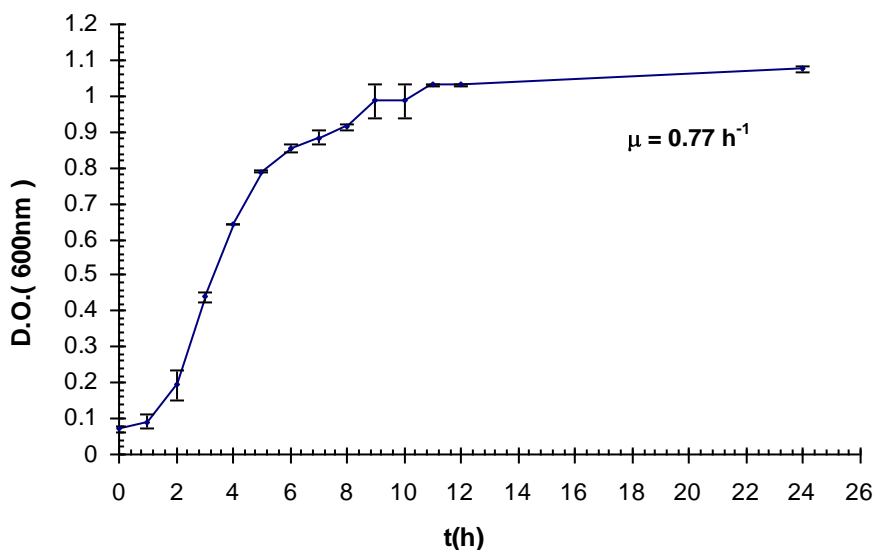


Figura 15. Cinética de crecimiento de *Weissella confusa* L9 en MRS a 30°C .

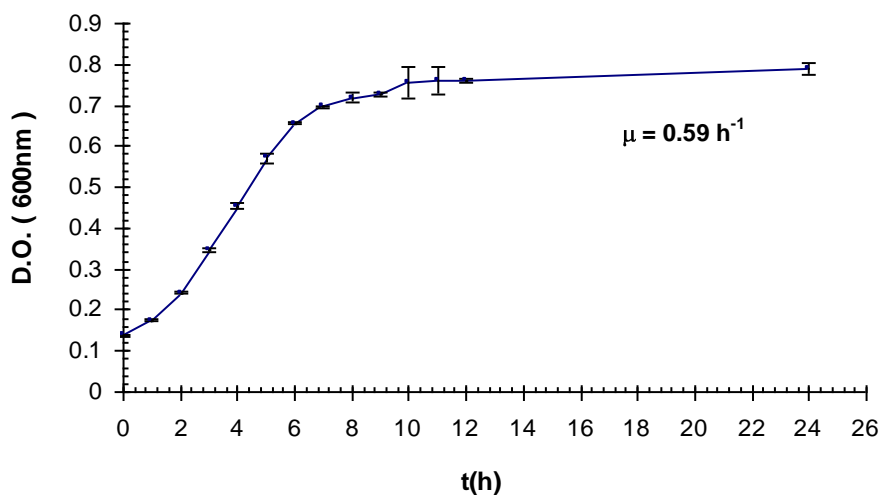


Figura 16. Cinética de crecimiento de *Streptococcus infantarius* 25124 en MRS-A a 30°C.

6.4.2. Comparación de las cuentas obtenidas en MASSW con las obtenidas en el medio MRS.

El medio MRS es el usado generalmente para cuantificar bacterias lácticas. Se compararon las cuentas de cada una de las bacterias estudiadas en ambos medios, para confirmar que en el medio MASSW se obtienen cuentas similares, y por lo tanto, no existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la enumeración con respecto al medio de cultivo MRS.

En las tablas 11 y 12 se muestran las cuentas obtenidas para cada bacteria al tiempo cero y las 24h de crecimiento, respectivamente; y en la figura 17, las colonias que se desarrollaron para el tiempo de 24h de crecimiento a las condiciones óptimas de incubación. En ambos casos, se obtuvieron cuentas similares para ambos medios, lo

cual indica que en el medio MASSW, tanto en concentraciones altas como bajas, no se inhibe el crecimiento de estas bacterias lácticas.

Tabla 11. Número de colonias en los medios MRS y MASSW, y concentración de las cepas al tiempo cero de fermentación en los medios MRS-A (*Streptococcus infantarius* 25124) y MRS (*Weissella confusa* L9) a 30°C.

Cepa	<i>Streptococcus infantarius</i> 25124		<i>Weissella confusa</i> L9	
Medio	MRS	MASSW	MRS	MASSW
Número de colonias	46	49	317	362
	31	40	431	412
	70	41	245	206
Cuenta _{prom}	49	43	331	327
UFC/mL (MRS-A ó MRS)	$4.9 \times 10^6 \pm 2.0 \times 10^6$	$4.3 \times 10^6 \pm 5.0 \times 10^5$	$3.3 \times 10^7 \pm 9.0 \times 10^6$	$3.3 \times 10^7 \pm 1.0 \times 10^7$

Tabla 12. Número de colonias en los medios MRS y MASSW, y concentración de las cepas al tiempo 24h de fermentación en los medios MRS-A (*Streptococcus infantarius* 25124) y MRS (*Weissella confusa* L9) a 30°C.

Cepa	<i>Streptococcus infantarius</i> 25124		<i>Weissella confusa</i> L9	
Medio	MRS	MASSW	MRS	MASSW
Número de colonias	74	63	109	88
	82	74	97	126
	109	97	137	92
Cuenta _{prom}	88	78	114	102
UFC/mL (MRS-A ó MRS)	$8.8 \times 10^8 \pm 6.5 \times 10^8$	$7.8 \times 10^8 \pm 1.7 \times 10^8$	$1.1 \times 10^9 \pm 2.0 \times 10^8$	$1.0 \times 10^9 \pm 2.0 \times 10^8$

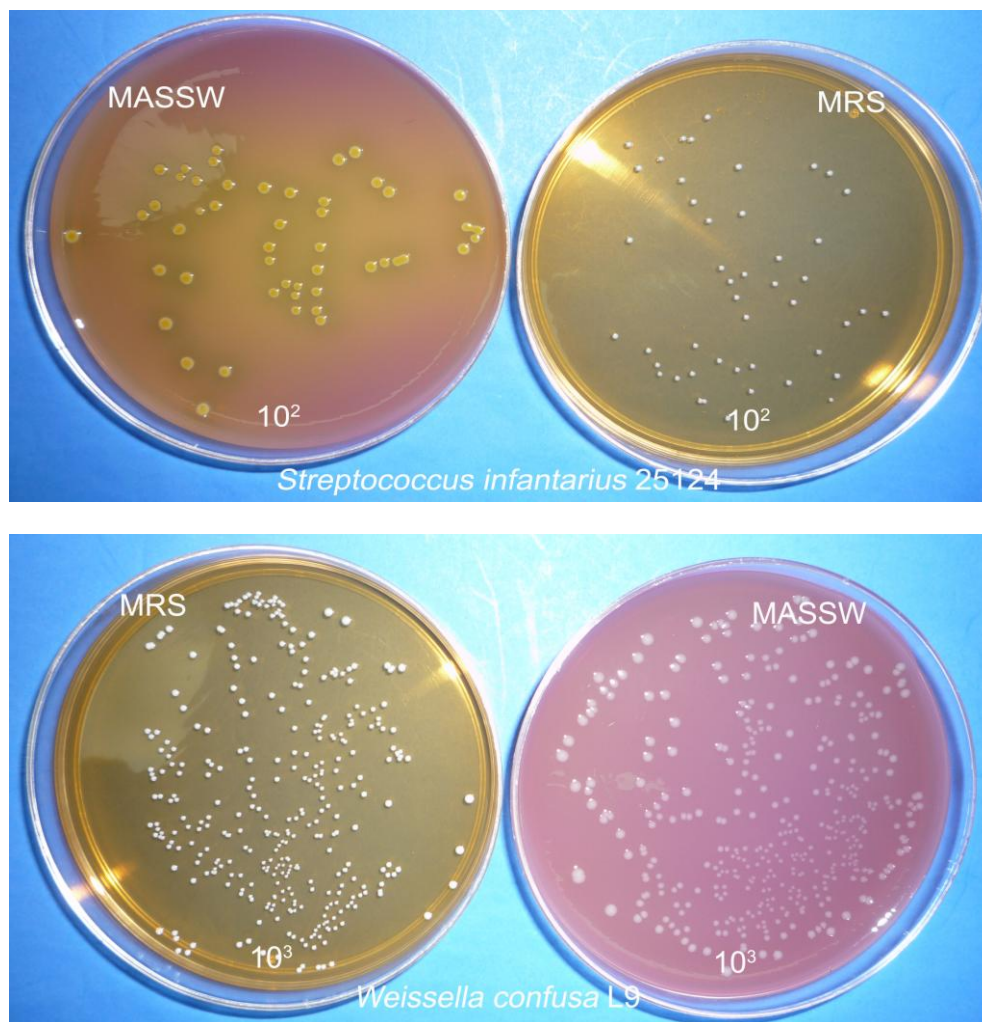


Figura 17. Cuenta en placa del tiempo cero de fermentación de los medios MRS-A (*Streptococcus infantarius* 25124) y MRS (*Weissella confusa* L9) a 30°C, en el medio diseñado MASSW (superior izq. e inferior der.) y el medio comercial MRS (superior der. e inferior izq.), incubados ambos a 48h a 30°C y 24h a 5°C. Las concentraciones 10^2 y 10^3 , indicadas en las cajas, corresponden al número de UFC/ mL inoculado sobre ellas.

6.4.3. Determinación de la cuenta mínima detectable de cada bacteria en cultivo mixto.

Se determinó la concentración mínima de *Streptococcus infantarius* 25124 que puede ser detectada en presencia de cuentas grandes de *Weissella confusa* L9, y viceversa, sobre el medio de cultivo diseñado. Para ello, se realizaron mezclas

(figura 18) de las cepas a distintas concentraciones y volúmenes, como se muestra en las tablas 13 y 14.

Dichos resultados arrojaron que, estando en mezcla los microorganismos, la concentración estimada como mínima para cuantificarlos y diferenciarlos, es de aproximadamente 10^2 UFC/mL (figura 19), correspondiente a un promedio de entre 7 y 11 colonias en el caso de *Weissella confusa* L9, y entre 18 y 21 colonias para *Streptococcus infantarius* 25124 (tablas 13 y 14). Asimismo, se determinó que cuando la diferencia en concentración es mayor de un ciclo logarítmico, no se detectan las colonias del microorganismo que está en menor concentración.

Tabla 13. Cuenta en placa de la mezcla de *Streptococcus infantarius* 25124 (Si) y *Weissella confusa* L9 (Wc) en MASSW (2mL).

<i>Streptococcus infantarius</i> 25124 / <i>Weissella confusa</i> L9						
Concentración a probar (UFC/mL)	$10^2/10^3$		$10^2/10^2$		$10^3/10^2$	
	Wc	Si	Wc	Si	Wc	Si
Cuenta de colonias	19	142	16	22	76	18
	3	127	4	18	72	21
	4	125	12	15	90	24
Cuenta _{prom}	9	131	11	18	79	21
Conc inicial (UFC/ml)	1.8×10^9	2.6×10^9	2.2×10^9	3.6×10^9	1.6×10^9	4.2×10^9

Tabla 14. Cuenta en placa de la mezcla de *Streptococcus infantarius* 25124 (Si) y *Weissella confusa* L9 (Wc) en MASSW (3mL).

<i>Streptococcus infantarius</i> 25124 / <i>Weissella confusa</i> L9						
Concentración a probar (UFC/mL)	$10^2/10^3$		$10^2/10^2$		$10^3/10^2$	
	Wc	Si	Wc	Si	Wc	Si
Cuenta de colonias	7	125	4	20	62	19
	8	124	6	28	62	3
	13	114	11	16	96	28
Cuenta _{prom}	9	121	7	21	73	17
Conc inicial (UFC/ml)	2.7×10^9	3.6×10^9	2.1×10^9	6.3×10^9	2.2×10^9	5.1×10^9

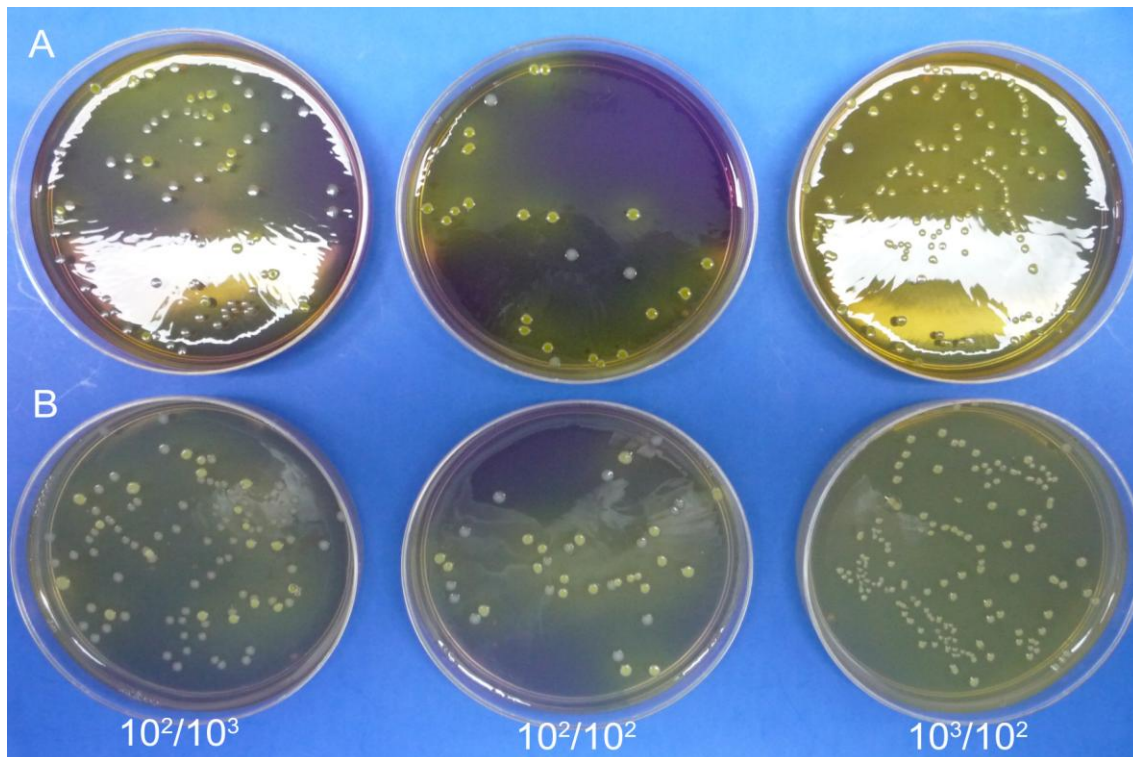


Figura 18. Cultivos en mezcla al 50%. (A) Volumen de mezcla 3mL (B) Volumen de mezcla 2mL.

[*Streptococcus infantarius* 25124] / [*Weissella confusa* L9]

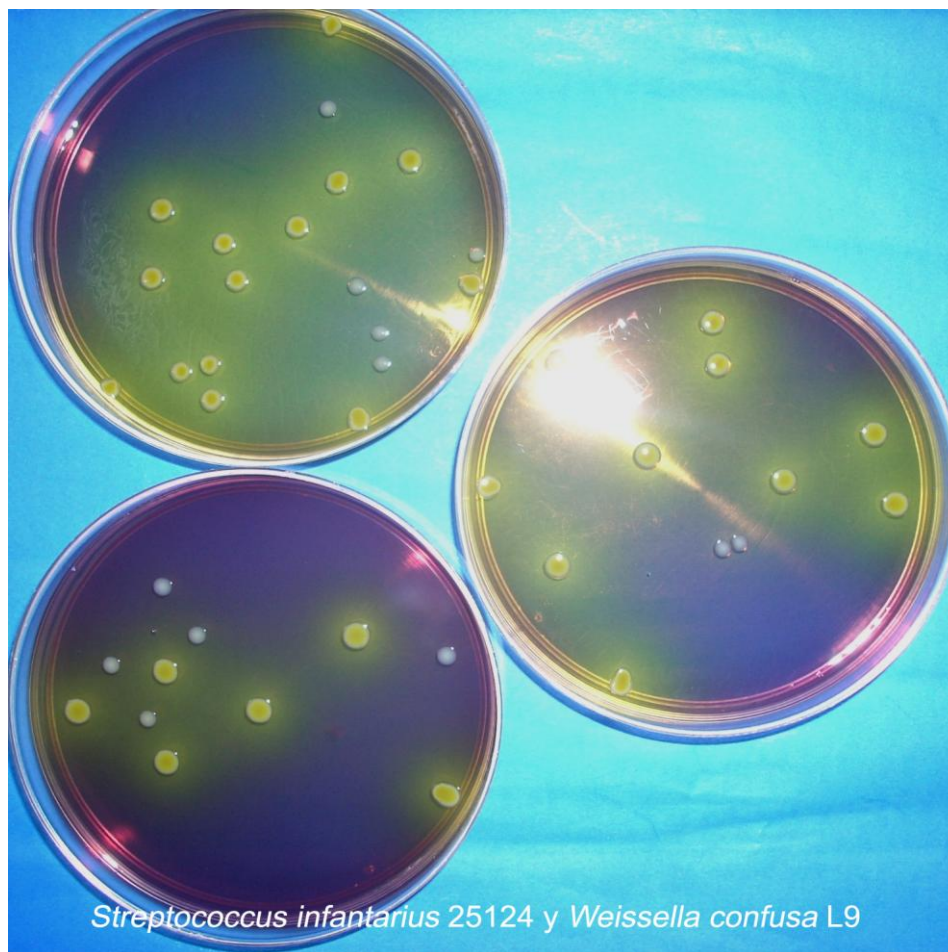


Figura 19. Cultivos de la mezcla de *Weissella confusa* L9 y *Streptococcus infantarius* 25124 a la concentración adecuada para su cuantificación (10^2 UFC/mL).

Con el medio diseñado, como puede observarse (figura 19), es posible distinguir las colonias de ambos microorganismos; sin embargo se presenta la limitación de todos los medios de cultivo diferenciales, en los cuales no es posible detectar cuentas bajas de un microorganismo si el otro se encuentra en cuentas altas. Para evitar este problema sería necesario usar un medio de cultivo diferente para cada cepa, en el cual se inhibiera el desarrollo de la otra cepa.

7. DISCUSIÓN GENERAL

El presente trabajo tuvo como objeto de estudio la cuantificación diferencial del crecimiento de dos bacterias ácido lácticas de interés en la fermentación del pozol, *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9, con la finalidad de que dicho estudio, aunado a otras investigaciones posteriores, pueda proveer de información acerca del papel que desempeñan estas cepas en la fermentación de la bebida.

Para lograr dicho objetivo, se requirió del diseño de un medio de cultivo diferencial. Para esto, fue necesario definir ciertas características de las cepas como la actividad amilolítica, el pH mínimo de crecimiento, la producción de polímero extracelular y la producción de acidez.

De la revisión de la actividad amilolítica se encontró que *Streptococcus infantarius* 25124 presenta actividad amilolítica a diferencia de *Weissella confusa* L9, lo que sugiere que puede ser una de las cepas proveedoras de sustrato para el crecimiento de bacterias no amilolíticas en el pozol como *Weissella confusa* L9, y que se desarrollan posterior a ella; aunque también resulta de interés, que *Weissella confusa* L9 es capaz de crecer en el medio amiláceo sin degradar dicha fuente de energía; suponiendo entonces que utiliza otros componentes del medio para sobrevivir.

Por otro lado, los resultados de la determinación del pH mínimo de crecimiento mostraron que *Weissella confusa* L9 puede resistir un valor de pH ácido (4.0) más

bajo al de *Streptococcus infantarius* 25124 (4.5); lo que concuerda con los estudios realizados por Reuter (1985) del comportamiento del género *Streptococcus*, pero discrepan de los reportados por Díaz *et al.* (2003) para la misma cepa de trabajo, ya que indican que el género *Streptococcus* está presente durante toda la fermentación del pozol siendo que durante la misma se alcanzan valores de pH de hasta 3.8 (Sainz *et al.* 2005), lo que implica una condición muy poco favorable para el crecimiento de este microorganismo de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo. Aunque quizá, esta aparente resistencia del microorganismo a las condiciones adversas del ambiente se deba a interacciones sinérgicas entre la diversa microbiota y él; o bien, a la formación de microambientes en la masa, con zonas más ácidas que otras, debido a las dificultades que se presentan para la difusión de los ácidos en el sustrato sólido; sin embargo, se requiere de revisiones más detalladas al respecto.

Estudios referentes a la producción de polímero extracelular de bacterias ácido lácticas revelan que sólo algunos de sus géneros son capaces producir polímeros. Dentro de estos se ubican los géneros *Weissella* y *Streptococcus*. De allí que se haya investigado la presencia de esta característica en las cepas de trabajo. Los resultados obtenidos referentes a esto, mostraron que *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9 son capaces de producir polímero cuando son crecidas en un medio con sacarosa a 30°C durante 24h. Sin embargo, la producción excesiva de polímero por las dos cepas a estas condiciones tuvo que ser controlada para poder aplicarla como característica diferencial en el medio a diseñar. Para ello, se realizaron variaciones en la concentración de sacarosa en combinación con

almidón, ya que con este último no producen polímero, y además, es la principal fuente de carbono y energía en la masa nixtamalizada para pozol. De lo anterior, se encontró que las concentraciones de sacarosa y almidón adecuadas para diferenciar a las cepas son 2g de sacarosa y 18g de almidón por litro de medio a preparar (correspondiente a 0.2% y 1.8%, respectivamente) cuando son crecidas a 30°C durante 24h. Resultó interesante conocer que *Streptococcus infantarius* 25124 produce polímero con mínimas cantidades de sacarosa a diferencia de *Weissella confusa* L9, que requiere de una concentración más elevada de sacarosa (Maina *et al.* 2008) ó del sometimiento de condiciones adversas de temperatura para producir polímero, como fue manifestado por la cepa en este estudio cuando se le incubó a 5°C durante 48h después de haberse mantenido a 30°C por 48-72h. Confirmando de esta manera, lo que Sánchez *et al.* (2006) mencionaban sobre el impacto que tienen las características del cultivo y el estrés en el tipo, concentración y producción de polímero en las especies ácido lácticas, especialmente en *Lactobacillus pentosus* LPS26, su microorganismo de estudio. De hecho se sabe que la producción de polímero, en ambientes naturales, puede ser asociada a la protección celular (por desecación, estrés osmótico, antibióticos, compuestos tóxicos ó ataque de bacteriófagos o protozoos) ó virulencia (De Vuyst *et al.* 1999; Sutherland, 1998).

La conjugación de las características idóneas para diferenciar a las cepas (producción de polímero, acidez y actividad amilolítica) permitió la elaboración del medio de cultivo diferencial MASSW (MRS, almidón-sacarosa, *Streptococcus-Weissella*). Este medio, al que además le fue incorporado el indicador púrpura de bromocresol en su composición como indicador de pH, se conformó por sacarosa y

almidón como principales fuentes de energía y diferenciación, y algunos otros componentes; asemejando su forma de elaboración (variación de las fuentes de carbono) a la de otros medios descritos previamente (Hartemink *et al.* 1997; Vinderola y Reinheimer, 1999; Roy, 2001; Talwalkar *et al.* 2004; Bujalance *et al.* 2006; Tabasco *et al.* 2008).

Cuando la formulación del nuevo medio fue establecida, le prosiguió el establecimiento de las condiciones de incubación para el crecimiento de *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9 tanto como cultivos puros (24-72h a 30°C) como mezcla de cultivos (48-72h a 30°C y 48h a 5°C), encontrándose que el tiempo de incubación (entre 2 hasta 4 días), aunque no la temperatura, coincidía con el de otros medios establecidos (M17, MRS 5.2, MRS clindamicin, etc.) (Van de Castele *et al.* 2006). Fue necesario establecer dichas condiciones de incubación cuando se advirtió que no se lograban distinguir las colonias de las cepas cuando se inoculaban mezcladas como cuando se inoculaban por separado. Para establecerlas, se requirió someter al medio inoculado a variaciones en la temperatura de incubación pues se observó que se favorecía la aparición de ciertas características en el medio, que no eran visibles cuando la incubación se realizaba a una sola temperatura, ni aún si se prolongaba el tiempo de incubación del medio a dicha temperatura. Lo anterior deja ver que la condición de estrés (cambio de temperatura) a la que fueron expuestas las cepas, posiblemente, activó mecanismos de sobrevivencia que indujeron a la utilización de algunos otros componentes del medio que se encontraban presentes, pero que no había sido necesarios utilizarlos, favoreciendo entonces, la aparición de características como la

producción de polisacárido, como se mencionó, en párrafos anteriores, para el caso de *Weissella confusa* L9 cuando fue sometida a baja temperatura (5°C) en la presente investigación. Esto, que pudiera ser un campo de investigación para otro estudio, permitió en la presente investigación mejorar la diferenciación entre las colonias de ambas cepas.

Una vez que las condiciones óptimas de crecimiento para diferenciar a las cepas se determinaron, se comparó el medio de cultivo diferencial MASSW con el medio MRS. De esto, se encontró de acuerdo al análisis estadístico realizado para esta comparación, que no existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre ellos para la enumeración de *Weissella confusa* L9 ni de *Streptococcus infantarius* 25124, por lo que podría considerársele como un medio óptimo para el conteo de las cepas en estudio; sin embargo, se requiere de la comparación con otros medios ya establecidos.

Y puesto que comúnmente en la práctica, resulta complicada la enumeración diferencial de una especie debido a la concentración en la que se encuentra en el alimento del cual proviene; se requirió evaluar la concentración a la cual puede diferenciarse a *Weissella confusa* L9 de *Streptococcus infantarius* 25124, y viceversa. Para ello, se inocularon sobre el medio de cultivo diferentes diluciones de las cepas, solas ó en mezcla, a las condiciones óptimas de incubación para diferenciarlas; lográndose de esta manera la determinación de la posible concentración (10^2 UFC/mL para cada una de las cepas) para enumerar y diferenciar a las mismas.

Sin embargo, aunque con el medio diseñado es posible distinguir las colonias de ambos microorganismos, la concentración para enumerar y diferenciar a estos, nos indica que se presenta la limitación de todos los medios de cultivo diferenciales, en los cuales no es posible detectar cuentas bajas de un microorganismo si el otro se encuentra en cuentas altas. Por lo que para evitar este problema sería necesario usar un medio de cultivo diferente para cada cepa, en el cual se inhibiera el desarrollo de la otra cepa.

8. CONCLUSIONES

- Se diseñó el medio de cultivo MASSW que permite la cuantificación diferencial de dos cepas pertenecientes a las bacterias ácido lácticas, *Weissella confusa* L9 y *Streptococcus infantarius* 25124, predominantes en la fermentación del pozol.
- Las características de las cepas que las hacen diferenciables en el medio de cultivo son: la actividad amilolítica, la producción de polímero extracelular y la producción de acidez en el medio.
- La comparación de cuentas del medio de cultivo MASSW y el medio comercial MRS, dejó ver que el primero permite cuentas equivalentes a las detectadas por el MRS, por lo que podría considerársele como un medio óptimo para el conteo de las cepas en estudio.
- El número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) mínimo de cada cepa que puede ser detectado sobre el medio MASSW en presencia de la otra es de aproximadamente 10^2 , lo cual como ocurre como todos los medios diferenciales, representa una desventaja.
- La cuantificación de las cepas en estudio, haciendo uso del medio MASSW, a partir de un modelo del pozol en el cual se inoculen únicamente estas dos cepas, probablemente permitirá conocer la interacción entre estas cepas y su participación en el pozol.

9. ANEXO A

A1. Preparación de medios de cultivo.

MRS (De man, Rogosa, Sharpe), OXOID®.

La formulación del medio comercial es la siguiente (g/L):

Componente	Conc (g/L)
Peptona	10
Extracto de carne	8
Extracto de levadura	4
Glucosa	20
Tween 80	1mL
Fosfato dipotásico	2
Acetato de sodio trihidratado	5
Citrato triamoniaco	2
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2
Sulfato de manganeso	0.05
Agar bacteriológico	10

La hidratación del MRS agar y el MRS caldo se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones de manufactura. El pH final fue de 6.02 ± 0.2 , en ambos casos. Se esterilizó a 121°C durante 15 min y se mantuvo previo a su utilización durante 24h a 30°C para corroborar su esterilidad.

MRS- almidón: MRS-A (Díaz, 2003).

Fue preparado disolviendo los siguientes componentes en 1L de agua destilada. Obteniéndose un pH final de 6.75- 6.8. Se esterilizó a 121°C durante 15min. Se mantiene a 30°C por 24h previamente a su utilización para corroborar su esterilidad.

Componente	Conc (g/L)
Peptona pancreática de caseína (OXOID®)	10
Extracto de carne (OXOID®)	10
Extracto de levadura (OXOID®)	5
Almidón (PROLABO®)	20
Citrato diamoniaco (J.T. BAKER®)	2.17
Acetato de sodio (J.T. BAKER®)	5
Sulfato de magnesio heptahidratado (SIGMA®)	0.207
Sulfato de manganeso (SIGMA®)	0.056
Fosfato dipotásico (MALLINCKRODT®)	2.62
Agar bacteriológico (OXOID®)	15

Nota: Para la determinación de la actividad amilolítica a pH 6.0 y 5.5 (acidificado) se utilizó el medio soluble de papa de la marca comercial J.T. BAKER®.

Agar MRS – AA (agar MRS-almidón acidificado).

La acidificación se llevó a cabo adicionando 902µL de una solución de ácido láctico al 50% a 225mL de agar MRS-A (J.T. BAKER®) estéril. Una vez preparado el medio se mantiene a 30°C por 24h previamente a su utilización para corroborar su esterilidad.

Agar MRS – AI (MRS almidón con indicador).

Componente	Conc (g/L)
Peptona pancreática de caseína (OXOID®)	10
Extracto de carne (OXOID®)	10
Extracto de levadura (OXOID®)	5
Almidón (PROLABO®)	*
Sacarosa (SIGMA®)	*
Citrato diamónico (J.T. BAKER®)	2.17
Acetato de sodio (J.T. BAKER®)	5
Sulfato de magnesio heptahidratado (SIGMA®)	0.207
Sulfato de manganeso (SIGMA®)	0.056
Fosfato dipotásico (MALLINCKRODT®)	2.62
Agar bacteriológico (OXOID®)	15
Indicador PBC o RM (SYNTHETICAL LABORATORIES®)**	0.05

PBC: Púrpura de bromocresol RM: Rojo de metilo

Las variantes que se tienen en este medio son la fuente de carbono * y el indicador**. En el primer caso, además de almidón (PROLABO®) se añade sacarosa (SIGMA®); ambos a diferentes proporciones. Las proporciones utilizadas fueron almidón: sacarosa, 25:75, 50:50, 99:1%, respectivamente; añadiendo la sacarosa en relación a la cantidad inicial de almidón en el medio (20g/L). En el segundo caso, el indicador de pH (Rojo de metilo o púrpura de bromocresol) se añadió a una concentración de 0.005% ó 0.05 g/L. El procedimiento de esterilización fue a 121°C durante 15min. El pH final del medio fue de 6.75.

Agar MRS – AS (agar MRS- almidón sacarosa).

Componente	Conc (g/L)
Peptona pancreática de caseína (OXOID®)	10
Extracto de carne (OXOID®)	10
Extracto de levadura (OXOID®)	5
Almidón (PROLABO®)	*
Sacarosa (SIGMA®)	*
Citrato diamoniaco (J.T. BAKER®)	2.17
Acetato de sodio (J.T. BAKER®)	5
Sulfato de magnesio heptahidratado (SIGMA®)	0.207
Sulfato de manganeso (SIGMA®)	0.056
Fosfato dipotásico (MALLINCKRODT®)	2.62
Agar bacteriológico (OXOID®)	15
Indicador púrpura de bromocresol (SYNTHETICAL LABORATORIES®)	0.05

En este caso, también se variaron las concentraciones de almidón* y sacarosa*; sin embargo el indicador utilizado fue únicamente púrpura de bromocresol. Las variaciones de las fuentes de carbono empleadas, almidón-sacarosa, se determinaron con respecto a la cantidad inicial de almidón (20g/L), de allí que la sacarosa fuera añadida en un 100, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 y 1%. Todos los componentes del medio fueron disueltos en 1L de agua destilada. Se esterilizó a 121°C durante 15min. En condiciones estériles, se vertió en placas hasta solidificar y se dejó en prueba de esterilidad a 30°C durante 24h.

MRS acidificado.

La acidificación del caldo o agar MRS se logró al adicionarle solución de ácido láctico al 50%, y puesto que se requirió de valores de pH variables, fue necesario variar el volumen de solución de ácido láctico al 50% a añadir en el medio. El volumen requerido en cada caso se especifica en la tabla A1.

Tabla A1. Volúmenes necesarios para preparar el medio acidificado.

pH requerido	Vol. de soln. de ácido láctico al 50% a añadir (mL)	Vol. de agar MRS (mL)	Vol. de soln. de ácido láctico al 50% a añadir(μL)	Vol. de caldo MRS (mL)
6.0 ó 6.5	-----	225	-----	4
5.5	0.73	225	13	4
5.0	1.45	225	25.8	4
4.5	2.69	225	47.8	4
4.0	4.94	225	87.8	4
3.7	7.19	225	127.8	4

A2. Preparación de reactivos.

Solución de ácido láctico (CH₃CH(OH)COOH) al 50% (Aldrich Chemical Company, Inc.).

Para acidificar el caldo MRS (OXOID®) y el agar MRS (OXOID®), se requirió de preparar 25mL de una solución de ácido láctico al 50% (ver A2). Para ello, se determinó la cantidad de ácido láctico ($\delta=1.209$) necesario, según lo siguiente:

$$25\text{mL} \left(\frac{50\%}{100\%} \right) = 12.5\text{mL}$$

$$12.5\text{mL ácido láctico} \left(\frac{1.209\text{g ácido láctico}}{\text{mL ácido láctico}} \right) \left(\frac{100\text{mL}}{85\text{g}} \right) = 17.77\text{mL ácido láctico}$$

Posteriormente, se colocaron los 17.77 mL de ácido láctico requeridos para la solución, en un matraz aforado de 100mL y se aforo a tal volumen con agua destilada. Finalmente, la solución ácida al 50% se traslado a un recipiente hermético y se le esterilizó a 121°C por 15 min. Se dejó enfriar y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su utilización.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abdelgadir, W., D.S. Nielsen, S. Hamad, M. Jakobsen.** 2008. A traditional Sudanese fermented camel's milk product, *Gariss*, as a habitat of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. *Int. J. Food Microbiol.* 127:215-219.
 2. **Addis, E.P.H., G.H. Fleet, J.M. Cox, D. Kolak, T. Leung.** 2001. The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 69:25-36.
 3. **Amann R. y M. Kühn.** 1998. *In situ* methods for assessment of microorganisms and their activities. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:352-358.
 4. **Ampe, F., N. ben Omar, C. Moizan, C. Wachter y J.-P. Guyot.** 1999. Polyphasic study of spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(9):5464-5473.
 5. **Atlas, R. y R. Bartha** (ed). 1993. Interactions among Microbial Populations, 37-68. En *Microbial Ecology: fundamentals and applications*. The Benjamin/Cummings Publishing company, Inc.Redwood City, CA.
 6. **Azar, M., N. Ter-Sarkissian, H. Ghavifek, T. Ferguson, H. Ghassemi.** 1977. Microbiological aspects of Sangak bread. *J. Food Science & Technol.*14:251-254.
 7. **Bantar, C.E., S. Reloso, F. Rodríguez, J. Smayevsky y H.M. Bianchini.** 1991. Absceso caused by vancomycin – resistant *Lactobacillus confusus*. *J. Clin. Microbiol* 29(9):2063-2064.
 8. **Beck, M., R. Frodl y G. Funke.** 2008. Comprehensive study of strain previously designated *Streptococcus bovis* consecutively isolated from human blood cultures and emended description of *Streptococcus gallolyticus* and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*. *J. Clin. Microbiol.* 46(9):2966-2972.
 9. **Benkerroum, N., M. Misbah, W. E. Sandine, A. T. Elaraki.** 1993. Development and use a selective medium for isolation of *Leuconostoc* spp. From vegetables and dairy products. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(2):607-609.
 10. **Ben Omar, N., y F. Ampe.** 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(9):3664-3673.
 11. **Biarç, J., I. S.Nguyen, A. Pini, F. Gossé, S. Richert, D. Thiersé, A. Van Dorsselaer, E. Leize-Wagner, F. Raul, J-P. Klein y M. Schöller-Guinard.** 2004. Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S.bovis*). *Carcinogenesis.* 25(8): 1477-1484.
 12. **Björkroth, K.J, U. Schillinger, R. Geisen, N. Weiss, B. Hoste, W. H. Holzapfel, H. J. Korkeala y P. Vandamme.** 2002. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*52: 141-148.
-

13. **Boquien, C., G. Corrieu y M. J. Desmazeaud.** 1988. Effect of fermentation conditions on growth of *Streptococcus cremoris* AM2 and *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091 in pure and mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(10): 2527-2531.
 14. **Boutrou, R., M. Aziza, A. Amrane.** 2006. Enhanced proteolytic activities of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* in mixed culture. *Enzyme and Microbial Techn.* 39:325-331.
 15. **Bouvet, A., F. Grimont, M.D. Collins, F. Benaouida, C. Devine, B. Régnault y P.A.D. Grimont.** 1997. *Streptococcus infantarius* sp. nov. related to *Streptococcus bovis* and *Streptococcus equinus*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 418:393-395.
 16. **Bujalance, C., M. Jiménez-Valera, E. Moreno, A. Ruíz-Bravo.** 2006. A selective differential medium for *Lactobacillus plantarum*. *J. Microbiol. Methods.* 66:572-575.
 17. **Cañas, U.A., E. Bárzana, J.D. Owens, M.C. Wachter.** 1993. La elaboración de pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia.* 44:219-229.
 18. **Caplice, E., G.F. Fitzgerald.** 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50:131-149.
 19. **Charlier, C., M. Cretenet, S. Even y Y. Le Loir.** 2009. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *Int. J. Food Microbiol.* 131:30-39.
 20. **Charteris, W.P., P.M. Kelly, L. Morelli, J. K. Collins.** 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Int. J. Food Microbiol.* 35: 1-27.
 21. **Choi, H.J., C.I. Cheigh, S.B. Kim, J.C. Lee, D.W. Lee, S.W. Choi, J.M. Park, Y.R. Pyun.** 2002. *Weissella kimchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:507-511.
 22. **Chun, J., J.S. Kim, J.H. Kim.** 2008. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella confusa* sp. 4. *Food Chemistry.*109:278-284.
 23. **Collins, M.D., J. Samelis, J. Metaxopoulos y S. Walibanks.** 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 75:595-603.
 24. **Dawson, John.** 2007. WHO'S IN A NAME? *Brefeldia maxima*. [online]. Disponible en <http://www.ilmico.gen.chicago.il.us/Authors/Brefeld671...> Último acceso julio 2009).
 25. **De Bruyne, K., N. Camu, K. Lefebvre, L. De Vuyst y P. Vandamme.** 2008. *Weissella ghanensis* sp. nov., isolated from a Ghanaian cocoa fermentation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:2721-2725.
-

-
26. **Degeest, B., F. Vaningelgem, L. De Vuyst.** 2001. Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11:747-757.
 27. **De Vuyst, L. y B. Degeest.** 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23:153-177.
 28. **Dfiaz, R.G.** 2003. Fermentación del almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.
 29. **Dfiaz, R.G., C. Wachter.** 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev. Latino. Microbiol.* 45(1-2):30-40.
 30. **Dfiaz, R.G., J.P. Guyot, F. Ruiz Teran, J. Morlon-Guyot y C. Wachter.** 2003. Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(8):4367-4374.
 31. **Domig, K.J., H.K. Mayer, W. Kneifel.** 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. *Int. J. Food Microbiol.* 88:147-164.
 32. **Ennahar, S. y Y. Cai.** 2004. Genetic evidence that *Weissella kimchii* Choi *et al.* 2002 is a later heterotypic synonym of *Weissella cibaria* Björkroth *et al.* 2002. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 54:463-465.
 33. **Elliker, P.R., A.W. Anderson y G. Hannesson.** 1956. An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *J. Dairy Res.* 39: 1611-1612.
 34. **Escalante, A., C. Wachter y A. Farrés.** 2001. Lactic acid bacterial diversity in the tradicional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence análisis. *Int. J. Food Microbiol.* 64:21-31.
 35. **Folkensberg, D.M., P. Dejmeck, A. Skriver y R. Ipsen.** 2006. Interactions between EPS-producing *Streptococcus thermophilus* strains in mixed yoghurt cultures. *J. Dairy Research.* 73: 385-393.
 36. **Gaggiano, M., R. Di Cagno, M. De Angelis, P. Arnault, P. Tossut, P.F. Fox, M. Gobbetti.** 2007. Defined multi-species semi-liquid ready-to-use sourdough starter. *Food Microbiol.* 24:15-24.
 37. **Garvie, E.I.** 1960. The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J Dairy Research.* 27:283-292.
 38. **Garvie, E.I.** 1984. Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostoc*'s from other lactic acid bacteria, p. 147-177. In Bergen T (ed.), *Methods in Microbiology*, Vol 16. Academic Press, London.
 39. **Giraffa, G.** 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:251-260.
-

-
40. **Gobbeti, M. y A. Corsetti.** 1999. *Streptococcus*, p. 2117-2127. In R. Robinson, C. Batt and P. Patel (ed.), Encyclopedia of Food Microbiology, Vol 3. Academic Press Ltd.
 41. **Green, M., K. Barbadora, M. Michaels.** 1991. Recovery of vancomycin-resistant gram positive cocci from pediatric liver transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 29:2503-2506.
 42. **Green, M., R.M. Wadowsky, K. Barbadora.** 1990. Recovery of vancomycin-resistant gram positive cocci from children. *J. Clin. Microbiol.* 28:484-488.
 43. **Hardie, J. M. y Whiley, R.A.** 1995. The genus *Streptococcus*, p. 55-124. In B.J.B. Wood and Wood and W.H. Holzapfel (ed.), The lactic acid Bacteria. The genera of lactic acid bacteria, Vol 2. Blackie Academic and professional. Bishopbriggs, Glasgow.
 44. **Hartemink, R., V.R. Domenech, F.M. Rombouts.** 1997. LAMVAB-A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *J. Microbiol. Methods.* 29:77-84.
 45. **Heraief, E., M.P. Glauser, L.R. Freedman.** 1982. Natural history of aortic-valve endocarditis in rats. *Infection and Immunity.* 37:127-131.
 46. **Herrera, Paul, Y. Kwon, S.C. Ricke.** 2009. Ecology and pathogenicity of gastrointestinal *Streptococcus bovis*. *Anaerobe.* 15:44-54.
 47. **Jackson, M.S., A.R. Bird, A.L. McOrist.** 2002. Comparison of two selective media for the detection and enumeration of *Lactobacilli* in human faeces. *J. Microbiol Methods.* 51: 313-321.
 48. **Jang, J., B. Kim, J. Lee, J. Kim, G. Jeong, H. Han.** 2002. Identification of *Weissella* species by the genus-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Letters.* 212: 29-34.
 49. **Jeong, S.-H., J.-H. Jung, J. Jang, J. Lee, J. Chun, y J. Kim.** 2002. *Weissella hanii* sp. nov., from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (In press).
 50. **Klander, O. y N. Weiss.** 1984. Regular, nonsporing Gram-positive rods, p. 1208-1260. In P. H. A.Sneath, M.S. Mair., M.E. Sharpe, y J.G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, 9th ed., vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
 51. **Lee, H.M. y Y. Lee.** 2008. A differential medium for lactic acid – producing bacteria in a mixed culture. *Letters in Appl. Microbiol.* 46(6):676-681.
 52. **Lee, J. S., K. C. Lee, J.S. Ahn, T.I. Mheen, Y.R. Pyun y Y.H. Park.** 2002. *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 52: 1257-1261.
 53. **Magnusson, J., H. Jonsson, J. Schnurer, and S. Roos.** 2002. *Weissella soli* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:831-834.
 54. **Maina, N.H., M. Tenkanen, H. Maaheimo, R. Juvonen y L. Virkki.** 2008. NMR spectroscopic analysis of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*. *Carbohydr. Res.* 343:1446-1455.
 55. **Martínez-Murcia, A.J. y M.D.Collins.** 1990. A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* base don reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol Lett.* 70:73-84.
-

-
56. **Maurer, J.**(ed.). 2006. Advanced PCR Technologies and Microarrays. In PCR Methods in Foods. Springer Science and Business Media, INC. N. York.
57. **Mendoza, L., M.C. Manca de Nadra, E. Bru, M. Farías.** 2009. Influence of wine-related physicochemical factors on the growth and metabolism of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts in mixed culture. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* 36:229-237.
58. **Miambi, E., J-P. Guyot, F. Ampe.** 2003. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 82:111-120.
59. **Mossel, D.A.A.** 2003. Mecanismos y fundamentos de la prevención de las alteraciones microbianas de los alimentos, p. 239-246. En Microbiología de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos, Acribia. Zaragoza, España.
60. **Mozzi, F., F. Vaningelgem, E. M. Hébert, R. Van der Meulen, M. R. F. Moreno, G. Font de Valdez y L. De Vuyst.** 2006. Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(6):4431-4435.
61. **Olano, A., J. Chua, S. Schroeder, A. Minari, M. La Salvia y G. Hall.** 2001. *Weissella confusa* (basonym: *Lactobacillus confusus*) bacteremia: a case report. *J. Clin. Microbiol.* 39(4):1604-1607.
62. **Paludan-Muller, C.H. Huss y L. Gram.** 1999. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a thai low-salt fermented fish product and the role of garlic as substrate for fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 46:219-229.
63. **Poyart, C., G. Quesne y P. Trieu-Cuot.** 2002. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (sod A) sequences: reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. *coli*' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*52:1247-1255.
64. **Ramakanth, R., Ravula y N.P.Shah.** 1998. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks. *Biotechnol. Techn.* 12(11):819-822.
65. **Reddy G., M. Altaf, B.J. Naveena, M. Venkatesgwar, E. Vijay-Kumar.** 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. *Biotechnol. Adv.* 26:22-34.
66. **Reuter, G.** 1985. Elective and selective media for lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2:55-68.
67. **Reuter, G.** 1992. Culture media for enterococci and group D-streptococci. *Int. J. Food Microbiol.* 17:101-111.
68. **Riebel, W., J. Washington.** 1990. Clinical and microbiologic characteristics of pediococci. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1348-1355.
-

-
69. **Rivera Noriega, A.** 2001. Efecto de la acción de microorganismos amilolíticos en la fermentación del pozol. Tesis. Facultad de Química, UNAM, México, 62 pp.
70. **Rojas, V., J.V. Gil, F. Piñaga, P. Manzanares.** 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 86:181-188.
71. **Roy, Denis.** 2001. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 69:167-182.
72. **Sainz T. J. Pérez, J. Villaseca, U. Hernández, C. Eslava, G. Mendoza, C. Wachter.** 2005. Survival to different acid challenges and outer membrane protein profiles of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pozol, a Mexican typical maize fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* 105: 357– 367.
73. **Sánchez, J.I., B. Martínez, R. Guillén, R.J. Díaz y A. Rodríguez.** 2006. Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(12):7495-7502.
74. **Sandine, W. E., P. C. Radich, and P. R. Elliker.** 1972. Ecology of the lactic streptococci. A review. *J. Milk Food Technol.* 35(3): 176-185.
75. **Savado, A., Cheik A. T. Ouattara, Paul W. Savado, Nicolas Barro, Aboubacar S. Ouattara y Alfred S. Traoré.** 2004 Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *Afr. J. Biotechnol.* 3:189-194.
76. **Schlegel, L., F. Grimont, E. Ageron, P.A. D. Grimont y A. Bouvet.** 2003. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis* / *Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:631-645.
77. **Schlegel, L., F. Grimont, M.D. Collins, B. Régnault, P.A.D. Grimont y A. Bouvet.** 2000. *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1425-1434.
78. **Schlegel, L., F. Grimont, P.A. Grimont y A. Bouvet.** 2004. New group D streptococcal species. *Indian J. Med. Res.* 119:252-256.
79. **Schellenberg, J., W. Smoragiewicz, B. Karska-Wysocki.** 2006. A rapid method combining immunofluorescence and flow cytometry for improved understanding of competitive interactions between lactic acid bacteria (LAB) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in mixed culture. *J. Microbiol Methods.* 65:1-9.
80. **Sidebotham, R.L.** 1974. Dextrans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30: 371-444.
81. **Skoog, D.A., D. M. West y F. J. Holler** (ed.). 2000. Teoría de las valoraciones de neutralización, p. 223. En Fundamentos de Química analítica. Vol I. Reverté. Barcelona, España.
-

-
82. **Stiles M.E y W. H. Holzapfel.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Review article. *Int. J. Food Microbiol.* 36:1-29.
83. **Sutherland, I. W.** 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* 16:41-46.
84. **Tabasco, R., T. Paarup, C. Janer, C. Peláez, T. Requena.** 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *Int. Dairy Journal.* 17:1107-1114.
85. **Tabasco, R., T. Paarup, C. Janer, C. Peláez, T. Requena.** 2008. (WO/2008/003810) Method for the differentiation and quantification of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milks, using selective antibiotic-free culture media. [online]. Disponible en <http://www.wipo.int/portal/index.html.en>. Último acceso Julio 2009.
86. **Talwalkar, A. y K. Kailasapathy.** 2004. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. *Int. Dairy Journal.* 14:142-149.
87. **Tanasupawat, S., O. Shida, S. Okada y K. Komagata.** 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolate from fermented fish in Thailand. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 50:1479-1485.
88. **Temmerman, R., G. Huys y J. Swings.** 2004. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology.* 15:348-359.
89. **Tharmaraj N. y N.P. Shah.** 2003. Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *J. Dairy Sci.* 86:2288-2296.
90. **Tortora, G. J., Funke, B.R., Case, C.L.** (ed). 1993. Crecimiento microbiano, p. 144-167. En Introducción a la Microbiología. 3ª ed. Acribia S.A. Zaragoza, España.
91. **Ulloa, M., Herrera, T. y Lappe, P.** 1987. Fermentaciones tradicionales indígenas de México. Serie de Investigaciones Sociales. Instituto Nacional Indigenista. 16:13-20.
92. **Van de Castele, S., T. Vanheuverzwijn, T. Ruysen, P. Van Assche, J. Swings, G. Huys.** 2006. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yogurt or cheese starters. *Int. Dairy Journal.* 16:1470-1476.
93. **van Hijum Sacha A. F.T., S. Kralj, L.K. Ozimek, L. Dijkhuizen y I.G.H. van Geel-Schutten.** 2006. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 70(1):157-176.
-

-
94. van Hylckama Vlieg, J.E. Rademaker, J.L., Bachmann, H., Molenaar, D., Nelly, W.J., Siezen, R.J. 2006. Natural diversity and adaptative responses of *Lactococcus lactis*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17:183-190.
 95. Vela, A., C. Porrero, J. Goyache, A. Nieto, B. Sánchez, V. Briones, M. A. Moreno, L. Domínguez y J. F. Fernández-Garayzábal. 2003. *Weissella confusa* infection in primate (*Cercopithecus mona*). *E. Inf. Diseases.* 9 (10):1307-1309.
 96. Vinderola, C.G. y J.A. Reinheimer. 1999. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in presence of yoghurt bacteria. *Int. Dairy Journal.* 14: 142-149.
 97. Vinderola, C.G. y J.A. Reinheimer. 2000. Enumeration of *Lactobacillus casei* in presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *Int. Dairy Journal.* 10:271-275.
 98. Wacher, C. A. Cañas, P.E. Cook, E. Bárzana y J.D. Owens. 1993. Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9:269-274.
 99. Wacher C., A. Cañas, E. Barzána, P. Lappe, M. Ulloa, J.D. Owens. 2000. Microbiology of indian and mestizo pozol fermentations. *Food Microbiol.* 17:251-256.
 100. Walter, L.D. 2008. En memoria de Lister. *Rev. Chil. Infect.* 25(5):351-356.
 101. Wolffs, P., R. Knutsson, B. Norling y P. Rådström. 2004. Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, flotation, prior to real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42(3):1042-1047.
 102. Yang, C., Y. Jiang, K. Huang, C. Zhu, Y. Yin. 2003. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38:265-271.

Direcciones de internet:

- ✓ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomihome.html/>, último acceso julio 2009.