



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Estudio de la presencia y sobrevivencia de  
*Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* en el pozol**

**T E S I S**

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

**PRESENTA**

**EIMARMENE DEL CARMEN MORALES FERRERO**



**MÉXICO, D. F.**

**2011**



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:**       **Profesor: Olga del Carmen Velázquez Madrazo**

**VOCAL:**               **Profesor: María del Carmen Wachter Rodarte**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Beatriz de Guadalupe Serrano López**

**1<sup>er</sup> SUPLENTE:**       **Profesor: Martha Giles Gómez**

**2<sup>o</sup> SUPLENTE:**       **Profesor: Aurora Irma Ortegón Ávila**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**Laboratorio 324 del Edificio de Alimentos y Biotecnología**

**Conjunto “E” de la Facultad de Química de la UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**

\_\_\_\_\_  
Dra. María del Carmen Wachter Rodarte

**SUSTENTANTE:**

\_\_\_\_\_  
Eimarmene del Carmen Morales Ferrero

*A mi familia, sobre todo a mi madre (Aurora Ferrero Sigales)*

*A Carlos Díaz Checa y familia*

*A Carmen Wacher y Laura Cabedo*

*A Judith Espinosa y Dora Centurión*

*A Rocío Santillana, Eva Niñez y Teresita Sainz*

*Al jurado asignado*

*A mis compañeros del laboratorio 324*

*(Conjunto E, Facultad de Química, UNAM)*

*A mis maestros y a mis amigos de la ENP plantel número 1, a los de la Facultad de Química, a los de francés (MC), a los de portugués (CELE), a los de inglés (EMC) y Facultad de Química, a los del P77 (El Colegio de México) y a los del DTTE (CELE). En particular, a Abigail Clatza, Alejandra Camacho, Alma Cortés, Blanca Numbé, Charmina Aguirre, Claudia Absalón, Claudia Hernández, Gail Romo, Guadalupe Rodríguez, Joseph Doshner, Leonardo Herrera, Leticia Flores, Lucía y Anibal Bascuñán, Lucy Cornejo, Manuel Castañeda, Marcela de la Rosa, Marco A. Galicia, Martha Acevedo, Martha Hernández, Norma Castañón, Norma Gaytán, Patricia Severiano, Víctor Ugalde y Kochitl Pascual*

*A mis compañeros y amigos de Givaudan Roure, a los de Universum y a los de Mark Al Chemical. Principalmente a Rubén González y Baldo Altube*

*Y de una manera muy especial, a Margarita Sigales Basualdo (mi abuela), Carmen Sigales Basualdo (mi tía), Angélica (mi amiga), Biserka Sveshtarova, Hugo Sousa y Fernando Estrada (mis profesores)*

*Gracias*

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	11
<b>INTRODUCCIÓN</b>	12
<b>OBJETIVOS</b>	14
<b>CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES</b>	
1.1 Tabasco, los mayas y el maíz	15
1.2 El pozol	19
1.3 El pozol: un alimento fermentado	24
1.4 Seguridad microbiológica de los alimentos fermentados	28
1.4.1 El pozol: una fermentación en esencia láctica de naturaleza mixta	29
1.4.1.1 pH bajo y ácidos orgánicos débiles	31
1.4.1.2 Bacteriocinas	34
1.4.1.3 Diacetilo y reuterina	39
1.4.1.4 Situaciones adicionales	39
1.4.2 Enterobacterias en alimentos fermentados	41
1.4.3 <i>Bacillus</i> en alimentos fermentados	46
1.5 Fuentes de contaminación en la elaboración del pozol	47
1.6 Microbiología del pozol	49
1.6.1 Hongos y levaduras	49
1.6.2 Bacterias	51
1.6.2.1 Métodos clásicos de aislamiento e identificación	51
1.6.2.2 Métodos independientes de cultivo	61
1.6.2.3 Enfoque polifásico	66
1.7 Bacterias lácticas	72
1.8 Enterobacterias	74
1.9 <i>Bacillus</i>	75

1.10 <i>Bacillus cereus</i>	78
1.11 <i>Staphylococcus aureus</i>	95
1.11.1 Resistencia de <i>S. aureus</i> al estrés ambiental	103

## **CAPÍTULO 2: MATERIAL Y MÉTODOS**

2.1 Muestreo y encuestas	114
2.2 Peso de la muestra	115
2.3 Determinación del pH	115
2.4 Determinación de ácido acético, ácido láctico, fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa	116
2.4.1 Preparación de la muestra (Diagrama 1; Santillana, 1995)	116
2.4.1.1 Extracción	116
2.4.1.2 Clarificación	116
2.4.2 Determinación de los ácidos láctico y acético por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	117
2.4.2.1 Curvas de calibración	118
2.4.2.1.1 Ácido láctico	118
2.4.2.1.2 Ácido acético	118
2.4.3 Determinación enzimática de fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa	119
2.5 Aislamiento microbiano	119
2.5.1 Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	120
2.5.1.1 Cuenta directa	120
2.5.1.2 Prueba de presencia/ausencia	120
2.5.2 Aislamiento de <i>Bacillus cereus</i>	122
2.5.2.1 Cuenta directa	122
2.5.2.2 Prueba de presencia/ausencia	123
2.5.2.2.1 Muestras 3 y 4	123
2.5.2.2.2 Muestras 5 a 14	123
2.6 Examen al microscopio	125
2.7 Pruebas bioquímicas	126
2.7.1 Prueba de la catalasa	126

2.7.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	127
2.7.2.1 Prueba de la catalasa (véase 2.7.1)	127
2.7.2.2 Utilización anaeróbica de glucosa	127
2.7.2.3 Utilización anaeróbica de manitol	127
2.7.2.4 Prueba de la DNasa	128
2.7.2.5 Prueba de la termonucleasa	130
2.7.2.5.1 Preparación del portaobjetos	131
2.7.2.5.2 Realización de la prueba	131
2.7.2.6 Prueba de la coagulasa	132
2.7.2.6.1 Bases y fundamento	132
2.7.2.6.1.1 ¿Qué es y cómo se obtiene el plasma humano?	132
2.7.2.6.1.2 ¿Qué es la enzima coagulasa y cómo se determina?	134
2.7.2.6.2 Procedimiento de la prueba de la coagulasa	136
2.7.2.6.2.1 Preparación del reactivo	136
a) Para las cepas de los pozoles 1, 2, 13 y 14	136
b) Para todas las cepas	136
2.7.2.6.2.2 Realización de la prueba de la coagulasa	136
2.7.3 <i>Bacillus cereus</i> (Metodología propuesta para cada cepa por analizar)	139
2.7.3.1 Prueba de la catalasa (véase 2.7.1)	139
2.7.3.2 Suspensión Bc	139
2.7.3.3 Caldo lisozima (Apéndice 3)	139
2.7.3.4 Caldo nitrato (Difco, 0268-17-8)	139
2.7.3.5 Voges Proskauer modificado (Apéndice 3)	140
2.7.3.6 Agar tirosina (Apéndice 3)	140
2.7.3.7 Agar MYP y agar <i>Bacillus cereus</i> (Apéndice 3)	141
2.7.3.8 Caldo rojo de fenol-glucosa (Apéndice 3)	141
2.7.3.9 Medio de movilidad (Apéndice 3)	141

### **CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

3.1 Encuestas	145
3.2 Determinación del peso de la muestra	149

3.3 Determinación del pH	149
3.3.1 En masas de nixtamal elaboradas en Tabasco para la producción de pozol de cacao (chorote)	149
3.3.2 Cambio del pH con la acidificación del pozol blanco	150
3.3.2.1 Valores iniciales de pH	151
3.3.2.2 pH a las 48 horas	152
3.3.2.3 Valores de pH a los 7 días de fermentación	152
3.4 Determinación de la presencia o ausencia de <i>B. cereus</i> y <i>S. aureus</i>	154
3.4.1 Aislamiento e identificación de <i>Bacillus cereus</i> en masas de nixtamal elaboradas en Tabasco para la producción de chorote (pozol de cacao)	154
3.4.2 Aislamiento e identificación de <i>Bacillus cereus</i> en masas de nixtamal preparadas en Tabasco para la producción de pozol blanco	156
3.4.3 Aislamiento e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> en masas de nixtamal elaboradas en Tabasco para la producción de chorote (pozol de cacao)	157
3.4.4 Aislamiento e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> en masas de nixtamal preparadas en Tabasco para la producción de pozol blanco	158
3.5 Presencia de <i>S. aureus</i> en las primeras horas de fermentación del pozol	159
3.6 Sobrevivencia de <i>S. aureus</i> en el pozol blanco (Tabla 7)	162
3.7 Concentraciones de ácido láctico y ácido acético	165
3.8 Concentraciones de fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa	172
<b>CONCLUSIONES</b>	179
<b>APÉNDICES</b>	180
<b>REFERENCIAS</b>	197



## APÉNDICES

Número	Nombre	Página
1	Encuesta sobre la calidad higiénica aparente de los locales donde se adquirieron las muestras de pozol	180
2	Determinación enzimática de fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa	181
3	Preparación de medios y reactivos	185
4	Resultados de las pruebas bioquímicas y de morfología celular realizadas a las colonias típicas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas de agar Baird-Parker	193
5	Transferencias de algunas especies del género <i>Bacillus</i> (1986-2005) (Nuevas combinaciones)	196

## LISTA DE FIGURAS

Número	Nombre	Página
1	<i>Reverso de un ídolo de Copán</i> , dibujado por F. Catherwood (Hagen, 1981)	20
2	Representación del método de elaboración del pozol indígena en Altos de Chiapas	26
3	Prueba de la DNasa, representación de los posibles resultados	129
4	Termonucleasa, preparación del portaobjetos e inoculación de los pozos	131
5	Representación del resultado de la coagulasa	137
6	Tabasco y sus municipios	145

## LISTA DE DIAGRAMAS

Número	Nombre	Página
1	Preparación de la muestra (extracción y clarificación)	117
2	Esquema de la conversión de protrombina en trombina y de la polimerización del fibrinógeno para formar hilos de fibrina (Gayton, 1987)	133
3	Sistema fibrinolítico (Harper, 1969)	135
4	Detección y cuantificación de <i>S. aureus</i> en el pozol	138
5	Detección de <i>B. cereus</i> (pozoles 3 y 4)	143
6	Detección y cuantificación de <i>B. cereus</i> (pozoles 5 a 14)	144

## LISTA DE GRÁFICAS

Número	Nombre	Página
1	Valores de pH obtenidos al inicio, a las 48 horas y a los 7 días de fermentación del pozol incubado a 29 °C	153
2	Porcentajes de los ácidos láctico y acético en el pozol 5 al inicio y a los 7 días de fermentación a 29 °C	168
3	Porcentajes de los ácidos láctico y acético al inicio de la fermentación del pozol	169
4	Porcentajes de los ácidos láctico y acético en el pozol después de 48 horas de fermentación a 29 °C	170
5	Porcentajes de maltosa, sacarosa, glucosa y fructosa en las muestras iniciales de pozol	175

## LISTA DE TABLAS

Número	Nombre	Página
1	Características típicas de <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermis</i> y los micrococos (U. S. FDA, 1995)	137
2	Características típicas de <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> (U. S. FDA, 1995)	142
3	Datos obtenidos a partir de las encuestas realizadas en los expendios de Villahermosa, Tabasco	148
4	pH de las masas de nixtamal elaboradas en Tabasco para la producción de pozol de cacao (chorote)	149
5	pH de las muestras de pozol blanco incubadas a 29 °C	151
6A	Presencia o ausencia de <i>Bacillus cereus</i> en masas de nixtamal elaboradas en Tabasco para la producción de chorote	155
6B	Presencia o ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en masas de nixtamal elaboradas en Tabasco para la producción de chorote	158
7	Determinación de la presencia y sobrevivencia de <i>S. aureus</i> y <i>B. cereus</i> en el pozol (muestras iniciales e incubadas a 29 °C)	163
8	Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos en el pozol	167

## RESUMEN

El pozol es una bebida ácida del sudeste de México que se prepara fermentando masas de nixtamal envueltas en hojas de plátano. Ocurre fundamentalmente una fermentación láctica y, como una de sus consecuencias, el valor de pH de las masas disminuye hasta menos de 4.5, lo que debería evitar el crecimiento de bacterias patógenas. Sin embargo, a pesar de la acidificación, se ha reportado el desarrollo de enterobacterias durante el proceso fermentativo. El objetivo de este proyecto de tesis fue investigar en el pozol la presencia y sobrevivencia de dos bacterias patógenas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Para esto, se emplearon cuatro chorotes y diez pozoles blancos procedentes de Villahermosa, Tabasco. Se analizaron las masas recién elaboradas y después de fermentadas, por 48 horas o 7 días, en una incubadora a 29 °C. Se determinó la presencia/ausencia de los dos microorganismos en 25 g de muestra. En las últimas diez bolas recibidas se realizó la enumeración de *S. aureus* y se determinaron el pH de las masas y las concentraciones de azúcares (sacarosa, maltosa, glucosa y fructosa) y ácidos (láctico y acético); los valores de pH, que al inicio se encontraban entre 4.8 y 6.7, estaban entre 3.9 y 4.8 luego de 48 horas de fermentación. En el mismo intervalo de tiempo, la concentración de ácido láctico aumentó de 0.1-0.4 a 0.5-0.8 g/100 g de masa húmeda, mientras que la de acético disminuyó de 0.03-0.17 a 0.00-0.08, en las mismas unidades. *B. cereus* no se detectó en ninguna muestra en la que haya sido investigado (n=12); *S. aureus*, en diez de las iniciales (con cuentas entre 3.9 y 5 log ufc/g), en cuatro de las incubadas por 48 horas y en la fermentada por una semana. La presencia de *S. aureus* en grandes números al inicio del proceso fermentativo sugiere que este alimento podría ser una fuente de intoxicación. Para eliminar este riesgo, debería asegurarse la producción del pozol en condiciones higiénicas y su rápida acidificación.

## INTRODUCCIÓN

El pozol es un alimento fermentado, de origen maya, que se elabora a partir de masa de maíz nixtamalizado y que se consume desde épocas prehispánicas en el sudeste de México. Su fermentación ocurre de forma natural, sin adición intencionada de inóculos, como en el caso de la mayoría de los alimentos fermentados antiguos, e involucra una microbiota mixta.

Puesto que el pozol se produce básicamente a nivel casero y con frecuencia sin observar medidas higiénicas, en las masas recién preparadas se ha indicado la existencia de grandes números de enterobacterias y, pese a la acidificación que resulta de la fermentación láctica ocurrida con posterioridad — una de cuyas ventajas es la inhibición de microorganismos indeseables, como las bacterias patógenas—, en las masas ya fermentadas se ha detectado la sobrevivencia de este grupo bacteriano en cantidades significativas (recordemos que dentro de las enterobacterias están *Shigella*, *Salmonella* y algunas cepas de *Escherichia coli* y de *Yersinia enterocolitica* causantes de enfermedades gastrointestinales).

Este trabajo consistió en investigar en el pozol la presencia y sobrevivencia de las ubicuas bacterias patógenas, Gram positivas y de transmisión alimentaria, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Hasta éste y el de Sainz (1998) no se había efectuado un estudio sistemático de la presencia/ausencia de patógenos en dicho alimento, lo cual era importante para poder establecer su calidad sanitaria.

Las características de su sustrato (físicas y químicas) y las de su proceso de elaboración y manejo podrían permitir la colonización del pozol por parte de *S. aureus* —transmitido a los alimentos por contaminación humana o animal— y de *B. cereus* —miembro esporógeno de la microflora natural de los tejidos vegetales—, hallado en alimentos ricos en almidón.

Debido a su gran variedad microbiana, a su fermentación en forma sólida y a su heterogeneidad —en cuanto a composición y grado de aireación—, en una misma bola de pozol podrían crearse micronichos de variadas características; esto último explicaría, al menos en parte, la sobrevivencia de algunas bacterias patógenas a pesar del bajo pH que alcanza este alimento.

Por otro lado, aunque se sabe del antagonismo —incluido el láctico— que existe entre algunos miembros de la microflora del pozol, también se tiene conocimiento de la capacidad de las enterobacterias patógenas para sobrevivir a valores bajos de pH, por el hecho de poseer mecanismos de defensa contra ambientes ácidos, y de la gran adaptabilidad y resistencia de *S. aureus* a diferentes condiciones de estrés ambiental.

---

Esta tesis de licenciatura contó con el apoyo de DGAPA (Proyecto IN210194) y de CONACYT (Proyecto 4688N).



## **OBJETIVOS**

Los objetivos de este estudio fueron los siguientes:

- Detectar y cuantificar *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, bacterias patógenas de transmisión alimentaria, en muestras de nixtamal recién elaborado.
- Detectar la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* en pozoles con 48 h o 7 días de fermentación.



## CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES

### 1.1 Tabasco, los mayas y el maíz

El sur de Veracruz —con sus planicies aluviales surcadas por el río Papaloapan— se interrumpe por la masa volcánica de Los Tuxtlas, en donde se ubica el Lago de Catemaco, y vienen posteriormente las amplias tierras de Tabasco (del náhuatl *tlapalco*, tierra anegada), con importantes sitios arqueológicos, máxime de los antiguos olmecas (la llamada *Cultura Madre*), y con planicies formadas por ríos y salpicadas de marismas y pantanos (Barrón de Morán, 1980; Piña, 1982; Layna y col., 1983; Fernández Eds., 1989).

Juan de Grijalva descubrió las tierras de Tabasco en el año 1518; durante la colonia formaron parte de Yucatán y más tarde pertenecieron a la intendencia de Veracruz; en 1824, después de consumada la Independencia, Tabasco se constituyó como Estado.

Benítez, en 1956, dijo:

Tabasco es el reino del agua, del brillo, de la onda, del perfume y del canto. Aquí se deslizan los ríos gigantes de México: el Mezcalpa, de cielos escarlata; el Tulijá, todo reflejos y transparencias; el violento Usumacinta; el verde y remansado San Pedro. Tierra virgen, futura gran despensa del mexicano, sobre la que flotan las nieblas del primer día de la creación (citado en Benítez, 1985).

Parte de Tabasco se incluye en la amplia región maya (la cual también abarca los Estados de Chiapas, Campeche, Yucatán y Quintana Roo, en la República Mexicana; así como Belice, Guatemala y la zona occidental de Honduras) en la que florecieron ciudades como Uaxactún, Piedras Negras, Tikal, Copán,



Quiriguá, Kaminaljuyú, Comalcalco, Palenque, Bonampak, Río Bec, Edzná, Hochob, Uxmal, Chichen Itzá, Tulum y muchas más; en donde habitaron, entre otros, los lacandones, tzeltales, tzotziles, tojolobales, choles, mames y mayas-yucatecos, los cuales subsisten (Sodi, 1964; Piña, 1982).

Los mayas prehispánicos fueron los genios matemáticos y astrónomos del Nuevo Mundo; inventaron grandes elementos artísticos y arquitectónicos; fueron buenos canteros, escultores, albañiles, pintores, talladores de piedras semipreciosas, alfareros, orfebres, escribas de códices y literatos (Piña, 1982). Pero su cultura era fundamentalmente agrícola (Barrón de Morán, 1980), y tocante a esto J. E. Thompson asienta:

[...] sin su místico amor por el maíz, es muy probable que los campesinos no se hubieran sometido a aquel gran programa, estupendo pero sin terminación previsible, de construir más pirámides y más templos en que la jerarquía vivía empeñada. Porque es obvio que para el labrador todas aquellas erecciones estaban encaminadas a conciliar a los dioses del cielo y de la tierra, y en el poder de tales seres estaba la protección de sus campos de maíz (Thompson, 1994).

La preocupación por el tiempo tuvo sus orígenes en la necesidad de proporcionar al campesino un calendario lo más exacto posible (Benítez, 1985).

Entre sus deidades tenían dioses celestes, terrenos y de la vegetación, el más conocido de estos últimos es el del maíz, Yum Kax, patrono de la labranza; había toda una serie de advocaciones que representaban diversas etapas de la germinación (Layna y col., 1983). Antes de iniciar la tarea —como la limpia, la siembra o la quema—, hacían ayunos, penitencias y ofrecimientos a los dioses que cuidaban sus campos. Los mayas aún en el presente queman copal ante sus estelas (Barrón de Morán, 1980), y el pozol es ofrendado en las ceremonias

realizadas en las diferentes etapas del cultivo del maíz (Ulloa y col., 1983).

En el primer milenio a. de C., es decir, durante la época premaya, se produjo la invención de la agricultura en Mesoamérica; su introducción supone un cambio tan trascendental para la vida de cualquier sociedad primitiva que muchos autores se refieren a ella como una revolución, y no es exagerado porque refleja una verdadera innovación y una importante ruptura con el pasado (Barrón de Morán, 1980; Layna y col., 1983).

Se cree que primero se cultivaron plantas tuberosas como la yuca, la papa y el camote; y luego las semillas: en primer lugar el maíz, después quizá el frijol, el chile y la calabaza, entre otras. La alimentación se complementaba recolectando productos silvestres (Barrón de Morán, 1980).

El maíz, cuyo almacenamiento resultaba relativamente fácil, hizo posible el paso de una economía de apropiación a una de producción, la cual alteró en forma definitiva las relaciones sociales. Este cereal cumplió en América la función que el arroz, el trigo y el centeno tuvieron en otras regiones del mundo. (Layna y col., 1983).

Hasta el momento, es difícil asegurar el sitio de procedencia del maíz. Sin embargo, se le ha supuesto derivado del *teocentli*, o maíz silvestre, y originario del sur de México y Guatemala, o bien del Perú, en donde se descubrió una mazorca prehistórica de maíz de vaina. El maíz actual es el resultado de la hibridación y domesticación del maíz silvestre, su cultivo en lugares propicios se ha intensificado y continúa siendo la base de la alimentación de los pueblos americanos (Barrón de Morán, 1980). En las áreas rurales de México, el maíz es el cereal más consumido; proporciona a la dieta diaria 70% de las calorías y cerca

de 50% de las proteínas (Paredes y col., 1981).

En el *Popol-Vuh* y los libros del *Chilam Balam*, serie de obras escritas por mayas o mestizos, podemos notar la importancia del maíz para el pueblo maya (Díaz, 1982).

📖 En el libro sagrado de los mayas-quichés, el *Popol-Vuh*, se relata la creación del hombre, tras varios intentos por encontrar lo que formaría su carne. Así, primero fueron los hombres de lodo, que faltos de entendimiento, fuerza y movimiento terminaron por deshacerse; después, los caídos en desgracia: los de madera, aniquilados mediante una inundación, por carecer de alma e inteligencia y por ser incapaces de sentir gratitud hacia su Creador y su Formador; y finalmente, los de masa de maíz —de los cuales surgiría el antiguo pueblo maya—, poseedores de una inteligencia tan grande que, por cautela, El Corazón del Cielo les echó vaho sobre los ojos para que ya no pudieran ver las cosas ocultas [por la distancia]. De esta manera, perdieron su sabiduría (Recinos, 1988).

📖 Los libros del *Chilam Balam* contienen profecías, ritos y datos de carácter histórico y mitológico, como la leyenda del maíz (estaba oculto dentro de una roca y, a petición del hombre, el dios de la lluvia lanzó un rayo tan intenso que la rompió; chamuscó unos granos, otros los quemó, otros se ahumaron y el resto no sufrió daño alguno; esto explica las cuatro clases de maíz: rojo, negro, amarillo y blanco). El maíz adquirió el grado de divinidad desde el momento en que surgió (Barrón de Morán, 1980).

## 1.2 El pozol

El pozol, cuyo nombre deriva de la palabra *pozolli* (espumoso en náhuatl), es producto de la fermentación de “bolas” de masa de maíz. [Éstas son de diversos tamaños y geometrías; las hay, por ejemplo, de 10 a 12 cm de largo, 5 a 8 cm de diámetro y 70 a 170 g de peso (pueden llegar hasta 1 kg o más)]. De origen maya, lo consumen poblaciones indígenas y mestizas del sudeste de México: de los Estados de Chiapas, Tabasco, Campeche, Quintana Roo, Yucatán, y en menor escala, Veracruz y Oaxaca.

Desde épocas prehispánicas, los chontales, mayas, lacandones, tzeltales, tzotziles, tojolobales, chamulas, mames, zoques y zapotecos lo han utilizado con diversos fines (alimenticios, curativos o ceremoniales, como los relacionados con el cultivo y cosecha del maíz); se le ha tomado para controlar diarreas y fiebre, y las bolas mohosas se han empleado como cataplasma para curar heridas e infecciones superficiales (Robelo, 1948; Cruz-Ulloa y Ulloa, 1973; Ulloa y col., 1983; Escamilla-Hurtado y col., 1991; Wachter, 1995).

Una plegaria lacandona elevada por un padre que suplica por el bien de su hijo fue recogida por A. Tozzer (quien entre otras cosas efectuó el primer estudio etnológico de América Central) y reza lo siguiente:

Guardad a mi hijo, padre mío. Haced que cese todo mal, haced que la fiebre cese. No dejéis que las fuerzas malévolas lo atropellen. No dejéis que una víbora pique al hijo mío. No permitáis la muerte de mi hijo cuando él esté jugando. Cuando él sea grande, él os dará una ofrenda de pozol. Cuando él sea grande, él os dará una ofrenda de tortillas. Cuando él sea grande, él os dará una ofrenda de tiras de corteza de árbol. Cuando él sea grande, él os tendrá presente (citado por Thompson, 1994).



**Figura 1. *Reverso de un ídolo de Copán*, dibujado por F. Catherwood (Hagen, 1981)**

Para su consumo, las bolas de pozol se diluyen en agua (en una relación aproximada de 1:2 a 1:3); se obtiene una bebida no homogénea de sabor ácido —a la que opcionalmente se le agrega sal, chile, azúcar o miel—, que se toma durante las jornadas de trabajo, en la comida o como refresco a cualquier hora del día (Ulloa y col., 1983).

Aunque no todos los alimentos fermentados son de origen prehispánico, la idea de fermentar el maíz sí parece serlo (Casillas y Vargas, 1984); en Mesoamérica surgieron técnicas para la elaboración de alimentos entre los años 12000 y 5000 a. de C. [se han hallado piedras de molienda que datan de este periodo (periodo cenolítico)]; si bien no conocían la agricultura, estaban familiarizados con las gramíneas salvajes, y la recolección de cereales autóctonos se generalizó (Layna y col., 1983). Existen muchos tipos de alimentos fermentados, pero al ser el maíz la base de la alimentación de los pueblos mesoamericanos, la mayoría se prepara a partir de este cereal (por ejemplo, además del pozol, en México tenemos el agua agria, el atole agrio, el tepache, el sendechó, el tesgüino, el tamal agrio y la tortilla agria) (Cruz-Ulloa y Ulloa, 1973; Valderrama y Ramírez, 1993; Nieto y Vázquez, 1993; Escamilla-Hurtado y col., 1991).

En su *Relación de las cosas de Yucatán* (1566), Fray Diego de Landa escribe:

Que el mantenimiento principal es el maíz, del cual hacen diversos manjares y bebidas, y aun bebido como lo beben, les sirve de comida y bebida, y que las indias echan el maíz a remojar en cal y agua una noche antes, y que a la mañana [siguiente] está blando y medio cocido y de esta manera se le quita el hollejo y pezón; y que lo muelen en piedras y que de lo medio molido dan a los trabajadores, caminantes y navegantes grandes pelotas y cargas y que dura algunos meses con sólo acedarse; y que de aquello toman una pella y deslíenla en un

vaso de la cáscara de una fruta que cría un árbol con el cual les proveyó Dios de vasos; y que se beben aquella sustancia y se comen lo demás y que es sabroso y de gran mantenimiento; y que de lo más molido sacan leche y la cuajan al fuego y hacen poleadas para las mañanas y que lo beben caliente; y que en lo que sobra de las mañanas echan agua para beber en el día porque no acostumbran beber agua sola. Que también tuestan el maíz, lo muelen y deslíen en agua, que es muy fresca bebida, echándole un poco de pimienta de Indias o cacao.

Que hacen del maíz y cacao molido una manera de espuma muy sabrosa con que celebran sus fiestas y que sacan del cacao una grasa que parece mantequilla y que de esto y del maíz hacen otra bebida sabrosa y estimada; y que hacen otra bebida de la sustancia del maíz molido así crudo, que es muy fresca y sabrosa (Landa, 1994).

Alfaro y Santacruz, en su *Relación de la provincia de Tabasco* (1579), afirman:

Bebían una bebida que se hace de la moneda suya que es cacao misturado con masa, de suerte que se hace un brebaje espeso, el cual es grande mantenimiento y así mismo otro de maíz cocido que se dice pozol (citado en Bailey, 1961).

En *Reverso de un ídolo de Copán* (Figura 1) —dibujado por Frederick Catherwood—, una de las personas representadas, tal vez un guía, lleva al parecer pozol en una canasta. Catherwood, notable dibujante norteamericano, se comprometió en 1839 con Stephens, pionero de la arqueología maya, a ejercer su dote de artista y realizar dibujos de Copán, Palenque, Uxmal y otras ciudades en ruinas (Benítez, 1985; Hagen, 1981).

En Tabasco —además del pozol o pozol blanco, y del chorote o pozol de cacao (conseguido por la fermentación de la masa de maíz con cacao molido)— hay pozol con pistle (la almendra de la semilla del zapote o mamey, tostada y molida); pozol con pataste (*Theobroma bicolor* —también llamado cacao blanco—, tostado, pelado y molido), de color café oscuro como el

chorote; y pozol con chile mashito (chile silvestre de pequeño tamaño, abundante en el territorio tabasqueño, asado y molido), consumido particularmente en un poblado del municipio de Macuspana [San Carlos], en uno del de Tacotalpa [Tapijulapa] y en el municipio Teapa (Bailey, 1961).

De un Estado a otro, y de país a país, la elaboración y la denominación del pozol presentan asimismo algunas modificaciones: en Acayucan, Veracruz, los zoque-popolucas lo preparan con maíz negro y le dicen *wayi*; en la región de Chinantla, Oaxaca, agregan a la bebida cacao tostado y molido, o cenizas de carbón encino; en la región mixe preparan pozol con cocolmécatl (bejuco silvestre y cacao molidos); en Yucatán suelen agregarle coco; en Colombia y Venezuela posee el nombre de *mazato*; etc. (Bailey, 1961; Nieto y Vázquez, 1993).

Cañas y col. (1993a y 1993b) reportaron dos tipos de pozol en la zona Altos de Chiapas —el *indígena* y el *ladino* o *mestizo*— y señalaron las etapas de su producción:

- A. Selección de la materia prima. Para la elaboración del pozol, se utiliza maíz desgranado blanco, amarillo o negro. De los dos primeros tipos, pacha es la variedad más usada.
- B. Limpieza del maíz crudo. Se hace de diferentes formas, una de ellas consiste en cubrir los granos con agua, dejarlos reposar unos minutos y retirar de la superficie del líquido el material flotante (maíz picado o podrido, cascarillas, etc.).
- C. Nixtamalización. Los granos se cuecen en agua con cal hasta que al friccionarlos con los dedos sus hollejos se remuevan fácilmente (entre 60 y 120 minutos). Los productores saben por experiencia que cantidad de cal añadir. El maíz adquiere aquí un color amarillo que debe eliminarse en el lavado [véase el siguiente inciso].



- D. Lavado del nixtamal. Se enjuagan los granos con agua (de pozo, de río o potable) y frotándolos con las manos (Figura 2) hasta que sea transparente el agua de lavado; cualquier resto de cal impartirá un sabor picante.
- E. Segunda cocción o “reventado”. Se cuece el nixtamal en agua hasta “reventar” o “florear” el grano de maíz. Es la diferencia básica entre el proceso mestizo y el indígena; sólo la llevan a cabo los productores ladinos, con la finalidad de eliminar el *chincastito* —sedimento chicloso que queda después de beber pozol indígena—, desagradable a su gusto.
- F. Remojo. Su objetivo es evitar que el maíz se seque en el siguiente paso [G]. El pozol indígena se remoja en el agua fría del último lavado del nixtamal; el ladino, en el agua caliente del reventado. Esta etapa dura habitualmente toda la noche.
- G. Molienda. Se efectúa en molinos comerciales de mano o de nixtamal. Según el tipo de pozol, se realiza a la mañana siguiente del reventado o de la nixtamalización.
- H. Elaboración de la “bola”. Luego de amasar lo obtenido de la molienda, se forman “cuerpos cuasi esféricos” a mano o sobre la mesa. [En dicho estudio, la temperatura interna de las bolas varió de 20 a 27 °C, y la externa, de 20 a 24 °C.] Para retener la humedad, el pozol se envuelve por tradición en hojas de plátano; sin embargo, ahora es común verlo en el mercado cubierto con bolsas de plástico.
- I. Fermentación. La mayor parte de los consumidores prefiere el pozol preparado ese mismo día, con cierto grado de fermentación ( $\approx 8$  h), pero algunos lo dejan fermentar 4 o 5 días y en ocasiones dos semanas o más.

### 1.3 El pozol: un alimento fermentado

Por lo general, los alimentos fermentados son aquéllos en cuya manufactura intervienen los microorganismos, produciendo cambios en el sustrato (Hesseltine y Wang, 1979). Lo requerido para fermentar los alimentos ya estaba

presente en la Tierra antes de la emergencia del hombre, quien heredó los microbios, las plantas y los procesos microbianos, aunque todavía no existieran los conceptos de microbiología, química o fermentaciones (Steinkraus, 1993).

Aun cuando algunos productos fermentados —como la cerveza, el pan, el vino, los embutidos (tipo salami), el queso, etc.— tienen un amplio consumo a nivel mundial (Coenders, 1996), muchos, tal vez la mayoría, se desconocen fuera de su lugar de procedencia, pero son muy importantes en la dieta de una gran cantidad de grupos étnicos (sus métodos de elaboración son sencillos y económicos, no requieren equipo complicado y utilizan materias primas disponibles y de bajo costo) (Cravioto y col., 1955).

Con la fermentación se originan en el sustrato cambios sensoriales y a veces también nutricionales; se reduce el tiempo de cocción (ahorro de energía); se incrementa la vida de anaquel del producto final; se proporciona variedad a la dieta, y se puede inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos y la síntesis de toxinas (Cravioto y col., 1955; Cruz-Ulloa y Ulloa, 1973; Hesseltine y Wang, 1979; Ulloa y col., 1987; Wachter y Santillana, 1990; Wachter y col., 1991; Jay, 1992; Calderón-Villagómez, 1993). Las fermentaciones alimentarias generan sabores, aromas y texturas aceptables y deseables para el consumidor (Steinkraus, 1993); gracias a ellas, alimentos desagradables al gusto se vuelven apetecibles (Hesseltine y Wang, 1979).

El análisis químico comparativo entre el maíz y el pozol indica en el segundo un significativo incremento de proteína, de extracto etéreo (grasa cruda), de algunas sales minerales y de vitaminas; entre otras cosas, hay una mayor concentración de niacina, de riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) y de los aminoácidos en los

	<p><i>Materia prima</i></p>
	<p><i>Limpieza</i></p>
	<p><i>Nixtamalización</i></p>
	<p><i>Lavado del grano (para el remojo)</i></p>

Figura 2. Representación del método de elaboración del pozol indígena en Altos de Chiapas

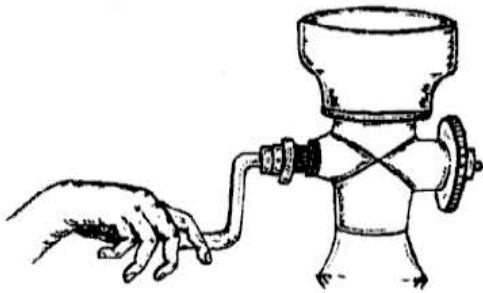
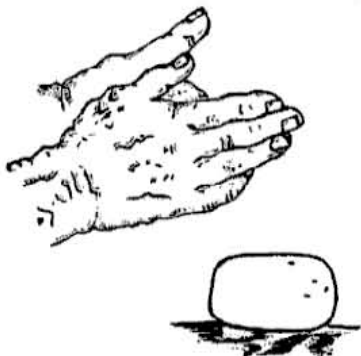
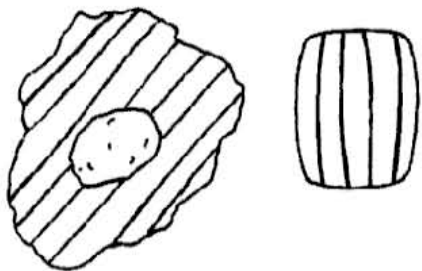

	<p><i>Molienda</i></p>
	<p><i>Elaboración de la bola de masa</i></p>
	<p><i>Envoltura</i></p>
	<p><i>Fermentación</i></p>

Figura 2. Representación del método de elaboración del pozol indígena en Altos de Chiapas (continuación)

cuales el primero es deficiente: lisina y triptófano (Cravioto y col., 1955; Ramírez, 1987; Viniegra, 1993). Además, la nixtamalización del grano habría contribuido de antemano al aumento del contenido de calcio y a una mejora en su calidad nutritiva (Álvarez y Leal, 1993; Badui, 1993), a pesar de la pérdida de algo de carbohidratos, fibra, grasa, proteína y vitaminas (Badui, 1993).

#### **1.4 Seguridad microbiológica de los alimentos fermentados**

Uno de los rasgos más interesantes de este tipo de alimentos es que durante el proceso fermentativo se inhibe a los microorganismos indeseables, como los patógenos, debido a la competencia por los nutrientes (consumidos preferentemente por quienes llevan a cabo la fermentación, al crecer en forma masiva) o a la síntesis de sustancias antimicrobianas, como ácidos orgánicos, bacteriocinas u otras sustancias inhibidoras (Wacher, 1995). No obstante, la ingesta de algunos de estos alimentos ha llegado a ocasionar intoxicación; tal es el caso del *bongkrek* o *tempeh bongkrek* (diferente al *tempeh kedalee*, hecho con soya) (Banwart, 1982; Jay, 1992).

El *bongkrek* o *semaji* —una torta de coco prensado elaborada en la zona central de Indonesia— es un alimento fermentado que ha alcanzado a provocar un gran número de muertes, puesto que los productos caseros pueden llegar a ser tóxicos. Los *bongkreks* inocuos son tortas “perfectas”, fermentadas por *Rhizopus oligosporus*, penetradas y revestidas por el hongo blanco. Para conseguir el crecimiento fúngico deseado, durante los dos primeros días de incubación deben mantenerse las condiciones adecuadas para éste, porque si en dicho tiempo se favorece más bien el desarrollo de las bacterias, y entre ellas

está *Pseudomonas (Burkholderia) cocovenenans*, se producen dos sustancias termoestables (toxoflavina y ácido bongkrékico), con actividad antifúngica y antibacteriana, tóxicas tanto para las personas como para los animales. En la elaboración del *bongkrek* no se privilegia el crecimiento de *P. cocovenenans* si el pH inicial es igual o menor a 5.5 (Banwart, 1982; Jay, 1992; Zhao y col., 1995).

También un alimento fermentado de maíz, que se prepara en algunas regiones de China, ha sido causa de una intoxicación alimentaria atribuida a cepas de *P. cocovenenans*; al igual que en el *bongkrek*, se sintetizan ácido bongkrékico y toxoflavina. El grano se remoja en agua a temperatura ambiente por dos a cuatro semanas y después se lava y se muele tal cual para obtener una *harina* de variados usos. Al parecer, los microorganismos patógenos crecen en el maíz húmedo mientras éste se mantiene a temperatura ambiente (Jay, 1992).

#### **1.4.1 El pozol: una fermentación en esencia láctica de naturaleza mixta**

Una de las características señaladas en las fermentaciones con cultivos mixtos es la eliminación de los microorganismos contaminantes, la cual ha sido especialmente evidente en el caso de las fermentaciones lácticas (Wacher, 1995). Existen varios estudios en los que al inicio del proceso fermentativo se ha encontrado una microbiota variada, pero con el tiempo las bacterias lácticas se han desarrollado hasta alcanzar el punto en que son las únicas células bacterianas en el alimento, acompañadas o no de mohos y levaduras (Christian y Nyako, 1983; Ramakrishnan y col., 1983; Sánchez y col., 1983; Wood, 1983; Okafor y col., 1984; Onyekwere y col., 1989; Ofuya y Nnajofofor, 1989); entre las bacterias eliminadas están reportados los géneros *Alcaligenes*, *Bacillus* y *Klebsiella*.

Para lograr las condiciones propicias de acidificación, se debe contar con un proceso de fermentación adecuado; son importantes el tiempo, la temperatura, el tipo de ingredientes, el contenido de materia seca y la capacidad amortiguadora del sustrato (Nout, 1992). En el caso del pozol, la presencia de hidróxido de calcio en la masa de nixtamal (el sustrato) tal vez disminuya el efecto de la acidificación. A más de que en la masa podrían hallarse microambientes con propiedades físicas y composiciones químicas heterogéneas, debido a que ésta no es finamente molida, sino martajada; a que su fermentación se lleva a cabo en forma sólida; a que los ácidos, que deben difundirse desde el lugar de su producción, pueden ser consumidos por algunos miembros de su microbiota —como ciertas levaduras y mohos—, creándose incluso microambientes libres de ellos, etcétera (Wacher, 1995).

Lorri y Svanberg (1992) sugieren que compuestos adicionales a los ácidos orgánicos también inhiben a las bacterias patógenas. Por su parte, Mensah y col. (1991) concluyen que el efecto antimicrobiano observado en un alimento fermentado de Ghana, el cual disminuía al someter dicho alimento a un proceso de cocción, no se debía al pH *per se*, sino a sustancias antimicrobianas termolábiles —como antibióticos y bacteriocinas— y a ácidos volátiles como el acético. A diferencia de Yusof y col. (1993), que advirtieron actividad bactericida sobre bacterias patógenas en un alimento prefermentado con una cepa de *Lactococcus lactis* y, pese a que esta última generaba cantidades significativas de nisina, la atribuyeron únicamente a la acidez.

Los lactococos, los enterococos, los lactobacilos, las carnobacterias y los pediococos están vinculados con el antagonismo láctico. En un cultivo mixto,

inhiben o destruyen a microorganismos con los que tienen un parentesco cercano, así como a los que producen alteraciones o toxinas en los alimentos (Jay, 1992). Por ejemplo, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris* compiten en la fermentación de productos lácteos, al tiempo que inhiben el crecimiento de otros Gram positivos. Las bacterias lácticas ejercen actividad antimicrobiana mediante ácidos orgánicos —como el láctico y el acético—, bacteriocinas, diacetilo, bióxido de carbono, reuterina y peróxido de hidrógeno (Daeschel, 1989; Steinkraus, 1983a).

#### **1.4.1.1 pH bajo y ácidos orgánicos débiles**

Los ácidos ejercen sobre los microorganismos dos efectos antimicrobianos distintos, aunque estrechamente relacionados. Uno se debe a la acidez en sí, esto es, al descenso del pH extracelular; el otro, de mayor importancia que el primero por sí mismo, a la forma no disociada del ácido (Rodríguez-Palenzuela, 2000). Bearson y col. (1997) indican que el estrés ácido puede describirse como el efecto biológico resultante de la combinación pH bajo-presencia de ácidos orgánicos en el ambiente.

Mientras que el efecto de la acidez del medio depende de la concentración y la fuerza del ácido utilizado en la acidificación, y puede obtenerse tanto con un ácido orgánico como con uno inorgánico —con la salvedad de que se necesitará una mayor cantidad del primero (débil) que del segundo (fuerte) para alcanzar el mismo pH—, el efecto inhibitorio ocasionado por la forma protonada no tendrá lugar si se emplea para la acidificación un ácido inorgánico fuerte, porque éste estará disociado (Rodríguez-Palenzuela, 2000). Muchos ácidos orgánicos se ocupan como aditivos alimentarios. Los de mayor actividad antimicrobiana son el



acético, láctico, propiónico, sórbico y benzoico; el espectro de inhibición tiene que ver con el ácido usado. La actividad del cítrico, caprílico, málico y fumárico, entre otros, es limitada (Pereyra y Trejo, 1999).

Los ácidos orgánicos actúan como inhibidores microbianos en función de su concentración, de su capacidad para entrar a las células y de la aptitud de estas últimas para metabolizarlos (Cherrington y col., 1991). Así, los efectos letales de los ácidos orgánicos débiles —que incluyen ácidos grasos volátiles— dependen de sus pKa's y del pH ambiental; estos ácidos en su forma protonada (sin carga) pueden difundir a través de la membrana y disociarse dentro de la célula para reducir el pH interno; cuanto más bajo sea el pH externo, más ácidos débiles no disociados atravesarán la membrana y afectarán el pH interno de la célula. Por lo tanto, se necesitará una menor concentración de ácido orgánico para destruir una célula a un pH externo de 3.5 que a uno de 4.4 (Baik y col., 1996; Bearson y col., 1997).

Cuando se dice que todos los microorganismos tienen un pH óptimo de crecimiento y un intervalo fuera del cual les resulta imposible proliferar, se hace referencia al pH del medio o extracelular, ya que el intracelular tiene que estar cerca de la neutralidad para prevenir cambios conformacionales de estructuras proteicas celulares, enzimas, ácidos nucleicos y fosfolípidos (Pereyra y Trejo, 1999; Rodríguez-Palenzuela, 2000).

La habilidad para mantener el pH interior dentro de un intervalo angosto de valores, a pesar de las variaciones del ambiental, se llama homeostasis de pH. Los principales componentes de su parte pasiva son la baja permeabilidad de la membrana a los iones —en especial a los protones— y la capacidad amortiguadora del citoplasma. En cambio, la homeostasis activa se alcanza, ante

todo, por el movimiento controlado de cationes y aniones (básicamente iones sodio, potasio y protones) a través de la membrana; por la descarboxilación de aminoácidos, como lisina y arginina; o por el bombeo activo de iones, de gran costo energético (Cueto, 2001).

Si la bacteria opera en un intervalo de pH exterior 3 a 4 unidades fuera de su valor habitual, las relaciones entre las formas ionizadas y no ionizadas de los sustratos cambian, y procesos como el sistema de transporte de solutos pueden no estar disponibles. Además, la célula bacteriana cuenta con pocas opciones para proteger al primer punto de daño por un pH extracelular adverso: las macromoléculas externas a la membrana citoplasmática (flagelo, pili, proteínas periplásmicas, pared celular, etc.) y debe producir versiones modificadas de éstas, capaces de resistirlo, o prescindir de su función en caso de que esto no fuera posible. Lo que ocurre, por ejemplo, con la pérdida de la movilidad del flagelo y, por tanto, de la respuesta quimiotáctica bajo condiciones de pH ácido (Cueto, 2001).

Al comparar la resistencia a la acidez de cepas de *E. coli* de diferentes ambientes y serotipos, Cueto (2001) halló que los resultados de sobrevivencia en caldo Luria-Bertani con pH 3.0, 2.5 y 2.0 variaban en función del tiempo de exposición, del ácido utilizado en la acidificación (clorhídrico o láctico), del serotipo de la cepa y del origen de esta última. A un mismo pH (3.0), la inhibición del crecimiento bacteriano fue más pronunciada cuando usó ácido láctico para ajustar el medio, que cuando empleó clorhídrico. Aplicó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) unifactorial, y los valores F experimentales indicaron que el pH y el tiempo de exposición estaban mucho más involucrados que las cepas en las diferencias significativas encontradas. Empleando la prueba Duncan, comparó los

resultados de sobrevivencia en los medios con distintos valores de pH y descubrió que no había una diferencia significativa entre los tratamientos pH 2.0-clorhídrico y pH 3.0-láctico, ni entre los dos restantes (ambos con clorhídrico, uno a pH 2.5 y otro a 3.0). En Bonestroo y col. (1993) también se señala la existencia de reportes de que los ácidos orgánicos usados como conservadores, como el láctico, son sustancialmente más efectivos que el ácido clorhídrico.

#### **1.4.1.2 Bacteriocinas**

Muchas bacterias lácticas producen bacteriocinas: *Pediococcus pentosaceus*, pediocina; ciertas cepas de *Lactobacillus acidophilus*, lactacina B; *Lactobacillus helveticus*, helveticina J; *Lactobacillus plantarum*, plantacina B; *Streptococcus mutans*, mutacina; etc. La más estudiada es la nisina (Jay, 1992; Barboza-Corona y col., 2004), cuyo nombre deriva de “group N [streptococci] inhibitory substance” (Daeschel, 1989).

La nisina es una bacteriocina clase I (Lantibióticas < 5 kDa), al igual que la subtilina (Pereyra y Trejo, 1999). La primera (un polipéptido termoestable) es eficaz frente a bacterias Gram positivas e inefectiva contra hongos y bacterias Gram negativas; la segunda, sintetizada por algunas cepas de *B. subtilis*, es de estructura y características muy parecidas a la nisina: termorresistente, estable a pH ácido y eficaz frente a bacterias Gram positivas. En los alimentos enlatados, impiden la emergencia de las endosporas en germinación (Jay, 1992). La enzima nisinasa, producida por algunas bacterias, inactiva a la nisina (Banwart, 1982).

Las bacteriocinas son compuestos químicos que inhiben o destruyen a especies estrechamente relacionadas con los microorganismos que las generaron,

así como a otras cepas de las mismas especies bacterianas de éstos (Baker y Breach, 1990; Banwart, 1982). Difieren de los antibióticos por lo antes mencionado y por no tener uso terapéutico en humanos ni en animales, ya que por su naturaleza proteica se inactivan al pasar por el tracto gastrointestinal y no se absorben como compuestos activos; por lo tanto, no presentan los riesgos relacionados con el uso de antibióticos y de otros conservadores que se acumulan en el organismo (Pereyra y Trejo, 1999).

Asimismo, muchos organismos Gram negativos sintetizan bacteriocinas: los coliformes, colicinas; las pseudomonadáceas, piocinas; *Serratia marcescens*, marcescinas; etc. Estas últimas, por ejemplo, afectan a otras cepas de *S. marcescens* y también a algunas de *E. coli*, *Shigella*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. Las bacteriocinas de los organismos Gram positivos tienen con frecuencia un espectro más amplio que las de los Gram negativos (Baker y Breach, 1990; Banwart, 1982). En microbiología médica, la aplicación más importante de estos compuestos es como marcadores epidemiológicos. Las cepas aisladas de infecciones hospitalarias pueden y deben ser tipadas por diversos métodos (serotipia, biotipia, lisotipia), y uno de los más utilizados es la bacteriocinotipia (Pumarola y col., 1994).

Colectivamente, las bacteriocinas forman un grupo heterogéneo en cuanto se refiere a las bacterias que las producen, a su espectro antibacteriano, a su modo de acción y a sus propiedades (Daeschel, 1989) y estructuras químicas. Debido a la gran variedad de estas últimas, afectan diferentes funciones esenciales de sus células objetivo (transcripción, traducción, replicación y biosíntesis de la pared celular). Sin embargo, en su mayoría son pequeños compuestos peptídicos catiónicos que actúan en la membrana formando canales o poros que alteran su

potencial eléctrico y causan la muerte celular (Oscáriz y Pisabarro, 2001; Weller, 1997). Es de llamar la atención que la síntesis de pequeños péptidos catiónicos con actividad antibacterial sea una estrategia de defensa encontrada también en animales y plantas [considérese las magaininas, cecropinas y defensinas en el primer caso, y las tioninas, en el segundo] (Oscáriz y Pisabarro, 2001). Dichos péptidos, que combaten un amplio espectro de microorganismos, no afectan las células eucarióticas (Montaño-Pérez y Vargas-Albores, 2002), por lo cual están siendo estudiados como agentes antimicrobianos con aplicación en alimentos.

En general, el mecanismo de acción de las bacteriocinas se desarrolla en dos fases. En la primera ocurre una adsorción sobre los receptores de la superficie bacteriana sensible, seguida por una actuación específica sobre el componente lipoproteico de la membrana citoplasmática o celular; y en la segunda, se lesiona de manera irreversible a la célula, al operar sobre procesos energéticos, metabolismo del ADN o síntesis de proteínas y ARN (Pumarola y col., 1994).

Acerca de la nisina, este antibiótico catiónico se une electrostáticamente a los fosfolípidos de la membrana, que tienen carga negativa. Esto favorece la subsecuente interacción de la parte hidrofóbica de la bacteriocina con la membrana citoplásmica objetivo, lo cual genera canales iónicos inespecíficos cuya formación se ve beneficiada tanto por la presencia de altos potenciales transmembrana (y lípidos aniónicos), como por la ausencia de lípidos catiónicos. Por otra parte, la formación de poros disminuye en presencia de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ ), ya que éstos neutralizan las cargas negativas de los fosfolípidos. Los poros que la nisina produce en la membrana permiten el flujo pasivo de iones ( $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ),

aminoácidos (ácido glutámico, lisina) y ATP, pero no el de proteínas citoplásmicas de mayor tamaño, lo que conduce a la disipación del potencial de membrana y la fuerza protomotriz y a la posterior muerte celular (Oscáriz y Pisabarro, 2001).

Muchos factores influyen en la actividad de la nisina; en particular, el tamaño y la edad del inóculo, la composición del medio y el pH de la solución en la cual ha sido disuelta; pues siendo una molécula acídica, es más estable y se disuelve mejor a un pH bajo (Thomas y Wimpenny, 1996). Según observaciones previas, en algunos casos la producción de bacteriocinas se incrementa significativamente en medios sólidos o semisólidos suplementados con agentes gelificantes (Martirani y col., 2002).

Pereyra y Trejo (1999) descubrieron que ocho de las noventa cepas de bacterias lácticas del pozol identificadas por Flores (1996) sintetizaban bacteriocinas. Además de comprobar su naturaleza proteica (fueron inactivadas por la enzima pronasa) y la ausencia de fagos, descartaron la producción de ácidos orgánicos (no usando un medio rico en glucosa) y la de peróxido de hidrógeno (realizando cultivos en anaerobiosis). El espectro de acción de las bacteriocinas encontradas incluyó *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium sporogenes*, *Micrococcus luteus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis lactis*, *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus acidophilus*. Aun cuando no todas presentaron antagonismo contra las mismas especies bacterianas, sí tuvieron en común un nulo efecto sobre su cepa productora; sobre los microorganismos Gram negativos ocupados (*E. coli* y *Vibrio cholerae*), y sobre *Clostridium perfringens*. Entre otras cosas, Pereyra y Trejo (1999) recomendaron definir en ulteriores estudios el rango de pH óptimo de

acción para cada bacteriocina y caracterizar genéticamente las bacterias lácticas que las originaron, pues por los resultados obtenidos —y por su porcentaje y calidad de identificación (Flores, 1996)— sugirieron que tanto la cepa 59 como la 60 podían ser la misma bacteriocina y/o cepa; lo mismo pensaron del par conformado por la 14 y la 19. Concluyeron que el índice de detección de las bacterias lácticas del pozol productoras de bacteriocinas fue alto (8.8%), comparado con los valores reportados en la literatura para otros alimentos (<0.1 a 0.2%). Consideraron que el pozol era un medio propicio para la síntesis de dichos compuestos y que el método empleado por ellas había sido el correcto.

Con la intención de evaluar la presencia de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas en treinta y tres muestras de queso elaborado artesanalmente en el Estado de Hidalgo, Ramírez y col. (2005) aislaron trescientas treinta cepas de cocos o bacilos Gram positivos, catalasa y oxidasa negativos, que presentaban crecimiento típico de bacterias lácticas en agar MRS. Para determinar su espectro de actividad, aplicaron el método de botón sobre medio MRS sin glucosa y tomaron como positivas aquellas cepas cuya zona de inhibición alrededor del botón fue mayor a 1mm. Manifestaron que noventa y seis de las cepas aisladas (26.09% del total) mostraron actividad inhibitoria frente al menos uno de los microorganismos probados, que fueron los siguientes (entre paréntesis se indica el número de estas últimas activo frente a ellos): los Gram positivos *Bacillus subtilis* (2), *Staphylococcus aureus* (4) y *Listeria monocytogenes* (8) y los Gram negativos *Vibrio cholerae* (86), *Shigella* (7), *Escherichia coli* (1), *Klebsiella pneumoniae* (8), *Enterobacter aerogenes* (4), *Citrobacter freundii* (3), *Proteus* (3) y *Salmonella* (6). Infirieron que deben realizarse más estudios para identificar y caracterizar

debidamente las sustancias responsables de dicha inhibición.

#### **1.4.1.3 Diacetilo y reuterina**

El diacetilo, que es sintetizado por microorganismos heterofermentativos y es responsable del olor a mantequilla, posee un evidente efecto antimicrobiano, como muchos otros agentes que imparten aromas y sabores a los alimentos. Es sensible al pH (aumenta su poder inhibitorio al disminuir éste y la temperatura de incubación) y le hace un tanto singular ser más eficaz frente a las bacterias Gram negativas (y hongos), que frente a las Gram positivas. Al parecer, en las primeras, el diacetilo contrarresta la utilización de la arginina, al reaccionar con las proteínas fijadoras de este aminoácido. Las segundas, en cambio, carecen de proteínas periplásmicas fijadoras similares y poseen una mayor reserva aminoacídica (Jay, 1992).

La reuterina, producida por la especie heterofermentativa *Lactobacillus reuterii*, es un agente antimicrobiano no proteínico, de bajo peso molecular y de amplio espectro, activo frente a ciertas bacterias —tanto Gram positivas como negativas—, hongos, levaduras y protozoos. Los organismos de importancia en salud pública inhibidos por ésta incluyen especies de *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* y *Tripanosoma* (Daeschel, 1989).

#### **1.4.1.4 Situaciones adicionales**

En el pozol puede haber efectos antagónicos adicionales a los ejercidos por las bacterias lácticas. Por ejemplo, Herrera y Ulloa (1975) reportaron uno *in vitro*: el de *Agrobacterium azotophilum* sobre veintidós especies microbianas



(*S. aureus*, *E. coli* y *S. typhimurium*, entre otras); no obstante, indicaron desconocer si éste se presentaba también cuando los microorganismos se encontraban creciendo en la masa de pozol.

En algunos casos, la acidificación ofrece ventajas que se suman a las ya expuestas (sensoriales, nutricionales y de seguridad microbiológica). De esta suerte, en el *gari*, un alimento fermentado de consumo corriente en África occidental, las raíces de mandioca (su materia prima) se vuelven inocuas mediante su fermentación, pues contienen un glucósido cianogénico (linamarina: el glucósido de la cianhidrínacetona) que se hidroliza espontáneamente en condiciones ácidas y libera ácido cianhídrico gaseoso. Claro, otros pasos del proceso de obtención del *gari* contribuyen de igual manera a deshacerse de este ácido: el lavado de la raíz; la separación de la capa externa y su gruesa corteza (con alto contenido de cianhídrico); la trituración o rallado (en las plantas con glucósidos cianogénicos la  $\beta$ -glucosidasa es extracelular y sólo la destrucción física o química de la pared celular la pone en contacto con el glucósido, para escindirlo y liberar el ácido cianhídrico); la eliminación del jugo; el tostado, y la cocción, pero por sí mismos no aseguran la inocuidad, de ahí la importancia de la hidrólisis ácida ocurrida al fermentarlas (Jay, 1992; Steinkraus, 1983a; Lindner, 1995).

Pese a todo lo anterior, se han aislado del pozol microorganismos —como *Bacillus cereus*, *Aspergillus flavus*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Philiaphora richardsiae*— que pueden representar un riesgo para la salud (Ulloa y col., 1983). A más de que las aflatoxinas que estén en el maíz utilizado y resistan

la nixtamalización no desaparecerán con la fermentación (Ulloa y Herrera, 1970). [Aunque termorresistentes, estas sustancias se destruyen con álcalis (principalmente con hidróxido de amonio) (Badui, 1988).]

Los grupos de microorganismos hallados de modo sistemático en la masa de pozol recién elaborada son los siguientes: bacterias lácticas, enterobacterias, bacterias mesófilas no lácticas (*Bacillus*), mohos y levaduras (Wacher, 1995).

#### **1.4.2 Enterobacterias en alimentos fermentados**

En ocasiones, a las enterobacterias encontradas en los alimentos fermentados se les atribuye alguna función: el ablandamiento de tubérculos (Oyewole, 1990), el rompimiento del mucílago durante la fermentación de café (Arunga, 1982; Carr, 1985), la fijación de nitrógeno (Taboada y col., 1975; Leal y col., 1987), el inicio de la acidificación (Gashe, 1985) y la producción de vitaminas (Steinkraus, 1983b; Keuth y Bisping, 1993). Mas una razón de peso para considerarlas indeseables es que dentro de este grupo se incluyen microorganismos patógenos —como *Salmonella*, *Shigella* y algunas cepas de *E. coli* y de *Yersinia enterocolitica*— causantes de enfermedades gastrointestinales (Wacher, 1995). Por otra parte, también se les ha relacionado con el deterioro de varios alimentos de este tipo (Giles, 1995).

El pH bajo y la presencia de ácidos orgánicos son importantes en los alimentos fermentados ácidos porque participan en la inhibición de bacterias patógenas —tales como las enterobacterias—, haciéndolos menos susceptibles de colonización, comparados con otros no sometidos a un proceso fermentativo. Sin embargo, es esencial evitar en lo posible contaminarlos con éstas, ya que una

fermentación ácida quizás no elimine en su totalidad los altos niveles de bacterias (de origen fecal u otro) que resultan a veces de la elaboración casera de los alimentos tradicionales (Caparelli y Mata, 1975; Mensah y col., 1988 y 1990; Girma y col., 1989; Nout y col., 1989; Wachter, 1995).

Los microorganismos entéricos enfrentan muchas situaciones de estrés ambiental (físico y químico), y una de ellas es el estrés ácido (el efecto biológico combinado de pH bajo y de ácidos orgánicos débiles, como el butírico, el propiónico y el acético) existente en la degradación del material orgánico, en los desechos industriales, en el drenaje ácido, etc. Además, arrostran la acidez del estómago (con un pH entre 2 y 3) y la presencia de ácidos grasos de cadena corta en el intestino y las heces; circunstancias que reducen el número de organismos viables, ya sean inocuos o patógenos. Por lo tanto, la capacidad de respuesta de estos microorganismos a cambios de pH potencialmente letales es crucial para su sobrevivencia (Goodson y Rowbury, 1989; Bearson y col., 1997; Baik y col., 1996).

El pH mínimo de crecimiento de *S. typhimurium* es inferior (pH 4.0) al de *E. coli* (pH 4.4) y al de *S. flexneri* (pH 4.8). No obstante, en medio complejo, estos últimos sobreviven a un menor pH (2.0 a 2.5) que el primero de ellos (pH 3.0), ya que poseen sistemas de resistencia a la acidez [AR] no demostrables en la salmonela. [Dicha resistencia ya había sido reportada en ambos microorganismos, inducida en la fase estacionaria por su crecimiento a cualquier pH en un medio complejo. Al igual que otra, inducida por la acidez y condiciones anaeróbicas.] Con relación a *S. typhimurium*, esta bacteria y *E. coli* expresan sistemas de respuesta de tolerancia a la acidez [ATR] inducibles a pH bajo en fase logarítmica y estacionaria, que funcionan en medio mínimo o complejo para proteger a las

células a un pH 3, mientras que *S. flexneri* no los expresa (Lin y col., 1995).

Al ser adaptada a la acidez, haciéndola crecer en condiciones ligeramente ácidas (pH 5.8) por dos o tres doblajes, *S. typhimurium* aumenta su tolerancia a otros tipos de estrés, como calor, salinidad y agentes superficiales activos (se denomina protección cruzada cuando una condición de estrés confiere protección contra otros tipos de estrés). Este resultado sugiere que el paso de las enterobacterias por el estómago las prepara para soportar otros estreses ambientales presentes en el intestino (Leyer y Johnson, 1993).

De acuerdo con Nout (1992), una combinación de condiciones —como valores bajos de pH (< 4.5, o de preferencia < 4.0) y concentraciones de 1 a 1.5% de los ácidos láctico y acético— en los alimentos fermentados puede inhibir el desarrollo de las familias *Bacillaceae*, *Micrococaceae* y *Enterobacteriaceae*.

Para estudiar la permanencia de *S. flexneri* en un alimento tradicional de Ghana, Mensah y colaboradores (1988) sembraron cuatro cepas de esta bacteria ( $\approx 10^7$  ufc/g) en masa de maíz con 3 días de fermentación (pH 3.2). Tres de ellas se detectaron en pequeños números hasta 6 h después de haber sido inoculadas (no fueron aisladas ulteriormente). La cuarta todavía se encontró a las 24 h, aunque en cantidad se había reducido de forma considerable. Y todas se hallaron en gran concentración en la masa sin fermentar (pH 6.2), a más de 24 h de su exposición.

Lorri y Svanberg (1992) señalaron una fuerte inhibición sobre bacterias patógenas, como *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Campylobacter*, *Shigella* y *Salmonella*, al ser inoculadas en atoles fermentados de cereal preparados en Tanzania. Además, en un estudio epidemiológico sobre la frecuencia de casos

de diarreas en dos tribus de la misma región, indicaron más episodios en la que los consumidores tomaban el atole sin fermentar que donde lo fermentaban. Por otro lado, Mensah y col. (1990) examinaron la presencia de bacterias Gram negativas en alimentos de maíz fermentados y sin fermentar (preparados para el destete por las madres de un pueblo de Ghana) y resultó que los niveles de éstas eran, de un modo significativo, menores en los primeros que en los segundos.

Simango y Rukure (1992) investigaron la permanencia de algunas bacterias patógenas inoculadas en *mahewu* (una papilla agria de maíz) y en dos atoles, uno sin fermentar y el otro fermentado (la concentración inicial era de  $10^6$  a  $10^7$  ufc/ml de alimento). En la papilla agria de maíz, ya no se detectó *Aeromonas* ni *Campylobacter* ni *Salmonella* a los 10 minutos, 20 minutos y 4 horas, respectivamente; *Shigella* y *E. coli* enterotoxigénica mostraron mayor resistencia, pero no se encontraron después de 24 horas; *E. coli* enteropatógena sí sobrevivió 24 horas, aunque su número disminuyó tres ciclos logarítmicos. En el atole fermentado, ni *Aeromonas* ni *Campylobacter* sobrevivieron por más de 10 minutos, ni *Salmonella* por más de 3 horas; *E. coli* y *Shigella* lo hicieron por 24 horas, aunque sus números descendieron más o menos tres ciclos logarítmicos. En el alimento sin fermentar todas sobrevivieron por más de 24 horas. Inferieron, no obstante, que los alimentos fermentados tradicionales tienen propiedades bacteriostáticas y bactericidas y no son la fuente principal de transmisión de bacterias entéricas patógenas.

Cuando en suspensiones de maíz inocularon a la vez *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* enteropatógena

y un cultivo láctico para la producción de *uji*, Mbugua y Njenga (1992) advirtieron durante las primeras 5 horas de fermentación a 25 °C que los patógenos habían mantenido su número constante, o lo habían aumentado un poco, para luego reducirlo drásticamente desde  $\approx 10^8$  hasta  $10^3$ - $10^5$  ufc/g en 30 horas de fermentación. El pH había disminuido de 5 a 3.5 en las primeras 5 horas, y a 3, en 20 horas.

En muestras de pozol, Wachter (1995) no observó la inhibición de enterobacterias a un pH de 4, el mínimo alcanzado (no obtuvo valores menores, aun después de un tiempo prolongado de fermentación). La higiene durante el proceso de elaboración es, entonces, esencial.

Cueto (2001), al investigar la resistencia a valores bajos de pH en cepas patógenas de *Escherichia coli* aisladas del pozol por Sainz (1998), aseveró que existe un peligro potencial de que éstas, por su permanencia habitual en un alimento ácido, incrementen su tolerancia a diferentes condiciones de estrés, adquieran resistencia a la acidez y representen un riesgo para la salud. Por lo que [como ya se ha dicho] es primordial ejercer una mayor vigilancia de las condiciones higiénicas durante la producción de este tipo de alimentos, para evitar contaminarlos con microorganismos patógenos y para poder asegurar su inocuidad, de la misma manera que deben buscarse otras alternativas que favorezcan su control. Rojas y Castillo (2003) llegaron a conclusiones parecidas, aunque al estudiar la supervivencia de un aislado de *Escherichia coli* O157:H7 en jugos de naranja no pasteurizados de expendio comercial.

### 1.4.3 *Bacillus* en alimentos fermentados

Las bacterias del género *Bacillus* pueden ser importantes en la fermentación de leguminosas, cereales y otros sustratos; verbigracia, en el *fufu* participan en el ablandamiento de los tubérculos de la yuca —tal vez por su actividad celulolítica— y en la producción del aroma típico; en el *natto* japonés, *B. natto* hidroliza la proteína de la soya (Hayashi y col., 1983); y en el *obiolor*, bebida de mijo nigeriana, cepas amilolíticas de *Bacillus* estimulan el crecimiento de las bacterias lácticas. Sin embargo, con frecuencia se les considera indeseables, porque dentro de este género se ubica la especie *B. cereus*, capaz de sintetizar toxinas que ocasionan problemas gastrointestinales. Además, algunas cepas de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. circulans*, *B. lentus*, *B. polymyxa*, *B. carotarum*, *B. sphaericus* y *B. pasteurii* también han sido reportadas como patógenas (Okafor y col., 1984; Oyewole y Odunfa, 1990; Jay, 1992; Drobniowski, 1993; Wacher, 1995; Abriouel y col., 2007). Las infecciones por *Bacillus* han sido documentadas quizá desde antes del comienzo del siglo XX; el máximo causante de éstas debe haber sido *B. cereus* (Drobniowski, 1993).

Los casos de intoxicación alimentaria por *B. licheniformis* y *C. perfringens* presentan un cuadro similar a los del síndrome diarreico provocado por *B. cereus*; por otra parte, *B. subtilis* genera un síndrome emético de inicio agudo, aunque una gran minoría de los pacientes sufra igualmente de diarrea (Drobniowski, 1993). Y en cuanto al psicrotolerante *B. weihenstephanensis*, algunas de sus cepas poseen la toxina emética descrita en *B. cereus* (Cobo y col., 2008). Si se establece intoxicación alimentaria por estos *Bacillus* no *anthracis*, los síndromes pueden ser originados por toxinas similares o idénticas a las de *B. cereus* y, según

Drobniewski (1993), ha sido interesante especular si las principales toxinas se localizan en elementos genéticos móviles y si la transferencia intraespecífica podría conferir enterotoxicidad a todo el género, explicando el esporádico aislamiento de diferentes especies en casos manifiestos de intoxicación alimentaria.

Un cultivo mixto de *Pseudomonas maltophilia*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* incrementa de forma significativa el valor nutritivo relativo de un atole de maíz fermentado, respecto al maíz sin fermentar (Nanson y Fields, 1982); a pesar de lo anterior, esta combinación no debe usarse para producir alimentos.

Wacher y col. (1993) indicaron —en un trabajo sobre las fuentes de contaminación del pozol— que el nixtamal recién cocido estaba libre de microorganismos, pero al enfriarse y lavarlo la cuenta de mesófilos aerobios (en log ufc/g de peso húmedo) era de  $< 2$ ; en el remojo, de 4.5; en la masa de nixtamal, de 4.3; en la bola de pozol incubada 6 horas, de 5.2; en la fermentada 11 horas, de 6.7; a las 14 horas de incubación, de 7.1; y a las 30 horas, de 6.8. El género *Bacillus* (bacterias mesófilas aerobias no lácticas) se ha encontrado sistemáticamente en las masas recién hechas (Wacher, 1995). *B. cereus* (Salinas, 1958; Rivera, 2001), *B. lentus* y *B. mycoides* (Rivera, 2001) han sido aislados del pozol.

### **1.5 Fuentes de contaminación en la elaboración del pozol**

La flora microbiana de un alimento consta de los microorganismos asociados con la materia prima, los añadidos voluntaria o accidentalmente al prepararlo y los que sobreviven a la distribución, al almacenamiento y a cualquier



tratamiento de conservación. La mayoría de los alimentos se halla expuesta a más de una fuente potencial de microorganismos (el suelo, el agua, el aire, las plantas, los abonos, los animales, las aguas residuales, los ingredientes, el equipo, la manipulación, el contacto con otros productos, los materiales de embalaje, etc.) (Banwart, 1982).

En lo tocante al pozol, debe considerarse la ecología microbiana de las plantas. En la microbiota de éstas, que se desarrolla en la superficie vegetal, predominan las bacterias Gram negativas y las Gram positivas esporuladas, acompañadas de números bajos de mohos y levaduras. Durante la cosecha, al aumentar la disponibilidad de nutrientes, se incrementan las cuentas de estos microorganismos. Las bacterias aerobias Gram negativas son reemplazadas por las anaerobias o anaerobias facultativas Gram positivas de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bacillus* y *Clostridium*. De esta manera, se puede decir que la microbiota natural de las plantas está compuesta por los siguientes grupos: bacterias lácticas, bacterias mesófilas (aerobias y anaerobias), bacterias Gram negativas (como las enterobacterias), mohos y levaduras; entonces, es común identificarlos en los alimentos fermentados de origen vegetal (Wacher, 1995). No obstante, en la producción del pozol —recordemos— se incluye un tratamiento térmico alcalino de los granos, gracias al cual tal vez se reduzca o elimine la microbiota natural.

En un estudio realizado en Chiapas, Wacher y col. (1993) descubrieron que el pozol puede llegar a contaminarse en diferentes etapas de su elaboración, mas esto acaece sobre todo en el remojo y la molienda. Aunque la microbiota que existe en los granos de maíz seguramente desaparece con el nixtamalizado,

ésta puede aumentar durante el lavado y el remojo del nixtamal, por la presencia de microorganismos en el aire, en el agua y en los recipientes empleados. Empero, su incremento sustancial ocurre durante la molienda; es ahí donde se inoculan, entre otros, los microorganismos fermentativos (la masa retenida en los espacios muertos del molino sirve como una muy importante fuente de éstos para los lotes frescos de masa). Luego de dicho paso, en el que es posible asimismo la incorporación de organismos indeseables, las cuentas totales de enterobacterias eran de  $\approx 4 \log \text{ ufc/g}$  (Wacher y col., 1993). La formación de las bolas y su envoltura en hojas de plátano son procesos del todo artesanales, donde la manipulación —por el contacto de la masa con la superficie de trabajo, con las manos del productor y con las hojas mismas— ofrece nuevas fuentes de contaminación, lo mismo que el agua agregada durante el amasado.

## **1.6 Microbiología del pozol**

### **1.6.1 Hongos y levaduras**

Ulloa (1974) investigó cuál era la sucesión de hongos y levaduras en muestras de pozol tabasqueño. *Cladosporium cladosporioides* y *Fusarium moniliforme*, presentes en los granos de maíz, fueron eliminados durante el tratamiento con cal y calor; *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cutaneum* y varias especies de *Candida* estaban en muestras con pocas horas de fermentación, en las cuales continuaron creciendo por varios días; y *Cladosporium cladosporioides/herbarum*, *Monilia sitophila* y *Mucor rouxianus/racemosus* aparecieron en el pozol al ir disminuyendo el pH e irse secando la superficie. Ya en estudios previos se habían aislado las levaduras *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Hansenula fabianii*,

así como los mohos *Aureobasidium pullulans*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Epicoccum* sp., *Penicillium claviforme*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium lanosoviride*, *Phialophora richardsiae*, *Rhizopus stolonifer* y *Trichoderma viride* (*T. reesei*). [Algunas de estas especies han sido referidas como patógenas o potencialmente patógenas para el hombre, como *G. candidum*, *Trichosporon cutaneum*, *Candida parapsilosis* y *Phialophora richardsiae*, que pueden causar geotricosis, piedra blanca (micosis superficial asintomática poco frecuente), candidiasis y feosporotricosis, respectivamente, si las condiciones son favorables para la infección.] En 1983, Ulloa y col. agregaron los nombres de *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Kluyveromyces fragilis* y *Saccharomyces cerevisiae* a la lista de levaduras aisladas de dicho alimento.

Usando la sonda filogenética Euc502, Ampe y col. (1999) pusieron de manifiesto que las especies eucariotes habían contribuido con  $10.2 \pm 0.1\%$  a la actividad fermentativa de un pozol con 12 h de haber sido elaborado; y con  $4.3 \pm 1.9\%$ , a la de uno con 5 días. Concluyeron que la cuantificación del ARNr proporciona información de los grupos activos, ya que se ha señalado que su contenido en una célula microbiana está en relación directa con la actividad metabólica de ésta, lo cual es de particular importancia en el caso de los hongos filamentosos —y también en el de algunas levaduras—, cuyas cuentas en placa son difíciles de realizar por la naturaleza intrínseca de sus hifas. Indicaron que, en resumen, los números relativamente bajos de hongos y levaduras encontrados por Wachter y col. (1993) en el pozol ( $10^6$  ufc/g, de un total superior

a  $10^9$  microorganismos) tal vez no reflejen el verdadero rol ecológico de los eucariotes si se comparan con los altos índices de ARN obtenidos en este estudio. El uso de las sondas filogenéticas —agregaron— permite evitar los posibles sesgos resultantes de la utilización de métodos dependientes de cultivo, o de los moleculares que emplean PCR. Sin embargo, es esencial el desarrollo de nuevas y más específicas sondas, puesto que, por ejemplo, la secuencia objetivo de la Lacb0722 modificada (bacterias lácticas) está presente asimismo en el ARNr 16S de especies de *Staphylococcus* y en el de algunas otras pocas bacterias Gram positivas no lácticas.

## **1.6.2 Bacterias**

### **1.6.2.1 Métodos clásicos de aislamiento e identificación**

Entre las primeras bacterias aisladas del pozol están *Bacillus cereus* y *Paracolobactrum aerogenoides* (Salinas, 1958); *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter (Alcaligenes) pozolis* (Ulloa y Herrera, 1972; Wachter, 1995); *Pseudomonas mexicana* y *Escherichia coli* var. *neapolitana* (Fuentes y col., 1974); y *Aerobacter aerogenes (Klebsiella pneumoniae)* (Salinas y Herrera, 1974; Wachter, 1995). Esta última y *A. azotophilum* son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico (Ulloa y Herrera, 1972; Salinas y Herrera, 1974; Taboada y col., 1975).

Más adelante en el tiempo, se estableció la importancia de las bacterias lácticas durante las primeras horas de fermentación (Silva, 1984; Ramírez, 1987; Nuraida, 1988; Escamilla-Hurtado y Mozqueda-González, 1992; Wachter, 1995; Ampe y col., 1999). Éstas son las responsables de la producción del ácido láctico y,

según Giles (1995), el descenso del pH coincide con su fase exponencial, pero continúa aun después de estabilizarse su cuenta (siguen metabólicamente activas).

Al estudiar pozoles de Tapachula, Silva (1984) reportó que la acidez se había incrementado de cuatro a cinco veces (en base seca) en las primeras 48 horas de fermentación; lo relacionó con la presencia de bacterias lácticas, de las que aisló *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermentum*.

Ramírez (1987) trabajó con pozoles de Yucatán, Campeche, Tabasco y Chiapas. A los 5 días de iniciado el proceso fermentativo, primero había advertido grupos bacterianos (bacterias Gram negativas, catalasa positivas; bacterias Gram positivas, catalasa negativas, y bacterias móviles Gram negativas, fijadoras de nitrógeno); y luego, grupos fúngicos.

Nuraida (1988) caracterizó algunas bacterias lácticas procedentes de pozol chiapaneco (aisladas por Owens y Wachter, 1987). Mientras que *Leuconostoc spp.* estuvo en el alimento todo el periodo de fermentación estudiado (6 días), los *Lactobacillus spp.* heterofermentativos —junto con *Streptococcus spp.*—, sólo en etapas tempranas, y los homofermentativos (de dicho género), únicamente en las tardías. *Lb. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus (Lactococcus) lactis* y *Streptococcus (Lactococcus) raffinolactis* fueron las especies identificadas.

Escamilla-Hurtado y Mozqueda-González (1992) prepararon pozol tipo mestizo (el de dos cocciones) en su laboratorio. Durante el proceso fermentativo, observaron un aumento en las cuentas totales de microorganismos mesófilos viables, de  $\approx 10^7$  a  $\approx 10^9$  ufc/g de muestra fresca (con  $\approx 69\%$  de humedad); el perfil de estas cuentas evidenció dos etapas de desarrollo activo. Aun cuando a

partir de las 16 horas detectaron levaduras, su presencia no fue preeminente. Después de 48 horas de fermentación, las bacterias lácticas (lactobacilos y estreptococos) habían iniciado un crecimiento poblacional que a las 96 horas llegaría hasta  $10^9$  ufc/g, y las bacterias Gram negativas casi habían desaparecido. Estos cambios se asociaron a una disminución progresiva del pH —al inicio era de  $\approx 6.8$ ; y luego de cuatro días, de  $\approx 3.9$  [valores sacados de gráficas]—, junto con un importante incremento de la acidez titulable.

Wacher (1995) determinó que las bacterias lácticas (BAL), las mesófilas no lácticas (*Bacillus*), las enterobacterias, los mohos y las levaduras son los grupos microbianos hallados de forma sistemática en la masa recién elaborada; que todos éstos crecen en ella, haciéndolo con mayor rapidez las bacterias lácticas y las mesófilas no lácticas, sin observarse un predominio de las primeras ni una inhibición de las segundas (ni de las enterobacterias) como resultado de la acidificación; que la microbiota del pozol es muy estable, y que las diferencias entre el proceso ladino y el indígena no influyen en su composición bacteriana. En las masas recién elaboradas encontró bacterias lácticas homo y heterofermentativas, con primacía de estas últimas. Al inicio de la fermentación predominó el género *Leuconostoc*, mas fue reemplazado posteriormente por otros más resistentes a la acidez, como *Lactobacillus sp.*

Aunque algunas BAL poseían actividad amilolítica —lo que coincidía con observaciones de Velázquez-Corona y col. (1984)—, y pese a que el almidón es el principal carbohidrato de las masas, Wacher (1995) concluyó que las BAL podían crecer incluso sin dicha actividad y no necesitaban tampoco de otro microorganismo

para desarrollarse en la masa de nixtamal: la concentración de carbohidratos directamente fermentables no era limitante o empleaban otro sustrato.

De lo anterior (Silva, 1984; Ramírez, 1987; Nuraida, 1988; Escamilla-Hurtado y Mozqueda-González, 1992; Wachter, 1995; Ampe y col., 1999), se infiere que el pozol es producto de una fermentación que, aunque básicamente láctica, es de naturaleza mixta, por la presencia de bacterias, mohos y levaduras a lo largo del proceso. Lo cual es importante porque los cultivos mixtos ofrecen una serie de ventajas sobre los convencionales cultivos únicos: es común que sus integrantes se complementen entre sí y trabajen en conjunto para atacar una mayor variedad de sustratos (al reunir un amplio espectro de actividades enzimáticas), al igual que podrían hacerlo para tratar de excluir los microorganismos indeseables y de destruir los compuestos tóxicos o nocivos para el consumidor; existe la posibilidad de llevar a cabo transformaciones del sustrato en etapas múltiples, así como la de obtener mayores velocidades de crecimiento y un mejor rendimiento del producto; y casi podría garantizarse el encontrar las mismas mezclas microbianas al final de la fermentación —dice Hesseltine (1992)—, aun después de años de resiembras, al crearse asociaciones microbianas estables. Su estudio científico, empero, es difícil (aislar e identificar los microorganismos del cultivo mixto, determinar cuáles son los contaminantes, definir los productos de cada uno de sus componentes, establecer el balance óptimo entre sus integrantes, etc.) (Wachter, 1995).

En el pozol se han hallado bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (Taboada y col., 1971; Herrera y Ulloa, 1970; Ulloa y Herrera, 1976-1982; Aguilera, 1989). La producción de proteína durante la fermentación de este alimento es el resultado de la compleja relación entre los componentes de su

microbiota (Giles, 1995); puede haber sinergismo entre las bacterias lácticas y las fijadoras de nitrógeno (Muñoz-González y Viniegra-González, 1981).

Giles (1995) efectuó la identificación de algunas enterobacterias aisladas de pozol tradicional. Encontró *K. pneumoniae* —ya señalada como fijadora de nitrógeno (en el *tempeh* provoca asimismo el incremento de vitamina B<sub>12</sub>)—, además de *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* (las tres asociadas con el aumento de concentración de las vitaminas B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> en el *tempeh*) y *E. coli* (Giles, 1995; Wood, 1985; Steinkraus, 1985; Keuth y Bisping, 1993). *K. pneumoniae* y *E. agglomerans* fueron identificadas sólo en pozol mestizo; *Serratia* y *E. coli*, exclusivamente en el tipo indígena. Como varios serotipos de *E. coli* están relacionados con enfermedades gastrointestinales, recomendó investigar la patogenicidad de las cepas de este género presentes en el pozol.

Flores (1996) caracterizó fisiológicamente una colección de noventa y tres cepas de BAL aisladas de antemano [ella dice que por Nuraida (1988) y Cañas (1991)] tanto de la superficie como del interior de bolas de pozol chiapaneco de los tipos indígena y mestizo (ladino). Utilizó el sistema API 50CH y el programa APILAB (ambos de Bio-Mérieux); este último proporcionó el porcentaje (%) y la calidad (excelente, muy buena, buena, baja, aceptable, dudosa y no válida) de identificación del taxón, el perfil de carbohidratos, la *t* de Student y las pruebas en contra y complementarias. Indicó *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus coprophilus*, *Leuconostoc citreum*, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* y



*Leuconostoc mesenteroides*. Más de la mitad de las cepas fue de identificación dudosa; es decir, su patrón de fermentación de carbohidratos no coincidió con ninguno de la base de datos del programa. Consideró que era normal, porque analizaba un sustrato que no había sido estudiado con anterioridad, y recomendó el uso de otros métodos, como los moleculares, lo mismo para verificar la presencia de BAL no señaladas en la literatura, que para complementar la identificación bioquímica realizada. Informó de la actividad amilolítica de veinte de las cepas y de la xilanolítica de ochenta. Puesto que no encontró que esta última hubiera sido reportada en BAL, también aconsejó averiguar la capacidad que tienen las integrantes de dicha colección para acidificar la masa a partir de hemicelulosa.

Olivares (1998) buscó caracterizar las glicosiltransferasas producidas por quince cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas del pozol por Wacher (1995). En once de ellas pudo medir la actividad enzimática cuantificando los azúcares reductores liberados en función del tiempo (en seis era extracelular; en tres estaba asociada a las células; en dos se manifestó tanto en las células como en el sobrenadante). No obstante, sólo la actividad de cuatro de éstas [la cual era extracelular] fue superior a 1 U/ml, por lo que en general no resultó relevante. Durante el seguimiento de la conversión de sacarosa a polímero, mediante el ensayo enzimático de Boehringer Mannheim, observó que diez de las cepas produjeron dextranas —según el caso, con dextransacarasas extracelulares y/o asociadas a las células—; y la restante (la CW 28, cuya actividad se vinculó únicamente a la célula), un polímero formado por unidades de fructosa, pues en el medio de reacción había glucosa libre y no fructosa como en los demás casos. Dicho polímero se identificó como levana por medio de un análisis de RMN, a más

de que ni la inulinasa ni la invertasa ni la dextranasa lo hidrolizaron. La levansacarasa no sintetizó oligosacáridos en las reacciones de aceptor con los compuestos empleados: galactosa, fructosa, maltosa, lactosa, glicerol y sorbitol. En cambio, el perfil de oligosacáridos obtenido de las dextransacarasa en presencia de maltosa fue igual al indicado para la dextransacarasa B-512, usada a nivel industrial. En referencia a la cepa CW28, Olivares (1998) destacó el que hubiera mostrado una actividad poco común en *L. mesenteroides*, pues si bien existían reportes de actividad levansacarasa en dicha especie bacteriana, ésta —además de ser extracelular— siempre estaba en menor proporción que la dextransacarasa de su microorganismo productor; de hecho, se le consideraba una actividad contaminante de esta última. Como Olivares (1998) notó adicionalmente en CW28 una actividad, tal vez dextransacarasa intracelular, que no generó oligosacáridos en presencia de maltosa y que no se expresó hasta que las células fueron lisadas, recomendó profundizar en la caracterización de ambas enzimas.

Sainz (1998) ahondó en la viabilidad de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* durante la fermentación del pozol —con relación al tiempo y al pH— y en la capacidad patogénica de los mismos. Al inicio del proceso fermentativo de las muestras ocupadas [las últimas diez de este trabajo de tesis, aunque con otra numeración], las cuentas de enterobacterias iban de 4.17 a 7.84 log ufc/g. En 48 horas, éstas disminuyeron más o menos 1 a 3 ciclos logarítmicos en siete de los pozoles analizados a ese tiempo de incubación; en los dos restantes, aumentaron hasta 2 ciclos. Por tanto, estas bacterias no desaparecieron aun a valores de pH comprendidos entre 4.8 y 3.8 (48 h). De las enterobacterias que Sainz supuso que estarían en el alimento (*Shigella spp.*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*),

sólo halló *E. coli*, así como otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia fergusonii*) y las bacterias de origen ambiental *Pseudomonas spp.*, *Xanthomonas spp.* y *Acinetobacter spp.* La identificación la efectuó bioquímicamente mediante el sistema API 20E (Bio-Mérieux). Entre las cepas de *E. coli* aisladas, Sainz (1998) encontró algunas de serogrupos reportados como patógenos y otras no pertenecientes a éstos, pero poseedoras de factores de virulencia (PFV). Por ejemplo, las de los serotipos O92:H6 (PFV), O?:H10 (PFV), O8:H7 (ETEC), O8:H8 (ETEC) y O88:H25 (EPEC). Las de este último sobrevivieron a un pH de 3.7 (muestra con 7 días de fermentación); y algunas de las de los otros cuatro, a valores de 3.8 a 4.4.

En bolas de pozol tabasqueño —preparadas unas en el local 801 del mercado “José María Pino Suárez” (MKD) y otras en la pozolería “Tabasco” (FMKD)—, Cabra (2000) descubrió que las cuentas iniciales de enterobacterias iban de 5.37 a 5.45 log ufc/g de muestra seca (para explorar igualmente el efecto que tiene sobre la microbiota el grado de aireación de las masas, tomó porciones de las zonas microaerobia y aerobia). Sugirió que la diferencia entre ambas condiciones higiénicas de elaboración quizá no radicaba en el número, sino en las características particulares del grupo de enterobacterias de cada una. La población, que fue disminuyendo a medida que aumentaba la acidez, no había desaparecido a las 74 horas (esto fue atribuido a la posible presencia de cepas acidorresistentes). El mayor descenso poblacional ocurrió durante las primeras 26 horas, tiempo en el cual las cuentas se redujeron de 5.4 a 4.3 log ufc/g de muestra seca, la acidez titulable aumentó de 0.1 a 0.98% y el pH bajó de 7.5 a 4.4. Desde las 11 hasta las

50 horas no detectó diferencias en el comportamiento ni en los niveles de enterobacterias entre las zonas aerobia y microaerobia de las masas FMKD, lo que no fue igual en el caso de las MKD, donde la población fue mayor en la zona aerobia. A las 74 horas, tanto para las FMKD como para las MKD, las cuentas finales en la zona microaerobia eran de  $\approx 3.8$ , y en la aerobia, de  $\approx 4.1$  (ambas en log ufc/g de muestra seca). Por lo que las cuentas resultaron semejantes al final de la fermentación. En su planteamiento del problema, Cabra (2000) señaló que Sainz (1998) sugiere que un mayor índice de contaminación puede estar relacionado con las condiciones higiénicas en que la masa de pozol se produce y con la forma y el lugar en que ésta se expende.

Para comparar la resistencia a la acidez de cepas de *E. coli* aisladas de pozol con la de otras de diferentes ambientes y serotipos, Cueto (2001) trabajó con las siguientes cepas de este microorganismo, después de una preselección en caldo Luria-Bertani ajustado a pH 3 con ácido clorhídrico: tres aisladas de un pozol tabasqueño con 3.7 de pH y 7 días de fermentación (Sainz, 1998), pertenecientes al serotipo O88:H25, reportado en la literatura como patógeno; una ambiental, del mismo serotipo que la anterior, obtenida de muestreos de aire de la Ciudad de México; una de origen clínico, también O88:H25, donada por el IMSS; una de serotipo O157:H7, proporcionada por el cepario del Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, y una K-12 HB101, que escogió como control negativo entre cuatro cepas K-12. Los ensayos de resistencia a la acidez los realizó en caldo Luria-Bertani con cuatro tratamientos de pH: tres acidificados con ácido clorhídrico (valores de pH de 2.0, 2.5 y 3.0), y uno, con láctico (pH 3.0). En promedio, la cepa de origen clínico fue la que mostró mayor resistencia a la

acidez, seguida por la representativa del pozol, la ambiental y la O157:H7. Sin embargo, no hubo diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) entre la primera y la segunda ni entre la segunda, la tercera y la cuarta. Esto indicó que las cepas presentes en el pozol podían ser fuente potencial de problemas gastrointestinales para los consumidores de dicho alimento, pues las condiciones acídicas generadas con la fermentación tal vez no sólo no las eliminan [en este caso no lo hicieron a un pH de 3.7 (Sainz, 1998)], sino que contribuyan con el tiempo, por su permanencia en ellas, a incrementar su tolerancia a las mismas. Añadió que fue notable la resistencia a la acidez encontrada en todas las cepas, no sólo en las procedentes del alimento fermentado ácido, sino también en la de la atmósfera de la Ciudad de México, e incluso en las apatógenas K-12, con una resistencia mayor a la esperada. De acuerdo con los resultados, cepas de serotipos diferentes a O157:H7 poseen la capacidad de resistir valores bajos de pH y, al igual que las de éste, podrían tolerar, sobrevivir y colonizar ambientes ácidos como los del pozol.

Cueto (2001) probó algo más: el tratamiento térmico subletal a 48 °C incrementa sensiblemente la ácido tolerancia de las cepas de *E. coli* aisladas del pozol, no así la de la O88:H25 de origen clínico ni la de la ambiental. Puesto que dicho alimento fermentado se consume en el sudeste de la República Mexicana, en Estados donde la temperatura fluctúa entre 30 y 40 °C, lo consideró importante.

Con la idea de evaluar el efecto de la interacción entre microorganismos amilolíticos no lácticos y bacterias lácticas no amilolíticas sobre la acidificación del pozol, Rivera (2001) aisló de una muestra proveniente de Villahermosa, Tabasco, tres bacterias amilolíticas no lácticas: *B. lentus*, *B. cereus* y *B. mycoides*. Con la

primera de éstas —que fue la de mayor actividad—, y con una bacteria láctica no amilolítica previamente identificada como *Lactobacillus plantarum* (cepa 42 Lilis [véase Flores, 1996]), realizó diferentes fermentaciones en masas de maíz nixtamalizado (MASECA) esterilizadas por radiación gamma. En cultivo puro, *B. lentus* creció hasta  $10^9$  ufc  $g^{-1}$  (cuenta obtenida a las 72 horas) sin modificar el pH del medio. A partir de las 24 horas, cuando se agotaron los azúcares simples, se detectó actividad amilolítica; ésta alcanzó un máximo de 1.4 unidades a las 168 horas (en ese momento, la concentración del microorganismo era de  $10^8$  ufc  $g^{-1}$ ). Al inocularlo junto con la bacteria láctica, *B. lentus* no llegó a los mismos números que en el cultivo puro, debido a los ácidos producidos; la cuenta final fue de  $10^3$  ufc  $g^{-1}$  a las 168 horas (pH 4.96). La actividad amilolítica fue baja durante dicha fermentación (0.1 unidades a las 48 horas). El crecimiento de *Lb. plantarum* en cultivo puro fue similar al obtenido en el mixto, el valor de pH descendió de  $\approx$  6.5-6.8 hasta 5. Rivera (2001) concluyó que *B. lentus* no fue capaz de aportar carbohidratos simples a la bacteria láctica. Por último, recomendó llevar a cabo un estudio similar, ahora con algunos hongos aislados del pozol.

#### **1.6.2.2 Métodos independientes de cultivo**

Como en los alimentos fermentados tradicionales participa una vasta microbiota, que puede incluir una gran cantidad de microorganismos difíciles de cultivar o no cultivables, durante los últimos años se han desarrollado estrategias basadas en métodos moleculares, con el fin de detectar e identificar de una forma rápida y directa los microorganismos que hay en una muestra, sin necesidad de

cultivarlos (Ampe y col., 1999; Escalante, 2000; Bolaños, 2004; López, 2006).

Para cuantificar los grupos microbianos fisiológicamente activos presentes en pozol tabasqueño tipo mestizo con 12 horas (M1) o 5 días de fermentación (M2), Ampe y col. (1999) aplicaron por primera vez a alimentos fermentados sondas de oligonucleótidos dirigidas al ARNr 16S de ciertos taxones. Como controles de hibridación/especificidad utilizaron una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, dos de *Escherichia coli*, una de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, otra de *Clostridium acetobutylicum*, una de *Corynebacterium glutamicum* y treinta y tres de bacterias lácticas de ocho géneros diferentes. Las sondas empleadas fueron las siguientes, su taxón objetivo se indica entre paréntesis: Univ1390 (universal), Eub338 (eubacterias), Euc502 (eucarias), Entero (enterobacterias), Lacb0722 (bacterias lácticas), Strc493 (*Lactococcus* + *Streptococcus*), 212RLa (*Lactococcus*), Lab158 (grupo *Lact./Ent.*) y LU2 (*Leuconostoc*). Desnaturalizaron el ARN total extraído de las cepas puras y de las muestras de pozol y lo aplicaron en membranas de nailon. Prehibridaron estas últimas, las hibridaron por separado con cada sonda y finalmente las lavaron dos veces en 100 ml 1 x SSC-1% SDS por 30 minutos. Detectaron quimioluminiscencia, siguiendo las instrucciones del proveedor, y cuantificaron por densitometría la sonda unida al ARN. Las especificidades experimentales de Lab158 y Strc493 no correspondieron con las teóricas; estas sondas, que mostraron ligeros traslapamientos, abarcaron en conjunto todas las cepas de bacterias lácticas. La abundancia de cada taxón se expresó como un tanto por ciento ( $\text{ARNr específico} \times 100 / \text{ARNr total}$ ), usando la sonda universal como referencia (100%). Reportaron que las bacterias prevalecieron a lo largo del proceso fermentativo; y dentro de este grupo, las lácticas. Los géneros preeminentes en M1

eran *Leuconostoc* y *Lactococcus*. Según ciertos cálculos, *Streptococcus* también constituía una parte importante. *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Pediococcus spp.* y *Weissella spp.* eran mucho menos relevantes. En M2 la cuenta de bacterias lácticas era mayor que en M1; y su estructura comunitaria, totalmente diferente a la anterior. En M2 la sumatoria de *Leuconostoc spp.* y *Lactococcus spp.* era de casi una décima parte que en M1. *Lactobacillus spp.* y los géneros relacionados (*Weissella* y *Pediococcus*) dominaban en M2. La presencia de *Streptococcus spp.* seguía siendo significativa. No hallaron enterobacterias en M1, pero sí en M2 ( $0.3 \pm 0.1\%$  del ARN total), muy cerca del límite de detección. Para concluir, señalaron que era necesario desarrollar nuevas sondas, más específicas.

Por medio del análisis de secuencias parciales de ADNr 16S, Escalante (2000) determinó la diversidad de BAL existente en una muestra de pozol chiapaneco tipo indígena con 8 a 10 horas de fermentación. Extrajo el ADN total de la fracción bacteriana por un método indirecto [este tipo de métodos involucra la separación diferencial de las células microbianas que están en la muestra, antes de proceder con la lisis celular y la extracción y purificación del ADN]. Amplificó por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) los ADNr 16S presentes, utilizando un par de *primers* universales hacia bacterias Gram positivas y relacionadas, y clonó los productos en *E. coli*. Al analizar las primeras trescientas bases de las treinta y seis clonas con inserto positivas, definió dieciséis de ellas como únicas. De estas últimas, secuenció posteriormente seiscientas cincuenta bases y comparó los resultados con las secuencias nucleotídicas no redundantes de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Empleando el programa BLAST, identificó *Clostridium sp.* y las siguientes bacterias



lácticas (enlistadas en orden descendente de abundancia): *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus bovis/suis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus delbrueckii*. Además, encontró ADN humano y un gen no ribosomal de *Alcaligenes bronchisepticus* (bacteria Gram negativa). Indicó que era la primera vez que se reportaba *Lb. alimentarius*, *Lb. delbrueckii* y *Streptococcus bovis/suis* en pozol indígena. Recomendó que en investigaciones subsecuentes se ocupara una combinación de *primers* en la que se incluyera alguno específico para bacterias Gram negativas.

Bolaños (2004) efectuó un estudio con pozol de siete diferentes productores de la ciudad de Villahermosa, Tabasco; seis eran del mercado “Pino Suárez”, y uno, de la “Pozolería de la Fuente”. Tomó muestras de la masa recién molida y de la que se acababa de moldear. Con esta última ( $\approx 250$  g), hizo pequeñas bolas, las envolvió en hojas de plátano y las incubó 0, 24, 48 o 72 horas a 30 °C. Extrajo el ADN de porciones ( $\leq 5$ g) de la superficie y del centro de cada una y amplificó por PCR la región V3 del gen ARNr 16S del ADN ribosomal. Separó por DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante) los fragmentos amplificados y mandó secuenciar los productos reamplificados de algunas bandas que seleccionó y cortó de los geles. Como varias de éstas tenían ADN de más de un microorganismo, realizó una clonación con el ADN amplificado, para separar los componentes y poder secuenciarlos e identificarlos. Comparó las secuencias obtenidas con las de la base de datos NCBI, utilizando los servicios BLAST, para buscar a sus “parientes” más cercanos. Asimismo, aplicó PCR-DGGE a la región V1 del gen ARNr 16S de una veintena de cepas de las ya identificadas por

Flores (1996), y la mayor parte de los resultados de la secuenciación no coincidió con los obtenidos por el método API 50CH (Flores, 1996). Los fenómenos de microheterogeneidad, co-migración y amplificación preferencial complicaron la identificación de los microorganismos del pozol; los dos primeros también se presentaron en la caracterización de las cepas puras. De la comparación entre proveedores, observó que aunque al inicio de la fermentación existía una gran variedad microbiológica, después la comunidad se fue estructurando conforme fue avanzando el proceso fermentativo. Detectó que tres bandas aparecieron constantemente en la mayoría de las muestras, eran de organismos pertenecientes a los géneros *Aerococcus/Pediococcus*, *Weissella* y *Streptococcus*. No halló diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) ni en riqueza ni en diversidad ni en dominancia entre el centro y la superficie de las bolas de pozol.

Mediante PCR-DGGE de una región del gen de la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa (*rpoB*) —que se puede usar como gen marcador para la identificación de microorganismos y que se ha reportado como no multicopia—, López (2006) evaluó la diversidad de la microbiota presente en diferentes muestras de pozol, compradas a los mismos siete productores con los que trabajó Bolaños (2004). Extrajo el ADN de porciones superficiales y centrales de las bolas fermentadas 0, 24, 48 o 72 horas, así como de la masa recién molida. A partir de los productos de PCR de dicha región, obtenidos de las siguientes cepas puras aisladas del pozol: *S. infantarius*, *Lb. plantarum*, *Lb. raffinolactis*, *Lact. lactis*, *Leuc. citreum*, *W. confusa*, *Leuc. argentum* y *Lb. pentosus* —caracterizadas inicialmente por Flores (1996) y posteriormente por Bolaños (2004)—, López (2006) elaboró un patrón de bandas en gel de DGGE. Comparó cada una de éstas con las de las

muestras, buscando una correlación entre incógnitas y modelos. Mandó secuenciar los productos reamplificados de las que no pudieron ser identificadas por el patrón de bandas e introdujo las secuencias obtenidas a la base de datos de la NCBI, utilizando el sistema BLAST, para saber cuáles eran los microorganismos relacionados. Desveló que en los geles obtenidos por DGGE el fragmento del gen *rpoB* estuvo representado para la mayoría de los microorganismos por una sola banda característica; aun cuando *Streptococcus infantarius* exhibió varias bandas, su número fue constante y el análisis no se complicó. Concluyó, por tanto, que el uso del gen *rpoB* presentaba ventajas respecto al del gen ARNr 16S. Estableció que la microbiota —desarrollada de mejor manera en el centro de la bola que en la superficie— variaba de un productor a otro. Sin embargo, *S. infantarius*, *W. confusa* y *Lact. lactis* predominaron en todas las muestras a lo largo de la fermentación; y *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum* y *Leuc. mesenteroides* subesp. *mesenteroides*, a partir de las 48 horas.

### **1.6.2.3 Enfoque polifásico**

Otra alternativa para determinar la estructura de los alimentos fermentados es aislar los microorganismos y tipificarlos (Díaz y Wachter, 2003). Varios estudios se han llevado a cabo con un enfoque polifásico, que integra diferentes tipos de información (genotípica, fenotípica y filogenética) (Romero, 2000). Cabe mencionar que Bolaños (2004) y López (2006) lo aplicaron en las secciones en las que trabajaron con las cepas identificadas por Flores (1996).

Empleando un oligonucleótido único, Farrés y col. (1999) realizaron los perfiles de RAPD (análisis de ADN polimórfico amplificado al azar) de las BAL

caracterizadas preliminarmente por Flores (1996). Ni la calidad ni la certeza de la identificación bioquímica mostraron una correlación con el agrupamiento obtenido al analizar las huellas de RAPD. Este último, que permitió la discriminación entre especies, denotó una mayor diversidad genética que la sugerida por métodos bioquímicos. El RAPD, conocido también como AP-PCR (PCR cebado aleatoriamente), consiste en amplificar al azar regiones del ADN extraído de los microorganismos a tipificar. No se necesita contar con información sobre secuencias específicas de dichos organismos porque los cebadores se escogen al azar. Se usan temperaturas de alineamiento bajas, de modo que se consiguen productos de PCR que permiten la alineación de los cebadores pese a la existencia de una o dos bases no coincidentes. Después de la separación mediante electroforesis en geles de agarosa, se obtienen patrones simples de fragmentos de ADN de diferentes tamaños (Díaz y Wachter, 2003).

Romero (2000) tipificó por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) veintidós cepas de *Lb. plantarum* identificadas por Flores (1996). Las tres de referencia eran de dicha especie y formaban parte de la *American Type Culture Collection* (ATCC): ATCC 8014, ATCC 10241 y ATCC 14431. El polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción corresponde a la primera generación de métodos de tipificación basados en el ADN. Romero (2000) extrajo el ADN genómico total, lo purificó y lo digirió con las enzimas de restricción *EcoRI*, *Hind III* y *Bgl II*. Luego sometió los productos de estas digestiones a electroforesis horizontal de campo constante en geles de agarosa. Tiñó estos últimos con bromuro de etidio (EtBr), los lavó y los fotografió sobre una lámpara de luz UV. Finalmente, realizó un análisis densitométrico; de esta forma, obtuvo gráficas de

densidad óptica contra distancia para cada cepa y para las tres enzimas empleadas. Construyó dendogramas aplicando el método de agrupamiento en pares con promedio aritmético (por sus siglas en inglés: UPGMA, *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*). Descubrió que cada enzima generó un perfil de restricción único por cepa (incluidas las de referencia) y que los tres dendogramas finales —de topología mutuamente distinta— no mostraban grupos relacionados estrechamente, sino que evidenciaban la formación de uno principal que albergaba 80 a 85% de las cepas, a una distancia que oscilaba entre 0.51 y 0.52. No encontró correlación entre el agrupamiento de las cepas y la calidad de la identificación fisiológica (que iba de excelente a dudosa); esperaba que las que compartieran una misma calidad presentaran un mayor número de bandas en común y se agruparan con niveles bajos de disimilitud, etc. Atribuyó todo esto a la heterogeneidad de la especie estudiada y, por consiguiente, a la de los perfiles de restricción. Aunque recomendó una corroboración, concluyó que las cepas de calidad de identificación dudosa sí eran de *Lb. plantarum*, por ubicarse dentro de los grupos principales. [Llama la atención que las que quedaron fuera de éstos tenían una calidad de buena a excelente.] Por su parte, Farrés y col. (1999) señalaron que estos resultados indicaban una mayor diversidad genética que la manifestada bioquímicamente.

Ray (2000) aisló del pozol una bacteria —designada por él como CS93— con las propiedades antimicrobianas de amplio espectro ya reportadas en *Agrobacterium azotophilum* (Herrera y Ulloa, 1975): inhibición de bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras y hongos. (Ray afirma que estudios recientes han cuestionado la identidad del aislamiento original.) Con la ayuda de métodos geno y fenotípicos, la clasificó como *Bacillus* sp., con una homología al

98% de *B. subtilis*, según el análisis de secuencia del ARNr 16 S. En un estudio posterior, Phister y col. (2004) trabajaron con esta cepa para determinar los compuestos responsables de su actividad antimicrobiana. Por métodos analíticos, identificaron los siguientes: bacilisina, iturina A y clorotetaina. El primero es activo frente a bacterias Gram negativas; los otros dos, frente a hongos y levaduras. Todos ellos son péptidos (Chitarra y col., 2003; Phister y col., 2004).

Para entender el papel de las bacterias lácticas amilolíticas (BALA) en el pozol, Díaz-Ruiz y col. (2003) determinaron la diversidad y las características de éstas en dos muestras de masa de nixtamal (A y B) compradas en un mercado de Villahermosa, Tabasco, y divididas en porciones de 100 g que se envolvieron en hojas de plátano y se incubaron a 30 °C por 7 días. Los tiempos de fermentación fueron 0, 6, 24, 48 y 72 h; y sus correspondientes valores de pH, de 7.4, 5.9, 4.8, 4.8 y 4.4. Las cuentas de bacterias lácticas (log ufc/g de masa seca) fueron de 4.9, 8.2, 9.9, 10.4 y 10.2; las de las BALA (log ufc/g de masa seca), de 4.5, 7.6, 8.4, 8.7 y 8.7, respectivamente. Caracterizaron las cuarenta cepas con mayor actividad amilolítica por medio de un enfoque fenotípico (análisis de fermentación de carbohidratos por el sistema API 50CH) y otro molecular (primero realizaron la ribotipificación empleando la enzima de restricción *EcoRI*, una sonda marcada y, para construir el árbol, el UPGMA; después, el análisis de secuencias parciales o casi completas del gen ARNr 16S de algunas cepas de los principales grupos, estableciendo cuáles eran sus más cercanos “parientes” conocidos mediante búsquedas en la base de datos del GenBank, ocupando el programa BLAST). En el dendograma de ribotipificación obtenido observaron cuatro grupos [dos de los

cuales eran líneas (L), constituidos por una sola cepa]. Identificaron posteriormente a *Streptococcus bovis* —con un notorio predominio—, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus macedonicus* (L1) y *Enterococcus sulfureus* (L2). Los maltooligosacáridos producidos por estas bacterias lácticas desde las primeras horas de fermentación del pozol pudieron ser utilizados por las no amilolíticas. De las bacterias lácticas presentes en la masa inicial, 40% era capaz de hidrolizar el almidón; esta relación disminuyó a 3% a las 72 h de fermentación. Esa elevada concentración de BALA al comienzo del proceso fermentativo del pozol evidenció su importancia en éste, en especial durante las primeras 24 h. Esto sugirió que el alto pH inicial (7.4) pudo haber favorecido el crecimiento de las bacterias lácticas con mayor actividad amilolítica.

Aunque la cepa CW28 fue caracterizada como *Leuconostoc mesenteroides* empleando el sistema API 50CH (Olivares, 1998), después se le identificó como *Leuconostoc citreum* mediante la comparación de secuencias del gen ARNr 16S (Ortiz y col., 2003). Además, su actividad fructosiltransferasa (FTF) asociada a la célula, previamente reportada como levansacarasa (Olivares, 1998), fue señalada como inulosacarasa (IS), ya que el polímero generado a partir de sacarosa resultó ser inulina [de acuerdo con el análisis de Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN), su espectro correspondió con el de un polímero de fructosa con enlaces  $\beta$  2-1]. Esto se confirmó al ser digerido el polisacárido por una inulinasa comercial producida por *Aspergillus niger*, que hidroliza de manera específica los enlaces  $\beta$  2-1 presentes en la inulina; la levana usada como control (con enlaces  $\beta$  2-6) no fue escindida (Ortiz y col., 2003). El gen codificante de la IS (*IsIA*) fue clonado, secuenciado y expresado heterológamente con el fin de

conocer su estructura y de poder obtener más adelante un biocatalizador, alternativo al uso de la cepa silvestre, para producir inulina a gran escala. Al analizar la secuencia de aminoácidos de la proteína, fue sorprendente encontrar que esta IS era una enzima quimérica natural —resultado de la substitución del dominio catalítico de una glucosiltransferasa (GTF) por el de una fructosiltransferasa (FTF)— poseedora de los siguientes dominios: el N-terminal, que tenía homología con la región variable de la alternansacarasa (ASR) [una GTF que sintetiza polímeros de glucosa (*alternan*)] producida por *L. mesenteroides* NRRL B-1355; el dominio catalítico, similar al de las levansacarosas e inulosacarosas (FTFs) de varios microorganismos; y el C-terminal, que también mostraba una alta homología con el correspondiente al de la ASR antes mencionada, designado en esta última como dominio de unión a polímero (GBD, siglas de *Glican Binding Domain*) (Olivares-Illana y col., 2003; Ortiz y col., 2003).

Ya que María T. Flores (Flores, 1996) reportó actividad xilanolítica en varias de las cepas de bacterias lácticas identificadas por ella mediante el sistema API 50CH, y puesto que el xilano es un componente importante de la hemicelulosa del maíz, Alma G. Flores (Flores, 2007) tipificó dicha colección de BAL por medio de la técnica molecular ARDRA (análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado). Así, extrajo y purificó el ADN de las cepas; amplificó el gen ribosomal 16S por PCR, ocupando los *primers* pA y anti pH; y digirió los productos de PCR con las enzimas de restricción *Hinf I* y *Hae III*. Mediante una electroforesis convencional en gel de agarosa al 1.8% —usando una cámara de campo constante a 55 volts—, separó los fragmentos obtenidos y a continuación los visualizó (EtBr), digitalizó los geles de agarosa y construyó un dendograma para cada enzima utilizada. No mandó



secuenciar ninguna cepa porque algunas representativas de los grupos principales ya habían sido identificadas por Bolaños (2004). Por otra parte, Flores (2007) realizó fermentaciones con la cepa SnC 11 —de alta actividad xilanólica y nula amilolítica (según Flores, 1996)— en los medios MRS sin glucosa (blanco) y MRS-Xilano (que tampoco lleva dextrosa, al igual que el anterior), para ver si ésta era capaz de crecer con dicho polisacárido como única fuente de carbono. Determinó la biomasa, los carbohidratos totales y los reductores, la actividad xilanólica y el pH a diferentes tiempos de fermentación. En el dendograma de la enzima de restricción *Hinf I* no existió un agrupamiento que reuniera géneros y/o actividades xilanólicas similares (medidas en agar APT-azul brillante de remazol unido a xilano, en función de los halos de hidrólisis generados). En el construido para la *Hae III* se agruparon mejor las especies previamente secuenciadas (Bolaños, 2004); además, en varios de los doce grupos obtenidos se reunieron cepas con actividades xilanólicas similares (también determinadas en agar APT-RBB-Xilano). De este último árbol, y de las identificaciones previas, concluyó que SnC 11 era *Lactococcus lactis* var. *lactis*. Este microorganismo no se desarrolló en medio MRS-Xilano, dado que no hubo incrementos significativos ( $\alpha = 0.05$ ) de biomasa ni de actividad xilanólica; ni tampoco decrementos de pH ni de concentración de carbohidratos. Sin embargo, como 64% de la colección es de mediana o alta actividad xilanólica (de acuerdo con Flores, 1996), Flores (2007) recomendó continuar con su estudio, para conocer a fondo sus implicaciones en el proceso fermentativo del pozol.

## 1.7 Bacterias lácticas

Este heterogéneo grupo de bacterias se caracteriza por el ácido láctico —su

producto principal—, la reacción de Gram y la carencia general de la enzima catalasa; pueden o no tener cápsula, pero son Gram positivas y no esporuladas (Banwart, 1982; Díaz, 1996).

Se cuentan entre éstas los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Oenococcus* y *Weissella* (Flores, 2007; López, 2006).

Por los productos finales de la fermentación de carbohidratos, se aceptan con frecuencia dos tipos de bacterias lácticas: las homo y las heterofermentativas. Las primeras sintetizan básicamente ácido láctico; las segundas (responsables en gran medida del aroma y el sabor), una mezcla de ácido láctico, ácido acético, etanol y CO<sub>2</sub>.

Según la presencia o ausencia de ciertas enzimas, otra clasificación admite los siguientes tres tipos:

- a) Las homofermentativas obligadas: tienen fructosa-bifosfato aldolasa, mas no glucosa-6-P deshidrogenasa.
- b) Las heterofermentativas obligadas: poseen dicha deshidrogenasa, pero no la fructosa-bifosfato aldolasa.
- c) Las homofermentativas facultativas: tienen las dos enzimas antes mencionadas y son capaces de emplear ambas rutas.

Las cepas de los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* son homofermentativas; las de *Leuconostoc*, heterofermentativas; y las de *Lactobacillus*, homo o heterofermentativas, dependiendo de la cepa (Jay, 1992; Wood y Holzappel, 1995).

## 1.8 Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* es un grupo grande y heterogéneo de bacilos cortos Gram negativos de importancia médica (en la actualidad se aceptan veintisiete géneros y ciento diez especies); los géneros *Escherichia*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Yersinia* y *Erwinia*, entre otros, pertenecen a ella.

Las enterobacterias están ampliamente distribuidas: es posible hallarlas en el suelo, el agua, el aire, la vegetación o como parte de la microbiota bacteriana normal en casi todos los animales de sangre caliente, incluido el hombre. En tanto que géneros como *Escherichia*, *Klebsiella* y *Proteus* —miembros de la microbiota habitual— pueden ser potencialmente patógenos, otros como *Shigella* y *Salmonella* siempre se asocian con enfermedades (Sainz, 1998; Hayes, 1993).

Algunos serotipos de *E. coli* se identifican en cuadros agudos de infección del tracto urinario; mientras que *Klebsiella*, *Proteus* y *Enterobacter*, en los crónicos. *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli* (enteroinvasiva, enterotoxigénica, enterohemorrágica y enteropatógena) y *Yersinia enterocolitica* son causa común de infecciones gastrointestinales. *Proteus* y *Klebsiella* dan lugar a diarrea sólo en pacientes recién nacidos (sobre todo prematuros) o con inmunodepresión, leucemia o linfomas. *Klebsiella*, *E. coli*, *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella* y *Serratia* se relacionan con casos de septicemia. En infecciones de las vías respiratorias bajas, participan *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae* y otros patógenos oportunistas, pues las afecciones virales primarias alteran el componente inmunológico pulmonar y facilitan el establecimiento de éstos (más de 70% de los patógenos

habituales de dichas vías es de tipo viral) (Kumate y col., 1976; Calderón, 1977a; Calderón, 1977b; Calderón, 1977c; Gómez, 1977; Jay, 1992).

La identificación de los géneros se realiza mediante pruebas bioquímicas, reacciones serológicas, pruebas de susceptibilidad a bacteriófagos específicos, patrones de sensibilidad a antibióticos o por técnicas de homología del ADN (Sainz, 1998).

### **1.9 *Bacillus***

Los miembros del ubicuo género bacteriano *Bacillus* tienen aspecto como de bastón, forman esporas, son Gram positivos o Gram variables y son aerobios o anaerobios facultativos. A diferencia de los de *Clostridium*, la mayoría de sus cepas es catalasa positiva, posee flagelos peritricos y esporula en el aire. Algunas especies pueden crecer a grados extremos de acidez (pH 2) o alcalinidad (pH 10); y las células vegetativas —que miden de 0.5 x 1.2 a 2.5 x 10  $\mu\text{m}$ —, a temperaturas óptimas entre 25 y 37 °C, aunque los miembros termófilos son capaces de hacerlo incluso a 75 °C, y los psicrófilos, a 3 °C. El contenido G + C del ADN de los integrantes de este género puede variar de 32 a 69%, y muchas especies podrían ser reclasificadas ulteriormente; la gran heterogeneidad de *Bacillus* se refleja en el debate sobre su estatus taxonómico y en la amplia variedad de nichos ecológicos ocupados por las múltiples especies que lo componen.

En función de la morfología de la spora y el esporangio, el género se divide en tres amplios grupos. Al primero de éstos, donde se ubica el mayor número de los aislados de *Bacillus* de importancia clínica, pertenecen *B. cereus*,

*B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis* y *B. cereus* var. *mycoides*, localizados en el subgrupo de las “grandes células”, que son bacilos Gram positivos con un ancho  $\geq 1 \mu\text{m}$  productores de esporas elipsoidales o cilíndricas, ya sea centrales o terminales, que no aumentan los esporangios; se distingue del otro subgrupo —el de las “pequeñas células”, en el que están *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. pumilus*— en que hay inclusiones protoplasmáticas de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (material orgánico de reserva no nitrogenado). Al grupo 2 corresponden primordialmente *B. circulans*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. larvae*, *B. popilliae*, *B. alvei*, *B. lentimorbus*, *B. stearothermophilus* y *B. brevis*; éstas son especies Gram variables que aumentan los esporangios con esporas elipsoidales centrales o terminales. En el grupo 3 predomina *B. sphaericus*, especie heterogénea y Gram variable cuyas esporas esféricas, terminales o subterminales, aumentan los esporangios (Drobniewski, 1993; Stanier y col., 1996).

Los estudios de hibridación del ADN, a pesar de algunas inconsistencias y dificultades técnicas, sugieren una gran semejanza cromosómica entre *B. anthracis* y otros *Bacillus*. Esta similitud ha sugerido la idea de que *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. anthracis* (denominados en conjunto “grupo *B. cereus*”) son variedades de una misma especie; a pesar de eso, el potencial patogénico y los espectros infecciosos de estos tres son bastante distintos (Drobniewski, 1993; Abriouel y col., 2007). Al comparar las secuencias del ARNr 16S de la cepa emética *B. cereus* NCTC 1143 y un *B. anthracis* var. *Sterne*, se tuvo conocimiento de que 1446 bases, o 94% del total de las secuencias, eran idénticas. *B. cereus* var. *mycoides* y *B. thuringiensis* se diferenciaron una de la otra por menos de nueve nucleótidos. La secuenciación de los genes del ARNr 23S derivada de la amplificación por PCR del ADN

cromosómico de *B. anthracis* y una cepa emética de *B. cereus* demostró que ambos organismos eran casi idénticos. Asimismo, los patrones electroforéticos de enzimas, el análisis fenético y la significativa aglutinación cruzada que ocurre entre los antígenos flagelares de *B. cereus* y *B. thuringiensis*, y entre los de las esporas de *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. anthracis*, han acentuado igualmente la estrecha conexión que hay entre estas especies (Drobniewski, 1993). En sentido estricto, el grupo *B. cereus* posee sólo tres especies, mas en el amplio, incluye a *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* y *B. pseudomycoides*, las cuales están bastante relacionadas (Abriouel y col., 2007).

En el laboratorio puede ser difícil caracterizar las especies de *Bacillus* y se efectúa una gran cantidad de pruebas fenotípicas para distinguirlas, a pesar de que a veces un simple rasgo las diferencia. Por ejemplo, el entomopatógeno *B. thuringiensis* produce una inclusión cristalina insecticida visible con el microscopio de contraste de fases (la delta endotoxina). Sin embargo, a veces surgen mutantes que no sintetizan dichos cristales proteicos después de la pérdida del plásmido y prácticamente son indistinguibles de *B. cereus*. Además, pese a que en general este último es móvil, hemolítico en agar sangre y resistente a la penicilina y al bacteriófago gamma —en tanto que *B. anthracis*, no—, puede haber considerables variaciones en las cepas, y las variantes de *B. cereus* no móviles son morfológicamente idénticas a *B. anthracis*, que en cambio es posible que sea débilmente hemolítico. Por lo que las colonias sospechosas de ser de esta última especie deben inocularse en sangre desfibrinada de oveja o caballo (incubación de 8h a 37 °C) en busca de bacilos encapsulados que también han de

ser rebuscados en los frotis preparados a partir de las colonias mucosas que crecieron durante la noche en agar con 0.7% de bicarbonato de sodio, incubadas en CO<sub>2</sub>. La toxina del ántrax es detectable inmunológicamente. Los plásmidos pXO1 y pXO2 [el primero codifica dicha toxina, y el segundo, la cápsula] pueden ser identificados en geles de agarosa y por técnicas de ADN recombinante (Drobniewski, 1993).

### **1.10 *Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* —bacilo esporógeno, Gram positivo, encontrado en el suelo, en el polvo y en el agua— forma parte, junto con otras especies de *Bacillus*, de la microflora natural de los tejidos vegetales y se desarrolla óptimamente en alimentos ricos en almidón (Jay, 1992). Sus esporas son bastante menos termorresistentes que las de *C. perfringens* y por lo general se destruyen a 100 °C en 5 a 30 minutos (Hayes, 1993); no obstante, el alto contenido de grasa de ciertos alimentos parece tener un efecto protector (Drobniewski, 1993).

Este microorganismo es capaz de provocar (i) infecciones locales, en especial en ojos, quemaduras y heridas posquirúrgicas o traumáticas; (ii) bacteriemia y septicemia; (iii) infecciones del sistema nervioso central, que incluyen meningitis, abscesos e infecciones asociadas con derivaciones; (iv) infecciones respiratorias; (v) endocarditis y pericarditis, y (vi) intoxicación alimentaria (Drobniewski, 1993).

Muchas veces las personas afectadas por los trastornos gastrointestinales ocasionados por *B. cereus* no recurren al médico, por lo cual —además de existir un subregistro—, pueden agravarse, sobre todo los niños, más susceptibles que

los adultos (Banwart, 1982; Drobniowski, 1993).

En el tratamiento de las infecciones no gastrointestinales debe considerarse que *B. cereus*, a desemejanza de casi todas las cepas de *B. anthracis*, elabora  $\beta$ -lactamasas y es resistente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo la tercera generación de cefalosporinas, y que, por el contrario, es común que sea susceptible a aminoglucósidos, clindamicina, vancomicina, cloranfenicol y eritromicina (Drobniowski, 1993).

Las cepas causantes de intoxicación alimentaria producen lecitinasa, proteasa, betalactamasa, cereolisina (factor letal para el ratón, hemolisina I) y las toxinas emética y diarreica. Esta última —detectable cuando existen  $10^{6.6}$  células/g o  $\approx 10^7$  células/ml, y cuyo peso se ha indicado entre 38 y 43 kDa— es una proteína termolábil (se destruye en 30 minutos a 56 °C) sensible a la pronasa y a la tripsina (Jay, 1992; Hayes, 1993). A más de *B. cereus*, la sintetizan algunas cepas de *B. mycoides*, *B. circulans*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. polymyxa*, *B. lentus*, *B. carotarum* y *B. pasteurii* aisladas de la leche. Se ha comprobado su producción entre 4 y 21 °C; en la primera de esas temperaturas, después de varias semanas (Jay, 1992). Por otro lado, la toxina emética (que induce el vómito) tiene un peso molecular de 5 kDa, es termoestable (no le afecta un calentamiento de 90 minutos a 126 °C), resiste las variaciones de pH (Jay, 1992; Hayes, 1993) y no es sensible a la tripsina ni a la pepsina. Las cepas productoras crecen entre los 15 y 50 °C, el valor óptimo se ubica entre los 35 y 40 °C (Jay, 1992).

Los síntomas del síndrome diarreico (náuseas, dolores abdominales, tenesmo, deposiciones acuosas y, muy rara vez, vómito y fiebre) aparecen entre



las 8 y 16 horas subsecuentes a la ingestión del alimento contaminado y duran de 6 a 12 horas. Los platillos a base de cereales que contienen maíz y almidón de maíz, las sopas de pasta, el arroz indonesio, el puré de patatas, las hortalizas, las verduras, la carne picada, los embutidos de hígado, los fiambres, la carne cocida, la leche y los helados, entre otros, son los alimentos vehiculadores (Jay, 1992); de los cuales, los proteicos como los cárnicos son los más comunes (Drobniewski, 1993). Al estudiar los brotes denunciados, se han hallado cuentas de *B. cereus* de  $10^5$  hasta  $10^9$  microorganismos/g en los restos de comida, la mayoría estaba entre  $10^7$  y  $10^8$  (Jay, 1992). Este síndrome se asemeja a la intoxicación alimentaria por *C. perfringens* y se debe a los efectos de una enterotoxina que puede ser preformada en el alimento o producida en el intestino delgado y que no está relacionada inmunológicamente con la de dicho clostridio (Drobniewski, 1993).

El síndrome emético (SE) es más grave que el diarreico. El período de incubación varía de 1 a 6 horas, aunque es más corriente uno de 2 a 5 horas (Jay, 1992; Vega, 1987). Los síntomas son náuseas agudas y vómito; es raro que haya diarrea. La enfermedad dura de 6 a 24 horas (Hayes, 1993). Causado por la ingestión de una toxina preformada en el alimento (Grande y col., 2006), el SE está vinculado fundamentalmente con platillos de arroz frito o hervido, porque el grano que desde el arrozal se ha contaminado con esporas de *B. cereus* se cocina y luego se conserva a temperatura ambiente durante un día antes de freírlo, permitiendo que las endosporas germinen y que las células vegetativas elaboren toxinas que la breve cocción subsiguiente no inactivará, estimuladas a su vez por la adición de proteínas en la forma de huevo o carne. La nata pasteurizada, los espaguetis, el

puré de patatas y los tallos de hortalizas también han sido implicados. Habiendo alcanzado cuentas tan altas como  $2 \times 10^9$  microorganismos/g, parece ser que el número necesario para originar este síndrome es mayor que para el diarreico (Jay, 1992). El SE es similar a la intoxicación alimentaria por *S. aureus* tanto en su periodo de incubación como en su sintomatología (Drobniowski, 1993).

Los síntomas del síndrome diarreico se resuelven en unas 12 h; y los del emético, normalmente en unas 24 h. Rara vez se necesita tratamiento de apoyo y no hay lugar para la terapia antimicrobiana. Ambos síndromes son autolimitantes [es normal que se resuelvan solos con el paso del tiempo] y habitualmente causan sólo una morbilidad moderada.

Como la elevada portación fecal asintomática de *B. cereus* está relacionada con la supervivencia de la espora y la amplia presencia de dicha bacteria en los alimentos, para probar que una muestra es responsable de un brote se requiere que las cepas aisladas tanto del espécimen clínico como de ésta sean del mismo serotipo (y/o biotipo o tipo fágico) y se cuantifiquen en números significativos ( $>10^5$  ufc/g). En la mayoría de las ocasiones, son necesarias las costosas pruebas bioquímicas de los laboratorios de referencia para demostrar de manera definitiva la asociación entre los aislados de los alimentos involucrados y los de los especímenes del paciente (Drobniowski, 1993).

Epidemiológicamente, los serotipos flagelares (H) que por lo regular están más relacionados con el síndrome diarreico son los siguientes: 1, 2, 6, 8, 10, 12 y 19; y con el emético, 1, 5, 8, 12 y 19, por lo que hay cierto traslapo. Algunas cepas son capaces de expresar tanto toxinas diarreicas como eméticas, pero el sustrato

y otras condiciones de crecimiento determinan la medida en que se producen (Drobniewski, 1993).

La toxina emética, a la que también se le llama factor de vómito y que quizá esté asociada con la esporulación, se forma de la fase de crecimiento logarítmica tardía a la estacionaria, a temperaturas óptimas de 25 a 30 °C, pero no por arriba de 40 °C. Se ha sugerido que puede ser producto de la descomposición de los alimentos en los que *B. cereus* crece. En caldo BHI suplementado con 1% de almidón o glucosa (peso en volumen), la enterotoxina diarreica se sintetiza en la fase de crecimiento logarítmica tardía a una temperatura óptima de 32 a 37 °C y a un pH de 7.5 (Drobniewski, 1993).

En general, la temperatura mínima de crecimiento de *B. cereus* es de 10 a 20 °C; la óptima, de 30 a 35 °C, y la máxima, de 35 a 40 °C, con casos extremos de 49 a 50 °C (Banwart, 1982); sin embargo, por lo antes mencionado sobre la toxina diarreica (Jay, 1992), los alimentos sensibles deberán guardarse a más de 55 °C o a menos de 4 °C para tratar de garantizar su inocuidad.

En cuanto al pozol, Salinas (1958) trabajó con dos comprados en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas [se ignora cuál era su tiempo de fermentación]. Tomó material de la parte interna de una de las bolas, lo diluyó en agua y lo examinó al microscopio. Además de granos de almidón, encontró varios tipos de levaduras, cocos y bacilos (grandes y pequeños) “que recorrían el campo vertiginosamente girando como rehiletes”. A causa de la presencia de este último grupo bacteriano, procedió a purificar algunos aislados. Preparó suspensiones del alimento en agua estéril y las sembró en agar harina de maíz (*corn meal agar*, Difco, B 386); la

incubación fue a 35 °C durante 48 h. Realizó resiembras en dicho medio y en caldo agar (Difco, B1). Ambos los incubó a 33 °C; el primero por 24 h, y el segundo, por 72 h. Efectuó una vez más observaciones al microscopio y comprobó la existencia de bacilos en cadena o estreptobacilos agrupados en dos, tres, cuatro o cinco elementos móviles, algunos de ellos con espora subterminal que deformaba al bacilo. Seleccionó dos cepas puras y, por sus características morfológicas y bioquímicas, las clasificó como *Bacillus cereus* y *Paracolobactrum aerogenoides*, por “concordar bastante bien con las indicaciones del Manual de Bergey para dichas bacterias” [no aparece en sus referencias bibliográficas].

Ulloa (1974) notó —sobre todo al inicio de la fermentación— una gran cantidad de bacterias en las placas inoculadas, en números similares o superiores a los de los hongos y las levaduras. Luego de atisbar bacilos de varios tipos y tamaños, micrococcos, estreptococos y estafilococos, recomendó investigar su identidad.

De una muestra proveniente de Villahermosa, Tabasco, Rivera (2001) aisló *B. lentus*, *B. mycoides* y *B. cereus*; éste último, a las 72 horas, no señaló el pH. Los porcentajes de identificación de cada uno fueron 99.4, 59.4 y 96.9. Para el aislamiento, empleó agar cuenta en placa-almidón; para la identificación, el sistema API 50CHB (Bio-Mérieux); y para el análisis, el programa APILAB PLUS. Aquí cabe apuntar que Drobniowski (1993) ha planteado, en general, que la hidrólisis del almidón y la producción de enterotoxina están ligadas al síndrome diarreico. Por ejemplo, menciona un estudio en el que nueve cepas aisladas de episodios de enfermedad diarreica hidrolizaron dicho polisacárido; en cambio, ochenta y dos que

fueron asociadas con el síndrome emético, no.

Aunque se ha reportado *B. cereus* en el pozol (Salinas, 1958; Rivera, 2001), su número, no, ni la producción de toxinas en función del pH, del tiempo de fermentación y de la concentración de ácidos orgánicos. Esta bacteria podría resistir la nixtamalización, por ser esporulada, o podría incorporarse en el remojo o en alguna otra etapa del método de elaboración (Fig. 2).

En referencia a otros alimentos, Caparelli y Mata (1975) encontraron *B. cereus* en tortillas fortificadas y sin fortificar preparadas en un pueblo indígena de Guatemala (éstas no llevan en sí un proceso fermentativo, mas se obtienen también a partir de masa de maíz nixtamalizado). En el grano indicaron una cuenta de *Bacillus sp.* de  $10^3$  organismos/g; en el nixtamal lavado, una de  $10^6$ , y en la masa, una de  $10^5$  a  $10^6$ . Hallaron *B. cereus*, *B. macerans*, *B. megaterium*, *B. polymyxa* y *B. subtilis*, sin predominio de ninguna especie. Con la cocción de la tortilla, dicho género disminuyó a  $10^3$  organismos/g; quedaba casi de manera exclusiva *B. cereus*. Las tortillas con 48 horas de almacenamiento tuvieron una alta concentración de este último microorganismo (en el caso de las no fortificadas era de  $10^7$  organismos/g, y en el de las fortificadas, superior a  $10^9$ ), y el recalentamiento no modificó mucho su número. Concluyeron que el consumo de las tortillas frescas no había representado ningún riesgo, no así el de las *viejas*, pues desde las 24 horas poseían concentraciones de *B. cereus* lo suficientemente altas como para poner en peligro la salud del consumidor. En esencia, la contaminación ocurrió al momento de elaborar las tortillas, por la inobservancia de medidas sanitarias y por los altos niveles de contaminación bacteriana y fecal del

agua empleada —muchas veces almacenada por largos periodos de tiempo—, en la que había además restos de masa e insectos.

Fang y col. (1999) analizaron trescientas veinte muestras de alimentos vegetarianos —empacados y sin empacar— adquiridos en un mercado local de Taiwán. Al examinar la presencia de *E. coli*, coliformes, *S. aureus* y *B. cereus*, descubrieron que el primero de éstos estaba en 28% de dichas muestras y que los índices de detección de coliformes, de *S. aureus*, de *B. cereus* y de esporas de este último eran de 32.5%, de 18.1%, de 3.4% y de 20.9%, respectivamente. *S. aureus* fue hallado en los cinco grupos de alimentos estudiados: harinas, vegetales, alimentos de soya, cereales y productos tipo *konjac*; mientras que *B. cereus*, sólo en los últimos tres. De *S. aureus* se aislaron treinta y ocho cepas, de las cuales diecisiete producían enterotoxinas de los tipos A, B, C y D; de *B. cereus*, siete, una de ellas sintetizaba toxina diarreica y otras cuatro provocaron la muerte de ratones adultos ICR.

Ya que los vegetales refrigerados mínimamente procesados juegan un papel importante en el mercado, Valero y col. (2000) evaluaron en éstos el riesgo potencial planteado por *B. cereus*. Después de hacer crecer en caldo nutritivo a diferentes temperaturas (5, 8, 10, 12, 16, 25 y 30 °C) cuatro cepas de esta especie productoras de toxina diarreica, inquirieron la capacidad de crecimiento de dos de ellas —una que era psicrótrofa (INRA TZ415) y otra que no (INRA L2104)—, inoculándolas en un sustrato líquido de zanahoria, para obtener una concentración inicial de  $10^2$  ufc ml<sup>-1</sup> (según la literatura, una cantidad que representa los niveles de *B. cereus* encontrados en vegetales). Al pH natural de dicho sustrato (6.2) y temperaturas de 12 °C o superiores (16 y 25 °C), ambas cepas crecieron rápido, pero únicamente

INRA TZ415 logró hacerlo a 5, 8 y 10 °C. Para apreciar el efecto del pH, se obtuvieron las curvas de crecimiento a 25 °C. Usando jugo de limón como acidulante, el menor pH al cual se desarrollaron ambas cepas fue 4.75; al utilizar ácido cítrico, la cepa INRA TZ415 sólo logró hacerlo al mayor pH al que se trabajó (5.0), y la INRA 2104, a 4.75. A consecuencia de lo obtenido, decidieron estudiar el crecimiento de ambas cepas a diferentes temperaturas (5, 8, 10, 12, 16 y 25 °C) en el sustrato de zanahoria acidificado a un pH 5.0 con jugo de limón; pese a que éstas alcanzaron a desarrollarse a 16 y 25 °C, se registró una importante reducción en las velocidades específicas de crecimiento, en comparación con las obtenidas en el no acidificado. Concluyeron que cuando el efecto del pH se combina con la refrigeración, llevar el sustrato a un pH 5.0 es suficiente para inhibir a *B. cereus* a temperaturas  $\leq 12$  °C. Por lo que la unión de estos dos factores podría tener un gran potencial en el control del desarrollo de este microorganismo en alimentos mínimamente procesados, como los de zanahoria.

Para obtener *tapé* indonesio, se cuece arroz, se inocula con hongos y levaduras y se mantiene de uno a tres días a temperatura ambiente (27 a 30 °C) antes de su consumo. En este tiempo, las enzimas amilolíticas del inóculo hidrolizan el almidón del sustrato, y algunos de los azúcares se fermentan a ácidos orgánicos y alcohol. El producto es un alimento fermentado de arroz, de sabor dulce, ácido y alcohólico, uno de los varios de este tipo que se consumen en el sudeste asiático. Debido a que la mayoría de éstos se elabora con cultivos iniciadores tradicionales que pueden contener especies de *Bacillus* capaces de crecer durante la fermentación, y como la contaminación de cereales por *B. cereus* es común y sus

esporas pueden sobrevivir a la cocción del arroz, existe el riesgo de que *B. cereus* llegue a niveles toxigénicos en estos alimentos antes de la creación de condiciones ácidas que lo inhiban. Por eso, Cook y col. (1991) resolvieron investigar si era posible que este microorganismo se desarrollara durante la fermentación de *tapé* indonesio preparado con cuatro variedades de arroz de dos tipos distintos (glutinoso y no glutinoso), empleando como inóculo un cultivo iniciador tradicional deshidratado (adquirido en un mercado de Cianjur, Java del Oeste); en este último no se encontró *Bacillus spp.*, pero sí el hongo *Amylomyces rouxii* y las levaduras *Hansenula anomala* y *Sacharomycopsis fibuligera*. Luego de inocular la cepa de *B. cereus* NCIB 8579 en el arroz cocido que iba o no a ser fermentado —a una concentración inicial aproximada de 6.0 log ufc/g—, también la sembraron a varios tiempos de fermentación (0, 18, 24, 36 y 60 h) en *tapé* elaborado con arroz glutinoso blanco, para observar el efecto de su exposición por cinco minutos a las diferentes condiciones presentes en el sustrato. El valor de pH inicial del arroz glutinoso era de 5.6 a 6.0, y del no glutinoso, de 6.0 a 6.3. Las muestras se incubaron a 30 °C.

Al realizar la primera parte, se midió el pH y se cuantificó *B. cereus* en las cuatro variedades de arroz fermentadas y sin fermentar, incubadas 72 horas. En el arroz tailandés glutinoso blanco, pulido y sin fermentar, la cuenta de *B. cereus* era de 8.3 log ufc/g (pH 5.6); en el fermentado, de 8.0 (pH 3.5). En el tailandés glutinoso negro, sin pulir y sin fermentar, el número era de 7.6 log ufc/g (pH 5.5); en el fermentado, de 6.1 (pH 4.6). En el arroz americano grano largo, blanco, pulido y sin fermentar, la cuenta de *B. cereus* era de 9.1 log ufc/g (pH 5.0); en el fermentado,



de 8.4 (pH 3.9). En el arroz italiano grano largo, café, sin pulir y sin fermentar, el número era de 8.8 log ufc/g (pH 5.4); en el fermentado, de 8.1 (pH 4.2). Por consiguiente, tanto las muestras de arroz cocido sin fermentar (ctas.  $10^7$  a  $10^9$  ufc/g) como las fermentadas (ctas.  $10^6$  a  $10^8$  ufc/g) permitieron el crecimiento de *B. cereus*, a pesar de que en estas últimas el pH era  $\leq 4.6$ . Fue interesante hallar la cuenta menor y el pH mayor en el arroz glutinoso negro; esto se atribuyó a que durante la fermentación del arroz pueden liberarse compuestos fenólicos (algunos de los cuales inhiben microorganismos) y a que las capas periféricas de esta variedad de grano contienen taninos, procianidinas y antocianinas. Después, en la segunda parte de la investigación, se puso de manifiesto que la sobrevivencia de las células expuestas por 5 minutos a diferentes tiempos de fermentación era cada vez menor al ir avanzando el proceso e ir disminuyendo el pH, lo cual fue singularmente notorio en el período de 18 a 24 horas. De esta manera, al tiempo cero la cuenta de *B. cereus* era de 5.7 (pH 5.9); a las 18 horas, de 5.6 (pH 5.2); a las 24, de 4.2 (pH 4.3); a las 36, de  $<3.0$  (pH 3.6); y a las 60, de  $<4.0$  (pH 3.7). Cook y col. (1991) concluyeron que dicho estudio demostraba la capacidad de crecimiento de *B. cereus* durante la fermentación del *tapé*. La formación de esporas fue probablemente el mecanismo por el cual esta bacteria sobrevivió a valores de pH perjudiciales para las células vegetativas. Por tanto, la producción de este tipo de alimentos requiere un cuidadoso control de calidad para evitar el desarrollo de *B. cereus*, en especial durante las primeras etapas de la fermentación.

Como la biología molecular de las bacterias tóxicas y patógenas presentes en los alimentos fermentados tradicionales de África es en gran medida desconocida,

Abriouel y col. (2007) estudiaron el parentesco filogenético y el potencial toxigénico de veintiséis cepas del grupo *Bacillus cereus* aisladas de cuatro muestras de *poto poto* (una masa agria de maíz) (n=24) y de una de *dégué* (un alimento fermentado a base de mijo perla) (n=2) adquiridas en puestos callejeros; las primeras, en Pointe Noire, República del Congo, y la última, en Ouagadougou, Burkina Faso. Para el aislamiento, emplearon placas de agar *B. cereus* (MYP) (Scharlau, Barcelona, España) adicionado con yema de huevo y polimixina B. La relación existente entre las cepas se evaluó mediante REP-PCR [amplificación por PCR de los elementos palindrómicos extragénicos repetitivos; Heitmann y col., 2005], así como por el análisis de las secuencias del ADNr 16S. Para diferenciar *B. cereus* de *B. anthracis*, se efectuó un ensayo de PCR multiplex en tiempo real dirigido simultáneamente a los genes *lef* y *capC* de los plásmidos pXO1 y pXO2 de este último, y al gen cromosómico *sspE* de ambos; las curvas de fusión de los productos de amplificación se obtuvieron graficando fluorescencia vs. temperatura. Los genes de enterotoxinas de *B. cereus* se determinaron por PCR. A partir de los aislados, se obtuvieron quince diferentes perfiles REP-PCR que luego se reunieron en cuatro grupos al aplicar el UPGMA y el coeficiente de similitud de Jaccard. El análisis de la secuenciación del ADNr 16S (1000 pb) identificó veintitrés cepas como *B. cereus* o *B. anthracis*; y tres —entre ellas las dos del *dégué*—, como *Bacillus sp.* o *B. cereus*. La amplificación por PCR multiplex en tiempo real indicó la ausencia de los genes *lef* y *capC* de los plásmidos pXO1 y pXO2; el análisis de la curva de fusión reveló sólo la presencia del amplicón de *sspE* de 71 pb típico de *B. cereus*, en vez de la del de 188 pb de *B. anthracis*, lo que confirmó la identidad de estos aislados como *B. cereus*. Cuatro cepas tenían actividad amilolítica; y

todas (n=26), actividad lecitinasa y  $\beta$ -hemolítica. Se detectó la producción de enterotoxina en los dos aislados del *dégué*; y en ninguno, el gen de toxina emética.

Zheng y Slavik (1999) aislaron de muestras de un condimento fermentado de soya chino —compradas en una tienda de abarrotes orientales— una cepa silvestre de *B. subtilis* (identificada así con 99.83% de probabilidad, usando los sistemas API 50CHB y API 20E), cuyo origen tal vez era el suelo, sintetizadora de al menos una sustancia antimicrobiana que podía ser una nueva bacteriocina con actividad contra *L. monocytogenes* y *B. cereus*. Este péptido inhibidor, nombrado bacilocina 22, tenía un peso molecular de  $\approx 3.4$  kDa, calculado por SDS-PAGE, y un pI de  $\approx 4.7$ , según su secuencia aminoacídica. Con excepción de la subtilosina A (de PM de  $\approx 3.4$  kDa y pI de  $\approx 4$ ), producida por *B. subtilis* 168 [véase Babasaki y col., 1985], y en la que no se había señalado actividad contra *L. monocytogenes*, todas las bacteriocinas de las bacterias Gram positivas habían sido reportadas con un pI mayor a 7. Ulteriormente, Zheng y col. (1999) hicieron patente que la cepa de *B. subtilis* JH642 y la silvestre 22a producían un péptido antilistérico identificado por el análisis de aminoácidos como la bacteriocina cíclica subtilosina.

Muñoz y col. (2004) sembraron la cepa psicrótrfica y toxigénica *B. cereus* LWL1 sola o junto con la de *Enterococcus faecalis* A-48-32 (Bac<sup>+</sup>) en leche de vaca y en un queso duro sin grasa manufacturado con dicha materia prima y un iniciador comercial ( $\approx 6.8$  log ufc/ml). En cultivo mixto no detectaron células viables de *B. cereus* después de 72 horas de incubación en la leche. La síntesis de toxina diarreica fue ocho veces menor que en los cultivos control de LWL1, marcadamente inhibida por la cepa Bac<sup>+</sup>. En los quesos inoculados con *B. cereus*

( $\approx 4 \log \text{ ufc/ml}$ ), éste alcanzó una concentración de  $6.27 \log \text{ ufc/g}$  luego de 5 días de maduración y una de  $\approx 8 \log \text{ ufc/g}$  después de 15 días. No obstante, en los elaborados con la mezcla *E. faecalis*-*B. cereus* (relación 2:1), las cuentas del bacilo fueron menores en  $\approx 1.0, 2.0, 4.32$  y  $5.6$  unidades logarítmicas, luego de 5, 10, 15 y 30 días de maduración respectivamente, en comparación con los quesos control. El crecimiento de *E. faecalis* A-48-32 se relacionó con la producción y la persistencia de la enterocina en el queso. Ni el desarrollo del iniciador comercial ni la producción de ácido láctico fueron afectados por la Bac<sup>+</sup>. Concluyeron que *E. faecalis* A-48-32 había generado cantidades suficientes de la bacteriocina AS-48 para inhibir a *B. cereus* durante la manufactura y maduración del queso, lo que respaldaba su uso potencial como cultivo adjunto.

Se evaluó el efecto de la enterocina AS-48 sobre la cepa *B. cereus* LWL1 [mencionada con anterioridad (Muñoz y col., 2004)] en los siguientes dos sistemas alimentarios modelo, almacenados a temperaturas de 37, 15 y 6 °C: arroz cocido y una fórmula infantil comercial a base de arroz (*rice cream*; Nestlé, España) disuelta en leche entera (Grande y col., 2006). En las muestras suplementadas con AS-48 en un rango de concentración de 20 a 35  $\mu\text{g/ml}$ , las cuentas de las células viables disminuyeron rápido en el transcurso de la incubación, dependiendo del tiempo, del alimento y de la concentración de la bacteriocina. La síntesis de enterotoxina fue inhibida a 37 °C. La sensibilidad de las endosporas al calor se incrementó singularmente en las muestras suplementadas; la inactivación se alcanzó al calentar por 1 min a 90 °C el arroz hervido, y a 95 °C, la fórmula infantil. En esta última, el efecto de AS-48 (8  $\mu\text{g/ml}$ , concentración subletal) fue potenciado por la

adición de lactato de sodio, ya que con 1.0 o 1.5% de este último no se detectaron células viables después de 24 h de incubación a 37 °C, y con 3.0%, luego de 4 h. Para 16 µg de bacteriocina/ml se necesitaron menores porcentajes de lactato: con 0.5% o 1% no se encontraron células viables después de un día, y con 1.5%, luego de 8 h. Con dicha sal del ácido láctico sólo se inhibió el crecimiento de LWL1 a la máxima concentración empleada: 3.0%. Concluyeron que la enterocina AS-48 podía impedir el desarrollo de *B. cereus* en alimentos no ácidos como los probados, en los que la bacteriocina fue estable al menos por 14 días sin importar la temperatura de almacenamiento. [En medios de laboratorio, Abriouel y col. (2002) ya habían indicado la mayor actividad de AS-48 sobre *B. cereus* a pH 6-8.]

Se investigó la capacidad de AS-48, sola y en combinación con otros agentes antimicrobianos, para eliminar de vegetales crudos las cepas *B. cereus* LWL1 y *B. weihenstephanensis* CECT 5894 [Colección Española de Cultivos Tipo] (Cobo y col., 2008). El lavado con las soluciones de enterocina AS-48 (25 µg/ml, concentración final) disminuyó la cuenta de células viables de cada uno —en 1.0-1.5 y 1.5-2.38 ciclos logarítmicos, respectivamente—, justo después de aplicar el tratamiento. En ambos casos, la bacteriocina logró reducir la población viable restante por debajo de los límites de detección durante el almacenamiento posterior de las muestras a 6 °C (1 a 3 días), pero no impidió la multiplicación en las otras conservadas a 15 o 22 °C. Los efectos bactericidas mejoraron mucho al utilizarla con carvacrol, ácido cinámico, ácido hidrocínámico, ácido polifosfórico, cloruro de hexadecilpiridinio, ácido peracético o hipoclorito de sodio; las mezclas de AS-48 con estos tres últimos dieron los mejores resultados. Una vez que se

aplicaron tratamientos combinados en brotes de alfalfa contaminados con una u otra especie bacteriana, en las muestras tratadas no se detectaron bacilos viables, o permanecieron en un número muy bajo, durante un período de almacenamiento de hasta una semana a 15 °C. Por medio del cocultivo de la cepa *E. faecalis* A-48-32 con la de LWL1 en germinados de soya (relación 100:1, enterococos-bacilos), se probó la inhibición de esta última por la bacteriocina producida *in situ*. La confirmación de *B. cereus* se realizó amplificando por PCR el gen *sspE* (con los *primers* específicos *sspE1-F* y *sspE1-R*) y detectando subsiguientemente su amplicón de 71 pb mediante electroforesis en geles de agarosa. Para la cuenta de células viables, se suplementó el agar *B. cereus* (MYP) (Scharlau, Barcelona) con ampicilina (concentración final de 80 mg/ml), para evitar el crecimiento de los enterococos. Para estos últimos, se empleó el *kanamycin aesculin azide agar* (KAA, Scharlau, Barcelona). La cepa A-48-32 logró crecer y producir bacteriocina en los germinados, tanto a 15 como a 22 °C. A la primera temperatura, el desarrollo de LWL1 fue inhibido por completo en el cocultivo, en tanto que a la segunda se observó un efecto bastante más limitado. Concluyeron que los resultados obtenidos de los tratamientos de lavado alientan la aplicación de la enterocina AS-48 en la descontaminación de germinados, puesto que por sí sola puede servir para reducir las cuentas de células viables de bacilos en muestras mantenidas en refrigeración, mientras que combinada puede recomendarse para evitar la proliferación de los bacilos sobrevivientes en condiciones de abuso de temperatura.

Con la intención de ampliar el uso de las bacteriocinas como agentes antimicrobianos en leche y productos lácteos, Martirani y col. (2002) trabajaron

con  $\approx 23000$  aislados bacterianos provenientes de esta última fuente. Identificaron una cepa de *B. licheniformis* (de acuerdo con su caracterización fenotípica y metabólica estándar y con el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S) productora, principalmente durante la fase logarítmica tardía, de una bacteriocina de  $\approx 2$  kDa llamada bacilocina 490. El espectro de actividad de esta última fue el siguiente: una inhibición muy alta de *B. anthracis*, *B. smithii* y *B. stearothermophilus*; una alta de *B. subtilis* [todas ellas especies relacionadas filogenéticamente con la cepa productora], y una baja de *Listeria innocua*, *Staphylococcus epidermidis*, *B. cereus* y *B. licheniformis*; *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Streptococcus faecalis*, *S. aureus*, *Salmonella no tphi*, *Proteus mirabilis*, *B. thuringiensis* y *Streptococcus thermophilus* no fueron inhibidas. La incubación de *B. smithii* ( $10^6$  bacterias/ml) a  $60$  °C en presencia de la bacilocina 490 ( $1\mu\text{g/ml}$ ) resultó en la muerte del 96% en 30 min, lo que indica un efecto bactericida. Una vez purificada, dicha sustancia se caracterizó parcialmente. Lo mismo en presencia que en ausencia de oxígeno, fue bastante estable (i) a  $100$  °C (con una actividad residual de 46% luego de 1 h de exposición a dicha temperatura); (ii) a  $4$  °C (permanecía estable a los doce meses de almacenamiento), y (iii) en un amplio rango de valores de pH (tuvo una actividad óptima a un pH de neutro a ligeramente básico; conservó 60% de ésta después de la incubación a pH 3.5 y 11.0, y 95 a 100% a un pH de 4.5 a 9.0). Al aplicarla en leche, mostró también un efecto bactericida. Concluyeron que la bacilocina 490 podía complementar a la nisina como un agente antimicrobiano contra algunos *Bacillus spp.* en alimentos no ácidos, en especial en los sólidos.

Para explorar la posibilidad de usarla como sustancia antimicrobiana en

alimentos, Bizani y col. (2005) estudiaron el modo de acción de la bacteriocina cereína 8a, producida por la cepa de *B. cereus* 8a (aislada del suelo de los bosques nativos del sur de Brasil). Observaron un efecto bactericida tanto contra *L. monocytogenes* como contra *B. cereus* a 400 y 200 unidades arbitrarias (UA)/ml respectivamente; para ambos microorganismos la cinética fue similar, pero el péptido se necesitó en una cantidad mayor para eliminar al primero que al segundo, por tener mayor actividad contra *Bacillus spp.* A 400 UA/ml, la cereína 8a logró restringir el crecimiento de *E. coli* y *S. enteritidis*, mas no las eliminó. Este efecto inhibitorio similar al de la nisina se incrementó cuando se adicionó el agente quelante EDTA (20 mM). Ya que la cereína 8a no posee actividad fosfolipasa, se pensó que era un péptido formador de poros. Este mecanismo se confirmó por microscopía electrónica de transmisión, la cual mostró daño en las paredes celulares y pérdida de material protoplásmico luego del tratamiento con la bacteriocina. La hidrofóbica cereína 7, sintetizada por *B. cereus* Bc7, ha sido caracterizada asimismo como un compuesto activo contra la membrana.

### **1.11 *Staphylococcus aureus***

Los organismos de esta especie son células esféricas Gram positivas, no esporógenas, inmóviles y que —por repartirse en más de un plano— asemejan uvas en su tallo (la palabra estafilococo deriva del griego *staphilée*, racimo, y *kókkos*, coco o grano) (Banwart, 1982; Diccionario esencial de la lengua española, 1994; Corripio, 1996).

*Staphylococcus aureus* puede ser anaerobio facultativo, mas se desarrolla mejor en condiciones aeróbicas. Algunas de sus colonias son blancas, otras están



pigmentadas en amarillo o naranja; el color depende de la cepa y de las condiciones de crecimiento. Como la mayoría de los estafilococos, es capaz de crecer en un medio con 7.5 a 15% de sal.

Debido a su presencia generalizada en la naturaleza (polvo, aire, ropa, suelo, agua, efluentes residuales, insectos, etcétera), a *S. aureus* se le considera un microorganismo ubicuo. Aunque su fuente principal se sitúa en la nariz humana, también está en la piel del hombre (manos, brazos, cara) y en la de otros animales, heridas infectadas, quemaduras, granos, forúnculos, acné, descargas nasales y de la garganta, etc.

*S. aureus* produce varias toxinas y factores de virulencia (proteínas extracelulares que contribuyen a establecer y mantener la enfermedad), como las toxinas  $\alpha$ ,  $\beta$  (fosfolipasa C),  $\gamma$  y  $\delta$ ; la hialuronidasa; la coagulasa estafilocócica; la toxina epidermolítica; la estafiloquinasa; la leucocidina; la toxina del síndrome del shock tóxico, y las enterotoxinas. En microbiología de alimentos se atiende ante todo a estas últimas (Banwart, 1982; Brock y Madigan, 1993).

Por métodos serológicos se han identificado las siguientes enterotoxinas: A, B, C, D y E (Jay, 1992; Brock y Madigan, 1993; U. S. FDA, 1992), la tercera se subcategoriza en C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>; todas ellas son proteínas sencillas que por hidrólisis dan dieciocho aminoácidos (Jay, 1992). Dichas enterotoxinas son relativamente termorresistentes, siéndolo la B más que la A y la D (Banwart, 1982). En general, su producción suele estar favorecida por las condiciones óptimas de crecimiento de *S. aureus*. En los brotes de intoxicación alimentaria, la enterotoxina estafilocócica A se aísla con mayor frecuencia que cualquiera de las demás, le

sigue la D, y el número más bajo se relaciona con la E (Jay, 1992); de país en país se pueden presentar variaciones (Banwart, 1982).

Los síntomas de intoxicación alimentaria estafilocócica —nauseas, vómito, retortijones abdominales (muy intensos), diarrea, sudoración, cefalalgia, abatimiento y un eventual descenso de la temperatura corporal—, que generalmente duran de 24 a 48 horas, suelen aparecer dentro de las 4 horas siguientes a la ingestión del alimento contaminado, aunque el tiempo varía de 1 a 6 horas; el índice de mortalidad es muy bajo o nulo. Esta intoxicación alimentaria es común, pero en muchas ocasiones el afectado no recurre al médico ni a las autoridades sanitarias.

En la mayoría de los casos de intoxicación alimentaria por *S. aureus* se ve envuelta la ingestión de alimentos preparados consumidos fríos, como las pastas de crema, la leche, el queso, las ensaladas, los helados, los bocadillos y los productos cárnicos (la mortadela, el jamón, el magro, el cerdo ahumado, etc., al dejarlos por imprudencia a temperatura ambiente; en las carnes frescas interviene menos ya que suelen conservarse en refrigeración) (Hersom y Hulland, 1980; Banwart, 1982). Los estafilococos enterotoxigénicos pueden encontrarse en los alimentos al momento de su obtención, máxime en los de origen animal, o bien llegar a ellos a partir de la manipulación (Mossel y Moreno, 1982).

Cuando se elaboran alimentos sensibles con un escaso número de estafilococos, éstos permanecerán exentos de enterotoxinas y de otros riesgos de intoxicación alimentaria si se mantienen por debajo de 40 °F (4 °C), o por arriba de 140 °F (60 °C), hasta tanto no se consuman. La poca higiene del personal, una cocción insuficiente y el hecho de conservar la comida en dispositivos para que

permanezca caliente —a una temperatura apropiada para el crecimiento de bacterias— influyen en la frecuencia de brotes de intoxicación alimentaria (Jay, 1992).

A continuación se da un ejemplo de la magnitud y gravedad de la exposición oral a enterotoxinas estafilocócicas. En el verano de 1998, más o menos 8000 personas se reunieron para celebrar la ordenación de un sacerdote católico en Minas Gerais, Brasil. A horas de haber consumido los alimentos, 4000 sufrían de gastroenteritis aguda; casi 2000 de ellas llenaban las salas de urgencias de 26 hospitales locales. Después de su valoración, 396 requirieron ser ingresadas; de éstas, 81 fueron admitidas en la unidad de cuidados intensivos. Un total de 16 pacientes (cerca de 20% de esos de la UCI) terminaron desarrollando un irreversible choque multisistema y murieron durante la hospitalización. El rastreo de la fuente de contaminación condujo a los preparadores de alimentos, quienes dieron positivo para *S. aureus* enterotoxigénicos (Carmo y col., 2004).

En su estudio sobre la calidad sanitaria de las tortillas preparadas en un pueblo de Guatemala, Caparelli y Mata (1975) hallaron números iguales de dos especies del género *Staphylococcus* (*S. aureus* y *S. epidermidis*) en tortillas viejas guardadas por 48 horas. Entre ambas, alcanzaron cuentas de  $10^7$  a  $10^8$  organismos/g; las manos de las mujeres productoras y el agua empleada en el proceso fueron las principales fuentes de contaminación. Concluyeron que la alta concentración de *S. aureus* en el alimento almacenado por 2 días pudo representar (junto con la de *B. cereus* y la de las bacterias coliformes) un riesgo para la salud del consumidor, pues algunas de sus cepas pueden producir enterotoxinas termoestables que tal

vez resistan el recalentamiento. Previamente, la cuenta de *Staphylococcus sp.* en el maíz había sido de  $10^5$  organismos/g; en el nixtamal lavado, de  $10^6$ ; en la masa, de  $10^7$ , y en la tortilla fresca recién cocida, de  $10^3$ , por lo que la mayoría de las bacterias fue eliminada durante la cocción; sin embargo, sobrevivieron las suficientes para llegar a las 24 horas casi a los niveles anteriores a ésta.

Escamilla-Hurtado y Mozqueda-González (1992) detectaron bacterias Gram negativas y *Staphylococcus spp.* sólo en las primeras 42 horas de fermentación de un pozol elaborado en su laboratorio. Con objeto de inducir el proceso fermentativo, mezclaron masa de nixtamal con pozol chiapaneco fermentado por 3 días (equivalente a 3% de la mezcla); luego separaron de la masa inoculada porciones de 50 g, las envolvieron en hojas de plátano limpias y las incubaron a 30 °C por 4 días (cada una se consideró una unidad de fermentación). El pH al inicio era de  $\approx 6.8$  y a las 42 horas había descendido a 5.4. [Para esta tesis, debe tomarse en consideración que dicho pozol se elaboró bajo condiciones higiénicas y no fue producto de una fermentación espontánea.]

Ciertos microorganismos presentes en el pozol —como los hongos y las levaduras— pueden alterar el pH y permitir que *S. aureus* crezca, pero otros estafilococos; los micrococos; los géneros *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, y las familias *Enterobacteriaceae* y *Lactobacillaceae* son conocidos competidores de éste (Banwart, 1982; Mossel y Moreno, 1982; Jay, 1992).

Aunque al parecer algunas BAL inactivan las enterotoxinas estafilocócicas (Jay, 1992; Mossel y Moreno, 1982), el queso llega a ser vehículo de estas últimas. Entonces, no siempre se podrá contar con la competencia microbiana

para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y la producción de sus enterotoxinas (Banwart, 1982).

Thomas y Wimpenny (1996) usaron la técnica de gradiente en placa para estudiar el efecto de la nisina (0, 50, 100, 250 y 500 UI/ml) sobre *S. aureus* y *L. monocytogenes* al variar la temperatura (20, 25, 30 y 35 °C), el pH (3.7 a 7.92) y el NaCl (2.1 a 7% [peso/vol.]). Mayores porcentajes de este último y menores temperaturas incrementaron sinérgicamente la inhibición de *S. aureus* por parte de la bacteriocina. El aumento de la concentración del NaCl potenció la acción de la nisina sobre *L. monocytogenes*. El efecto de las diferencias de temperatura no fue tan claro. Registrado por observación directa y análisis de imagen, el crecimiento visible de *S. aureus* en ciertas placas, sobre todo en aquellas incubadas a 20 y 25 °C y con más de 100 UI de nisina/ml, se limitó a una región con forma de arco y un pH cercano a 5. Entre pH 7.9 y  $\approx$  5.0, un descenso en el potencial de hidrógeno incrementó la efectividad de la bacteriocina contra ambos organismos. A pH de  $\approx$  4.5 a 5.0 y temperaturas de 20 y 25 °C, estos últimos mostraron resistencia tanto a la nisina como al NaCl. Se obtuvieron resultados similares en cultivos líquidos unidimensionales. Concluyeron que el que algunos patógenos puedan ser menos sensibles a la nisina a ciertos valores de pH tiene importantes aplicaciones prácticas.

Entre febrero y junio de 1999, se notificó de dos brotes de intoxicación alimentaria en Minas Gerais, Brasil. En el primero de éstos, ocurrido en febrero en la ciudad de Manhuaçu, cincuenta personas enfermaron después de consumir queso Minas casero; los síntomas (diarrea, vómito, mareos, escalofríos y dolores de cabeza) aparecieron a las 2 horas de haber sido ingerido el alimento. El otro

sucedió entre mayo y junio en la ciudad de Passa-Quatro y afectó a trescientos veintiocho individuos, quienes sufrieron de diarrea y vómito luego de tomar leche cruda o “bronca”. Para la investigación del primer brote se colectó lo siguiente: leche sin pasteurizar y tres quesos Minas elaborados de forma casera; para la de Passa-Quatro, tres muestras de leche —de un litro cada una— y cinco de agua de la llave. En el caso de Manhuaçu, el análisis microbiológico indicó la presencia de *S. aureus* [las cuentas:  $2.4 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  (leche sin pasteurizar);  $1.0 \times 10^5$  ufc  $g^{-1}$  (queso 3);  $1.0 \times 10^8$  ufc  $g^{-1}$  (queso 2), y  $> 2.0 \times 10^8$  ufc  $g^{-1}$  (queso 1)] y la síntesis de enterotoxinas SEA, SEB y SEC. En el otro brote se descartó el agua porque era del certificado suministro municipal, y el análisis de la leche cruda mostró una concentración bastante elevada ( $> 2.0 \times 10^8$  ufc  $g^{-1}$ ) de *Staphylococcus no-aureus* (con colonias no características en medio Baird-Parker, coagulasa y termonucleasa negativos, fermentación de D-manitol negativa, etc.) productores de SEC y SED. Por las enterotoxinas encontradas, las posibles fuentes de contaminación fueron los manipuladores de alimentos, en el primer brote, y la mastitis del ganado, en el segundo. A pesar de que la legislación brasileña indica que ha de utilizarse leche pasteurizada en la preparación del queso Minas, todavía es común en Minas Gerais el uso de leche cruda en la elaboración casera de queso. La alta cuenta estafilocócica inicial en ambos brotes acaso haya sido, asimismo, a consecuencia de haber mantenido la leche varias horas a una temperatura de 10 a 40 °C, permitiendo la producción de enterotoxinas (Carmo y col., 2002).

*Staphylococcus aureus* es el principal agente responsable de intoxicación alimentaria estafilocócica. Sin embargo, como algunos trabajos efectuados en

los últimos años han hecho hincapié en que los estafilococos coagulasa negativos (ECN) también pueden sintetizar enterotoxinas estafilocócicas y ser causa potencial de intoxicación, Ribeiro de Souza y col. (2006) decidieron detectar genes de enterotoxinas en los ECN obtenidos de las muestras enlistadas a continuación, adquiridas en tiendas de *delicatessen* o en mercados locales de Botucatu, São Paulo (Brasil): productos de panadería (n=38), leche (n=18), *snacks* (n=11), queso blanco (n=10), sándwiches (n=8) y carne de puerco (n=3). Aislaron los estafilococos cuyas colonias en agar Baird-Parker eran de consistencia suave, de superficie convexa y de color gris oscuro a negro, poseedoras de contornos bien definidos y rodeadas o no de halos opacos. Después les realizaron la tinción de Gram y las pruebas de la catalasa y la coagulasa. Diferenciaron el género *Staphylococcus* del de *Micrococcus* por métodos bioquímicos, así como por su resistencia a la bacitracina y su sensibilidad a la furazolidona. Veinte de las muestras dieron positivo para ECN, ninguna era de *snack*. Entre las especies aisladas, bioquímicamente determinadas, estaban *S. epidermidis* (40%), *S. xylosus* (20%), *S. warneri* (20%), *S. saccharolyticus* (15%) y *S. hominis* (5%); con números que iban de  $3.0 \times 10^2$  a  $1.4 \times 10^6$  ufc/g o ml de alimento examinado. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), detectaron el gen *sea* en tres cepas (correspondientes a *S. xylosus*, *S. epidermidis* y *S. hominis*) y el *sec-1* en otra (*S. xylosus*), las cuatro provenían de piezas de panadería. No reportaron *seb* ni *sed* (*sea*, *seb*, *sec-1* y *sed* son los genes de SEA, SEB, SEC y SED, respectivamente), ni enterotoxinas (método de aglutinación en látex, o RPLA; siglas de *Reverse Passive Latex*

*Agglutination*); si estas últimas estaban presentes, su concentración era inferior a la detectable. Concluyeron que no debe ignorarse la capacidad toxigénica de los ECN aislados de alimentos, es necesario estudiarlos más.

Posteriormente, con el propósito de identificar genes de enterotoxinas en los ECN y los ECP (estafilocos coagulasa positivos) obtenidos de productos lácteos, responsables de dieciséis brotes de intoxicación alimentaria, Ferreira y col. (2008) seleccionaron, de una colección de ciento cincuenta y dos cepas, quince representativas de cada uno de los dos grupos estafilocócicos indicados. En las de los ECN (n=15) buscaron la presencia de los genes *coa* y *femA*, característicos de *S. aureus*; y en todas (n=30), primero la de los genes de enterotoxinas (por PCR) y más adelante la de sus productos (por inmunoensayo). Siete de los aislados coagulasa negativos amplificaron el gen *coa* y fueron reclasificados como ECP; y cinco de los ocho restantes poseían genes de enterotoxinas y sintetizaron toxina detectable por inmunoensayo. De un total de treinta cepas, veintiuna tenían genes de enterotoxinas estafilocócicas (en general, los más hallados fueron el *sea* y el *seb*); la mayoría de éstas produjo toxina. Concluyeron que estos resultados evidenciaban que los ECN aislados de lácteos son capaces de manifestar enterotoxigenidad genotípica y fenotípica, al igual que los ECP, y también que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método específico y sensible, útil para el análisis de los estafilocócicos encontrados en brotes de intoxicación alimentaria, con independencia de la expresión de la coagulasa.

#### **1.11.1 Resistencia de *S. aureus* al estrés ambiental**

Debido a la ubicuidad de *Staphylococcus aureus* —el cual puede sobrevivir



en una amplia variedad de nichos ambientales, colonizarlos y causar una gama de enfermedades de ligeras a mortales, que incluyen septicemia, meningitis, síndrome del choque tóxico, intoxicación alimentaria y abscesos cutáneos—, Clements y Foster (1999) investigaron su adaptabilidad y resistencia al estrés ambiental. Durante la patogénesis, por ejemplo, los fagocitos del huésped, incluidos neutrófilos y macrófagos, migran al sitio de la infección bacteriana para ingerir las células invasoras, que después serán destruidas en un fagolisosoma. En este último, se libera mieloperoxidasa, la cual cataliza la formación de ácido hipocloroso (HClO) —un poderoso oxidante— a partir de iones cloruro y  $H_2O_2$ . Esta acidificación parece ser importante porque los neutrófilos deficientes en mieloperoxidasa reducen su actividad bactericida. La acidez (pH 2) elimina rápido a *S. aureus*; sin embargo, éste puede desarrollar resistencia al pH “asesino” si se adapta antes, exponiéndolo a uno mayor no letal. Todavía debe establecerse el papel de esta respuesta de tolerancia a la acidez (ATR) en la sobrevivencia bacteriana dentro de los neutrófilos y macrófagos. Se desconoce el mecanismo de adaptación a la acidez, pero debe contrarrestar los efectos letales de la acidificación del citoplasma, que incluyen la reducción de la velocidad del flujo metabólico y el daño a macromoléculas, especialmente al ADN. Cabe apuntar (Brock y Madigan, 1993) que también se forma ácido láctico durante el proceso de fagocitosis, pues los fagocitos reemplazan la respiración aerobia por el metabolismo anaerobio de la glicólisis (un pH ácido es el óptimo para las enzimas hidrolíticas lisosomales).

La NADPH oxidasa, que está en la membrana del fagolisosoma, cataliza la reducción del  $O_2$  a  $O_2^-$  (anión superóxido). Este último se convierte luego en otras

especies reactivas del oxígeno (ROS) que pueden llegar a dañar las proteínas, los lípidos y el ADN de la célula fagocitada y causar su muerte. Una de esas ROS es el  $H_2O_2$ , formado junto con un singlete de oxígeno al reaccionar el anión superóxido al pH ácido del fagocito; otra, el peroxinitrito ( $OONO^-$ ), generado indirectamente por la óxido nítrico sintasa; etc. Como defensa contra las ROS, *Staphylococcus aureus* produce varios compuestos. La catalasa KatA, acumulada extracelularmente, inactiva al  $H_2O_2$ ; existe una correlación entre esta actividad enzimática y la patogenicidad, siendo mayor la primera en las cepas virulentas que en las que no lo son. La alquil hidroperóxido reductasa (AhpC) puede proteger a *S. aureus* de las especies reactivas del nitrógeno, incluyendo al  $OONO^-$ . La principal superóxido dismutasa (SOD), SodA, está relacionada sobre todo con la defensa contra el  $O_2^-$  endógeno, pero también con la resistencia a la acidez, conferida vía ATR (siglas de *Acid-Tolerance Response*). Puede estar presente por igual una segunda SOD (SodX), vinculada a la pared celular, que inactiva el  $O_2^-$  exógeno (Clements y Foster, 1999; Brock y Madigan, 1993). Asimismo, se sabe que los carotenoides de *S. aureus* secuestran el singlete de oxígeno y evitan de esta manera la participación de este último en la muerte de la célula bacteriana dentro del fagocito. Por otra parte, la mayoría de las cepas de *S. aureus* produce proteínas (leucocidinas) que destruyen los fagocitos (cuyos restos son los constituyentes fundamentales del pus) y puede liberarse de ellos después de la ingestión (Brock y Madigan, 1993).

La habilidad de *S. aureus* para sobrevivir o crecer en una variedad de ambientes no asociados con la patogénesis contribuye a la diseminación de este

estafilococo y a los problemas para erradicarlo de los hospitales. Por este motivo, Clements y Foster (1999) estudiaron fuera del huésped su tolerancia a la desecación, su resistencia al estrés osmótico y su respuesta de sobrevivencia a la inanición. En cuanto a la primera, ésta es en extremo alta. A pesar de que poco se sabe acerca de su mecanismo, se ha observado una correlación entre la pigmentación de *S. aureus* y su resistencia a la desecación y a los ácidos grasos de la piel. (Uno de los criterios clásicos para identificar a este microorganismo es el desarrollo de un color amarillo-naranja al ir envejeciendo la colonia, a consecuencia de la acumulación del carotenoide 4,4'-diaponeurosporeno y de la estafiloxantina; la ruta biosintética por la cual se forma este último pigmento ha sido bien caracterizada, al igual que los genes *crtM/crtN*, que codifican las enzimas involucradas en ella.) En relación al estrés osmótico, *S. aureus* es capaz de crecer en presencia de altas concentraciones de NaCl ( $\geq 1.7$  M). En un medio de alta osmolaridad, acumula en el citoplasma los solutos compatibles glicina, prolina y betaína sin inhibir los procesos celulares. Adicionalmente, los puentes interpeptídicos de los peptidoglicanos de la pared celular se acortan, lo cual puede conferir fuerza mecánica a la célula, para resistir los cambios en la presión de turgor. Sugiriendo el estímulo de una protección cruzada contra otros tipos de estrés, el choque osmótico induce la expresión del gen *ahpC*; esto último es muy interesante porque el estrés oxidativo mismo no lo hace. La alta osmolaridad reprime la expresión de muchas determinantes de virulencia; lo cual tal vez sea parte de un mecanismo general de respuesta al ambiente, que limita la producción de componentes al momento y la situación en que sean apropiados.

Afuera, sobre la piel o en un absceso, la disponibilidad de nutrientes puede

convertirse en un severo problema. La carencia de éstos induce en *S. aureus* un estado de sobrevivencia a la inanición, al que se hace referencia en el párrafo precedente. Una limitada concentración de glucosa o de otros múltiples nutrientes provoca la muerte de  $\approx 99\%$  de la población después de dos días a 37 °C. Las células sobrevivientes, que permanecen viables por varios meses, disminuyen su tamaño y tienen menos septos de división. Además, aumentan su resistencia a la acidez, al estrés oxidativo y al reto con enzimas líticas. Para desarrollar este estado, mantenerlo y salir de él se necesitan varios loci, entre los cuales están, por ejemplo, un gen que codifica una hemo A sintasa, homólogo al *ctaA* de *B. subtilis*; otro (*sodA*), análogo a la familia de las superóxido dismutasas dependientes de manganeso (Mn-SOD) codificadas por *sodA*; y un componente de la respuesta SOS (*umuC*). Tanto la resistencia al estrés oxidativo como los mecanismos de reparación son, por ende, muy importantes para la sobrevivencia a largo plazo. No está claro por qué muere 99% de la población bacteriana, pero es probable que sus restos sirvan de sustento a las supervivientes. El compromiso a apoptosis [modalidad específica de muerte celular, implicada en el control del desarrollo y el crecimiento (RAE, 2001)] parece ocurrir en una etapa temprana de la inanición; acaso esté funcionando un sistema de suicidio semejante al propuesto para *E. coli*. Cuando ya hay disponibilidad de nutrientes, las células en inanición aumentan de inmediato la síntesis de ARN y ulteriormente la de proteínas, lo que conduce a la inversión de muchos de los cambios celulares asociados a este estado. Durante la recuperación, las proteínas se expresan en un orden temporal específico (Clements y Foster, 1998 y 1999; Clements y col., 1999a y 1999b).

En cuanto al *sodA* de *S. aureus* señalado con anterioridad, Clements y col. (1999a) descubrieron que su expresión está subordinada a la fase de crecimiento, igual que lo está la actividad SOD. [Ambas fueron bajas en la fase exponencial. La primera aumentó durante la fase estacionaria; la segunda, al entrar en la postexponencial, para mantenerse alta a lo largo de la estacionaria.] A más de eso, éstas dependen del nivel de aireación del cultivo, alcanzando la mayor actividad y expresión en condiciones de elevado aireamiento. La falta de SodA (cepa mutante SPW1, con una inserción de transposón en el gen *sodA*) dio por resultado una incrementada sensibilidad al estrés oxidativo generado internamente adicionando metil viológeno, aunque esto fue evidente sólo en la fase estacionaria, que es cuando también ocurre la máxima expresión de *sodA*. En la cepa no mutante de *S. aureus* (8325-4), el metil viológeno indujo la expresión del gen —y por consecuencia la actividad SOD—, en concreto durante la transición de la fase de crecimiento exponencial a postexponencial y sólo si se adicionaba antes de alcanzada la fase estacionaria. La incubación de las cepas SPW1 y 8325-4 en un medio con xantina y xantina oxidasa, para generar radicales libres externamente, no afectó ni la velocidad a la que crecían ni su rendimiento ni la pérdida de viabilidad celular, sin importar la fase en que éstas se encontraran. SPW1 manifestó una menor aptitud para sobrevivir a la deficiencia de aminoácidos y glucosa en el medio. Un análisis adicional evidenció que, al agitar los cultivos durante la inanición, la velocidad de pérdida de viabilidad de SPW1 fue mucho mayor que la de *S. aureus* 8325-4, mientras que en condiciones estáticas ambas cepas mostraron la misma cinética. Sin embargo, al emplearse protocolos estándar de recuperación, la inactivación de *sodA* en SPW1 no tuvo efecto sobre

la capacidad de las células en inanición para reanudar su crecimiento. El gen *sodA* no jugó ningún papel en la patogénesis.

Con el objetivo de explorar la tolerancia de *S. aureus* a la acidez, Clements y col. (1999a) trabajaron con las cepas ya mencionadas (8325-4 y SPW1), resuspendiéndolas en un medio líquido químicamente definido (CDM) que contenía 0.1% de glucosa, acidificado a pH 2; la viabilidad la determinaron en agar CDM y la reportaron en ufc/ml. Para la respuesta de adaptación a la acidez (AAR), resuspendieron las células por 1 hora en CDM pH 4 antes de determinar la tolerancia a la acidez. Las células de *S. aureus* 8325-4 en fase exponencial fueron sensibles al CDM acidificado a pH 2, pero se volvieron tolerantes cuando se adaptaron por 1 hora a pH 4 antes del reto a dicho pH (2); por lo tanto, aumentaron su resistencia a la acidez [metodologías indicadas en Chan y col., 1998]. Como las células de la cepa SPW1 en fase exponencial fueron menos tolerantes al CDM pH 2 que las de 8325-4 (luego de 10 minutos, la pérdida de viabilidad de la primera era de >3 unidades logarítmicas; y la de la segunda, de 1 unidad), concluyeron que SodA se relaciona con la resistencia a la acidez. Asimismo, infirieron que ésta tiene además un papel en la AAR, ya que a los 30 minutos (reto a pH 2, después de una adaptación a pH 4), la viabilidad de SPW1 reveló una caída de >2 unidades logarítmicas, en comparación con la de 0.6 unidades de la otra cepa. Al resuspender las células de *S. aureus* 8325-4 a pH 7 (no adaptador) y pH 4 (adaptador), luego de 60 minutos el nivel de expresión de *sodA* permanecía más o menos constante en el primer caso, en tanto que en el segundo era casi diez veces mayor que el obtenido al final del caso anterior; por consiguiente, la acidez indujo su expresión. En dichas condiciones, la actividad SOD exhibió un comportamiento similar.

Es mencionable la factibilidad de que SodA participe por igual en la ocupación exitosa de nichos específicos, ya que se ha demostrado que la de la *Haemophilus influenza* juega un papel primario en la colonización de la nasofaringe, que es uno de los sitios preferidos de *S. aureus*. Otros microorganismos que tienen *sodA* son *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *B. subtilis* y *Listeria monocytogenes*. La SodA de *S. aureus* posee una mayor identidad con la de estos dos últimos (Clements y col., 1999a).

Como el bacilo esporógeno Gram positivo *Bacillus subtilis* responde al estrés ambiental induciendo la actividad de un factor sigma alternativo  $\sigma^B$ , y ya que en *S. aureus* ha sido identificado uno homólogo —cuya expresión ocurre fundamentalmente durante la fase estacionaria de crecimiento y, según dicen algunos autores, mejora con el choque térmico—, Chan y col. (1998) inquirieron su papel en la respuesta de *S. aureus* al estrés ambiental y a la inanición (sobrevivencia y recuperación). Después de un choque térmico a 54 °C (10 min), se relacionó a  $\sigma^B$  con el recobro de la bacteria, debido a que la fase de latencia de la cepa mutante PC400 (*sigB::Tc*) fue 30 minutos mayor que la de *S. aureus* 8325-4. El factor  $\sigma^B$  estuvo implicado a su vez en la resistencia a la acidez (pH 2) y al peróxido de hidrógeno, pero no al etanol o al choque osmótico. Al someter tanto a la cepa mutante como a la 8325-4 a un pH subletal (pH 4) antes de exponerlas a uno letal (pH 2), descubrieron que esta respuesta de adaptación a la acidez que resulta en tolerancia también estuvo mediada principalmente vía  $\sigma^B$ . En contraste, este factor al parecer no jugó ningún rol en el desarrollo de la resistencia a la acidez asociada con la inanición, pues no hubo diferencia entre la cinética de

sobrevivencia de las cepas PC400 y 8325-4 con 7 días de inanición al exponerlas a pH 2; ni tampoco fue vital para los mecanismos de recuperación o de sobrevivencia a dicho estado. Las concentraciones mínimas inhibitorias de meticilina (0.6 µg/ml), gentamicina (0.7 µg/ml), eritromicina (0.2 µg/ml), vancomicina (1 µg/ml) y estreptomicina (5 µg/ml) fueron idénticas para ambas cepas.

Clements y Foster (1999) han aislado variantes morfológicas de *S. aureus* (variantes de colonias pequeñas, VCPs) que muestran una incrementada resistencia a antibióticos aminoglucósidos y que se asocian con infecciones crónicas. Estas mutantes surgidas de modo espontáneo tienen una disminuida actividad hemolisina y coagulasa, una reducida pigmentación y un lento crecimiento. Dichas características podrían permitir que las VCPs permanezcan dentro de las células del paciente, resistan los agentes antimicrobianos y, si son capaces de revertir a formas de rápido crecimiento y alta virulencia, formen un reservorio de bacterias potencialmente dañinas.

Se cree que la producción de la coagulasa, la hemolisina, la fibrinolisisina, las enterotoxinas de *S. aureus* y el pigmento amarillo relacionado con la capacidad de esta bacteria para sobrevivir a la acción destructiva del singlete de oxígeno en el fagocito está ligada a plásmidos. Además, la multiresistencia a antibióticos también codificada en plásmidos es común en este notable patógeno nosocomial (Brock y Madigan, 1993).

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* están entre las principales causas de morbilidad y mortalidad hospitalaria. En los últimos años, por ejemplo, los *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) y los que lo son a aminoglucósidos



y meticilina (MARSA) han sido responsabilizados alrededor del mundo por brotes de infecciones nosocomiales [las adquiridas en el hospital]. Estas cepas, junto con las que han desarrollado resistencia a otros antibióticos, están muy diseminadas y requieren estrictas medidas de control; una vez en el ambiente hospitalario, permanecen ahí por un largo tiempo, a pesar de los intentos por erradicarlas.

Adicionalmente, se ha investigado el papel que pueden jugar las enterotoxinas de *S. aureus* en la patogénesis de importantes enfermedades sistémicas; es decir, generalizadas, sin localización específica en el cuerpo. Hay evidencia de que una gran cantidad de cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con septicemia [infección de la sangre causada por microorganismos] sintetiza enterotoxinas, al igual que la mayoría de las obtenidas del síndrome de choque tóxico no menstrual. Por lo tanto, debe considerarse la posibilidad de que estas sustancias causen, además de vómito y diarrea, importantes efectos tóxicos sistémicos. En ocasiones, cepas aisladas de casos clínicos carecen de la capacidad de producir toxina del síndrome de choque tóxico (TSST-1) y algunos autores han señalado a la enterotoxina estafilocócica B como su agente causal, puesto que aplicada de manera intravenosa ha sido capaz de inducir un número de cambios fisiológicos y patológicos similares a los de la TSST-1 (Oliveira y col., 1996; Brock y Madigan, 1993).

Por lo antes dicho, Oliveira y col. (1996) estudiaron la existencia de cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicas y multirresistentes en un gran hospital comunitario de Río de Janeiro, Brasil. Según la tabla publicada, cuarenta y seis cepas de esta especie bacteriana se aislaron de las siguientes muestras clínicas obtenidas de los pacientes hospitalizados: seis de secreciones de heridas

quirúrgicas, nueve de catéteres venosos, tres de sangre, nueve de orina, once de secreciones respiratorias y ocho de secreciones varias. La identificación se realizó por métodos bioquímicos e indicó un patrón único; sin embargo, se observaron notables diferencias en los patrones de fagotipificación y de síntesis de enterotoxinas. Catorce cepas se asociaron al grupo fágico III, el resto no se pudo tipificar, aunque la mayor parte de este último grupo mostró una ligera sensibilidad al fago 54, lo que coincidió con otros escritos sobre cepas nosocomiales de *Staphylococcus aureus*. Un número igual (n=14) produjo una o más enterotoxinas: A y D se encontraron, cada una —juntas (n=5) o por separado—, en nueve de ellas; C, en cuatro; y E, en una. Como éstas (equivalentes a 30.4% del total de las cepas) eran MRSA o MARSA, los autores señalaron que si bien la capacidad para sintetizar enterotoxinas permite a algunas cepas de *S. aureus* causar graves enfermedades, la gravedad aumenta cuando éstas son multirresistentes. En suma, cinco cepas fueron MRSA; treinta y seis, MARSA; y cinco, MSSA (*S. aureus* sensibles a la meticilina). No se detectó SEB ni TSSF-1. Los resultados sugirieron la amplia diseminación de diversas cepas de esta especie bacteriana en el nosocomio. No obstante, se evidenció que tres de las aisladas de casos con desenlace fatal, recuperadas de las secreciones respiratorias de pacientes de la unidad de cuidados intensivos, eran una misma. Para saber si había portadores de cepas MRSA y MARSA, examinaron a un gran número de los trabajadores del hospital, entre ellos doctores y enfermeras, y descubrieron portadores nasofaríngeos en un bajo porcentaje (menos de 5%); éstos fueron removidos de sus cargos mientras se trataban con crema de mupirocina [un antibacteriano tópico contra *Staphylococcus sp.* y *Streptococcus sp.* (Weller, 1997)].

## **CAPÍTULO 2: MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1 Muestreo y encuestas**

Se analizaron catorce muestras de pozol adquiridas en diferentes fechas y en varios expendios de Villahermosa, Tabasco. Éstas eran enviadas por avión al aeropuerto de la Ciudad de México; tan pronto como llegaban, se ponían en hielo y se transportaban al laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química; entre la compra y el análisis, el tiempo promedio estimado fue de 4 horas.

Con la intención de seguir el proceso fermentativo, las últimas diez muestras recibidas se envolvieron en hojas de plátano previamente flameadas y se incubaron en una estufa a 29 °C durante 8 días. Para obtener información relacionada con las condiciones sanitarias existentes en la preparación de dichas bolas (n=10), se redactó el cuestionario del Apéndice 1.

En cuanto a las determinaciones, la prueba de la termonucleasa se efectuó por triplicado; todas las demás, por duplicado. Se reportó el valor promedio.

Las muestras se colectaron en Villahermosa porque en esa ciudad hay un alto consumo de pozol; a diferencia de otros lugares, está muy generalizado entre los mestizos y existen alrededor de cuatrocientas pozolerías (Zebadua, 1997). El pozol blanco se bebe mínimo en trece de los diecisiete municipios tabasqueños; el chorote, en ocho; y ambos, tanto en el Centro como en Nacajuca (Centro Nacional de Estudios Municipales de la Secretaría de Gobernación, 1988), donde se elaboraron las bolas con las que se trabajó en esta tesis.

En Tabasco habitan, a excepción de chamulas y mames, los grupos

indígenas que desde épocas prehispánicas han utilizado este alimento con varios fines. Y es en los municipios Centro, Nacajuca, Macuspana y Tacotalpa donde se ubica  $\approx 75\%$  de los indígenas de este Estado [en los dos primeros está 50% del total (en el Centro, 28%, y en Nacajuca, el 22% restante)] (Censo, 1990; Ulloa y col., 1983).

Las enfermedades intestinales constituyen la tercera causa de mortalidad infantil en Tabasco (8.0% del total). Debido al gran consumo de pozol por poblaciones de todas las edades, a las características de su sustrato y a su proceso de elaboración, se decidió investigar la presencia de microorganismos patógenos en este alimento y establecer si podía ser causa de enfermedades diarreicas.

Los factores sociales, individuales, culturales, religiosos y políticos de un pueblo intervienen en el proceso salud-enfermedad (Tercer mundo ed., 1986; Campos-Navarro, 1997; Campos-Navarro y col., 1997; Sainz, 1998). Las infecciones bacterianas y la diarrea infantil son endémicas en muchos países en vías de desarrollo, incluido México (Calderón, 1977a; Calderón, 1977b; Calderón, 1977c; Barrell y Rowland, 1979; Cravioto y col., 1988; Casalino y col., 1988).

## **2.2 Peso de la muestra**

Se ocupó una balanza LABTOP-ACE-3000B, Yamato, para conocer el peso total de la muestra.

## **2.3 Determinación del pH**

Del centro de la bola de pozol se tomaron 2 g de masa, se mezclaron con 2 ml de agua destilada (llevada a un pH de 7) y se determinó el pH con un potenciómetro (Jenway 3020) ajustado de antemano con soluciones reguladoras

de pH 4 y 7.

## **2.4 Determinación de ácido acético, ácido láctico, fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa**

Del centro de la bola de pozol se tomaron  $\approx$  15 g de masa y se guardaron, hasta su procesamiento, a  $-70$  °C (Ultracongelador Puffer Hubbard) en bolsas de plástico (21x15 cm) etiquetadas con anterioridad.

### **2.4.1 Preparación de la muestra (Diagrama 1; Santillana, 1995)**

#### **2.4.1.1 Extracción**

Se pesaron 5 g de masa húmeda en un tubo de centrifuga de 50 ml (Nalgene); se les añadieron 20 ml de agua destilada precalentada a 65 °C (el disolvente de extracción); y se mezclaron en un homogeneizador Glas-Col a 6000 rpm por 3 minutos. El producto se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos (Centrífuga Beckman J2-21M/E), se separó el sobrenadante y se aforó a un volumen de 25 ml con agua destilada.

#### **2.4.1.2 Clarificación**

El extracto se mantuvo en congelación a  $-20$  °C por 4 días; se encontraba dentro de bolsas de plástico (13x8 cm) etiquetadas, selladas con calor. Después de descongelarlo y homogeneizarlo, se tomaron de él varias alícuotas y se centrifugaron a una velocidad de 6400 rpm durante dos minutos (Centrífuga personal Millipore), con el objeto de eliminar las partículas sólidas que se

separaron y facilitar la filtración con prefiltro (Prefiltro tipo AP, Millipore) y filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Filtro tipo HV, Millipore). Las muestras claras ya podían ser empleadas en las determinaciones, cada una se preparó por duplicado.

5 g de masa + 20 ml de agua destilada a 65 °C. Mezclar a velocidad máxima en un homogeneizador Glas-Col (6000 rpm) durante 3 minutos



Centrifugar a 10000 rpm por 20 minutos



Separar el sobrenadante y aforarlo a 25 ml con agua destilada



Dejarlo en congelamiento a -20 °C durante 4 días



Descongelarlo a temperatura ambiente y homogeneizarlo



Tomar varias alícuotas y centrifugarlas a 6400 rpm por 2 minutos



Filtrar con prefiltro y membrana de 0.45  $\mu\text{m}$



Muestra clara, lista para ser inyectada en el HPLC y para ser utilizada en la determinación enzimática de carbohidratos

#### **Diagrama 1. Preparación de la muestra (extracción y clarificación)**

#### **2.4.2 Determinación de los ácidos láctico y acético por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

Para esta determinación se usó el equipo listado más adelante, el cual

operó con una fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.01 N (Apéndice 3) y un flujo de 0.6 ml/min a temperatura ambiente:

- Cromatógrafo de líquidos isocrático Perkin-Elmer Series 250, inyector Valco con loop de 100 µl
- Detector de índice de refracción Perkin-Elmer modelo LC-30
- Integrador personal Perkin-Elmer modelo 1020S
- Columna Aminex HPX-87H de Bio-Rad, con un tamaño de partícula de 9 µm y una longitud de 300 x 7.8 mm de diámetro interno
- Precolumna catión H<sup>+</sup> de Bio-Rad Laboratories

Se realizaron las curvas de calibración de los compuestos de interés para establecer su concentración en las muestras.

#### **2.4.2.1 Curvas de calibración**

##### **2.4.2.1.1 Ácido láctico**

Se prepararon soluciones de entre 0.0625 y 0.5% de ácido láctico, a partir de una patrón de lactato de litio (Reactivo analítico, Sigma L + Lactic Acid Lithium Salt) cuya concentración era de 10 g/100 ml (9.25 g/100 ml, expresada como ácido láctico); las disoluciones se conservaron a -20 °C.

##### **2.4.2.1.2 Ácido acético**

Partiendo de una solución patrón de acetato de sodio (Reactivo analítico, Productos Químicos Monterrey), con una concentración de 12.3 g/100 ml (que expresada como acético era de 7.3 g/100 ml), se prepararon soluciones de entre 0.0625 y 0.5% de ácido acético, las cuales se mantuvieron en congelamiento a -20 °C.

A partir de las áreas obtenidas, se calcularon la ordenada al origen y la pendiente para uno y otro ácido. La ecuación de la recta resultante en cada caso fue la siguiente:

$$\text{Ácido láctico } Y= 23783541X + 54542$$

$$\text{Ácido acético } Y= 11388582X + 26495$$

Donde Y es el área de respuesta y X la concentración.

Al inicio de cada sesión, y a veces intercalándolo con las muestras, se inyectaba al cromatógrafo el estándar correspondiente a uno de los puntos de las curvas de calibración, para verificar el buen funcionamiento del equipo. Las concentraciones de los ácidos se reportaron como g/100 g de base húmeda.

#### **2.4.3 Determinación enzimática de fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa**

Ya que no fue posible llevar a cabo la cuantificación de dichos azúcares por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (Santillana, 1995) —pues las concentraciones de carbohidratos en las muestras eran muy bajas—, se emplearon dos sistemas enzimáticos comerciales (Díaz, 1996; Apéndice 2): D-Glucosa/D-Fructosa (Boehringer 139 106) y Maltosa/Sacarosa/D-Glucosa (Boehringer 1 113 950).

#### **2.5 Aislamiento microbiano**

Los microorganismos se aislaron según los métodos establecidos en el *Food and Drug Administration bacteriological analytical manual* (U. S. FDA, 1995).



## **2.5.1 Aislamiento de *Staphylococcus aureus***

### **2.5.1.1 Cuenta directa**

Se pesaron asépticamente 25 g de muestra de pozol en una bolsa de Stomacher; se añadieron 225 ml de agua peptonada al 0.1% (Peptona bacteriológica, Oxoid, L37); y se homogeneizaron por un minuto a velocidad normal en el Stomacher (Seward 400). Se prepararon más diluciones decimales con el agua peptonada. Se repartió en forma equitativa 1 ml de la dilución correspondiente (0.3 ml, 0.3 ml y 0.4 ml) en tres cajas de agar Baird-Parker (Oxoid, CM275; Bioxon, Cat. 239-1) con emulsión de yema de huevo-telurito (Apéndice 3). Se extendió el inóculo sobre la superficie del agar con una varilla de vidrio doblada en L y flameada; para homogeneizar las diluciones, se utilizó un Vortex (Fisher Vortex-Genie 2, Cat. 1 012 812). Las cajas se incubaron a 37 °C por 48 h (se observó si a las 24 h ya se notaban colonias típicas); se mantuvieron en posición recta en la incubadora hasta la absorción del inóculo y luego se invirtieron. Se seleccionaron al azar de 3 a 5 colonias sospechosas, se sembraron en tubos inclinados (viales) de agar nutritivo (Oxoid, CM3) y se incubaron a 37 °C por 24 h. Cuando se obtuvo crecimiento en estos últimos, se procedió a efectuar pruebas bioquímicas diferenciales para la caracterización y enumeración de *Staphylococcus aureus*.

### **2.5.1.2 Prueba de presencia/ausencia**

Con técnica aséptica, se pesaron 25 g de pozol en una bolsa de Stomacher; se añadieron 225ml de caldo triptona-soya + 10% de NaCl

(Apéndice 3); y se homogeneizaron por un minuto en el Stomacher (Seward 400), a velocidad normal. Se incubó el medio a 37 °C por 24 h y se homogeneizó, de nuevo en el Stomacher, por un minuto más a velocidad normal. Se sembraron por estría dos cajas que contenían agar Baird-Parker con emulsión de yema de huevo-telurito y se incubaron a 37 °C por 48 h; se observó si a las 24 h ya se notaban colonias de apariencia típica. Al azar se seleccionaron de 3 a 5 colonias sospechosas, se sembraron en viales de agar nutritivo y se incubaron a 37 °C por 24 h. Finalmente, con el crecimiento obtenido en dichos tubos, se realizaron pruebas bioquímicas diferenciales.

El agar Baird-Parker con emulsión de yema de huevo-telurito —desarrollado por Baird-Parker en 1962, al modificar el medio de telurito y glicina de Zebovitz y col. (1955)— se usa para el aislamiento e identificación de estafilococos coagulasa positivos en alimentos. La reducción del telurito da colonias negro azabache; el piruvato de sodio es un estimulante selectivo del crecimiento; y la emulsión concentrada de yema de huevo es un agente diagnóstico con el cual *S. aureus* genera en el medio unas zonas claras, por proteólisis, y otras opacas —dentro de las claras—, por lipólisis (Krupp, 1968; Oxoid, 1981).

Las colonias sospechosas de ser de *S. aureus* son circulares, lisas, convexas y húmedas; están rodeadas de una zona de aclaramiento bien definido de 2 a 5 mm de ancho; y tienen un color gris a negro azabache, un borde intacto, blanco y estrecho, una consistencia gomosa —al tocarlas con el asa— y un diámetro de 2 a 3 mm, en cajas “no atestadas”. A veces, los estafilococos coagulasa negativos crecen en dicho agar, aunque rara vez producen

aclaramiento; *Staphylococcus saprophyticus* sí puede producirlo, pero sus colonias son más irregulares que las de *S. aureus*. Las levaduras, los micrococcos y las especies de *Bacillus* pueden llegar a desarrollarse en el medio. Las colonias del primer grupo (que son blancas) no clarean; las del segundo (diminutas y con varios tonos de marrón o negro), tampoco; las del tercero (de color marrón oscuro mate) a veces sí lo hacen, después de 48 horas (Oxoid, 1981; U. S. FDA, 1995).

Otros medios empleados con frecuencia para el aislamiento y la identificación de *Staphylococcus aureus* son los siguientes: agar sal manitol, agar sangre, medio carne con 10% de sal, agar fosfato fenolftaleína, medio Ludlam (selectivo para el aislamiento de *S. aureus* a partir de material contaminado), agar leche y agar salino al 8% (agar nutritivo + 8% de NaCl).

### **2.5.2 Aislamiento de *Bacillus cereus***

Para este aislamiento se utilizaron los medios agar base *Bacillus cereus* (Oxoid, CM617) y agar manitol-yema de huevo-polimixina (MYP) (Apéndice 3).

#### **2.5.2.1 Cuenta directa**

Se pesaron asépticamente 25 g de la muestra de pozol en una bolsa de Stomacher; se añadieron 225 ml de buffer fosfato Butterfield diluido en agua (Apéndice 3); y se homogeneizaron por un minuto a velocidad normal en el Stomacher (Seward 400). Se prepararon más diluciones decimales con dicho buffer. Las cajas de Petri se inocularon por duplicado (con 0.1 ml de la dilución que correspondía) mediante el método de extensión por superficie, en el que se usa una varilla de vidrio doblada en L y flameada. Las placas se incubaron a 29 °C

por 48 h (tras conservarlas en posición recta hasta que el inóculo fue absorbido por el agar, se invirtieron). Se seleccionaron al azar de 3 a 5 colonias sospechosas, se sembraron en tubos de agar nutritivo (Oxoid, CM3) y se incubaron a 29 °C por 24 h. Cuando se obtuvo crecimiento en este medio, se efectuaron las pruebas bioquímicas diferenciales para la caracterización y enumeración de *B. cereus*.

## **2.5.2.2 Prueba de presencia/ausencia**

### **2.5.2.2.1 Muestras 3 y 4**

Se pesaron asépticamente 25 g de pozol en una bolsa de Stomacher; se añadieron 225 ml de buffer fosfato Butterfield diluido en agua (Apéndice 3); y se homogeneizó la muestra por un minuto a velocidad normal en el Stomacher (Seward 400). Con el buffer se prepararon más diluciones decimales; por cada una de ellas se inoculó por duplicado una serie de tres tubos de caldo tripticasa-soya-polimixina que se mantuvieron ulteriormente a 29 °C por 48 h. Los tubos con crecimiento se resembraron en placas de agar MYP, y estas últimas se incubaron a 29 °C por 48 h. Para luego corroborar la presencia de *B. cereus*, se escogieron de 3 a 5 colonias sospechosas por caja y se transfirieron a tubos de agar nutritivo. El número más probable se calcula por medio de tablas, con base en el número de tubos de cada dilución en los que se confirme el microorganismo.

### **2.5.2.2.2 Muestras 5 a 14**

Se pesaron asépticamente 25 g de pozol en una bolsa de Stomacher; se añadieron 225 ml de caldo tripticasa-soya-polimixina (Apéndice 3); y se

homogeneizó la muestra por un minuto en el Stomacher (Seward 400), a velocidad normal. El medio se incubó a 29 °C por 48 h y se volvió a homogeneizar en este último aparato por un minuto. Se sembraron por estría cajas de agar MYP y agar *Bacillus cereus* y se incubaron a 29 °C por 48 h. Se seleccionaron de 3 a 5 colonias sospechosas, se sembraron en tubos de agar nutritivo y se incubaron a 29 °C por 24 h. Con el crecimiento obtenido en éstos, se procedió a realizar las correspondientes pruebas bioquímicas diferenciales.

En cuanto a los medios ocupados, la concentración final de polimixina B (100 UI/ml) y la adición de yema de huevo los hacen selectivos para *B. cereus*. El piruvato de sodio y la peptona al 0.1% (peso/volumen) en la formulación del agar *Bacillus cereus* mejoran la precipitación de la yema de huevo y favorecen la esporulación. Los indicadores de pH (el azul de bromotimol, en dicho agar, y el rojo de fenol, en el MYP) están para evidenciar la utilización del manitol; pues, a diferencia de *B. megaterium* —con el cual puede confundirse—, *B. cereus* no fermenta este poliol (Collins y Lyne, 1989).

Las colonias de *B. cereus* en el agar del mismo nombre son de  $\approx$  5 mm de diámetro y de un tono azul turquesa, rodeadas de un halo de dicho color, debido a la precipitación de la yema de huevo. En el medio MYP las colonias son rosas y el halo rosa-rojizo (U. S. FDA, 1995; Oxoid, 1990); en la mayoría de las demás especies de *Bacillus*, la actividad fosfolipidásica se limita a la zona debajo de las colonias (Collins y Lyne, 1989).

La reacción con la yema de huevo distingue a *B. cereus* de otras especies de *Bacillus* (excepto de *B. thuringiensis*). Y aunque *Staphylococcus aureus*,

*Serratia marcescens* y *Proteus vulgaris* también pueden crecer en el medio *Bacillus cereus* y reaccionar con la yema de huevo, éstos producen una clarificación, y *B. cereus*, en contraste, una precipitación. Además, sus colonias son diferentes en forma y color a las de esta última especie (Oxoid, 1990).

Otros medios para *B. cereus* son el agar triptona glucosado (donde las colonias —irregulares “como vidrio molido”, grandes y planas— demuestran una reacción ácida) y el agar sangre hidrato de cloral (Collins y Lyne, 1989).

## **2.6 Examen al microscopio**

Con la ayuda del asa bacteriológica estéril, se tomó un poco del crecimiento microbiano por analizar, se colocó en una gota de agua sobre un portaobjetos, se mezcló a la perfección y se extendió formando una película delgada; los cultivos en medio líquido se extendieron tal cual estaban. Esta preparación se secó al aire y se fijó posteriormente pasando el portaobjetos, con la película hacia arriba, por la llama de un mechero (los microorganismos se adhieren a la laminilla, de manera que el colorante ya no desprenderá la película). Se efectuó la tinción de Gram (Harrigan y McCance, 1976), se secó la preparación al aire o con un papel absorbente y se examinó al microscopio (Microscopio óptico compuesto Carl Zeiss); el lugol y los colorantes se compraron a Sigma de México.

La tinción de Gram es un tipo de coloración diferencial; las bacterias que retienen el colorante inicial (violeta) son Gram positivas, y las que se decoloran y toman el de contraste (rojo o pardo), Gram negativas.

Al hacer referencia a *S. aureus*, se habla de cocos Gram positivos normalmente organizados en racimos (aspecto de uvas), carentes de cápsula y

espora. Las extensiones a partir de cultivos líquidos pueden proporcionar la imagen de cocos Gram positivos en parejas, cadenas cortas y grupos (Lynch y col., 1990; Baker y Breach, 1990).

*B. cereus* es un bacilo grande (1 x 10 µm), Gram positivo y formador de esporas, que se adhiere con frecuencia en cadenas largas o pequeñas (Collins y Lyne, 1989; U. S. FDA, 1995).

Las bacterias lácticas —caracterizadas por su producto principal: el ácido láctico— son morfológicamente heterogéneas (Díaz, 1996) y pueden o no tener cápsula, pero son Gram positivas y no esporuladas (Banwart, 1982).

## **2.7 Pruebas bioquímicas**

### **2.7.1 Prueba de la catalasa**

Con el asa bacteriológica estéril, se tomó crecimiento del microorganismo por probar y se colocó en una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. La determinación se llevó a cabo sobre un portaobjetos dentro de la campana de flujo laminar bien iluminada. La enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno con liberación de oxígeno (Bryan y col., 1971; Brock y Madigan, 1993); la producción de burbujas de gas indica un resultado positivo.

La prueba de la catalasa es útil para la identificación de muchas bacterias. Por ejemplo, los estreptococos no poseen esta enzima, pero todos los estafilococos, sí. *Bacillus* es catalasa positivo; al contrario de *Clostridium*, que es negativo (ambos de la Familia *Bacillaceae*). *Listeria monocytogenes* es catalasa positiva, y los estreptococos betahemolíticos, catalasa negativos (Finegold y Baron, 1991; Brock y Madigan, 1993).

En suma, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* son catalasa positivos, mientras que las bacterias lácticas son catalasa negativas.

## **2.7.2 *Staphylococcus aureus***

### **2.7.2.1 Prueba de la catalasa (véase 2.7.1)**

### **2.7.2.2 Utilización anaeróbica de glucosa**

Se tomó crecimiento del microorganismo desarrollado en el agar nutritivo (2.5.1); se inocularon los tubos de medio de fermentación de glucosa (Apéndice 3) (al sembrarlos, el asa bacteriológica debe llegar al fondo de éstos); y se cubrió la superficie del agar con una capa de aceite mineral estéril (Apéndice 3), de al menos 2.5 cm de grosor. Los tubos se incubaron 5 días a 37 °C; al mismo tiempo se corrieron los controles (cepa pura de *S. aureus* y tubos sin inocular).

El cambio de coloración del medio —a amarillo, por el púrpura de bromocresol— denota la producción anaeróbica de ácido; se interpretó como resultado positivo el vire de color en todo el tubo.

### **2.7.2.3 Utilización anaeróbica de manitol**

Con el microorganismo desarrollado en el agar nutritivo (2.5.1), se inoculó el medio de fermentación de manitol (al igual que en el caso anterior, el asa debe alcanzar el fondo del tubo) (Apéndice 3). La superficie del agar se cubrió de inmediato con una capa de aceite mineral estéril, de al menos 2.5 cm de grosor, y los tubos se incubaron 5 días a 37 °C, se corrieron simultáneamente



los controles (cepa pura de *S. aureus* y tubos sin inocular).

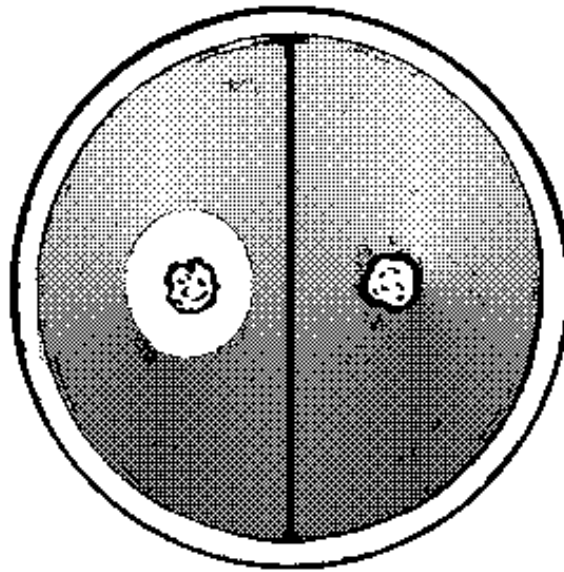
La producción anaeróbica de ácido conduce al cambio de color del medio (a amarillo, también por el púrpura de bromocresol). Sólo se consideró positivo el vire del indicador por todas partes del tubo.

Aunque en el *Food and Drug Administration bacteriological analytical manual* (U. S. FDA; 1995) se señala que algunas cepas de *S. aureus* son manitol negativas, Lynch y col. (1990) afirman que esta fermentación es característica de los microorganismos patógenos coagulasa positivos.

#### **2.7.2.4 Prueba de la DNasa**

Se tomó una asada del cultivo puro obtenido en el agar nutritivo (2.5.1) y, con la intención de generar un crecimiento denso, se sembraron en botón placas de agar DNasa (Oxoid, CM321). Las cajas se incubaron 18 h a 37 °C y después se inundaron con ácido clorhídrico 1 N; la cepa es DNasa positiva si se forman zonas de aclaramiento alrededor de los botones (Fig. 3).

El agar DNasa contiene ADN (Apéndice 3), y la DNasa microbiana hidroliza este último hasta una mezcla de mono y polinucleótidos. El ácido clorhídrico añadido reacciona con el nucleico del medio y forma un precipitado turbio (zona opaca). Por el contrario, las colonias productoras de DNasa están rodeadas de un sustrato con fragmentos nucleótidos que no precipitan con el clorhídrico (zona transparente) (Fig. 3).



*Prueba positiva Prueba negativa*

**Figura 3. Prueba de la DNasa, representación de los posibles resultados**

Algunas publicaciones indican una estricta conexión entre la actividad DNasa y la coagulasa. Por ejemplo, DiSalvo (1958), al trabajar con cepas de *S. aureus* procedentes de muestras clínicas (sangre, orina, tracto respiratorio, exudados y heces), observó que de 204 cepas probadas, 199 fueron DNasa y coagulasa positivas, en tanto que las otras 5 dieron resultados negativos en ambas determinaciones.

En cambio, Blair y col. (1967) examinaron 2415 colonias sospechosas de ser de *S. aureus* y hallaron que de las 1608 que habían sido DNasa positivas sólo 1385 fueron coagulasa positivas. Concluyeron que la prueba de la DNasa podía aplicarse para separar los microorganismos coagulasa negativos de los positivos, porque aun cuando no todos los DNasa positivos fueron coagulasa positivos,

ningún DNasa negativo fue coagulasa positivo (Oxoid, 1981).

*Bacillus subtilis*, *Clostridium septicum*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Pasteurella pestis*, *E. coli* y *Serratia marcescens* también producen DNasa (Lynch y col., 1990).

#### **2.7.2.5 Prueba de la termonucleasa**

En las cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas existe una estrecha correlación entre la coagulasa y la nucleasa termoestable. Por ejemplo, en un estudio realizado con 250 cepas enterotoxigénicas, 232 sintetizaron la primera, y 242, la segunda (Jay, 1992).

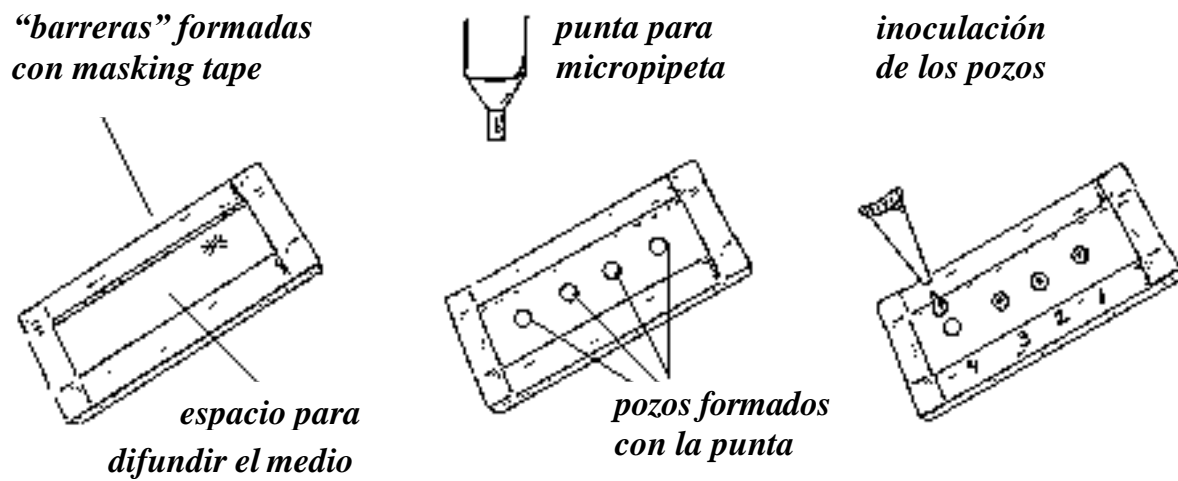
Se denomina nucleasa a un grupo de enzimas que despolimeriza los ácidos nucleicos (ADN y ARN) (Weller, 1997; Brock y Madigan, 1993). Éstas se encuentran en órganos animales —como el hígado, el páncreas o el timo—, semillas en germinación y cultivos microbianos (Osol, 1983).

Esta prueba busca evidenciar la DNasa termoestable de *S. aureus*. Entre las ventajas de usar esta enzima como indicador de la actividad y el crecimiento de dicho microorganismo están las listadas a continuación: se puede detectar más rápido que las enterotoxinas (horas, en relación a días) y sin necesidad de concentrar la muestra; aparentemente las células enterotoxigénicas la generan antes que a las enterotoxinas; es termoestable, al igual que estas últimas; y persistirá aunque las células bacterianas hayan sido destruidas por el calor, bacteriófagos o agentes químicos.

*S. epidermidis* y algunos micrococos producen nucleasa, pero ésta no es tan estable al calor como la de *S. aureus* (Jay, 1992).

### 2.7.2.5.1 Preparación del portaobjetos

Se tomaron portaobjetos limpios, se colocó *masking tape* en sus cuatro orillas —para poner barreras de cerca de 3 mm de altura (Fig. 4)— y se vertió el medio para la prueba de la termonucleasa (Apéndice 3) en los espacios obtenidos. Al solidificar el agar, se cortaron pozos de 2 mm de diámetro con las puntas estériles de 5 ml para micropipeta (6 a 8 pozos por portaobjetos).



**Figura 4. Termonucleasa, preparación del portaobjetos e inoculación de los pozos**

### 2.7.2.5.2 Realización de la prueba

Con una asada del microorganismo desarrollado en el agar nutritivo (2.5.1), se sembraron tubos de caldo infusión cerebro corazón (BHI) y se incubaron toda la noche. Éstos se colocaron subsiguientemente en un baño de agua hirviendo,

donde permanecieron 15 minutos. Una vez fríos, se utilizaron para inocular los pozos preparados con antelación (en cada uno se adicionó  $\approx 0.01$  ml del cultivo). Los portaobjetos se incubaron a 37 °C por 4 horas; para esto, se metieron junto con un poco de agua estéril dentro de cajas de Petri también estériles.

Cada prueba se efectuó por triplicado, se corrieron al mismo tiempo los controles positivos y negativos. Tanto en el agar DNA azul de toluidina (Apéndice 3) como en el medio para la prueba de la termonucleasa preparado en el laboratorio (Apéndice 3) se interpreta como reacción positiva el desarrollo de un halo rosa-morado extendido al menos 1 mm de la periferia del pozo.

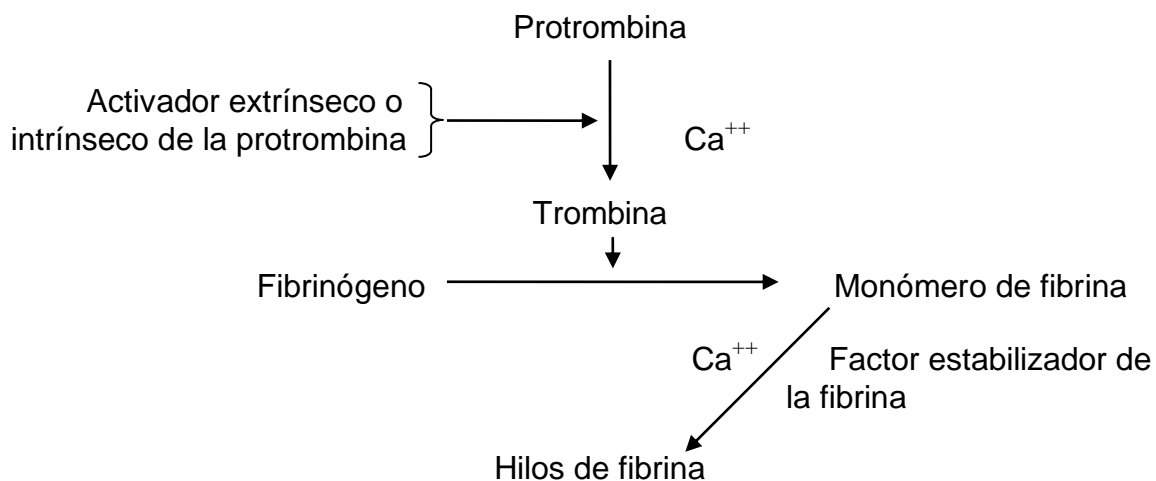
La prueba de la termonucleasa sirve de apoyo, en particular cuando la reacción de la coagulasa es 2+ (Fig. 5). Se dice que es tan específica como la de la coagulasa, pero es menos subjetiva que esta última al implicar un cambio de color de azul a rosa brillante (U. S. FDA, 1995).

## **2.7.2.6 Prueba de la coagulasa**

### **2.7.2.6.1 Bases y fundamento**

#### **2.7.2.6.1.1 ¿Qué es y cómo se obtiene el plasma humano?**

La sangre —un tejido que circula dentro del sistema virtualmente cerrado de los vasos sanguíneos, y que está compuesto por plasma (líquido de mantenimiento de las células en suspensión) y elementos figurados (plaquetas, leucocitos y eritrocitos)— coagula cuando el fibrinógeno, una proteína plasmática soluble, se transforma en fibrina, un material compuesto de fibras que forman redes en las que se retienen sus elementos figurados (Diagrama 2).



**Diagrama 2. Esquema de la conversión de protrombina en trombina y de la polimerización del fibrinógeno para formar hilos de fibrina (Gayton, 1987)**

Formado el coágulo, los hilos de fibrina se contraen gradualmente y expulsan un líquido claro (suero), con poco o nada de fibrinógeno, ya que éste se ha convertido en fibrina. Si se centrifuga sangre a la cual se ha agregado un anticoagulante apropiado, las células se depositan en el fondo del tubo, mientras que el plasma, de color pajizo y sólo separable de ellas cuando se evita la coagulación, queda por encima y puede decantarse (Gayton, 1975 y 1987; Harper, 1969).

Los oxalatos, los citratos y el EDTA —los principales anticoagulantes extravasculares— evitan que el ión calcio participe en la conversión de protrombina en trombina (Diagrama 2). El EDTA, por ejemplo, forma complejos con él. En cuanto al oxalato y al citrato de calcio obtenidos al utilizar las otras sales, el primero precipita y el segundo, aunque soluble, se halla por completo no ionizado.

Si la sangre va a ser usada en transfusiones, deberá emplearse citrato en vez de oxalato; este último es muy tóxico, en tanto que el primero puede ser metabolizado por el paciente y eliminado de la sangre transfundida, la cual coagulará de nuevo de manera normal (Gayton, 1987; Harper, 1969; Keenan y col., 1985).

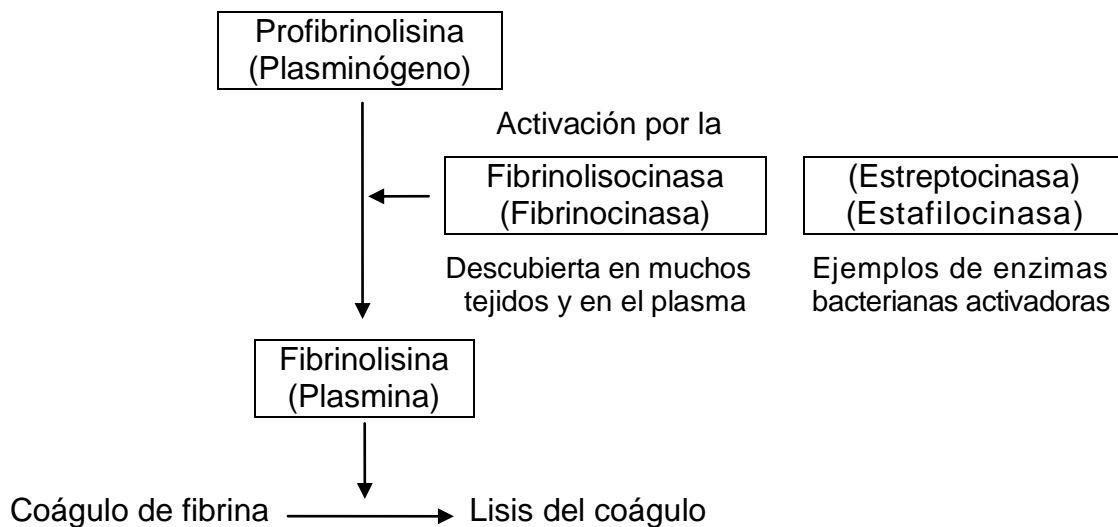
#### **2.7.2.6.1.2 ¿Qué es la enzima coagulasa y cómo se determina?**

Para colocar una barrera y evitar la diseminación de microorganismos dentro del cuerpo, en las regiones donde existe la posibilidad de una invasión microbiana se forman con frecuencia coágulos de fibrina (por eso ocurre la inflamación de cualquier tejido que sufre algún daño). Varios microorganismos son capaces de producir enzimas fibrinolíticas, como la estreptocinasa (de origen estreptocócico), que al disolver dichos coágulos permiten una invasión adicional (Diagrama 3). Otros, en cambio, producen enzimas que favorecen la coagulación de la fibrina y son responsables de la circunscripción de los microorganismos a un lugar determinado (y no de su dispersión), lo que los protege de la fagocitosis; la más estudiada de estas últimas es la coagulasa, tal vez la culpable de que se encuentren localizadas muchas infecciones estafilocócicas, como los forúnculos y las espinillas (Harper, 1969; Gayton, 1975; Brock y Madigan, 1993; Baker y Breach, 1990).

La coagulasa puede estar “unida o ligada” o “libre”; en el primer caso, la prueba en laminilla o portaobjetos la pone de manifiesto, y en el segundo, la efectuada en tubo. La mayoría de los estafilococos patógenos posee ambas formas de coagulasa y sólo de modo ocasional produce una u otra. Si el

microorganismo es autoaglutinable en solución salina, no es aplicable la prueba en laminilla, que depende de la agregación o aglutinación inmediata visible, por lo que si se realiza esta última, se recomienda efectuar la otra con los estafilococos que resulten negativos (Banwart, 1982; Baker y Brech, 1990; Lynch y col., 1990).

Como la coagulasa no afecta el plasma de algunos animales, se ha postulado la existencia de un factor llamado “activador” en el de aquellos en que su presencia es demostrable; el plasma humano y el de conejo lo poseen y pueden ser usados para la determinación (Lynch y col., 1990), este último se prefiere al de humano, que puede contener sustancias inhibitoras de la reacción (Finegold y Baron, 1991). Además, se recomienda el plasma oxalatado, o con EDTA, por encima del citrado, ya que pueden obtenerse pruebas coagulasa positiva falsas debido a los microorganismos que utilizan el citrato (Banwart, 1982).



**Diagrama 3. Sistema fibrinolítico (Harper, 1969). También existen inhibidores de la activación del plasminógeno (no representados)**



### **2.7.2.6.2 Procedimiento de la prueba de la coagulasa**

Para esta determinación se empleó la prueba en tubo (véase 2.7.2.6.1.2).

#### **2.7.2.6.2.1 Preparación del reactivo**

##### **a) Para las cepas de los pozoles 1, 2, 13 y 14**

El reactivo de Bacto coagulasa plasma con EDTA (Difco, 0803-46-5) se rehidrató con agua destilada estéril y se adicionaron (con puntas estériles) 0.5 ml de éste a los tubos de prueba, también estériles.

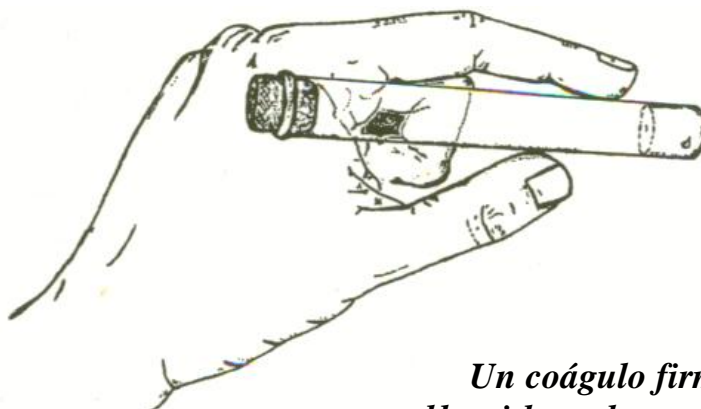
##### **b) Para todas las cepas**

En los tubos de prueba estériles, se mezclaron cuidadosamente 1 ml de plasma (obsequiado por el cepario de la Facultad de Química) con 1 ml de solución salina estéril al 0.85%.

#### **2.7.2.6.2.2 Realización de la prueba de la coagulasa**

Se tomó una asada del microorganismo desarrollado en el vial de agar nutritivo (2.5.1), se sembraron tubos de caldo infusión cerebro corazón (BHI) y se incubaron toda la noche a 37 °C. Con la micropipeta de 0.1 ml, se adicionaron dos gotas del crecimiento en caldo BHI a los tubos de plasma ya preparados (2.8.2.6.1); se mezclaron con cuidado y se mantuvieron en un baño a 37 °C por 4 h (en los que no se formó un coágulo en ese tiempo, fue necesario reincubar y reexaminar a las 24 h). Los tubos se examinaron cada hora con movimientos suaves, porque si se sacudían se corría el riesgo de romper el coágulo (falso negativo). En la figura 5 se halla representada la prueba positiva (4+). Una coagulación parcial (3+ o 2+) deberá analizarse otra vez.

Se corrieron como controles tubos sin inocular y tubos inoculados con una cepa pura de *S. aureus*, proporcionada amablemente por el cepario de la Facultad de Química.



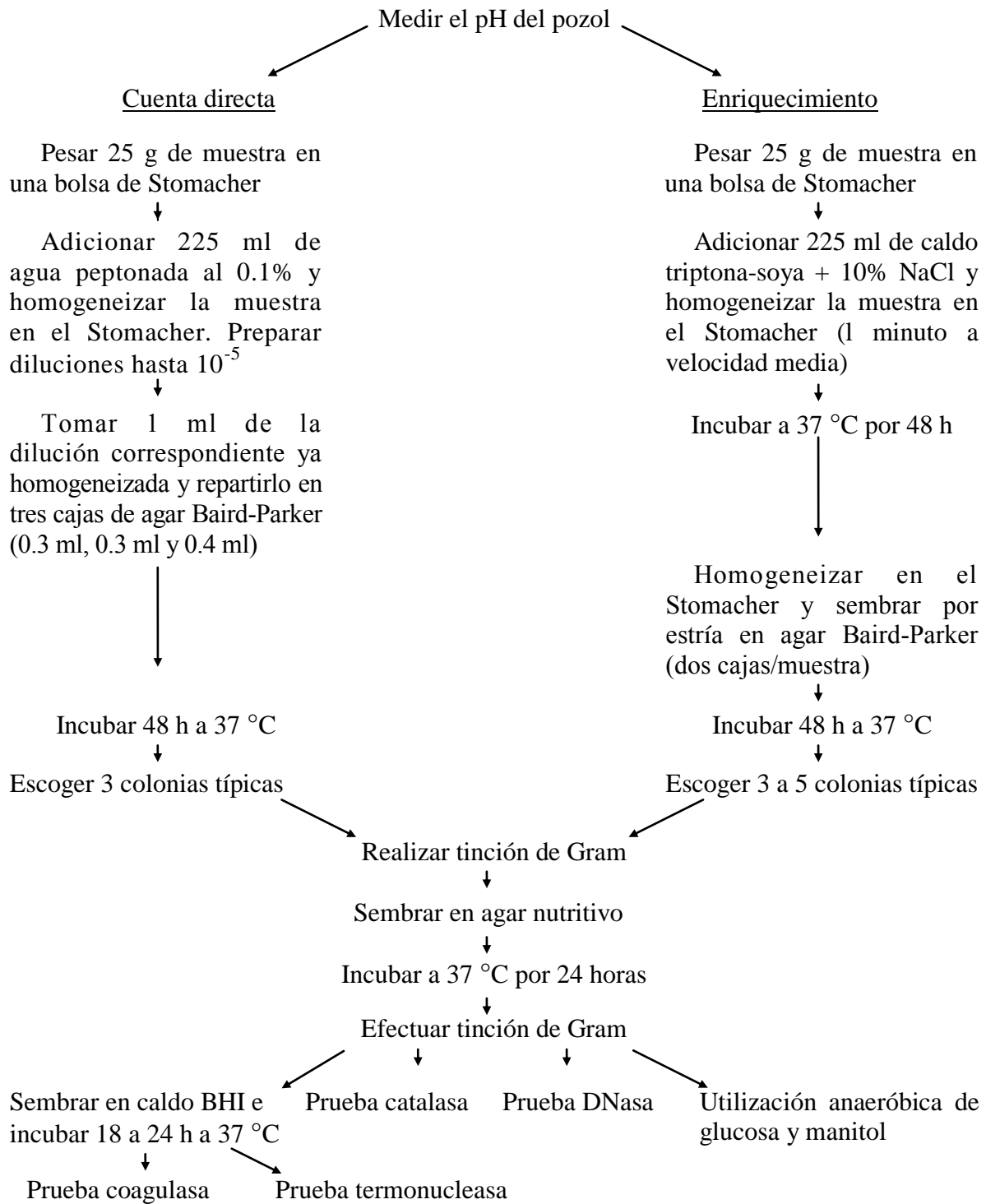
*Un coágulo firme, completo y adherido a las paredes, que permanece en su lugar cuando el tubo se inclina o invierte, se considera prueba positiva (4+); otros resultados quedarían entre este valor y el del plasma “intacto” (0)*

**Figura 5. Representación del resultado de la coagulasa**

En el Diagrama 4 se muestra la metodología seguida y en la Tabla 1 aparecen las características típicas de *S. aureus*, *S. epidermis* y los micrococos.

**Tabla 1. Características típicas de *S. aureus*, *S. epidermis* y los micrococos (U. S. FDA, 1995)**

Características	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermis</i>	Micrococos
Actividad catalasa	+	+	+
Producción de coagulasa	+	-	-
Producción de termonucleasa	+	-	-
Utilización anaeróbica de glucosa	+	+	-
Utilización anaeróbica de manitol	+	-	-



Se siguió la metodología del *Food and Drug Administration bacteriological analytical manual* (U. S. FDA, 1995) para realizar las pruebas bioquímicas.

**Diagrama 4. Detección y cuantificación de *S. aureus* en pozol**

### **2.7.3 *Bacillus cereus* (Metodología propuesta para cada cepa por analizar)**

#### **2.7.3.1 Prueba de la catalasa (véase 2.7.1)**

#### **2.7.3.2 Suspensión Bc**

Una asada del microorganismo desarrollado en el vial de agar nutritivo (2.5.2) se transfirió a un tubo con 0.5 ml de buffer fosfato Butterfield diluido en agua (Apéndice 3). La suspensión se homogeneizó en el Vortex mixer y se utilizó para inocular por duplicado los medios confirmatorios. Como control, en todas las pruebas se sembró una cepa pura de *B. cereus*.

#### **2.7.3.3 Caldo lisozima (Apéndice 3)**

Con una asada de dicha suspensión (2.7.3.2), se inocularon 2.5 ml de caldo lisozima (al 0.001%) y 2.5 ml de caldo nutritivo (control sin lisozima). Los tubos se incubaron 24 h a 37 °C; los negativos debieron reincubarse 24 h más antes de desecharlos. Al final, se registró el crecimiento como positivo o negativo.

En cada corrida se incubaron, también como controles, tubos de caldo lisozima y de caldo nutritivo sin inocular.

#### **2.7.3.4 Caldo nitrato (Difco, 0268-17-8)**

Los tubos con 5 ml de caldo nitrato se inocularon con una asada de la suspensión Bc (2.7.3.2) y se incubaron 24 h a 37 °C. Al terminar dicho periodo de incubación, a cada cultivo se le adicionaron 0.25 ml de los reactivos A y C para la

prueba de nitrito (Apéndice 3); un color naranja, visible en menos de 10 minutos, pone de manifiesto la reducción del nitrato. Este método se basa en la diazoación (o diazotación) del ácido sulfanílico con el nitrito formado y en su posterior copulación con el  $\alpha$ -naftol para formar un compuesto azo coloreado.

### **2.7.3.5 Voges Proskauer modificado (Apéndice 3)**

Con una asada de la suspensión antes mencionada (2.7.3.2), se inocularon 5 ml del medio de Voges Proskauer modificado. Al terminar el periodo de incubación (48 h  $\pm$  2 h a 37 °C), se adicionó con la micropipeta 1 ml del cultivo a un tubo de prueba estéril; a este último se le pipetearon 0.6 ml de la solución  $\alpha$ -naftol (Apéndice 3) y 0.2 ml de KOH al 40% (Apéndice 3), y la mezcla se agitó perfectamente; se pueden agregar unos cristales de creatinina (Creatinina C.P. anhidra, LYM). El resultado es positivo si después de mantener los tubos 1 h a temperatura ambiente se genera un color rosa a violeta (se ha producido acetil metil carbinol).

### **2.7.3.6 Agar tirosina (Apéndice 3)**

La superficie entera del agar tirosina (agar inclinado) se inoculó con una asada de la suspensión referida como Bc (2.7.3.2). Los tubos se incubaron 48 h a 37 °C y en ellos se investigó si había una zona clara cerca del crecimiento (ésta denota la descomposición del aminoácido tirosina). Antes de desecharlos, permanecieron en incubación un total de 7 días.

### **2.7.3.7 Agar MYP y agar *Bacillus cereus* (Apéndice 3)**

Ambos se sembraron por agotamiento y las cajas se incubaron a 37 °C por 24 h. Un precipitado alrededor del desarrollo bacteriano señala la producción de lecitinasa; si el medio se torna amarillo, se ha fermentado el manitol. *B. cereus* es lecitinasa positivo y manitol negativo.

Este paso puede omitirse si en las placas originales no hay interferencia de otros microorganismos. En el caso del pozol, la microflora es tan compleja que sí hubo una gran interferencia y fue necesario resembrar.

### **2.7.3.8 Caldo rojo de fenol-glucosa (Apéndice 3)**

Con una asada de la suspensión Bc (2.7.3.2), se inocularon 3 ml de caldo rojo de fenol-glucosa. Los tubos se incubaron por 24 h a 37 °C en una jarra de anaerobiosis. Luego de ese tiempo, se agitaron vigorosamente y se buscó si había habido crecimiento, indicado por un aumento en la turbidez y un cambio de color del medio de rojo a amarillo; esto último, por la producción anaeróbica de ácido a partir de la glucosa.

### **2.7.3.9 Medio de movilidad (Apéndice 3)**

Se inoculó el medio de movilidad (Apéndice 3) perforando el centro con una asada de la suspensión Bc (2.7.3.2); los tubos se incubaron a 29 °C por 18 a 24 h, y se observó el tipo de crecimiento a lo largo de la línea de perforación. Si éste era difuso y llegaba lejos de dicha línea, el microorganismo era móvil. Si, por el contrario, sólo había crecimiento en y a lo largo de esta última, el organismo no era

móvil.

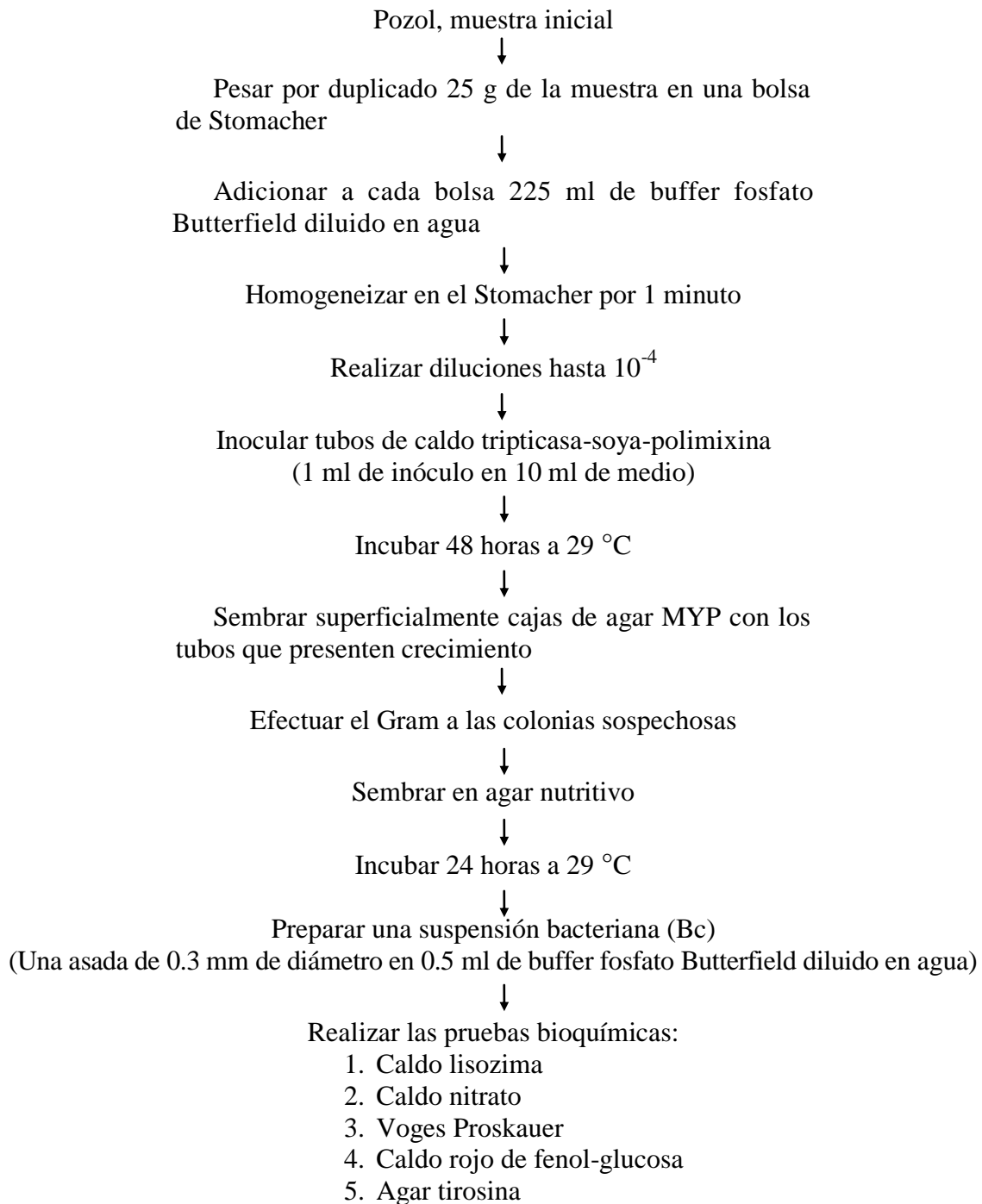
La mayoría de las cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* es móvil, gracias a flagelos peritricos. *B. anthracis* y casi todas las cepas de *B. cereus* var. *mycoides* son no móviles; algunas de las de *B. cereus*, también.

En la Tabla 2 aparecen las características típicas de *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. cereus* var. *mycoides*. En los diagramas 5 y 6 se muestra la metodología seguida para la detección de *B. cereus*.

**Tabla 2. Características típicas de *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* var. *mycoides* (U. S. FDA, 1995)**

	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> *	<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i>
Gram	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+
Movilidad	+	±	±	–
Reducción de nitrato	–	+	±	+
Descomposición de tirosina	±	+	±	±
Resistencia a lisozima	–	+	+	+
Reacción con yema de huevo	–	+	+	+
Utilización anaeróbica de glucosa	–	+	+	+
Reacción de Voges Proskauer	–	+	+	+
Fermentación de manitol	+	–	–	–
Hemólisis	–	–	+	+

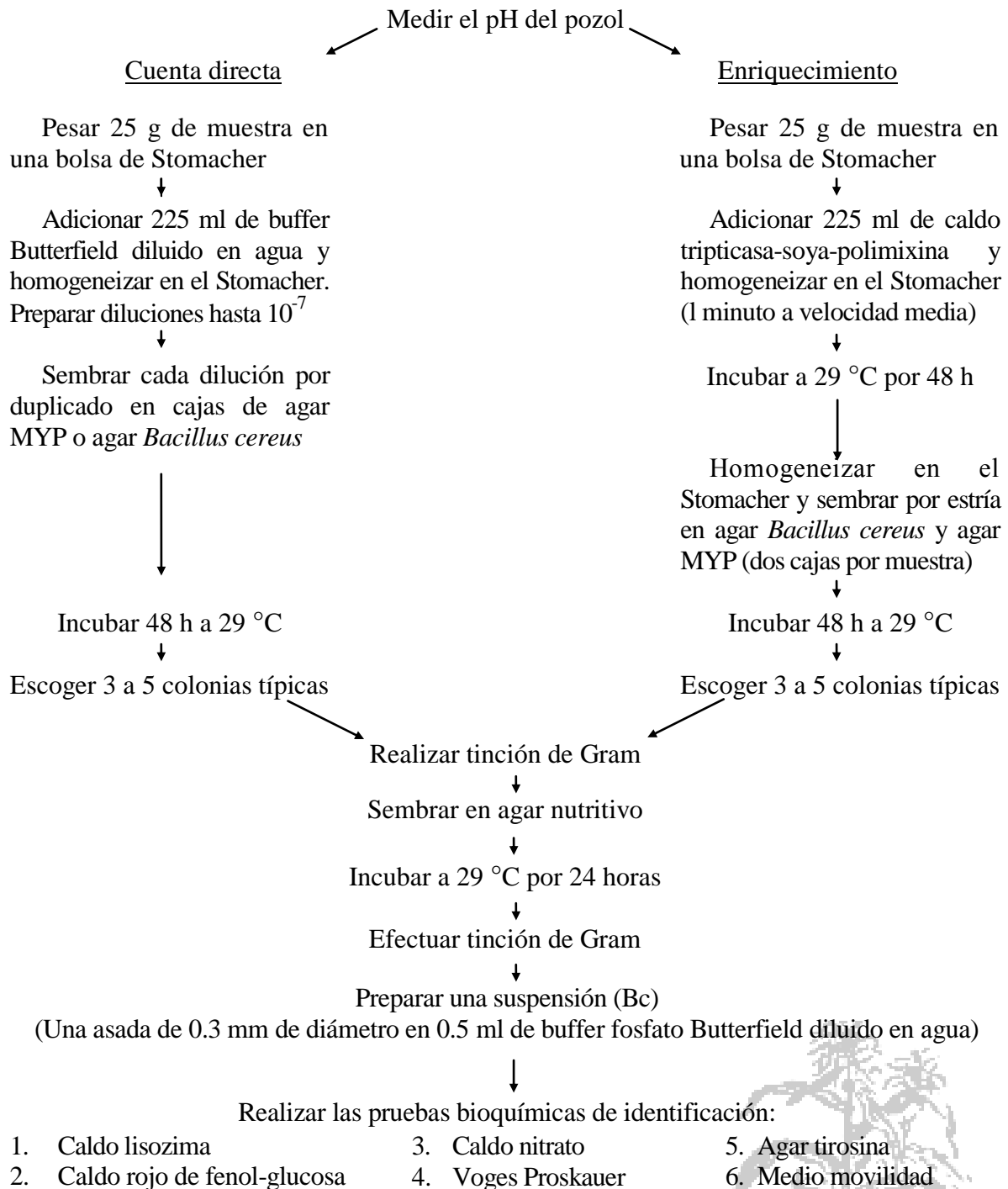
\**B. thuringiensis* es patógeno para insectos.



Para llevar a cabo las pruebas bioquímicas, se siguió la metodología del *Food and Drug Administration bacteriological analytical manual* (U. S. FDA, 1995).

**Diagrama 5. Detección de *B. cereus* (pozoles 3 y 4)**





Se siguió la metodología del *Food and Drug Administration bacteriological analytical manual* (U. S. FDA, 1995) para efectuar las pruebas bioquímicas.

**Diagrama 6. Detección y cuantificación de *B. cereus* (pozoles 5 a 14)**

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Encuestas

Tabasco se divide en diecisiete municipios, la base de la división territorial y político-administrativa de las entidades federativas. En el Centro (Número 4, Figura 6) se encuentra su capital, Villahermosa (Censo, 1990). Todas las muestras analizadas en este trabajo se adquirieron en diferentes expendios de esa ciudad; no obstante, las bolas 5, 12 y 13 habían sido elaboradas con anterioridad en Nacajuca (el productor tardaba de 1 a 1.5 h en ir desde su casa hasta el mercado Pino Suárez de Villahermosa).

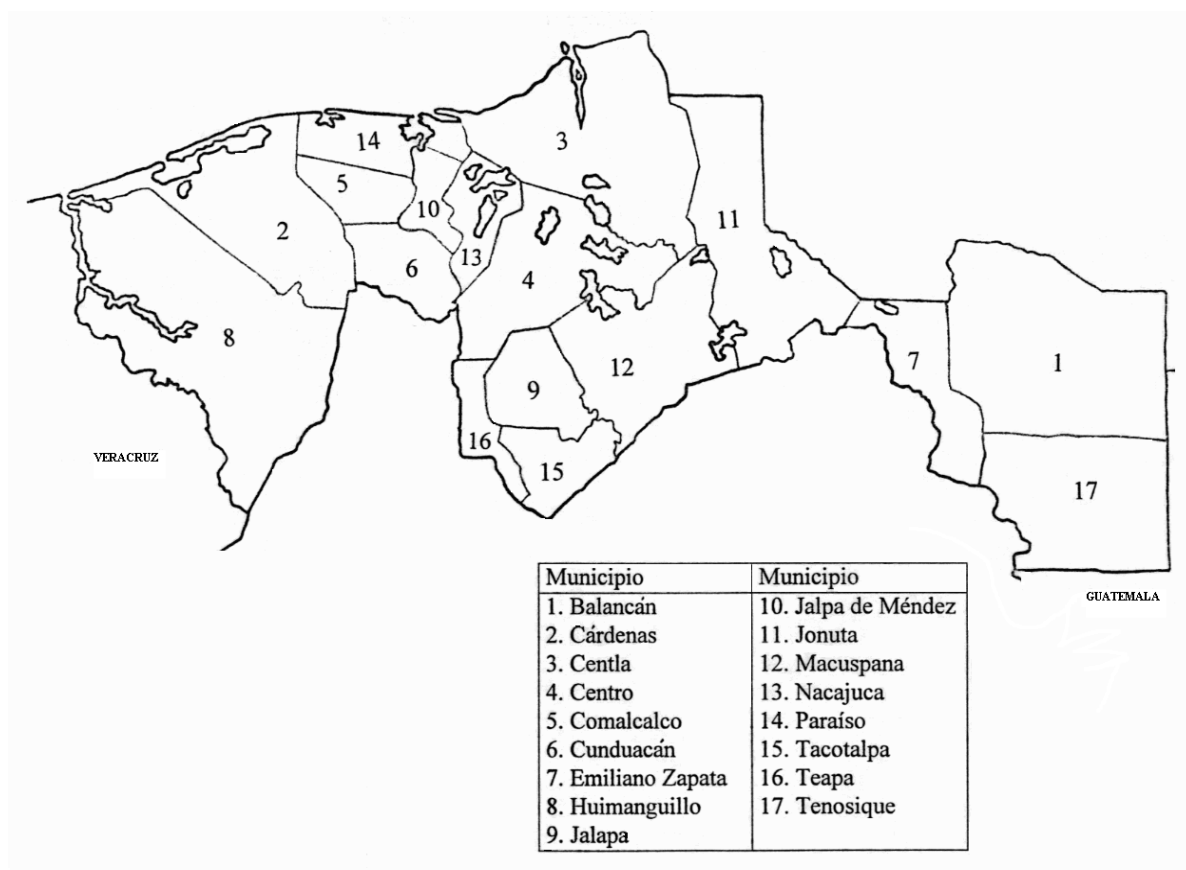


Figura 6. Tabasco y sus municipios

Se realizaron encuestas para las últimas diez muestras recibidas, recolectadas entre finales de febrero y mediados de mayo de 1997 (el número asignado corresponde al orden de su llegada). Las bolas de pozol se compraron de preferencia en mercados (únicamente la número 8 se adquirió en un local apartado de éstos). Aunque los datos obtenidos (Tabla 3) no proporcionan información suficiente sobre las condiciones higiénicas de la producción y venta del pozol, se efectuó un análisis comparativo de los distintos parámetros evaluados, el cual indicó que éstas por lo común no son buenas.

Salvo en los de las muestras 8 y 11, se reporta gran tránsito de personas en los locales. Esto es importante por la generación de corrientes de aire que ponen en movimiento microorganismos (como los proyectados al exterior en forma de aerosoles, cuando hablamos, tosemos o estornudamos), esporas, células vegetales, pelo, polen, polvo, etcétera. Como apunta Banwart (1982), a pesar de que la incidencia de la gente sobre la concentración de microorganismos en el aire libre es casi nula, no puede decirse lo mismo en los establecimientos donde se procesan alimentos.

El polvo arrastrado por el viento transporta poblaciones significativas de microbios que pueden viajar a lo largo de grandes distancias. La mayoría de éstos sobrevive pobremente en el aire; sin embargo, *Staphylococcus* resiste bastante bien las condiciones de sequedad y puede supervivir en el polvo durante largos períodos de tiempo (Brock y Madigan, 1993).

En el local donde se compró la muestra 11 se señala la presencia de insectos, sin especificarse su tipo. Según Banwart (1982), todos transportan microorganismos, pero la mosca constituye un serio vector de enfermedades —

mucho más que cualquier otro tipo de insecto común—, al contaminar los alimentos no sólo por sus excreciones, sino también por contacto, ya que recoge organismos en sus velludas patas; ésta es en parte responsable de la difusión de *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Escherichia* y otros.

En referencia a las instalaciones donde se expende el pozol, y donde en algunos casos éste además se elabora, las características son muy diversas: puede tratarse de una mesa colocada en el pasillo de un mercado (bolas 5, 12 y 13), hasta de locales bien establecidos (véase la Tabla 3). Así, los de las muestras 7, 10 y 11 no tienen puertas, techos ni ventanas; los de los pozoles 6, 9 y 14 están mal ventilados; el de la muestra 8 está bien establecido y en apariencia bien ventilado.

Se dice que la densidad microbiana ambiental es proporcional al número de personas que ocupa un espacio cerrado, su actividad y la ventilación del lugar; la flora microbiana del aire en una planta de procesamiento de alimentos traduce las condiciones sanitarias de sus instalaciones (Banwart, 1982).

Los locales de las muestras 6 a 14 se limpian con agua y jabón, pero en los de las bolas 7, 8 y 10 a veces utilizan adicionalmente desinfectantes comerciales o cloro.

Lo único empleado para enjuagar los molinos destinados a la preparación de la masa de nixtamal es agua (véase la Tabla 3). El que ésta sea de la llave y se almacene con frecuencia en recipientes abiertos también se relaciona con la contaminación bacteriana, así como la existencia de espacios muertos en los molinos, en los cuales algunas bacterias indeseables podrían mantenerse (Caparelli y Mata, 1975; Wachter, 1995).

Las principales fuentes de microorganismos son el remojo y la molienda,

**Tabla 3. Datos obtenidos a partir de las encuestas realizadas en los expendios de Villahermosa, Tabasco**

<b>Procedencia de la muestra</b>	<b>Higiene del personal</b>	<b>Instalaciones de los locales</b>	<b>Abastecimiento de agua</b>	<b>Equipos y utensilios empleados</b>
<b>Mercado Pino Suárez Señora de Nacajuca Muestras 5, 12 y 13</b>	Limpieza aparente en ropa y manos. Tránsito de personas.	Puesto constituido por una mesa ubicada en un pasillo del mercado.	No se tienen datos.	Leña para la cocción y un molino.
<b>Mercado Pino Suárez Pozolería 2 Muestra 6</b>	Limpieza aparente en ropa y manos. Tránsito de personas.	Piso de mosaico, techo de madera y paredes de cemento. Sin puertas ni ventanas. Aseo con agua y jabón.	Agua de la llave, almacenada en recipientes de plástico.	Gas y un molino que se aseá enjuagándolo con agua. Se recibe la masa en una lámina anexa al molino.
<b>Mercado Pino Suárez Pozolería 3 Muestra 7</b>	Limpieza aparente en ropa y manos. Tránsito de personas.	Piso de cemento. No hay puertas, techo ni ventanas. Aseo con agua y jabón, a veces con algún desinfectante comercial.	Agua de la llave.	Gas y un molino aseado enjuagándolo con agua. Reciben la masa en un plástico.
<b>Pozolería “La flor del maíz” Muestra 8</b>	Limpieza aparente en ropa y manos. Poco tránsito de personas.	Local apartado del mercado. Con puertas y ventanas. Piso, techo y paredes de cemento. Aseo con agua y jabón, en ocasiones con un desinfectante comercial.	Agua corriente.	Un fogón y un molino. La masa se recibe en charola de lámina. El pozol se vende en una mesa dentro de una vitrina de cristal.
<b>Mercado Pino Suárez Junto a carnicerías Muestras 9 y 14</b>	Limpieza aparente en ropa y manos. Tránsito de personas.	Piso de mosaico, techo de madera y paredes de cemento. Mala ventilación. Aseo con agua y jabón.	Agua de la llave, almacenada en cubetas.	Gas y un molino que se enjuaga con agua. Reciben la masa en recipientes de lámina.
<b>Mercado Pino Suárez Pozolería 1 Muestra 10</b>	Limpieza aparente en ropa y manos. Tránsito de personas.	Piso de mosaico. No hay techo, puertas ni ventanas. Aseo con agua y jabón, a veces con cloro.	Agua de la llave.	Gas y un molino. Se recibe la masa en recipientes de plástico.
<b>Mercado Atasta Muestra 11</b>	Limpieza aparente en ropa y manos. Poco tránsito de personas.	Piso de cemento. No tiene techo, puertas ni ventanas. Presencia de insectos. Aseo con agua y jabón.	Agua corriente.	Gas y un molino enjuagado con agua. Reciben la masa en recipientes de plástico.

mas la elaboración de las bolas y su envoltura en hojas de plátano —por el contacto de la masa con la superficie de trabajo, con las manos del productor y con las hojas mismas— favorecen la adición de organismos no deseados, entre los cuales podría estar *S. aureus*.

### **3.2 Determinación del peso de la muestra**

Todas las bolas pesaron cerca de un kilogramo; por tanto, dicha magnitud fue relativamente homogénea y ejerció la misma influencia en la acidificación.

### **3.3 Determinación del pH**

#### **3.3.1 En masas de nixtamal elaboradas en Tabasco para la producción de pozol de cacao (chorote)**

Las primeras cuatro muestras recibidas fueron de pozol de cacao. En la Tabla 4 aparecen los resultados de la medición del pH al inicio del proceso fermentativo.

**Tabla 4. pH de las masas de nixtamal elaboradas en Tabasco para la producción de pozol de cacao (chorote)**

Muestra	pH
1	5.8
2	5.3
3	4.2
4	4.4

El tiempo promedio entre la compra y el análisis de las bolas fue de 4 h; empero, el pH de éstas resultó menor a lo esperado. Por ejemplo, Wachter (1995)

no obtuvo un pH inferior a 4.8 sin antes fermentar el pozol por más de 12 h en una incubadora (a 28 °C) o por varios días a temperatura ambiente (18 a 20 °C).

De acuerdo con Ulloa (1974), en la elaboración de este alimento la masa tiene un pH inicial de 6.8, y este valor disminuye gradualmente hasta 3.9 al octavo día. [Como el pH de los granos de maíz ( $\approx 5.9$ ) aumenta a 7.5 por el tratamiento en agua con cal (de pH 11.75), Ulloa atribuyó el pH de 6.8 de la masa de maíz nixtamalizado a que en la molienda los granos se mezclan de manera más homogénea.]

También Escamilla-Hurtado y Mozqueda-González (1992) reportaron en pozol tipo mestizo elaborado en su laboratorio un valor inicial de pH de  $\approx 6.8$ . Este último llegó a  $\approx 5.4$  a las 42 horas, y a  $\approx 3.9$ , después de 4 días (una porción de 50 g de masa inoculada se consideró una unidad de fermentación).

Posteriormente, Cabra (2000) halló en muestras tabasqueñas un pH inicial de 7.5, que descendió a 4.1 en 74 horas (durante las primeras 26 bajó hasta  $\approx 4.4$ ); y Díaz-Ruiz y col. (2003), uno de 7.4, que disminuyó a 4.4 a las 72 horas de fermentación (en este último estudio, el pozol se dividió en porciones de 100 g y se incubó a 30 °C).

### **3.3.2 Cambio del pH con la acidificación del pozol blanco**

Para seguir el proceso fermentativo, se determinó el pH de diez muestras de pozol blanco al llegar al laboratorio, a las 48 h y a los 7 días de fermentación (Tabla 5 y Gráfica 1).

**Tabla 5. pH de las muestras de pozol blanco incubadas a 29 °C**

Muestra	pH inicial	pH 48 h	pH 7 días
5	4.9	ND	3.7
6	6.7	4.3	ND
7	5.7	4.4	4.3
8	5.0	4.8	3.9
9	4.8	4.2	3.9
10	5.8	4.2	3.6
11	5.0	3.9	3.9
12	4.9	3.9	3.9
13	4.8	4.1	3.9
14	5.0	4.2	3.8

ND = No determinado

La temperatura afecta la acidificación. En Tabasco, esta propiedad intensiva varía de los 20 °C en diciembre y enero, a los 40 °C en verano (Padilla-Couttolenc y col., 1985); *S. aureus* y *B. cereus* pueden desarrollarse bien en esas temperaturas. [El primero crece entre 7 y 47.8 °C (con un óptimo de 35 a 39 °C). La temperatura mínima de crecimiento del segundo es en general de 10 a 20 °C; la óptima, de 30 a 35 °C, y la máxima, de 35 a 40 °C, con casos extremos de 49 a 50 °C (Banwart, 1982)]. En la presente investigación, las bolas de pozol se incubaron a 29 °C; cabe suponer que la temperatura interior de éstas fuera igual a la exterior.

### **3.3.2.1 Valores iniciales de pH**

El pH inicial de la muestra 6 era el mayor de todos (6.7); casi el referido por Ulloa (1974) y Escamilla-Hurtado y Mozqueda-González (1992) para la masa



al inicio de la fermentación (6.8). Al llegar al laboratorio, los demás pozoles tenían un pH entre 4.8 y 5.8 (uno, de 5.8; otro, de 5.7; tres, de 5; dos, de 4.9; y los últimos dos, de 4.8); es decir, había una unidad de diferencia entre el menor y el mayor de éstos.

Las bolas 5, 9, 12 y 13 estaban en el rango de pH más bajo (4.8 a 4.9), posiblemente debido a que la quinta, la doceava y la treceava muestras fueron elaboradas en Nacajuca (el productor recorre un largo trayecto para llevar su mercancía a Villahermosa) y a que con el noveno pozol se nos presentó un problema técnico y lo recibimos en promedio un poco más tarde que los otros nueve.

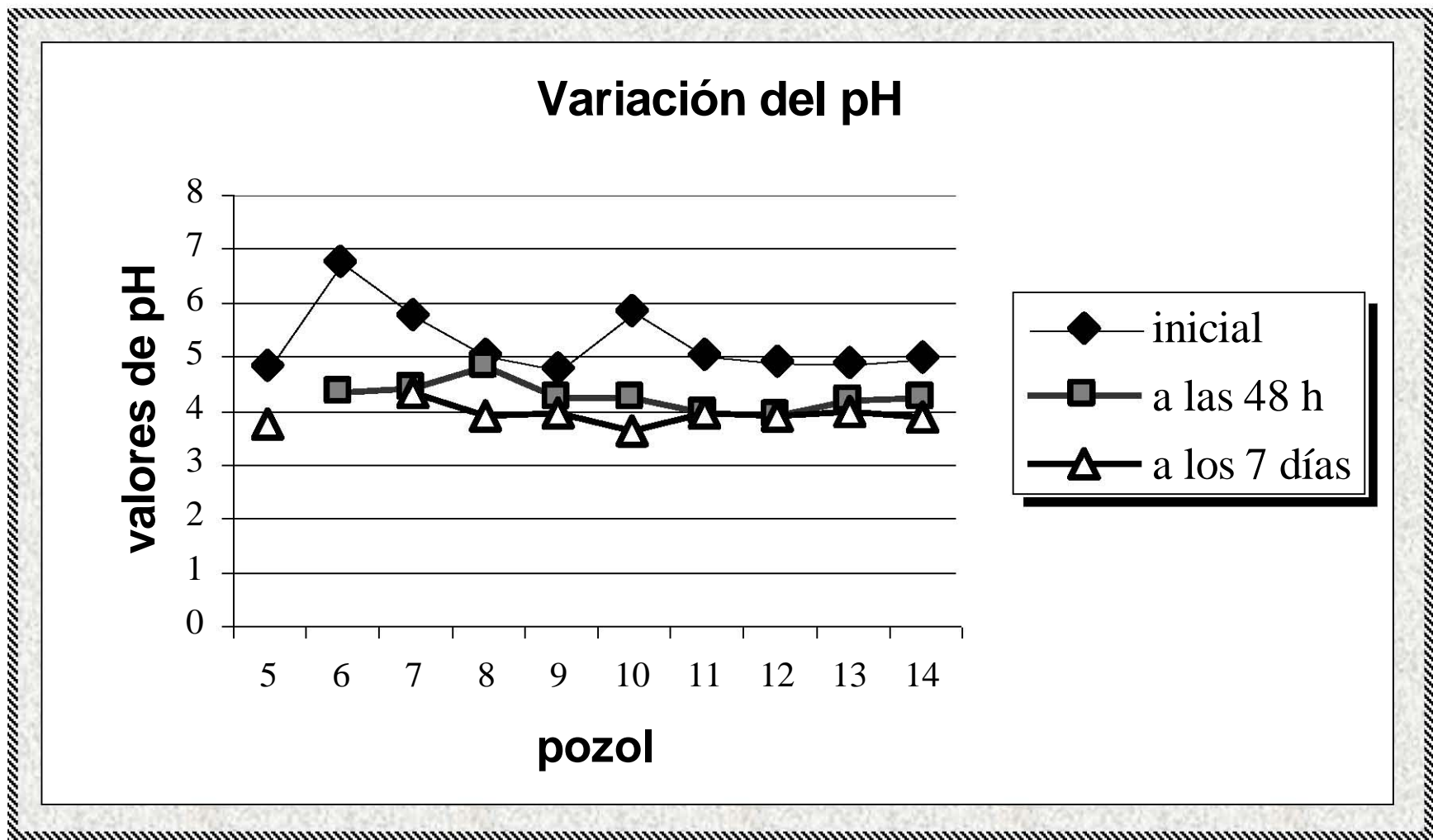
### **3.3.2.2 pH a las 48 horas**

Dichos valores se encontraban entre 4.8 y 3.9 —otra vez (véase la sección 3.3.2.1), cerca de una unidad de diferencia— y eran bastante independientes del pH inicial. El pH 48 h más alto era el de la muestra 8 (Tabla 5 y Gráfica 1); el más bajo lo tenían las bolas 11 y 12; los demás estaban entre 4.4 y 3.9.

### **3.3.2.3 Valores de pH a los 7 días de fermentación**

Éstos iban de 4.3 a 3.6 (3.9 se repitió cinco veces); la distancia entre ellos fue menor que en las otras dos determinaciones. Los pozoles 7, 11 y 12 ya no disminuyeron el pH mostrado a las 48 horas de fermentación; los demás sí, entre 0.9 y 0.2 unidades. El pH más alto fue el de la muestra 7 (4.3).

El pH final reportado por Ulloa (1974) y Escamilla-Hurtado y Mozqueda-González (1992) fue de 3.9; Wachter (1995) no obtuvo ningún valor inferior a 4



Gráfica 1. Valores de pH obtenidos al inicio, a las 48 horas y a los 7 días de fermentación del pozol incubado a 29 °C

al trabajar con bolas de pozol tradicional chiapaneco, aun después de un tiempo prolongado de incubación.

En suma, el mayor valor de pH fue el de 6.7 (Mi 6); y el menor, el de 3.6, alcanzado a los 7 días (véase la número 10, tabla 5). La acidificación inicial es importante para poder eliminar con rapidez a los microorganismos patógenos.

### **3.4 Determinación de la presencia o ausencia de *B. cereus* y *S. aureus***

Las primeras cuatro muestras recibidas (pozol de cacao o chorote) se emplearon para fijar la presencia o ausencia de *S. aureus* (bolas 1 y 2) o de *B. cereus* (números 3 y 4) al inicio del proceso fermentativo. Las siguientes diez (pozol blanco), para investigar si dichas bacterias estaban al comienzo de la fermentación y si sobrevivían a ésta.

#### **3.4.1 Aislamiento e identificación de *Bacillus cereus* en masas de nixtamal elaboradas en Tabasco para la producción de chorote (pozol de cacao)**

*B. cereus* no se detectó en los chorotes 3 y 4 (Tabla 6 A), pero se requería de un mayor número de muestras para ofrecer un resultado representativo, por lo que se analizaron otras diez (sección 3.4.2). Además, debía cuantificarse en caso de ser encontrado, pues tanto el síndrome emético como el diarreico se asocian por lo general con una concentración de entre  $10^5$  y  $10^9$  células/g (la de este último síndrome es ligeramente mayor que la del primero) (Jay, 1992).

Junto con otras especies del mismo género, *Bacillus cereus* forma parte de la microflora de los tejidos vegetales y se desarrolla bien en alimentos ricos en

almidón. Ya que sus esporas poseen una resistencia al calor típica de otros mesófilos (Jay, 1992), *B. cereus* tal vez soporte la nixtamalización, pero si desaparece en ésta podría incorporarse en algún otro paso del proceso de elaboración del pozol. [Salinas lo aisló en 1958; y Rivera, en 2001. Asimismo, en una investigación efectuada en un pueblo de Guatemala, Caparelli y Mata (1975) lo localizaron en tortillas preparadas con masa de maíz nixtamalizado.]

Pese a que normalmente se acepta que este microorganismo crece en un intervalo de pH de 4.9 a 9.3 (Jay, 1992) —y a que los potenciales de hidrógeno de los dos chorotes analizados ya estaban por debajo de 4.4—, tiene cabida mencionar que (i) Raevuori y Genigeorgis (1975) sostienen que ese es el rango de pH que permite su desarrollo en medios de laboratorio, pero que en algunos trabajos se señala entre 4.5 y 5.15 el valor mínimo en alimentos [incluso ellos mismos (1975) observaron el crecimiento de *B. cereus* en una base cárnica con un pH de 4.35, aunque después de inocularlo a una alta concentración ( $10^6$  células en 0.1 ml)]; (ii) Cook y col. (1991) manifestaron que la fermentación de *tapé* indonesio permitía su desarrollo a un  $\text{pH} \leq 4.6$  (una muestra lo tenía hasta de 3.5), y (iii) Valero y col. (2000) descubrieron que el pH menor al cual sobrevivieron dos de sus cepas sembradas en un sustrato líquido de zanahoria (25 °C) fue de 4.75.

**Tabla 6A. Presencia o ausencia de *Bacillus cereus* en masas de nixtamal elaboradas en Tabasco para la producción de chorote**

Muestra	pH	Microorganismo investigado	Presencia en 25 g de chorote
3	4.2	<i>Bacillus cereus</i>	–
4	4.4	<i>Bacillus cereus</i>	–

### 3.4.2 Aislamiento e identificación de *Bacillus cereus* en masas de nixtamal preparadas en Tabasco para la producción de pozol blanco

Tal como en las otras dos muestras analizadas (bolas 3 y 4; Tabla 6 A), no se halló *Bacillus cereus* (Tabla 7). De nuevo, en dos de ellas (9 y 13) el pH inicial ya estaba por debajo del intervalo conocido para el crecimiento de esta especie bacteriana (4.9 a 9.3; Jay, 1992), el cual depende además de otras condiciones —como nutrientes, temperatura, Aw, etcétera—; en dos más (5 y 12) se ubicaba en el límite inferior, y en otras tres (8, 11 y 14), muy cerca de este último.

Al comparar los resultados con lo afirmado por Raevuori y Genigeorgis (1975), aunque los valores iniciales de pH de dichos pozoles (5, 8, 9, 11, 12, 13 y 14) quedaban dentro del intervalo de 4.5 a 5.15, donde algunos autores sitúan el pH mínimo para el crecimiento de *B. cereus* en alimentos, éste no se encontró.

Como ya se ha dicho en la sección de material y métodos (capítulo 2), se sembraron dos medios comúnmente empleados para el aislamiento de *B. cereus* (el agar *Bacillus cereus* y el MYP); para el caso particular del pozol, a ambos les faltó selectividad, dado que en ellos se desarrollaban distintos microorganismos.

Es interesante apuntar que Salinas, en su tesis (1958), utilizó agar harina de maíz [medio para el cultivo de hongos (*Difco*<sup>™</sup> & *BBL*<sup>™</sup> *manual*, recurso disponible en la red)] y señaló características poco corrientes en *B. cereus* en la cepa aislada por ella: un Gram variable [tanto a las 20 como a las 24 horas era negativo; y a las 48 horas, positivo]; la presencia de cápsula; la fermentación positiva de xilosa y rafinosa, y una reducción de azul de metileno negativa (Salinas, 1958; Drobniewski, 1993; Leardini, recurso disponible en la red; Sue y col., 2006).

### **3.4.3 Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* en masas de nixtamal elaboradas en Tabasco para la producción de chorote (pozol de cacao)**

En los dos chorotes analizados (números 1 y 2) se estableció la existencia de *Staphylococcus aureus* cuando el pH de éstos era de 5.8, en uno, y de 5.3, en el otro (Tabla 6B). Las pruebas hechas para su identificación se muestran en el Apéndice 4. Una vez confirmada su presencia, era básico determinar su densidad poblacional microbiana, así como su evolución durante el proceso fermentativo (nos permitiría saber si desaparecía naturalmente o si, por el contrario, el consumo de este alimento en cualquier fase de la fermentación suponía un riesgo para la salud). Por tal motivo, se llevaron a cabo las secciones 3.5 y 3.6.

*S. aureus* es capaz de crecer dentro de una escala de valores de pH de 4 a 9.8; su óptimo está entre 6 y 7 (Jay, 1992). No obstante, si antes se le adapta, sometiendo a las células en fase exponencial por una hora a pH 4 en un medio químicamente definido, puede desarrollar resistencia a un pH de 2 (Chan y col., 1998; Clements y Foster, 1999; Clements y col., 1999a y 1999b).

A más de lo anterior, la poca disponibilidad de nutrientes induce en esta bacteria un estado de sobrevivencia a la inanición, que provoca que las células supervivientes (viables por varios meses) disminuyan su tamaño y su división y aumenten su resistencia a la acidez, al estrés oxidativo y al reto con enzimas líticas (Clements y Foster, 1999).

Como en la elaboración del pozol se reporta en la masa un pH inicial de 6.8 a 7.5 (Ulloa, 1974; Escamilla-Hurtado y Mozqueda-González, 1992; Wachter, 1995; Cabra, 2000; Díaz-Ruiz y col., 2003), condición adecuada para el crecimiento de

*Staphylococcus aureus*, es importante la rápida acidificación del alimento.

**Tabla 6B. Presencia o ausencia de *Staphylococcus aureus* en masas de nixtamal elaboradas en Tabasco para la producción de chorote**

Muestra	pH	Microorganismo investigado	Presencia en 25 g de chorote
1	5.8	<i>Staphylococcus aureus</i>	+
2	5.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	+

#### **3.4.4 Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* en masas de nixtamal preparadas en Tabasco para la producción de pozol blanco**

Del medio Baird-Parker con emulsión de yema de huevo y telurito se aislaron 96 colonias sospechosas de ser de *S. aureus* (colonias circulares, lisas, convexas y húmedas; de 2 a 3 mm de diámetro en las cajas “no atestadas”; de color gris a negro azabache; con borde intacto blanco y estrecho; de consistencia gomosa cuando se tocaban con el asa, y rodeadas de una zona de aclaramiento bien definido). De éstas, 75% fue coagulasa positiva (Apéndice 4). Por la compleja microflora del pozol, en la cuenta directa se observó la interferencia de gran número de microorganismos que crecían en el medio: hongos (sobre todo en muestras con 48 horas de fermentación), levaduras, micrococos, otros estafilococos, bacilos y sarcinas, pero no fue imposible la cuantificación de *Staphylococcus aureus*.

Se probó el medio sal manitol (los estafilococos presuntamente coagulasa positivos dan colonias rodeadas de halos brillantes amarillo-anaranjados, mientras que los negativos producen colonias rodeadas de zonas púrpura rojizas) y también

hubo una gran interferencia de la microflora del pozol. Inclusive la característica acidez del alimento estudiado dificultó aún más su utilización. Por lo anterior, y por trabajos como el efectuado por Sharpe y col. en 1962 (Oxoid, 1981), se eligió el empleo del agar Baird-Parker con emulsión de yema de huevo y telurito.

En el Apéndice 4 se exponen los resultados de las pruebas confirmatorias: catalasa, DNasa, termonucleasa, coagulasa y fermentación anaeróbica de manitol y de glucosa.

La prueba de la coagulasa se realizó tanto en plasma humano (quizás citrado, si era de una muestra para transfusión) como conejil (con EDTA). Algunos autores no recomiendan el uso del plasma con citrato porque pueden darse falsos positivos si el microorganismo metaboliza dicha sal (Banwart, 1982); en este caso, si la sangre de la que se obtuvo el plasma había sido citrada, no apareció dicho problema. Y aunque aconsejan igualmente preferir el plasma de conejo sobre el de humano, los resultados generados tanto con uno como con otro fueron los mismos.

Se registró una exacta correlación entre las pruebas de la DNasa, la coagulasa y la termonucleasa. Además, todas las cepas negativas a la prueba de fermentación anaeróbica de manitol (P3) lo fueron también a las tres pruebas antes mencionadas (Apéndice 4); sin embargo, no todas las P3 positivas dieron positivo a estas últimas (véase las cepas Sien 7.3, Si 9.1, Si 9.3 y Sien 9.4; Apéndice 4).

### **3.5 Presencia de *S. aureus* en las primeras horas de fermentación del pozol**

Se estableció la presencia de *S. aureus* en ocho pozoles blancos (5, 6, 7, 10, 11, 12, 13 y 14); y su ausencia, en los dos restantes (8 y 9) (Tabla 7). Entonces, si se incluyen los dos chorotes (Tabla 6B), al inicio de la fermentación



se determinó *S. aureus* en diez muestras, de doce analizadas.

Pese a que había estafilococos en la bola 8, no se detectó *S. aureus*; este pozol se exhibía en una vitrina de cristal y se adquirió en un local bien instalado, sin tránsito de personas, apartado de los mercados y bien ventilado y aseado. No obstante, Sainz (1998) denotó en dicha muestra una cuenta inicial de enterobacterias de 4.54 log ufc/g en base húmeda; y a las 48 horas de fermentación, una de 6.62, en las mismas unidades. Aisló cepas de *E. coli* reportadas como patógenas y otras, no señaladas así, poseedoras de factores de virulencia.

Mientras que en la número 9 se encontraron estafilococos, mas no de la especie investigada, en la bola 14 (del mismo productor) la cuenta inicial de *S. aureus* dio de 4.5 log ufc/g en base húmeda. Esto sugeriría una cierta variabilidad en la calidad del pozol, aun elaborado por el mismo individuo, pero Sainz (1998) determinó en la novena Mi una concentración de enterobacterias de 7.17 log ufc/g en base húmeda [indicó una contaminación masiva o que permitieron su proliferación en masa, como en los pozoles 11 y 13]; y en la fermentada 48 horas, una de 6.25 log ufc/g en base húmeda. Sainz (1998) no aisló *E. coli* ni *Shigella* ni *Salmonella*. El pH de ambas muestras era muy parecido. El local donde se compraron está junto a las carnicerías, presenta problemas de ventilación y tránsito de personas y sólo se limpia con agua y jabón; almacenan el agua en cubetas (Tabla 3).

Las bolas 5, 12 y 13 (las de la señora de Nacajuca) se adquirieron en una mesita del mercado "José María Pino Suárez". La primera y la tercera de éstas (5 y 13, respectivamente) tenían una cuenta inicial de *S. aureus* de 4.5 log ufc/g en base húmeda; la otra (la 12), una de < 1 log ufc/g; sus valores de pH eran casi

idénticos. De nuevo, se sugiere una calidad variable, pero se puede decir que en cerca de 70% de las muestras elaboradas en Nacajuca y analizadas en el laboratorio se halló una alta concentración de este microorganismo.

El sexto pozol (Mi) poseía tanto el mayor pH como la mayor cuenta; esta última (5 log ufc/g en base húmeda) ya pudo representar un riesgo para la salud. El local donde se compró reflejaba problemas de tránsito de personas y de ventilación, a más de que almacenaban el agua en recipientes de plástico y aseaban el lugar únicamente con agua y jabón.

Tómese en consideración que *S. aureus* está presente en numerosos alimentos. Por lo general, se necesitan unas  $10^5$  a  $10^6$  células del microorganismo/g antes de que el nivel de enterotoxina pueda ocasionar intoxicación (de acuerdo con estimaciones, y en función de la sensibilidad de cada individuo, se precisa de 0.015 a 0.357  $\mu\text{g}$  de ésta por kilogramo de peso corporal para desarrollar los síntomas) (Banwart, 1982).

La muestra 7 tenía un pH de 5.7; la 11, de 5.0; y ambas, una cuenta inicial de *S. aureus* de  $< 1$  log ufc/g en base húmeda. Éstas se adquirieron en diferentes locales, con algunas características físicas comunes. En el de la bola 11 se reporta que hay insectos y que exclusivamente se limpia con agua y jabón. Sainz (1998) encontró en este onceavo pozol una cepa de *E. coli* de origen animal (serotipo O9:H31); de todas las que aisló, fue la única con esa procedencia, tal vez los insectos actuaron como vectores diseminadores. Esto es importante por la existencia de cepas patógenas de origen animal (como *E. coli* O157:H7, aislada de heces de ganado bovino y causa de brotes de colitis

hemorrágica y síndrome urémico hemolítico): la contaminación del alimento por excreciones animales vuelve inseguro su consumo (Sainz, 1998).

En la Mi 10 la concentración de *S. aureus* era de 3.9 log ufc/g en base húmeda; y el pH, de 5.8. El local donde dicho pozol se compró evidencia el tránsito de personas y una mala ventilación; se asea con agua y jabón (en ocasiones también se utiliza cloro), y dispone de agua corriente.

Las bolas 5, 6, 13 y 14 pudieron representar un riesgo para la salud: la sexta muestra tenía una cuenta inicial de 5 log ufc/g en base húmeda; las otras tres, de 4.5 log ufc/g (niveles ligeramente menores que los que se juzgan peligrosos). No obstante, al reflexionar sobre su pH [entre 4.8 y 5.0 (se supone de 6.8 a 7.5 en las masas recién elaboradas)], es factible imaginar números mayores en ellas antes de que arribaran al laboratorio y fueran analizadas.

### **3.6 Sobrevivencia de *S. aureus* en el pozol blanco (Tabla 7)**

En un comienzo se pensó en efectuar esta determinación con las muestras iniciales (Mies) y con las de siete días de fermentación. Sin embargo, debido al pH tan bajo con el que llegaron las primeras cinco bolas (Tablas 6A, 6B y 7), y a los resultados obtenidos del pozol 5, se decidió trabajar con las Mies y con las fermentadas por 48 horas.

Así, a los 7 días de fermentación, la cuenta que poseía al inicio la bola 5 (la única en la que se realizó esta determinación a la semana de su llegada) había disminuido en 3.5 ciclos logarítmicos. A pesar de que 1 log ufc/g no representa un riesgo para la salud, puede que haya cepas acidorresistentes en el producto fermentado, pues el valor de pH al momento del aislamiento (3.7) queda un poco

**Tabla 7. Determinación de la presencia y sobrevivencia de *S. aureus* y *B. cereus* en el pozol (muestras iniciales e incubadas a 29 °C)**

<b>Número de la muestra</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Peso (g)	946	1050	1038	1073	1013	1022	989	955	1049	1085
pH inicial (Mi)	4.9	6.7	5.7	5.0	4.8	5.8	5.0	4.9	4.8	5.0
<i>Staphylococcus aureus</i> Presencia en 25 gramos	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> Log ufc/gramo	4.5	5.0	<1	-	-	3.9	<1	<1	4.5	4.5
<i>Bacillus cereus</i> Presencia en 25 gramos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 48 h	ND	4.3	4.4	4.8	4.2	4.2	3.9	3.9	4.1	4.2
<i>Staphylococcus aureus</i> Presencia en 25 gramos	ND	+	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> Log ufc/gramo	ND	2.7	-	-	-	<1	-	-	<1	<1
<i>Bacillus cereus</i> Presencia en 25 gramos	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 7 días	3.7	ND	4.3	3.9	3.9	3.6	3.9	3.9	3.9	3.8
<i>Staphylococcus aureus</i> Presencia en 25 gramos	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> Log ufc/gramo	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus cereus</i> Presencia en 25 gramos	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = No determinado

Mi = Muestra inicial

por debajo de la escala normal de crecimiento de *S. aureus* (4 a 9).

En el análisis a las 48 horas, *S. aureus* sobrevivía en cuatro (6, 10, 13 y 14) de los otros siete pozoles blancos en los que originalmente había sido detectado (6, 7, 10, 11, 12, 13 y 14); en el 10, el 13 y el 14 se identificó su número como  $< 1 \log \text{ ufc/g}$ , y en el 6, como  $2.7 \log \text{ ufc/g}$ . Recordemos que la muestra 6 tenía una cuenta inicial de  $5.0 \log \text{ ufc/g}$ ; la 5, la 13 y la 14, de  $4.5$ ; y la 10, de  $3.9 \log \text{ ufc/g}$ .

En la elaboración del pozol, la masa retenida en los espacios muertos del molino sirve como fuente potente de microorganismos a los lotes frescos de masa (Wacher, 1995), y algunas bacterias presentes en ella quizás se adapten a la acidez con el transcurso del tiempo (Cueto, 2001). Es posible que las cepas de *S. aureus* aisladas de la bola 5, a un pH de 3.7, sean de éstas. En el estudio de Clements y col. (1999a), un pH de 7 no fue adaptador, pero uno de 4, sí.

Otra explicación a la presencia de *S. aureus* a un pH de 3.7 (pozol 5) podría ser su concentración inicial. Por eso se ha indicado que, aunque las muestras 5, 13 y 14 poseían una cuenta inicial menor a la considerada peligrosa ( $10^5$  a  $10^6$  células/g), tal vez habrían representado un riesgo para la salud en una etapa más temprana del proceso fermentativo. Cuando la primera de estas tres arribó al laboratorio, el pH ya era de 4.9; y su cuenta, de  $4.5 \log \text{ ufc/g}$  en base húmeda.

Del mismo modo, y en virtud de su fermentación en forma sólida, se dice que en el pozol existen micronichos de variadas características (Wacher, 1995), lo que esclarecería, al menos en parte, la sobrevivencia de algunas bacterias patógenas, a pesar del bajo pH alcanzado.

Actualmente, el medio más usado para el aislamiento de *S. aureus* sigue siendo el Baird-Parker, y para el de *B. cereus*, el MYP. Las pruebas bioquímicas se complementan con las moleculares, las inmunológicas (v. gr., para las enterotoxinas estafilocócicas y la diarreica de *B. cereus*) y las tisulares (v. gr., para la enterotoxina emética de dicho bacilo).

### **3.7 Concentraciones de ácido láctico y ácido acético**

Las bacterias lácticas ejercen su actividad antimicrobiana mediante la síntesis de ácidos orgánicos —como el láctico y el acético—, bacteriocinas, diacetilo, reuterina, bióxido de carbono y peróxido de hidrógeno (Daeschel, 1989); los primeros actúan como inhibidores de microorganismos, dependiendo de su concentración, de su capacidad para entrar en las células y de la habilidad de estas últimas para metabolizarlos (Cherrington y col., 1991).

El producto de la cuantificación de los ácidos láctico y acético aparece en la Tabla 8 y en las gráficas 2, 3 y 4. Aunque se pusieron las masas en hielo desde su compra (a primera hora del día) y hasta su procesamiento, las muestras iniciales (Mies) presentaban ya un cierto grado de fermentación. El ácido láctico iba de 0.1 a 0.4%, y el acético, de 0.03 a 0.17%, ambos reportados en base húmeda.

Las bolas 5, 8, 9, 11, 13 y 14 (cuyos valores de pH estaban entre 4.8 y 5.0) tenían una concentración inicial de ácido láctico de 0.4% en base húmeda; la 12 (con un pH de 4.9), una de 0.3%; los pozoles 7 y 10, una de 0.2% (el pH del primero era de 5.7, y el del segundo, de 5.8); y el número 6, una de 0.1% (su pH era de 6.7).

En cuanto al acético, la Mi 8 poseía una concentración de 0.03% en base

húmeda; las identificadas como 5 y 7, una de 0.04%; la 9, la 11, la 12 y la 13, una de 0.05%; la 6, una de 0.06%; la 10, una de 0.07%; y la 14, una de 0.17% (todas en base húmeda).

La concentración del ácido acético ( $pK_a = 4.76$ ) fue en general menor que la del láctico ( $pK_a = 3.8$ ) y guardó una menor relación con el pH. Por ejemplo, el pozol 14 tenía un mayor porcentaje de ácido acético que las muestras 5, 8, 9, 11 y 13, y el mismo de láctico (0.4 %), pero no fue el del pH más bajo.

A las 48 h de fermentación, el ácido láctico aumentó. En las muestras 9, 10, 11, 12, 13 y 14, a 0.8% en base húmeda (con valores de pH de 3.9 a 4.2); en la bola 6, a 0.7% (pH de 4.3); en la 7, a 0.6% (pH de 4.4); en la 8, a 0.5% (pH de 4.8). En cinco de éstas (7, 9, 11, 13 y 14) se incrementó el valor inicial en 0.4% en base húmeda; en otras dos (6 y 10), en 0.6%; en una (12), en 0.5%; en la otra (8), en 0.1%. En referencia al acético, su porcentaje aumentó en cuatro de ellas (7, 11, 12 y 13) [en las bolas 11, 12 y 13, en 0.01% (de 0.05 a 0.06% en base húmeda), y en la 7, en 0.03%]; se mantuvo igual en tres (6, 9 y 10), y disminuyó en la 8 y la 14.

Los valores obtenidos del pozol 5 (7 días) fueron del todo diferentes a los de las muestras fermentadas por 48 horas: el ácido láctico disminuyó en un 25% y el acético aumentó en un 2175% (en la bola 7 sólo se incrementó en un 75%, y en la 11, la 12 y la 13, en un 20%). Este último ácido sí ejerció influencia en el pH final; su concentración era alta, aun así se detectó la presencia de *S. aureus* a un pH de 3.7 en una cuenta de  $< 1 \log \text{ ufc/g}$  en base húmeda.

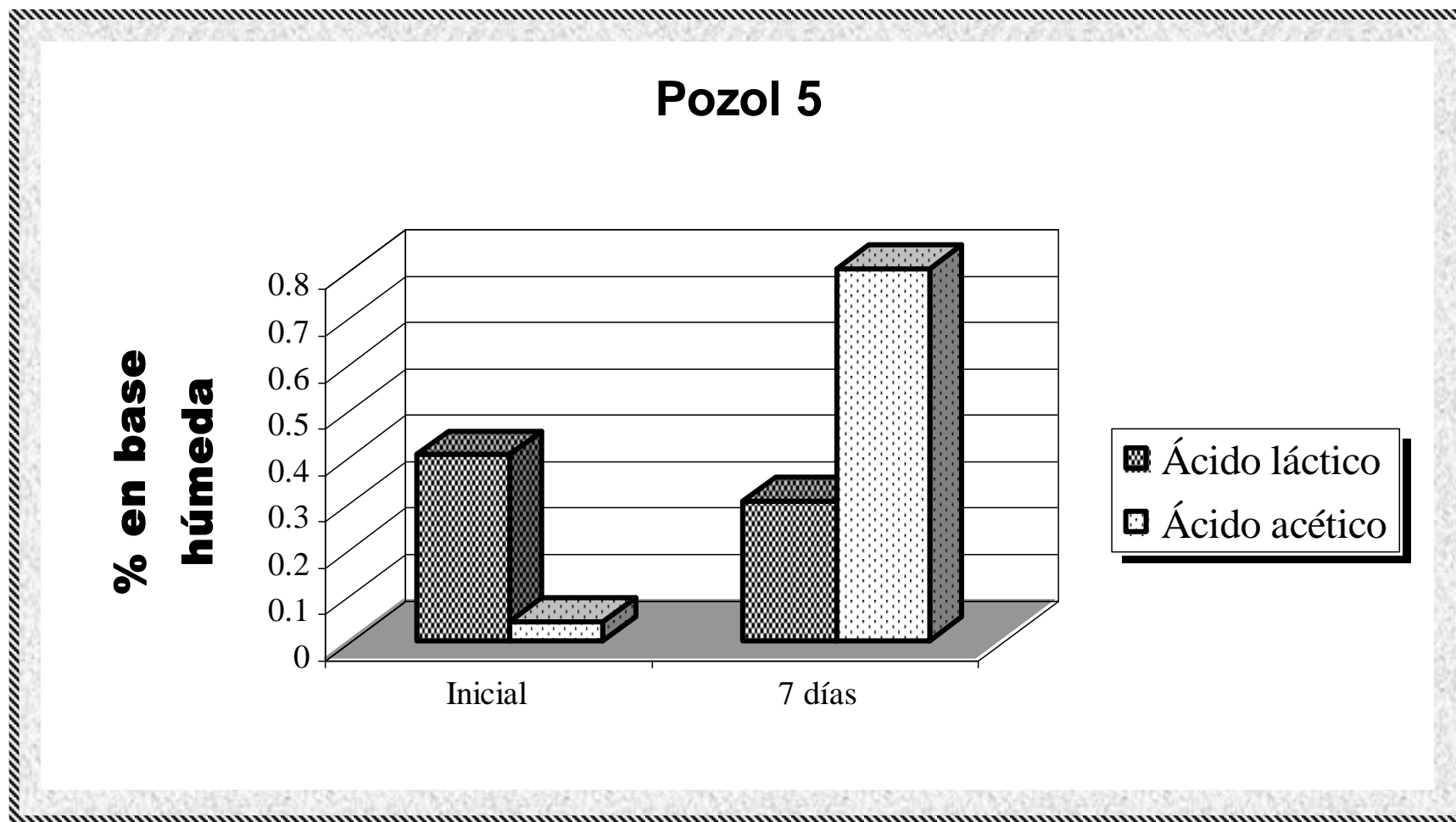
Excepto por los de la muestra 5, los resultados coinciden con lo afirmado por Santillana (1995): el pozol es fundamentalmente una homofermentación.

**Tabla 8. Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos en el pozol**

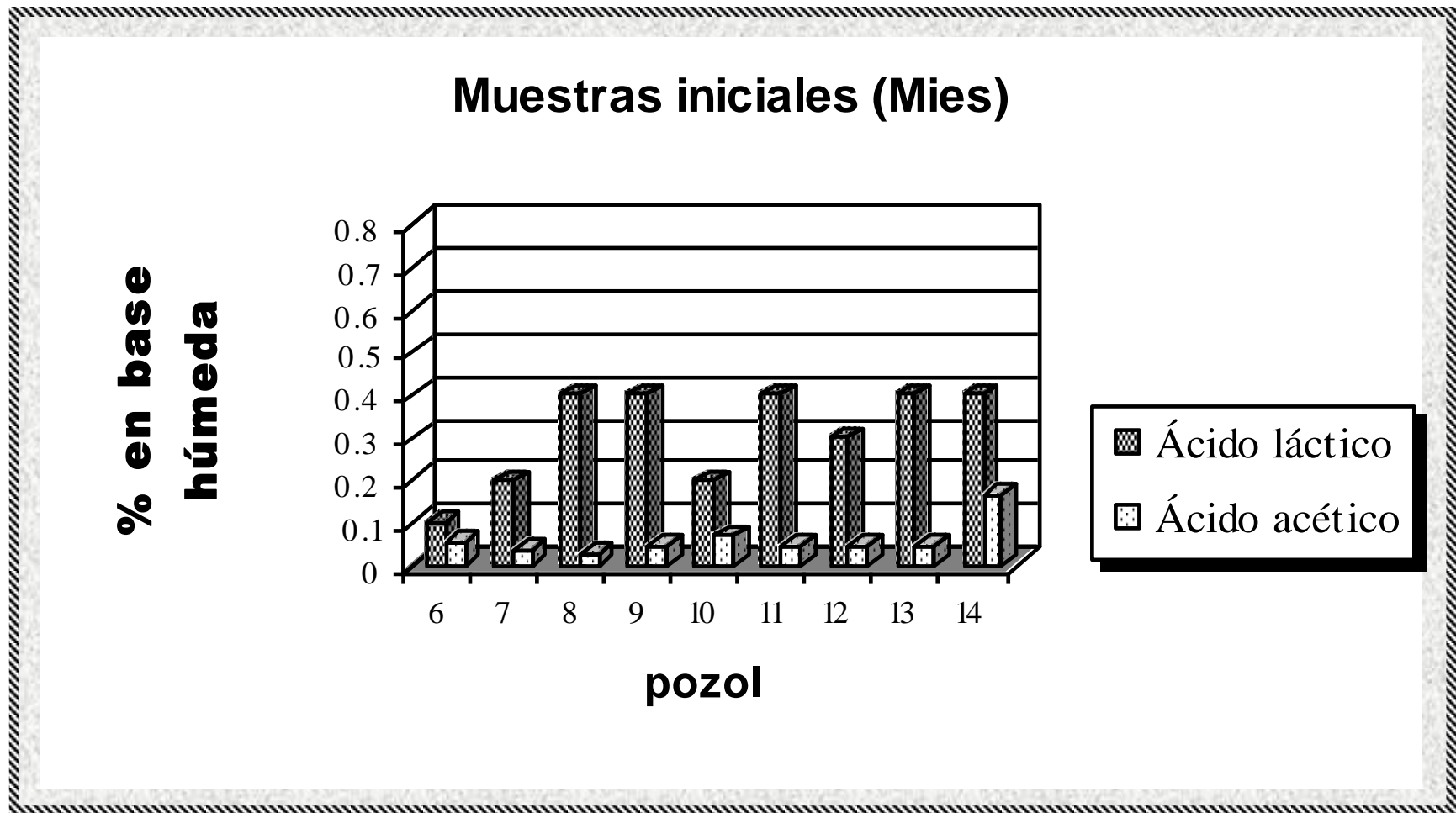
<b>Pozol</b>	<b>pH</b>	<b>Ác. láctico % en base húmeda</b>	<b>Ác. acético % en base húmeda</b>	<b>Maltosa % en base húmeda</b>	<b>Sacarosa % en base húmeda</b>	<b>Fructosa % en base húmeda</b>	<b>Glucosa % en base húmeda</b>
5 (Mi)	4.9	0.4	0.04	0.0160	0.0124	0.0040	0.0000
5 (7días)	3.7	0.3	0.91	0.3750	0.0000	0.0020	0.2990
6 (Mi)	6.7	0.1	0.06	0.3354	0.2054	0.0200	0.0170
6 (48h)	4.3	0.7	0.06	0.6600	0.0000	0.0000	0.1130
7 (Mi)	5.7	0.2	0.04	0.0000	0.0350	0.1204	0.0000
7 (48h)	4.4	0.6	0.07	0.0165	0.0120	0.0070	0.0000
8 (Mi)	5.0	0.4	0.03	0.0210	0.0075	0.1060	0.0030
8 (48h)	4.8	0.5	–	0.0133	0.0058	0.0000	0.0070
9 (Mi)	4.8	0.4	0.05	0.0942	0.0000	0.0300	0.0020
9 (48h)	4.2	0.8	0.05	0.1825	0.0000	0.0001	0.4430
10 (Mi)	5.8	0.2	0.07	0.0039	0.0000	0.0636	0.0000
10 (48h)	4.2	0.8	0.07	0.3422	0.0000	0.0026	0.0180
11 (Mi)	5.0	0.4	0.05	0.0210	0.0058	0.0300	0.0026
11 (48h)	3.9	0.8	0.06	0.2540	0.0000	0.0013	0.0500
12 (Mi)	4.9	0.3	0.05	0.0104	0.0058	0.0624	0.0018
12 (48h)	3.9	0.8	0.06	0.0704	0.0083	0.0009	0.0026
13 (Mi)	4.8	0.4	0.05	0.0282	0.0033	0.0011	0.0013
13 (48h)	4.1	0.8	0.06	0.2112	0.0000	0.0002	0.0210
14 (Mi)	5.0	0.4	0.17	0.0050	0.0000	0.0500	0.0020
14 (48h)	4.2	0.8	0.08	0.1834	0.0000	0.0009	0.0160

Mi = Muestra inicial

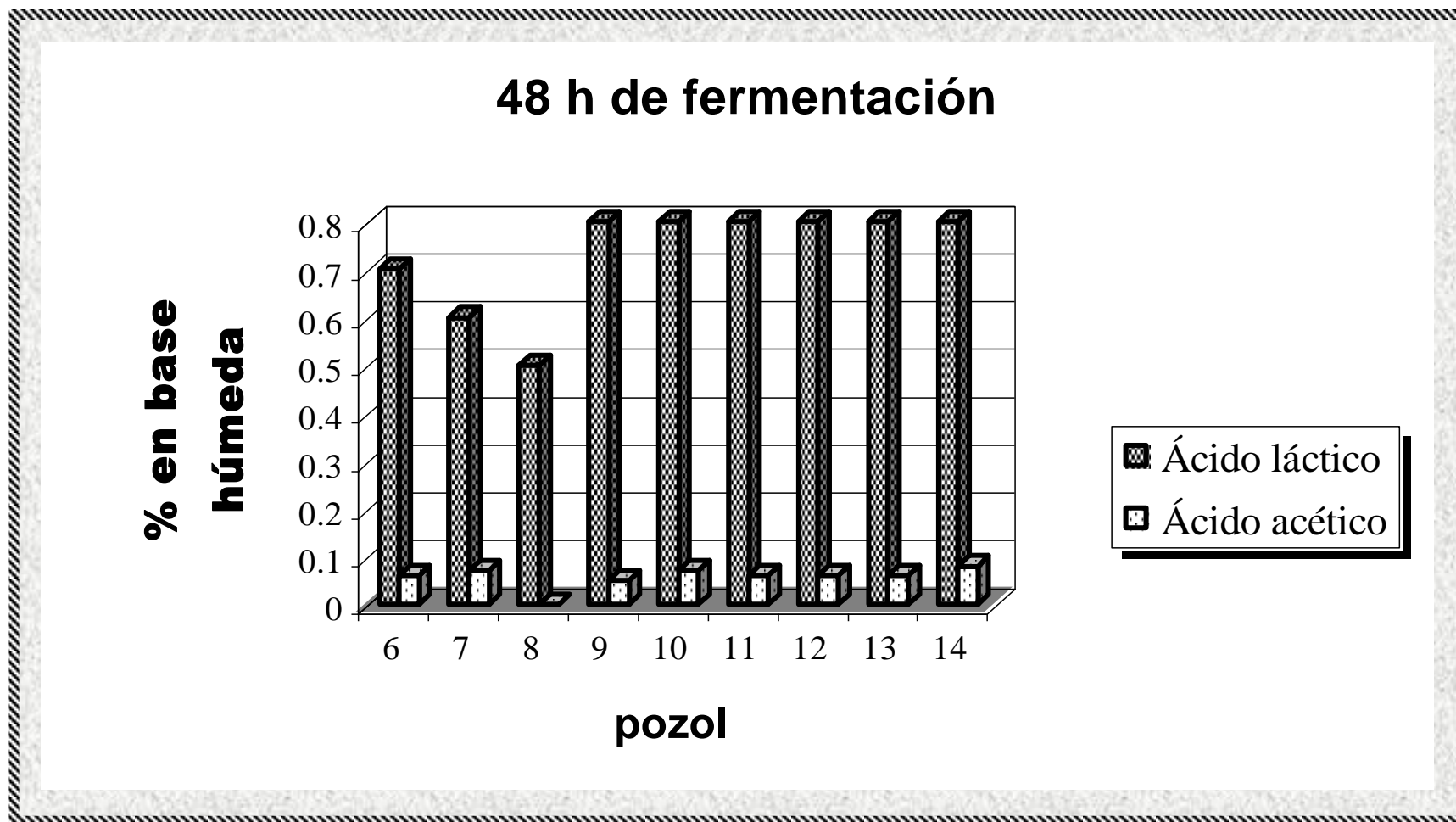




Gráfica 2. Porcentajes de los ácidos láctico y acético en el pozol 5 al inicio y a los 7 días de fermentación a 29 °C



Gráfica 3. Porcentajes de los ácidos láctico y acético al inicio de la fermentación del pozol



Gráfica 4. Porcentajes de los ácidos láctico y acético en el pozol después de 48 horas de fermentación a 29 °C

Verbigracia, en la sexta bola la concentración inicial de ácido acético era 0.06% en base húmeda, cantidad que permanecía igual a las 48 horas (algo similar pasó con las muestras 9 y 10); tal vez dicho ácido se produjo sólo al inicio del proceso fermentativo. [Según Wachter (1995), al comienzo de la fermentación predominan las bacterias del género *Leuconostoc* (heterofermentativo); sin embargo, luego son reemplazadas por otras más resistentes a la acidez, como las de *Lactobacillus* (homo o heterofermentativas).] Asimismo, al haberse encontrado bacterias, mohos y levaduras a lo largo del proceso, hay coincidencia con Silva (1984), Ramírez (1987), Nuraida (1988), Escamilla-Hurtado y Mozqueda-González (1992), Wachter (1995) y Ampe y col., (1999) en que el pozol es producto de una fermentación que, aunque en esencia láctica, es de naturaleza mixta.

La Mi 6 era la que tenía la cuenta más alta de *S. aureus* (5 log ufc/g), el mayor pH (6.7) y la menor concentración de ácido láctico (0.1% en base húmeda). A los dos días, el porcentaje de dicho ácido (0.7) y el pH (4.3) ya eran similares al de la mayoría de las muestras fermentadas por 48 horas (0.8%; valores de pH de 3.9 a 4.2); aun así, la cuenta de *S. aureus* en este sexto pozol seguía siendo la más alta en ese tiempo de incubación. De ahí el recalcar la importancia de la densidad microbiana inicial y las buenas prácticas de higiene y manufactura.

Básicamente la presencia de *S. aureus* en la muestra 5 con 7 días de fermentación (pH 3.7) sugiere la existencia en el pozol de cepas acidorresistentes. De acuerdo con Clements y Foster (1999), esta bacteria desarrolla resistencia a valores de pH aniquilantes si se va adaptando a éstos por exposición a valores mayores no letales. El mecanismo de esta adaptación es todavía desconocido.

### 3.8 Concentraciones de fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa

El principal carbohidrato del maíz es el almidón (61 a 78% en peso seco); y entre los de los carbohidratos solubles están la sacarosa (4 a 8%), la glucosa y la fructosa (1 a 3%). La concentración de azúcares fermentables disminuye durante el proceso de nixtamalización, debido a las pérdidas en las aguas de cocción y lavados (Díaz, 1996; Flores, 1998).

Los resultados (Tabla 8 y Gráfica 5) señalan un muy bajo porcentaje de azúcares en el pozol y corroboran la calidad variable del maíz indicada por Santillana (1995), Díaz (1996) y Flores (1998). Entre una muestra y otra los valores iniciales son bastante distintos; a pesar de eso, se desveló una cierta tendencia entre ellas.

Podemos notar que:

- a) A menor concentración de sacarosa, menor pH; los pozoles 5, 8, 9, 11, 12, 13 y 14 tienen entre 0.0000 y 0.0124% de sacarosa en base húmeda (valores de pH entre 4.8 y 5.0); el número 7, un 0.035% (pH de 5.7); y el 6, un 0.2054% (6.7 de pH). En el pozol 10, a un pH de 5.8, parece que la sacarosa ya se había agotado con cierta anterioridad.
- b) A menor porcentaje de fructosa, menor pH; las muestras 7 y 10 tienen una concentración de 0.1204 y 0.0636% de fructosa en base húmeda, respectivamente, y un pH de 5.7 y 5.8; las identificadas como 5, 9, 11, 12, 13 y 14, una entre 0.0040 y 0.0624% y un pH de 4.8 a 5.0. La 8 (con una de 0.1060% y un pH de 5.0) no parece ajustarse a esto, sino más bien quedar en un punto medio.

- c) A menor concentración de maltosa, mayor pH; los pozoles 5, 8, 9, 11, 12, 13 y 14 tienen de 0.0050 a 0.0942% de maltosa en base húmeda y un pH entre 4.8 y 5.0; y el 7 y el 10, un 0.000 y 0.0039 por ciento, con un pH de 5.7 y 5.8, respectivamente. El caso del 6 es diferente, tenía una concentración mucho mayor que la de las otras muestras.
- d) A menor porcentaje de glucosa, mayor pH; las bolas 8, 9, 11, 12, 13 y 14 tienen entre 0.0013 y 0.0030% de glucosa en base húmeda, con un pH de 4.8 a 5.0; la 7 y la 10 no presentan dicho monosacárido (con un pH entre 5.7 y 5.8). Las muestras 5 (pH de 4.9) y 6 (pH de 6.7) no coinciden con esto.

El pozol 6 —con un pH de 6.7, el más cercano al reportado por Ulloa (1974) en la masa de nixtamal (6.8)— tuvo la más alta concentración de sacarosa y no se habían realizado grandes modificaciones sobre los demás azúcares (tal vez por esto no entra ni en b ni en c ni en d): el proceso fermentativo no había avanzado tanto como en los otros pozoles. Lo cual confirma que estos últimos ya tenían un cierto grado de fermentación.

El disacárido hallado en mayor porcentaje fue la maltosa; éste pudo haber sido liberado por actividad amilolítica.

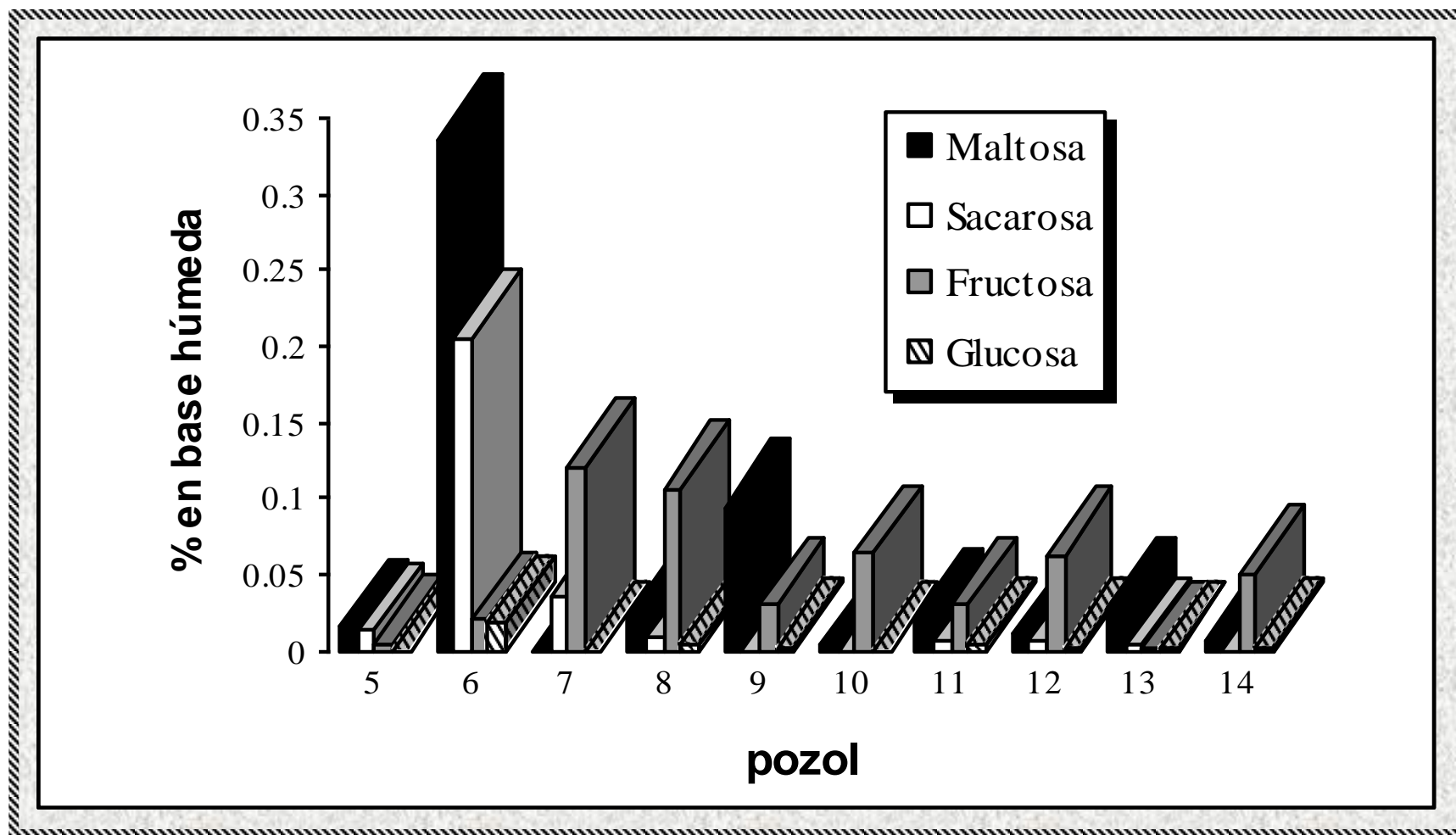
De lo anterior, esperaríamos —al proseguir la fermentación y bajar el pH— la disminución de la sacarosa y la fructosa, así como el aumento de la maltosa y la glucosa. Al analizar los resultados de la cuantificación de azúcares a las 48 horas de fermentación y a los 7 días (muestra 5), observamos que sí sucedió esto (Tabla 8).

- a) Sacarosa. En las muestras 9, 10 y 14 su concentración era de 0.000% en base húmeda, así que ya no pudo seguir disminuyendo; en las bolas 5, 6, 7, 8, 11 y 13 ésta sí bajó; en la 12 aumentó.
- b) Fructosa. Su porcentaje descendió en todas las muestras.
- c) Maltosa. En el pozol 8 disminuyó; en los demás, aumentó.
- d) Glucosa. En la bola 7 la glucosa permaneció en ceros; en las otras (48 h o 7 días) su concentración era mayor que en las Mies.

El disacárido investigado que estaba en mayor porcentaje en las muestras iniciales y en las fermentadas (excepto en la Mi del pozol 7) fue la maltosa.

Al parecer (como indicó Díaz en 1996, al trabajar con la cepa *Leuconostoc* Pz 12 en un medio líquido definido), en comparación con otros carbohidratos, las bacterias lácticas prefieren consumir la sacarosa; y entre la glucosa y la fructosa producidas, la primera de estas dos (como lo sugieren claramente las Mies 5, 7 y 10). Además, se encontró maltosa en constante producción; este disacárido puede aportar glucosa, quizás como último recurso, con tiempo para que una parte del monosacárido se consuma y otra se almacene, mientras la fructosa se sigue utilizando.

A diferencia del estudio de Santillana (1995), que tenía como objetivo el establecimiento de una técnica analítica por medio de HPLC, y como lo sugiere el de Flores (1998), sí se halló maltosa en el pozol. En contraste con el último trabajo mencionado, se determinó la producción de dicho disacárido y el aumento de la glucosa durante la fermentación. [Flores (1996) ya había señalado la existencia de



Gráfica 5. Porcentajes de maltosa, sacarosa, glucosa y fructosa en las muestras iniciales de pozol



actividad amilolítica en veinte de las noventa y tres cepas de bacterias lácticas aisladas del pozol caracterizadas por ella. Luego, Díaz-Ruiz y col. (2003) descubrieron que 40% de las BAL presentes en la masa inicial del pozol era capaz de hidrolizar el almidón (esta relación disminuyó a 3% a las 72 horas de fermentación)].

Como han reportado Wachter (1995) y Flores (1998), incluso cuando el porcentaje de azúcares en la muestra inicial sea bajo, las bacterias lácticas llevan a cabo la acidificación de la masa y al final las concentraciones de los ácidos en el pozol resultan con frecuencia similares entre unas y otras muestras. Es notable recordar que ocurre una fermentación de naturaleza mixta y que, tal como señaló Giles (1995) al llevar a cabo fermentaciones sobre sustratos estériles y no estériles, es importante la compleja relación que existe entre los componentes de la microbiota del pozol. Según Hesseltine (1992), es común que los integrantes de un cultivo mixto se complementen entre sí y trabajen juntos para atacar a una mayor variedad de sustratos al reunir un amplio espectro de actividades enzimáticas.

Entre otras cosas, en su momento se concluyó que para trabajos ulteriores era mejor desarrollar la investigación justo en el lugar donde se elaboraran las muestras —tal como hicieron después Cabra (2000), Díaz-Ruiz y col. (2003), Bolaños (2004) y López (2006)—, porque las empleadas en éste ya tenían un cierto grado de transformación al momento de recibirlas, pese a los cuidados que se tuvieron. A más de que se pensó que hubiera sido interesante realizar fermentaciones controladas —o un experimento como el de Cueto (2001)— con las cepas de *S. aureus* sospechosas de ser acidorresistentes, para comprobar su

respuesta a valores bajos de pH. Finalmente, por los resultados obtenidos, incluidos los de Sainz (1998), se pudo decir que en general las condiciones higiénicas en la elaboración del pozol no son buenas.

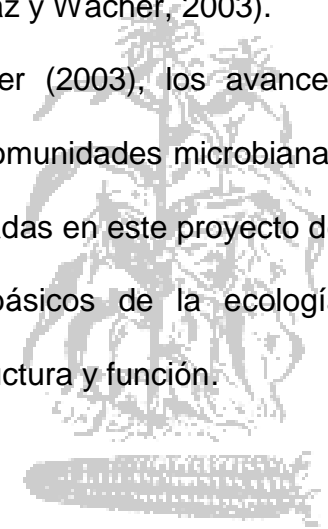
En relación con lo que ha sucedido más adelante en el tiempo con otras investigaciones, cabe indicar que en los últimos años no sólo se le ha dado importancia a los estafilococos coagulasa positivos, sino también a los negativos (Carmo y col., 2002; Rodrigues y col., 2004; Ribeiro de Souza y col. 2006; Fereira y col., 2008, entre otros); que varios *Bacillus* se han transferido a otros géneros (Apéndice 5), y que las bacteriocinas se han estudiado de manera más amplia (Zheng y Slavik, 1999; Zheng y col., 1999; Martirani y col., 2002; Muñoz y col., 2004; Bizani y col., 2005; Grande y col., 2006; Cobo y col., 2008; Viedma y col., 2009), en virtud de que éstas han tenido hasta ahora una limitada aplicación como conservadores en alimentos [por ejemplo, en el caso de la nisina (la única de uso significativo, aceptada comercialmente en cuarenta países desde 1983), debido a su muy baja actividad a pH neutro o alcalino (su máxima estabilidad es a pH 2 y es casi insoluble a pH 8.0)]; en la mayoría de las referencias citadas, se busca en las bacteriocinas un efecto sobre *B. cereus* en alimentos no acídicos.

Adicionalmente, ya que, como se ha visto, ha sido difícil describir por métodos convencionales las complejas microbiotas de los alimentos fermentados tradicionales —entre los cuales está el pozol—, en la actualidad se aplican diferentes alternativas para determinar su estructura microbiana. Una de ellas consiste en aislar los microorganismos y tipificarlos mediante técnicas basadas en el ADN, como el RFLP [Romero, 2000], la ribotipificación [Díaz-Ruiz y col., 2003],

el AFLP, el ARDRA [Flores, 2007] y el RAPD [Farrés y col., 1999]. Y, para la detección de microorganismos no cultivables o aún no cultivados, se utilizan métodos en los que se determina la densidad microbiana a partir de los ácidos nucleicos extraídos directamente de la muestra. Son ejemplo de éstos la obtención de "huellas digitales", usando la DGGE o la TGGE [Bolaños, 2004; López, 2006], y la comparación de las secuencias de las bases de datos con las de los fragmentos amplificados de ADNr 16S [Escalante, 2000] (Díaz y Wachter, 2003).

No obstante, estas novedosas técnicas tienen asimismo limitaciones. Los métodos empleados para extraer los ácidos nucleicos de las muestras no garantizan que estos ácidos se recuperen intactos ni que todos los microorganismos presentes en ellas sean lisados; una vez obtenidos, los ácidos nucleicos deben purificarse para eliminar sustancias que inhiban las enzimas de restricción o la reacción de PCR; esta última también puede introducir errores, ya que es posible que ocurran amplificaciones preferenciales (por la reasociación del ADN usado como molde) o la formación de moléculas quiméricas (moléculas de ADNr híbridas formadas cuando una molécula de ADN parcialmente elongada sirve como cebador en el siguiente ciclo de PCR); etc. (Díaz y Wachter, 2003).

Tal como dicen Flores (1996) y Díaz y Wachter (2003), los avances recientes en la metodología empleada en el análisis de comunidades microbianas complementan las técnicas tradicionales, como las empleadas en este proyecto de tesis, para así obtener información sobre aspectos básicos de la ecología microbiana de los alimentos fermentados: diversidad, estructura y función.



## CONCLUSIONES

Figura: Representación del monumento 19 de la Venta, Tabasco

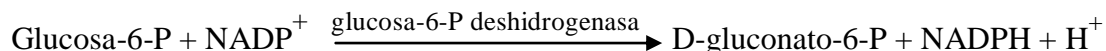
- Se investigó la presencia de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* en masas de nixtamal preparadas en Tabasco. Sólo se encontró al primero de éstos; en algunos casos, con cuentas iniciales que pudieron representar un riesgo para la salud.
- Se determinó la sobrevivencia de *S. aureus* en muestras de pozol con 48 h de fermentación y valores de pH de hasta 4.2; sus números habían disminuido y ya no representaban el riesgo antes mencionado.
- En una bola de pozol fermentada por 7 días —con un pH de 3.7—, se estableció la sobrevivencia de *S. aureus* en una cuenta que no constituía un riesgo para la salud; sin embargo, se plantea la posibilidad de que esta bacteria pudiera adaptarse a la acidez si está en la masa retenida en los espacios muertos de los molinos de nixtamal, que sirve como fuente de microorganismos a los lotes frescos de masa.
- Aunque al inicio el pozol pudo ser transmisor de *S. aureus*, la fermentación con el tiempo le confirió seguridad, al disminuir los números de dicha bacteria hasta niveles no considerados peligrosos. Por eso, es fundamental recalcar la importancia de su elaboración en condiciones higiénicas y de su rápida acidificación.
- Se determinó la producción de ácido láctico durante el proceso fermentativo estudiado, este ácido guardó una estrecha relación con el pH; el acético —hallado en pequeña cantidad—, al parecer no, pues en algunos casos el porcentaje encontrado inicialmente ya no se incrementó con el tiempo.
- La concentración inicial de azúcares en el pozol fue variable, como puede serlo también en el maíz, pero a pesar de eso el por ciento de ácido láctico llegó a ser similar en la mayoría de las muestras y el pH, también.

## **Apéndice 1. Encuesta sobre la calidad higiénica aparente de los locales donde se adquirieron las muestras de pozol**

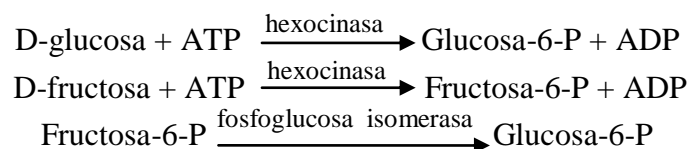
1. Lugar de adquisición de la muestra (mercado o pozolería, número del local).
  
2. Higiene del personal involucrado en la elaboración del pozol:
  - a) ¿Se ven limpias las manos del personal?
  
  - b) ¿Su ropa parece limpia?
  
3. Características de los locales:
  - a) Describir las características generales del lugar donde se compró la muestra.  
¿Está bien establecido?, ¿cómo es?
  
  - b) ¿De qué materiales son el techo, las paredes y los pisos?
  
  - c) ¿Tiene puertas y ventanas?
  
  - d) ¿Está aislado, o el pozol se prepara en el área donde transita la gente?
  
  - e) ¿Se observa limpio el local?
  
  - f) ¿Está ventilado?
  
  - g) ¿Existen insectos?
  
  - h) ¿Cómo asean el lugar?
  
  - i) ¿Cuentan con agua corriente (agua de la llave)?
  
4. Describir los servicios y equipos usados para obtener la masa.

## Apéndice 2. Determinación enzimática de fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa

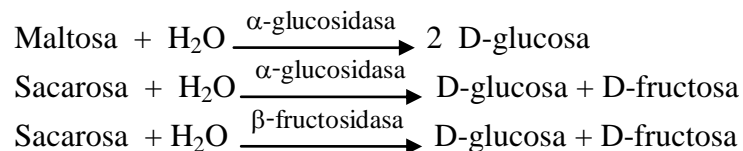
Se basa en determinar espectrofotométricamente (a 340 nm) el NADPH formado a partir de glucosa-6-P, conforme a la siguiente reacción:



La glucosa y la fructosa se convierten en glucosa-6-P por medio de las reacciones señaladas enseguida:



La maltosa y la sacarosa deben hidrolizarse primero, para después transformar la glucosa en glucosa-6-P (véanse las reacciones indicadas abajo).



De esta manera se pueden cuantificar los hidratos de carbono, ya que se obtiene un mol de NADPH por cada uno de los de glucosa, fructosa y sacarosa y por cada medio mol de maltosa.

Para la cuantificación de azúcares, los reactivos se utilizaron a un volumen reducido de 3 a 1 ml (Díaz, 1996); el orden de adición se presenta en las tablas A 1 y A 2.

El análisis se efectuó en celdas desechables de metacrilato de 1.5 ml, con un paso de luz de 1 cm. El equipo empleado (Spectronic Genesis 5 de Milton Roy)

se calibró contra agua. Las determinaciones se llevaron a cabo entre 20 y 25 °C a 340 nm

Para calcular la concentración de los azúcares, se tiene la siguiente ecuación:

$$C = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A_x \text{ [g/l]}$$

(x 2♥)

♥ Sólo cuando se mide maltosa

Donde:

V=Volumen final [ml]

v =Volumen de la muestra [ml]

PM =Peso molecular de la sustancia por analizar [g/mol]

d =Paso de la luz [1 cm]

$\varepsilon$  =Coeficiente de extinción del NADPH a 340 nm = 6.3 [L x mmol<sup>-1</sup>x cm<sup>-1</sup>]

La cuantificación se realizó a partir de las absorbancias, con base en lo ulterior:

#### Glucosa

$$\Delta A_{\text{glucosa}} = (A_2 - A_1)_{\text{muestra glucosa}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco glucosa}}$$

#### Fructosa

$$\Delta A_{\text{fructosa}} = (A_3 - A_2)_{\text{muestra fructosa}} - (A_3 - A_2)_{\text{blanco fructosa}}$$

#### Sacarosa

$$\Delta A_{\text{sacarosa}} = [(A_2 - A_1)_{\text{muestra sacarosa}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco sacarosa}}] - \Delta A_{\text{glucosa}}$$

#### Maltosa

$$\Delta A_{\text{maltosa}} = [(A_2 - A_1)_{\text{muestra maltosa}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco maltosa}}] - \Delta A_{\text{sacarosa}}$$

Si se ha diluido la muestra al prepararla, el resultado de la ecuación debe multiplicarse por el factor de dilución F. Cuando se ha trabajado con sólidos o semisólidos —cuyo pesaje es necesario para la preparación—, el resultado debe calcularse a partir de la cantidad pesada. En esta determinación se partió de un sólido y se realizaron diluciones, todo se consideró a la hora de hacer los cálculos.

**Tabla A 1**

	Blanco	Muestra
Pipetear en las celdas:		
Solución 1	0.333 ml	0.333 ml
Muestra	–	0.033 ml
Agua desionizada	0.666 ml	0.633 ml
Mezclar, esperar tres minutos y leer las absorbancias de las soluciones ( $A_1$ ). Empezar la reacción por la adición de:		
Suspensión 2	0.007 ml	0.007 ml
Mezclar, esperar el final de la reacción (10 a 15 min) y leer la absorbancia de las soluciones ( $A_2$ ). Añadir:		
Suspensión 3	0.007 ml	0.007 ml
Mezclar, esperar de 10 a 15 minutos y leer las absorbancias de las soluciones ( $A_3$ ).		

Donde:

Solución 1: Buffer de trietanolamina, pH = 7.6/NADP/ATP

Suspensión 2: Hexocinasa/Glucosa-6-P deshidrogenasa

Suspensión 3: Fosfoglucosa isomerasa



**Tabla A 2**

Pipetear en las celdas:	Blanco maltosa	Muestra maltosa	Blanco sacarosa	Muestra sacarosa	Blanco glucosa	Muestra glucosa
Solución 1	0.066 ml	0.066 ml	–	–	–	–
Solución 2	–	–	0.066 ml	0.066 ml	–	–
Muestra	–	0.033 ml	–	0.033 ml	–	0.033 ml
Mezclar e incubar a 20-25 °C por 20 min. Añadir:						
Solución 3	0.333 ml	0.333 ml	0.333 ml	0.333 ml	0.333 ml	0.333 ml
Agua desionizada	0.600 ml	0.567 ml	0.600 ml	0.567 ml	0.667	0.633 ml
Mezclar, esperar 3 minutos y leer las absorbancias de las soluciones (A <sub>1</sub> ). Empezar la reacción por la adición de:						
Suspensión 4	0.007 ml	0.007 ml	0.007 ml	0.007 ml	0.007 ml	0.007 ml
Mezclar, esperar el final de la reacción (10 a 15 min) y leer las absorbancias de las soluciones (A <sub>2</sub> ).						

Donde:

Solución 1: Buffer de acetatos, pH =6.6/ $\alpha$ -glucosidasa

Solución 2: Buffer de acetatos, pH =4.6/ $\beta$ -fructosidasa

Solución 3: Buffer de trietanolamina, pH = 7.6/NADP/ATP

Suspensión 4: Hexocinasa/Glucosa-6-P deshidrogenasa

### Apéndice 3. Preparación de medios y reactivos

#### ∞ Equipo:

Campana de flujo laminar, Industrias Alder, S. A. de C. V.  
 Termo-baño Felisa (Fabricantes de Equipo para Laboratorio e Industria, S. A.)  
 Estufa Apolo de Phillips  
 Balanza de barra triple IROSA, Modelo 4066  
 Balanza analítica Sartorius  
 Balanza OHAUS 1500D  
 Cajas de Petri desechables estériles, S y M Laboratorios, S.A. de C.V.

#### ∞ Medios comerciales

Nombre	Fórmula(g/l)	Preparación
Agar <i>Bacillus cereus</i> (Oxoid, CM617)	Peptona 1.00 Manitol 10.00 Cloruro de sodio 2.00 Sulfato de magnesio 0.10 Fosfato disódico 2.50 Fosfato potásico 0.25 Piruvato de sodio 10.00 Azul de bromotimol 0.12 Agar 14.00  pH=6.2±0.2	Se suspendió el medio (20.5 g) en el agua destilada (475 ml), se agitó y se calentó a ebullición hasta disolverlo en su totalidad. Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. Se enfrió hasta 50 °C, se le vertió de forma aséptica un vial del suplemento selectivo para <i>Bacillus cereus</i> (Oxoid, SR99E) — previamente reconstituido con 2 ml de agua destilada estéril— y se le añadieron 25 ml de emulsión de yema de huevo (Oxoid, SR47). Se homogeneizó bien y se distribuyó en cajas de Petri. Cada frasco del suplemento selectivo contiene 50 000 unidades de polimixina B.
Agar Baird-Parker (Oxoid, CM275)	Triptona 10.00 “Lab Lemco” en pvo. 5.00 Extracto de levadura 1.00 Piruvato de sodio 10.00 Glicina 12.00 Cloruro de litio 5.00 Agar 20.00  Tras enfriarlo hasta 50 °C, se le adicionaron 50 ml de la emulsión de yema de huevo-telurito.  pH=6.8±0.2	El medio en polvo se añadió al agua destilada (63 g/l) y se hirvió hasta disolverlo por completo. Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. Se llevó a 50 °C, se le adicionó la emulsión de yema de huevo-telurito (Oxoid, SR54), se mezcló muy bien y se vertió a cajas de Petri. Como el telurito de potasio se encontraba al 0.21% p/v en los 50 ml de emulsión añadidos, la concentración final de esta sal en el medio Baird-Parker era de 0.01% p/v.  En algunas ocasiones, se ocupó la misma emulsión de yema de huevo que se empleó para el aislamiento de <i>B. cereus</i> (Oxoid, SR47) y se le agregó el telurito de potasio en solución.

Nombre	Fórmula(g/l)	Preparación
Agar DNasa (Oxoid, CM321)	Triptosa 20.00 ADN 2.00 Cloruro de sodio 5.00 Agar 12.00 pH=7.3±0.2	El medio en polvo se agregó al agua destilada (39 g/l) y se hirvió con agitación hasta disolverlo por completo. Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos y se enfrió hasta poder verterlo en cajas de Petri.
Agar nutritivo (Oxoid, CM3)	"Lab-Lemco" en pvo. 1.00 Extracto de levadura 2.00 Peptona 5.00 Cloruro de sodio 5.00 Agar 15.00 pH=7.4±0.2	El agar nutritivo en polvo se añadió al agua destilada (28 g/l) y se agitó e hirvió hasta disolver completamente los ingredientes. Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min (se prepararon tubos y cajas de éste).
Agar para cuenta en placa (Oxoid, CM325)	Triptona 5.00 Extracto de levadura 2.50 Glucosa 1.00 Agar 9.00 pH=7.0±0.2	Se añadió el medio en polvo al agua destilada (17.5g/l) y se agitó e hirvió hasta disolver los ingredientes. Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos y se enfrió lo suficiente para poder vaciarlo en cajas de Petri.
Base de agar Baird-Parker (Bioxon, 239-1)	Peptona de caseína 10.00 Extracto de carne 5.00 Extracto de levadura 1.00 Cloruro de litio 5.00 Agar 17.00 Glicina 12.00 Piruvato de sodio 10.00 pH=6.8±0.2	Este medio se adicionó al agua destilada (60 g/l) y se agitó e hirvió hasta disolverlo por completo. Se esterilizó en la autoclave a 121 °C por 15 min. Se enfrió hasta 45 °C y se le agregaron 10 ml de la solución de telurito de potasio al 1% y 50 ml de la emulsión de yema de huevo (Oxoid, SR47). Se homogeneizó cuidadosamente y se vertió en cajas de Petri.
Caldo APT (Difco, 0655-17-9)	Extracto de levadura 7.50 Triptona 12.50 Glucosa 10.00 Citrato de sodio 5.00 Clorhidrato de 0.001 tiamina 5.00 Cloruro de sodio 5.00 Fosfato dipotásico 0.14 Cloruro de magnesio 0.80 Sulfato de magnesio 0.04 Sulfato ferroso Complejo de monooleato de 0.02 sorbitana pH=6.7±0.2	El medio en polvo se agregó al agua destilada (46.2 g/l) y se agitó y calentó hasta disolver los ingredientes por completo. El medio líquido se distribuyó en tubos, para luego esterilizarlo en autoclave a 121 °C por 15 minutos; se evitó el sobrecalentamiento.

Nombre	Fórmula(g/l)	Preparación
Caldo infusión cerebro corazón ( <i>BHI Broth</i> ) (Oxoid, CM225)	Infusión de corazón de vaca (en forma sólida) 5.00 Infusión de cerebro de ternera (en forma sólida) 12.50 Peptona proteosa 10.00 Glucosa 2.00 Cloruro de sodio 5.00 Fosfato disódico 2.50 pH=7.4±0.2	El medio en polvo se adicionó al agua destilada (37 g/l), se agitó y calentó hasta disolver los ingredientes y se repartió en tubos. Estos últimos se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 min. Nota: si los tubos no se usan el mismo día en que se han esterilizado, antes de inocularlos deben colocarse en un baño de agua hirviendo por varios minutos —para eliminar el oxígeno absorbido— y luego deben enfriarse rápidamente (sin agitar).
Caldo nitrato (Difco, 0268-17-8)	Extracto de carne 3.00 Peptona 5.00 Nitrato de potasio 1.00 pH=7.0±0.2	Se adicionó el medio en polvo al agua destilada (9 g/l), se disolvió y se distribuyó en tubos; estos últimos se esterilizaron a 121 °C por 15 min.
Caldo nutritivo (Oxoid, CM1)	“Lab-Lemco” en pvo. 1.00 Extracto de levadura 2.00 Peptona 5.00 Cloruro de sodio 5.00 pH=7.4 aprox.	El medio en polvo se agregó al agua destilada (13 g/l), se disolvió bien y se repartió en tubos, para esterilizarlos en autoclave a 121 °C por 15 minutos.
Caldo triptonsoya (Oxoid, CM129) + 10% de NaCl	Digerido pancreático de caseína 17.00 Digerido papaico de haba de soya 3.00 Cloruro de sodio 5.00 Fosfato de potasio dibásico 2.50 Glucosa 2.50 pH=7.3 aprox.	Se añadieron el NaCl (100 g/l) y el medio en polvo (30 g/l) al agua destilada; después de haberlos disuelto totalmente, el caldo preparado se distribuyó en matraces Erlenmeyer (225 ml en cada uno). Estos últimos se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 min.

## ☞ Medios y reactivos preparados en el laboratorio

Aceite mineral		
Aceite mineral para uso medicinal (Droguería San Isidro Sur). En un principio se trabajó con parafina refinada para histología (Laboratorios del Río, S.A.), pero es más fácil manejar el aceite mineral y da los mismos resultados.		Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Se dejó enfriar y se distribuyó —con pipeta de vidrio estéril y propipeta— en los tubos inoculados para las pruebas de utilización anaeróbica de carbohidratos.
Ácido acético 5 N		
Ácido acético glacial (Mallinckrodt A.R.)	28.75 ml	El ácido se disolvió en el agua y se distribuyó en frascos.
Agua destilada	71.25 ml	

Ácido sulfúrico 1 N		
Ácido sulfúrico (Reactivo Baker, Lote: L43C09)		Se preparó con agua desionizada y se filtró con papel Whatman Número 4.
$M = \frac{\% \times \delta \times 10}{PM}$ <p>Donde:</p> <p>%=97.8 PM=98.08 <math>\delta</math>=1.84 1 M=2 N</p>		
Ácido sulfúrico 0.01 N		
Ácido sulfúrico 1 N	10 ml	Se preparó, se filtró (papel Whatman Núm. 4) y se desgasificó dejándolo un par de horas con vacío. Antes de ocuparlo — era la fase móvil en el HPLC—, se desgasificaba en un sonicador (Branson 2210).
Agua desionizada	990 ml	
Agar manitol-yema de huevo-polimixina (MYP)		
Fórmula		Se disolvieron los ingredientes en el agua destilada y se ajustó el pH a 7.2±0.2. Se esterilizó el medio a 121 °C por 15 minutos. Se llevó a 50 °C, se le adicionó la solución de polimixina B (solución al 0.1%) y la emulsión de yema de huevo, se agitó perfectamente, se enfrió un poco y se distribuyó en cajas de Petri.
“Lab-Lemco” en polvo (Oxoid, L29)	1.00 g	
Peptona (Oxoid, L37)	10.00 g	
Manitol (Probaind de México)	10.00 g	
Cloruro de sodio (NaCl) (J.T. Baker)	10.00 g	
Rojo de fenol (Merck) (1% en etanol)	2.5 ml	
Agar	15.00 g	
Agua destilada	900 ml	
Al enfriarlo hasta 50 °C, se le adicionaron 50 ml de la emulsión de yema de huevo (Oxoid, SR47) y 10 ml de la solución de polimixina B al 0.1%.		
Agar tirosina		
<u>Base</u>		El agar nutritivo en polvo se añadió al agua destilada y se hirvió con agitación hasta disolverlo por completo. Se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min. Se enfrió hasta 48 °C, se le adicionó de manera aséptica la suspensión de tirosina estéril (un tubo/100 ml de medio) y se mezcló a la perfección. Se colocaron asépticamente 3.5 ml de éste en cada tubo de prueba esterilizado con anticipación y se solidificaron de forma inclinada; deben enfriarse/solidificarse rápido para evitar la separación de la tirosina y el agar.
Agar nutritivo (Oxoid, CM3)	2.8 g	
Agua destilada	100.0 ml	
<u>Suspensión de tirosina</u> (véase la página 191)		
Agua peptonada al 0.1%		
Fórmula (g/l)		Se suspendió 1 g de peptona por litro de agua destilada, se agitó y calentó
Peptona bacteriológica (Oxoid, L37)	1.00	

Continúa en la siguiente página

		hasta disolverla por completo. Se repartió en matraces y tubos y se esterilizó a 121 °C por 15 minutos.
<b>Buffer fosfato Butterfield (solución stock)</b>		
Fórmula (g/l) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34	Se disolvió el KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> en 500 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 1 N y se llevó el volumen a un litro, también con agua destilada. Se esterilizó a 121 °C por 15 min, para guardarlo después en refrigeración.
<b>Buffer fosfato Butterfield diluido en agua</b>		
Fórmula Buffer fosfato Butterfield (solución stock) Agua destilada	1.25 ml 998.75 ml	La solución se preparó, con 1.25 ml de la solución stock, aforando a un litro con el agua destilada. El buffer ya diluido se distribuyó en tubos y matraces y se esterilizó a 121 °C por 15 minutos.
<b>Caldo lisozima</b>		
Fórmula Caldo nutritivo (Oxoid, CM1) Solución de lisozima	99 ml 1 ml	Se preparó el caldo nutritivo y se esterilizó a 121 °C por 15 min (al mismo tiempo se esterilizaron los tubos para la prueba). Ya frío, se le adicionó —dentro de la campana y con material estéril— 1 ml de la solución de lisozima, se mezcló perfectamente y se distribuyó en los tubos antes mencionados.
<b>Caldo rojo de fenol-glucosa</b>		
Fórmula(g/l) Peptona proteosa Cloruro de sodio (NaCl) “Lab-Lemco” en pvo. (ecto. de carne) Glucosa Rojo de fenol (7.2 ml de la soln. al 0.25%)	10.000 5.000 1.000 5.000 0.018	Se disolvieron los ingredientes en el agua destilada y se ajustó el pH a 7.4±0.2. Se distribuyó el medio, a razón de 2.5 ml por tubo de 13 x 100 mm, y se esterilizó en autoclave a 118 °C por 10 minutos.
<b>Caldo tripticasa-soya-polimixina</b>		
Fórmula (g/l) Peptona tripticase (triptona) Peptona fitona (soytona) Cloruro de sodio K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Glucosa pH=7.3±0.2	17.0 3.0 5.0 2.5 2.5	El medio en polvo se añadió al agua destilada (30 g/l), se disolvió bien y se distribuyó en matraces o tubos de ensayo. Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. Antes de usarlo, se adicionó la solución de polimixina B (6.7 ml/l).
<b>Medio de fermentación de glucosa</b>		
Fórmula (g/l) Triptona (Oxoid, L42) Extracto de levadura (Oxoid, L21)	10.00 1.00	Se disolvieron los ingredientes —con calor y agitación suave— en el agua destilada y se ajustó el pH (7.0±0.2). Se

Continúa en la siguiente página

Glucosa (Proband de México)	5.00	repartió el medio en tubos de 16 x 125 mm (cubriéndose 2/3 partes de cada uno), y éstos se esterilizaron en autoclave a 115 °C por 10 minutos.
Púrpura de bromocresol (Synthetical Lab.)	0.04	
Agar bacteriológico (Bioxon, Cat. 150-1) pH=7.0±0.2	2.00	
Medio de fermentación de manitol		
Fórmula (g/l)		Se disolvió el medio —con calor y una suave agitación— en el agua destilada y se ajustó su pH (7.0±0.2). Se repartió en tubos de 16 x 125 mm (cubriéndose 2/3 partes de cada uno), y éstos se esterilizaron en la autoclave (115 °C por 10 min).
Triptona (Oxoid, L42)	10.00	
Extracto de levadura (Oxoid, L21)	1.00	
Manitol (Proband de México)	5.00	
Púrpura de bromocresol (Synthetical Lab.)	0.04	
Agar bacteriológico (Bioxon, Cat. 150-1) pH=7.0±0.2	2.00	
Medio de movilidad		
Fórmula (g/l)		Empleando calor y una agitación suave, se disolvió el medio en el agua destilada. Se le ajustó el pH a 7.4±0.2. Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Se enfrió hasta 50 °C y se repartió asépticamente en tubos estériles de 13 x 100 mm (2 ml de medio en cada uno). Éstos se almacenaron dos días a temperatura ambiente antes de utilizarlos.
Tripticasa	10.00	
Extracto de levadura	2.50	
Glucosa	5.00	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.50	
Agar	3.00	
Medio para la prueba de la termonucleasa*(véase la página 192)		
Fórmula (g/l)		Se disolvió el Tris en 1 litro de agua destilada y se ajustó el pH a 9.0. Se agregaron los otros ingredientes, menos el azul de toluidina, y se calentó a ebullición para disolverlos. Al final, se añadió y disolvió el colorante. El medio se esterilizó a 121 °C por 15 min; si se ocupa inmediatamente, se dice que esto no es necesario.
Agar DNasa (Oxoid, CM321)	5.8500	
Agar bacteriológico (Bioxon, Cat. 150-1)	8.2000	
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> ) anhidro	0.0011	
Cloruro de sodio (NaCl) (J. T. Baker)	9.2500	
Azul de toluidina	0.0830	
Tris (hidroximetil) aminometano	6.1000	
Reactivos para la prueba de nitrito		
<u>Reactivo A “Ácido sulfanílico”</u>		Se suspendió el ácido sulfanílico en el ácido acético y se trató de disolver. Se almacenó el reactivo en botellas color ámbar.
Fórmula		
Ácido sulfanílico (J. T. Baker, 0354)	1 g	
Ácido acético 5 N	125 ml	
<u>Reactivo C “α-Naftol”</u>		Se suspendió el α-Naftol en el ácido acético y se disolvió. El reactivo se almacenó en botellas color ámbar.
Fórmula		
α- Naftol (Mallinckrodt chemical)	1 g	
Ácido acético 5 N	200 ml	

Reactivos para Voges Proskauer modificado		
<u>Solución 1</u>		Se mezcló y se guardó en frascos oscuros con tapón.
$\alpha$ - Naftol	5 g	
Alcohol absoluto	100 ml	
<u>Solución 2</u>		Se mezcló y se guardó en frascos oscuros con tapón.
Hidróxido de potasio	40 g	
Agua destilada	100 ml	
Solución de lisozima		
Fórmula		Se disolvió la lisozima en el agua destilada y se esterilizó por filtración a través de una membrana de 0.45 $\mu$ m; se realizó una prueba de esterilidad antes de ocuparla (por duplicado, se sembró una asada en agar nutritivo y no hubo crecimiento).
Lisozima	0.1 g	
Agua destilada	100.0 ml	
Solución de peróxido de hidrógeno al 3%		
Peróxido de hidrógeno (solución al 30%) (Sigma de México, S.A. de C.V.)		Se tomaron 10 ml de la solución de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% y se aforaron a 100 ml con agua destilada. La solución al 3% se mantuvo en refrigeración hasta su uso.
Solución de polimixina B al 0.1%		
Sulfato de polimixina B (aerosporina) con potencia de 7 600 U/mg (ICN Biomedical Inc.)		Se disolvieron 50 000 U en 50 ml de agua destilada. La solución se esterilizó por filtración (membrana de 0.45 $\mu$ m) y se almacenó, protegiéndola de la luz, a -4 °C.
Solución de polimixina B al 0.15%		
Sulfato de polimixina B (aerosporina) con potencia de 7 600 U/mg (ICN Biomedical Inc.)		Se disolvieron 50 000 U en 33.3 ml de agua destilada. La solución se esterilizó por filtración (membrana de 0.45 $\mu$ m) y se almacenó, protegiéndola de la luz, a -4 °C.
Suspensión de tirosina		
L- tirosina	0.5 g	En un tubo de ensayo con tapón de rosca, se suspendió la tirosina en el agua destilada, se mezcló a la perfección y se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos.
Agua destilada	10.0 ml	
Voges Proskauer modificado		
Fórmula (g/l)		Se disolvieron los ingredientes en el agua destilada. El medio se distribuyó en tubos (5ml/tubo) y se esterilizó en autoclave a 121 °C por 10 minutos.
Peptona proteosa	7.0	
Cloruro de sodio	5.0	
Glucosa	5.0	
pH=6.5±0.2		



\*Medio para la prueba de la termonucleasa

Obtuvimos el medio para la prueba de la termonucleasa a partir del agar DNasa, en base a la fórmula del agar DNA-azul de toluidina.

Comparación de fórmulas

Agar DNasa		Agar DNA-azul de toluidina	
Fórmula por litro de agua destilada		Fórmula por litro de agua destilada	
DNA	2.0 g	DNA	0.3 g
Agar	2.0 g	Agar	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g	Cloruro de sodio	10.0 g
Triptosa	20.0 g	Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> ) anhidro	1.1 mg
		Tris (hidroximetil) aminometano	6.1 g
		Azul de toluidina	83.0 mg

El medio preparado en el laboratorio se presenta a continuación:

Fórmula (g/l)	
Agar DNasa (Oxoid, CM321)	5.8500
Agar bacteriológico (Bioxon, Cat. 150-1)	8.2000
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> ) anhidro	0.0011
Cloruro de sodio (NaCl) (J. T. Baker)	9.2500
Azul de toluidina	0.0830
Tris (hidroximetil) aminometano	6.1000

Donde 5.85 g de agar DNasa tienen 0.3 g de DNA, 3.0 g de triptosa, 0.75 g de cloruro de sodio y 1.8 g de agar.

Al hacer la suma de los ingredientes, resulta lo siguiente:

DNA	0.3 g
Triptosa	3.0 g
Cloruro de calcio	1.1 mg
Cloruro de sodio	10 g (9.25 + 0.75)
Agar	10 g (1.8 + 8.2)
Azul de toluidina	0.083 g
Tris	6.1 g



La diferencia entre el medio preparado en el laboratorio y el agar azul de toluidina buscado es esencialmente la triptosa (3.0 g adicionales).

**Apéndice 4. Resultados de las pruebas bioquímicas y de morfología celular realizadas a las colonias típicas de *Staphylococcus aureus* aisladas de agar Baird-Parker**

<i>Cepa*</i>	<i>Pozol</i>	<i>pH</i>	<i>Tinción de Gram</i>	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P3</i>	<i>P4</i>	<i>P5</i>	<i>P6</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Control</i>	–	–	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sen1.1</i>	1	5.8	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	ND	ND	+	+
<i>Sen1.2</i>	1	5.8	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	ND	ND	+	+
<i>Sen1.3</i>	1	5.8	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	ND	ND	+	+
<i>Sen1.4</i>	1	5.8	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	ND	ND	+	+
<i>Sen1.5</i>	1	5.8	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	ND	ND	+	+
<i>Sen1.6</i>	1	5.8	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	ND	ND	+	+
<i>Sen2.1</i>	2	5.3	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	ND	ND	+	+
<i>Sen2.2</i>	2	5.3	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	ND	ND	+	+
<i>Sen2.3</i>	2	5.3	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	ND	ND	+	+
<i>Sen2.4</i>	2	5.3	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	ND	ND	+	+
<i>Sen2.5</i>	2	5.3	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	ND	ND	+	+
<i>Sen2.6</i>	2	5.3	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	ND	ND	+	+
<i>Si5.1</i>	5	4.8	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Si5.2</i>	5	4.8	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Si5.3</i>	5	4.8	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Si5.4</i>	5	4.8	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sien5.1</i>	5	4.8	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sien5.2</i>	5	4.8	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sien5.3</i>	5	4.8	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sien5.4</i>	5	4.8	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sfen5.1</i>	5	3.7	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sfen 5.2</i>	5	3.7	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sfen 5.3</i>	5	3.7	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Si6.1</i>	6	6.7	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	–	–	–	–	–
<i>Si6.2</i>	6	6.7	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Si6.3</i>	6	6.7	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	–	–	–	–	–	–
<i>Sien6.1</i>	6	6.7	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sien6.2</i>	6	6.7	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sien6.3</i>	6	6.7	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sf6.1</i>	6	4.3	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sf6.2</i>	6	4.3	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sf6.3</i>	6	4.3	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sfen6.1</i>	6	4.3	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sfen6.2</i>	6	4.3	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sien7.1</i>	7	5.7	<i>cocos G(+) en racimos</i>	+	+	+	+	+	+	+

Cepa*	Pozol	pH	Tinción de Gram	P1	P2	P3	P4	P5	P6	S. aureus
Sien7.2	7	5.7	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Sien7.3	7	5.7	cocos G(+) en racimos	+	+	+	-	-	-	-
Sien7.4	7	5.7	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Si8.1	8	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	-	-	-	-	-
Si8.2	8	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	-	-	-	-	-
Si8.3	8	5.0	bacilos G(+)	/	/	/	/	/	/	-
Si 8.4	8	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	-	-	-	-	-
Sien8.1	8	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	-	-	-	-	-
Sfen8.1	8	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	-	-	-	-	-
Sfen8.2	8	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	-	-	-	-	-
Si9.1	9	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	+	-	-	-	-
Si9.2	9	4.8	sarcinas	/	/	/	/	/	/	-
Si9.3	9	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	+	-	-	-	-
Si9.4	9	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	-	-	-	-	-
Sien9.1	9	4.8	bacilos cortos G(+)	/	/	/	/	/	/	-
Sien9.2	9	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	-	-	-	-	-
Sien9.3	9	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	-	-	-	-	-
Sien9.4	9	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	+	-	-	-	-
Si10.1	10	5.8	cocos G(+) en racimos	+	+	-	-	-	-	-
Si10.2	10	5.8	cocos G(+) en racimos	+	+	-	-	-	-	-
Si10.3	10	5.8	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Si10.4	10	5.8	cocos G(+) en racimos	+	+	-	-	-	-	-
Sien10.1	10	5.8	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Sien10.2	10	5.8	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Sien 10.3	10	5.8	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Sfen 10.1	10	4.2	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Sfen 10.2	10	4.2	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Sfen 10.3	10	4.2	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Sien 11.1	11	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Sien 11.2	11	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Sien 11.3	11	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Sien 11.4	11	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Sien 12.1	12	4.9	cocos G(+) en racimos	+	+	-	-	-	-	-
Sien 12.2	12	4.9	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Sien 12.3	12	4.9	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Sien 12.4	12	4.9	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Si 13.1	13	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	-	-	-	-	-
Si 13.2	13	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Si 13.3	13	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	-	-	-	-	-
Si 13.4	13	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
Sien 13.1	13	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+

Cepa*	Pozol	pH	Tinción de Gram	P1	P2	P3	P4	P5	P6	<i>S. aureus</i>
<i>Sien</i> 13.2	13	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sien</i> 13.3	13	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sien</i> 13.4	13	4.8	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sfen</i> 13.1	13	4.1	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sfen</i> 13.2	13	4.1	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sfen</i> 13.3	13	4.1	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sfen</i> 13.4	13	4.1	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Si</i> 14.1	14	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Si</i> 14.2	14	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Si</i> 14.3	14	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Si</i> 14.4	14	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sien</i> 14.1	14	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sien</i> 14.2	14	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sien</i> 14.3	14	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sien</i> 14.4	14	5.0	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sfen</i> 14.1	14	4.2	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sfen</i> 14.2	14	4.2	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sfen</i> 14.3	14	4.2	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sfen</i> 14.4	14	4.2	cocos G(+) en racimos	+	+	+	+	+	+	+

**Donde:**

P1 = Prueba de la catalasa

P5 = Prueba de la termonucleasa

P2 = Fermentación anaeróbica de glucosa

P6 = Prueba de la coagulasa

P3 = Fermentación anaeróbica de manitol

ND = No determinado

P4 = Prueba de la DNasa

**\*El significado de las claves de las cepas es:**

*Sen* = Cepa aislada, por enriquecimiento, de una muestra analizada sólo al inicio de la fermentación (muestras 1 y 2), para identificar *S. aureus*

*Si* = Cepa aislada, en la cuenta directa y de una muestra inicial, para la identificación de *S. aureus*

*Sien* = Cepa aislada, por enriquecimiento y de una muestra inicial, para identificar *S. aureus*

*Sf* = Cepa aislada, en la cuenta directa, de la muestra fermentada en el laboratorio [durante 7 días (pozol 5) o 48 h (el resto de las bolas)], para la identificación de *S. aureus*

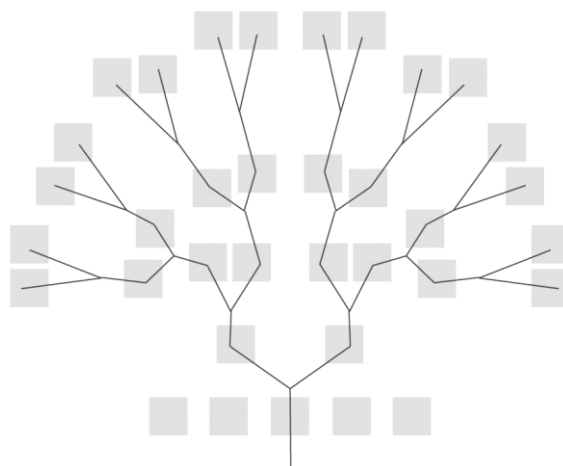
*Sfen* = Cepa aislada, por enriquecimiento, de la muestra fermentada en el laboratorio (la núm. 5 durante 7 días; las otras, por 48 h), para identificar *S. aureus*

1<sup>er</sup> número = Número del pozol

2<sup>o</sup> número = Número asignado a la cepa

**Apéndice 5. Transferencias de algunas especies del género *Bacillus* (1986-2005) (Nuevas combinaciones)**

1ª Edición del <i>Bergey's manual of systematic bacteriology</i> (BISMIS, 1986)	2ª Edición del <i>Bergey's manual of systematic bacteriology</i> (BISMIS, 2005)
<i>Bacillus globisporus</i>	<i>Sporosarcina globisporus</i>
<i>Bacillus pasteurii</i>	<i>Sporosarcina pasteurii</i>
<i>Bacillus psychrophilus</i>	<i>Sporosarcina psychrophila</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>Bacillus thermodenitrificans</i>	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>



## REFERENCIAS

- Abriouel, H., ben Omar, N., Lucas, R., Martínez, M., Ortega, E. y Gálvez, A. (2007). Differentiation and characterization by molecular techniques of *Bacillus cereus* group isolates from *poto poto* and *dégué*, two traditional cereal-based fermented foods of Burkina Faso and Republic of Congo. *Journal of Food Protection*, **70**(5): 1165-1173.
- Abriouel, H., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez, M. y Valdivia, E. (2002). Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(3): 1473-1477. (Disponible en: <http://aem.asm.org/cgi/reprint/68/3/1473?ijkey=8baafc0d8e8ba2e968e59349a151c05ad7ddd9e2>)
- Aguilera, D. (1989). *Estudio microbiológico y bioquímico de la fermentación del pozol*. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, UIA, México, pp. 84-93.
- Álvarez, E. y Leal, H. (1993). Adaptación de la fermentación del pozol al enriquecimiento proteico de subproductos agrícolas. En: *Alimentos fermentados indígenas de México*. M. C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras), UNAM, pp. 123-129.
- Ampe, F., ben Omar, N. y Guyot, J. P. (1999). Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented food using rRNA-targeted oligonucleotide probes: application to pozol, a Mexican lactic acid fermented maize dough. *Journal of Applied Microbiology*, **87**, 131-140.
- Arunga, R. O. (1982). Coffee. En: *Microbiology of fermented food*. V. 7, A. H. Rose (Ed.), Academic Press, U. K., pp. 259-274.
- Babasaki, K., Takao, T., Shimonishi, Y. y Kurahashi., K. (1985). Subtilisin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *Journal of Biochemistry* (Tokio), **98**, 585-603.
- Badui, S. (1988). *Diccionario de tecnología de alimentos*. 1ª edición, Editorial Alhambra Mexicana, México, D. F., pp. 37, 38, 68, 99, 113 y 207.

- Badui, S. (1993). *Química de los alimentos*. 3ª edición, 2ª reimpresión, Editorial Alhambra Mexicana, México, D. F., pp. 197-200 y 409-446.
- Baik, H. S., Bearson, S., Dunbar, S. y Foster, J. W. (1996). The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* provides protection against organic acids. *Microbiology*, **142**, 3195-3200.
- Bailey, O. R. (1961). *Contribución al estudio de alimentos mexicanos, pozol y chorote, bebidas refrescantes y alimenticias tabasqueñas*. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, UNAM, México, 59 pp.
- Baker, F. J. y Breach, M. R. (1990). *Manual de técnicas de microbiología médica*. Editorial Acribia, España, Zaragoza, pp. 113-23, 548, 561 y 584-86.
- Banwart, G. (1982). *Microbiología básica de los alimentos*. Editorial Bellaterra, pp. 34-48, 97, 98, 105-120, 129-143, 220-244, 274-278, 362 y 363.
- Barboza-Corona, J. E., Vázquez-Acosta, H., Salcedo-Hernández, R. y Bautista-Justo, M. (2004). Probióticos y conservadores naturales en alimentos. *Acta Universitaria*, septiembre-diciembre, año/vol. 14, número 003, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México, pp.32-38. (Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/416/41614304.pdf>)
- Barrell, R. A. E. y Rowland, M. G. M. (1979). Infant foods as a potential source of diarrhoeal illness in rural West Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**, 85-90.
- Barrón de Morán, C. (1980). *Historia de México*. 22ª edición, Editorial Porrúa, México, D. F., pp. 22-151.
- Bearson, S., Bearson, B. y Foster, J. W. (1997). Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **147**, 173-180.
- Benítez, F. (1985). *Ki: el drama de un pueblo y una planta*. 1ª edición, Lecturas mexicanas, número 78, Fondo de Cultura Económica, México, D. F., pp. 10-39.
- BISMIS (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 1ª edición, vol. 2, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA, pp. 1104-1139.
- BISMIS (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2ª edición, vol. 2, Parte A (Introductory essays), Editorial Springer, USA, pp. 189, 191, 258 y 279.

- BISMIS (Bergey's International Society for Microbial Systematics) (1975). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Reimpresión de la 8ª edición, vol. 3, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA, pp. 531-550.
- Bizani, D., Motta, A. S., Morrissy, J. A. C., Terra, R. M. S., Souto, A. A. y Brandelli, A. (2005). Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *International Microbiology*, **8**: 125-131. (Disponible en: <http://www.im.microbios.org/0802/0802125.pdf>)
- Bolaños, S. (2004). *Variabilidad en la microbiota de diferentes muestras de pozol, determinada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)*. Tesis de Maestría en Ciencias (Bioquímicas), Facultad de Química, UNAM, México, 111 pp.
- Bonestroo, M. H., Kusters, B. J. M., de Wit, J. C. y Rombouts, F. M. (1993). The fate of spoilage and pathogenic bacteria in fermented sauce-based salads. *Food Microbiology*, **10**, 101-111.
- Brock, T. D. y Madigan, M. T. (1993). *Microbiología*. 6ª edición, Prentice Hall-Hispanoamericana, pp. 4, 38, 71-72, 127-130, 171, 332-333, 373 -377, 416-423, 431, 511, 798-799, 820, 821, 874, 880, 930, 934 y G-6.
- Bryan, A. H., Bryan, C. A. y Bryan, C. G. (1971). *Bacteriología*. 1ª edición en español, Compañía Editorial Continental, México, D. F., pp. 263, 517 y 467-473.
- Cabra, V. C. (2000). *Estudio cinético comparativo de la fermentación de masa de pozol elaborada en dos condiciones higiénicas distintas*. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, México, 90 pp.
- Calderón, E. (1977a). Infecciones del tracto respiratorio superior. En: *Conceptos clínicos de infectología*. E. Calderón (Ed.), 4ª edición, Méndez Cervantes Editor, México, D. F., pp.123-130.
- Calderón, E. (1977b). Infecciones del tracto respiratorio inferior. En: *Conceptos clínicos de infectología*. E. Calderón (Ed.), 4ª edición, Méndez Cervantes Editor, México, D. F., pp. 131-141.
- Calderón, E. (1977c). Infecciones de vías urinarias. En: *Conceptos clínicos de infectología*. E. Calderón (Ed.), 4ª edición, Méndez Cervantes Editor, México, D. F., pp. 259-278.



- Calderón-Villagómez, A. (1993). Bebidas y alimentos fermentados entre los choles: estudio etnohistórico, microbiano y químico (Proyecto de investigación). En: *Alimentos fermentados indígenas de México*. M. C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras), UNAM, pp. 57-62.
- Campos-Navarro, R. (1997). La hamaca: historia, etnografía y usos médicos de un mueble americano. *Rev. Med. IMSS (México)*, **35**(4): 287-294.
- Campos-Navarro, R., García-Vargas, F., Barrón, U., Salazar, M. y Cabral-Soto, J. (1997). La satisfacción del enfermo hospitalizado: empleo de hamacas en un hospital rural del sureste de México. *Rev. Med. IMSS (México)*, **35**(4): 265-272.
- Cañas, A. O., Bárzana, E., Owens, J. D. y Wachter, M. C. (1993a). La elaboración del pozol en los Altos de Chiapas. *Ciencia*, **44**, 219-229.
- Cañas, A. O., Bárzana, E., Owens, J. D. y Wachter, M. C. (1993b). Estudio de la variabilidad en los métodos de producción de pozol en los Altos de Chiapas. En: *Alimentos fermentados indígenas de México*. M. C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras), UNAM, pp. 69-74.
- Caparelli, E. y Mata, L. (1975). Microflora of maize prepared as tortillas. *Applied Microbiology*, **29**(6), 802-806.
- Carmo, L. S. do, Cummings, C., Linardi, V. R., Souza, R., de Souza, J. M., de Sena, M. J., dos Santos, D. A., Shupp, J.W., Peres, R. K y Jett, M., (2004). A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. *Foodborne Pathog. Dis.*, **1**(4): 241-6.
- Carmo, L. S. do, Souza, R., Linardi, V. R., de Sena, M. J., dos Santos, D. A., de Faria, M. E., Pena, E. C., Jett, M. y Heneine, L. G. (2002). Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, **19**, 9-14.
- Carr, J. G. (1985). Tea, coffee and cocoa. En: *Microbiology of fermented foods*. V. 2, J. B. Wood (Ed.), Elsevier Applied Science Publishers, USA, pp. 133-154.
- Casalino, M., Yusuf, M. W., Nicoletti, M., Bazzicalupo, P., Coppo, A., Colonna, B., Cappelli, C., Bianchini, C., Falbo, V., Ahmed, H. J., Omar, K. H., Maxamuud, K. B. y Maimone, F. (1988). A two-year study of enteric infections associated with diarrhoeal diseases in urban Somalia. *Transactions of the*

- Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **82**, 637-641.
- Casillas, L. E. y Vargas, L. A. (1984). La alimentación entre los mexicas. En: *Historia general de la medicina en México*. Tomo I, México antiguo, F. Martínez Cortés (Ed.), Academia Nacional de Medicina y Facultad de Medicina, UNAM, México, pp. 133-156.
- Censo (1990). Resultados definitivos del XI censo general de población y vivienda, México.
- Centro Nacional de Estudios Municipales de la Secretaría de Gobernación (1988). *Los municipios de Tabasco*. Colección Enciclopedia de los municipios de México. Talleres Gráficos de la Nación, México, D. F., 114 pp.
- Chan, P. F., Foster, S. J., Ingham, E. y Clements, M. O. (1998). The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor  $\sigma^B$  controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J. Bacteriol.*, **180**(23): 6082-6089.
- Cherrington, C. A., Hinton, M., Mead, G. C. y Chopra, I. (1991). Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. En: *Advances in Microbial Physiology*. Vol. 32, Academic Press, Londres, pp. 87-108.
- Chitarra, G. S., Breeuwer, P., Nout, M. J. R., van Aelst, A.C., Rombouts, F. M. y Abee, T. (2003). An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10–20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of Applied Microbiology*, **94**, 159-166.
- Christian, W. F. K. y Nyako, K. O. (1983). Ghanian *kenkey*. En: *Handbook of indigenous fermented foods*. K. H. Steinkraus (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 220-226.
- Clements, M. O. y Foster, S. J. (1998). Starvation recovery of *Staphylococcus aureus* 8325-4. *Microbiology*, **144**: 1755-1763. Disponible en: <http://mic.sgmjournals.org/content/144/7/1755.full.pdf>
- Clements, M. O. y Foster, S. J. (1999). Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.*, **7**(11): 458-462.
- Clements, M. O., Watson, S. P. y Foster, S. J. (1999a). Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in

- starvation survival, stress resistance, and pathogenicity. *J. Bacteriol.*, **181**(13): 3898-3903.
- Clements, M. O., Watson, S. P., Poole, R. K. y Foster, S. J. (1999b). *CtaA* of *Staphylococcus aureus* is required for starvation survival, recovery, and cytochrome biosynthesis. *J. Bacteriol.*, **181**(2): 501-507.
- Cobo, A., Abriouel, H., Lucas, R., ben Omar, N., Valdivia, E. y Gálvez, A. (2008). Inhibition of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* in raw vegetables by application of washing solutions containing enterocin AS-48 alone and in combination with other antimicrobials. *Food Microbiology*, **25**, 762-770.
- Coenders, A. (1996). *Química culinaria: estudio de lo que les sucede a los alimentos antes, durante y después de ser cocinados*. Editorial Acribia, España, Zaragoza, pp. 265-271.
- Collins, C. H. y Lyne, P. (1989). *Métodos microbiológicos*. 5ª edición, Editorial Acribia, España, Zaragoza, pp. 173-181, 252-256, 423-428.
- Cook, P. E., Themba, M. M.-A. L. y Campbell-Platt, G. (1991). Growth of *Bacillus cereus* during rice *tapé* fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, **13**, 78-81.
- Corripio, F. (1996). *Diccionario etimológico de la lengua española*. Ediciones B, México, D. F., pp. 101 y 183.
- Cravioto, A., Reyes, R. E., Ortega, R., Fernández, G., Hernández, R. y López, D. (1988). Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidemiology and Infection*, **101**, 123-134.
- Cravioto, R. O., Cravioto, O. Y., Massieu, H. G. y Guzmán, G. J. (1955). El pozol, forma indígena de consumir el maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta. *Ciencia*. México, **15**, 27-30.
- Cruz-Ulloa, S. y Ulloa, M. (1973). Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y en otros países latinoamericanos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, **34**, 423-457.
- Cueto, M. C. (2001). *Estudio de la resistencia a valores bajos de pH de cepas patógenas de Escherichia coli aisladas de pozol*. Tesis de Maestría en

- Ciencias (Bioquímicas), Facultad de Química, UNAM, México, 71 pp.
- Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, **43**(1), 164-167.
- Díaz, G. (1996). *Metabolismo de carbohidratos de una bacteria láctica aislada del pozol*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas (Alimentos), Facultad de Química, UNAM, México, 99 pp.
- Díaz, G. y Wachter, M. C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **45**(1-2), 30-40.
- Díaz, M. A. (1982). *Los libros del maíz. Origen, tradición y leyendas*. 1ª edición, Árbol Editorial, México, D. F., pp. 49-88.
- Díaz-Ruiz, G., Guyot, J. P., Ruiz-Terán, F., Morlon-Guyot, J. y Wachter, M. C. (2003). Microbial and physiological characterization of weakly amyolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(8): 4367-4374. (Disponible en: <http://aem.asm.org/cgi/reprint/69/8/4367>)
- Diccionario esencial de la lengua española. México, D. F., Ediciones Larousse, 29ª reimpresión, 1994, p. 277.
- Difco™ & BBL™ manual*. Corn meal agar, corn meal agar with polysorbate 80 y corn meal agar with 1% dextrose. En: *Technical Center*. BD (Ed.). pp. 161-162. (Disp. en: [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Corn\\_Meal\\_Agar.pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Corn_Meal_Agar.pdf))
- Drobniewski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*, **6**(4): 324-338. (Disponible en: <http://cmr.asm.org/cgi/reprint/6/4/324>)
- Escalante, J. A. (2000). *Determinación de la diversidad de bacterias lácticas del pozol por análisis de secuencias de ADNr 16S*. Tesis de Doctorado (Doctorado en Biotecnología), Facultad de Química, UNAM, México, 132 pp.
- Escamilla-Hurtado, M. L. y Mozqueda-González, E. (1992). Fermentación láctica en pozol, una bebida mexicana de maíz. *Tecnol. Aliment. (Méx.)*, **27**, 37-41.
- Escamilla-Hurtado, M. L., Velázquez-Corona, J. R., Virgen-García, M. I., Oropeza-Beivide, N. C., Vázquez-Osorno, M. E. y Brouzes, F. (1991). *Manual de productos fermentados tradicionales de maíz*. UAM-Iztapalapa,

- Instituto Nacional del Consumidor, Dirección General de Culturas Populares, Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, México, 39 pp.
- Fang, T. J., Chen, C. Y. y Kuo, W. Y. (1999). Microbiological quality and incidence of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in vegetarian food products. *Food Microbiology*, **16**(4), 385-391.
- Farrés, A., Ampe, F., Escalante, A., Flores, M. T., Guyot, J. P., Morlon-Guyot, J., Romero, M. T. y Wachter, M. C. (1999). Determinación de la diversidad bacteriana del pozol: un enfoque polifásico. *Memorias del VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería*. Huatulco, Oaxaca, México, p. 112. (Disponible en: [http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/pleins\\_textes\\_7/b\\_fdi\\_55-56/010021710.pdf](http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_7/b_fdi_55-56/010021710.pdf))
- Fereira, J., do Carmo, L. S., Tong, L. C., Shupp, J. W., Cummings, C., dos Santos, D. A., Oliveira, M. M., Cantina, A., Nicoli, J. R. y Jett, M. (2008). A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int. J. Infect. Dis.* 2008 Jan 16; [Epub ahead of print]. (Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18206412>)
- Fernández (Eds.) (1989). *Escuela; diccionario enciclopédico*. 5ª edición, México, D. F., p. 815.
- Finegold, S. M. y Baron, E. J. (1991). *Bailey Scott. Diagnóstico Microbiológico*. 7ª edición, 1ª reimpresión, Editorial Médica Panamericana, Argentina, pp. 138-139.
- Flores, A. E. (1998). *Estudios sobre la acidificación de alimentos fermentados de maíz*. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, México, 75 pp.
- Flores, A. G. (2007). *Estudio de bacterias lácticas xilanolíticas aisladas del pozol. Identificación por medio de ARDRA*. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, México, 71 pp.
- Flores, M. T. (1996). *Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol*. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 71 pp.

- Foster, J. W. y Hall, H. K. (1990). Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, **172**(2): 771-778. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC208505/pdf/jbacter01044-0269.pdf>
- Fuentes, I., Herrera, T. y Ulloa, M. (1974). Descripción de una especie nueva de *Pseudomonas*, *P. mexicana*, y determinación de *Escherichia coli* var. *neapolitana* aisladas del pozol. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **16**, 99-103.
- Gashe, B. A. (1985). Involvement of lactic acid bacteria in the fermentation of *tef* (*Eragrostis tef*), an Ethiopian fermented food. *Journal of Food Science*, **50**, 800-801.
- Gayton, A. C. (1975). *Fisiología humana*. 4ª edición en español, Editorial Interamericana, México, pp. 67-85.
- Gayton, A. C. (1987). *Fisiología humana*. 6ª edición en español, Editorial Interamericana, Mc. Graw Hill, México, pp. 410-430.
- Giles, M. (1995). *Estudio sobre las interacciones microbianas importantes para el incremento de proteína durante la fermentación del pozol*. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, UNAM, México, 73 pp.
- Girma, M., Gashe, B. A. y Lakew, B. (1989). The effect of fermentation on the growth and survival of *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa* in fermenting *tef* (*Eragrostis tef*). *MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **5**, 61-66.
- Gómez (1977). Infecciones gastrointestinales. En: *Conceptos clínicos de infectología*. E. Calderón (Ed.), 4ª edición, Méndez Cervantes Editor, México, D. F., pp.253-257.
- Goodson, M. y Rowbury, R. J. (1989). Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at sub-lethal acid pH value. *Letters in Applied Microbiology*, **8**, 77-79.
- Grande, M. J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M. y Gálvez, A. (2006). Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48.

- International Journal of Food Microbiology*, **106**(2): 185-194.
- Hagen, V. von (1981). *En busca de los mayas (la historia de Stephens y Catherwood)*. 3ª edición, Editorial Diana, México, D. F., pp. 120-148.
- Harper, H. A. (1969). *Manual de química fisiológica*. 2ª edición, El Manual Moderno, México, pp. 178-184.
- Harrigan, W. F. y McCance, M. E. (1976). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic Press, London.
- Hayashi, U., Ota, T., Sundhagel, M., Smanmathuroj, P. y Bhadacharoen, W. (1983). Miscellaneous oriental fermentations. En: *Handbook of indigenous fermented foods*. K. H. Steinkraus (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 530-547.
- Hayes, P. R. (1993). *Microbiología e higiene de los alimentos*. 1ª edición en español, Editorial Acribia, S. A., España, Zaragoza, pp. 7, 8 y 39-41.
- Heitmann, I., Jofré, L., Hormázabal, J. C., Olea, A., Vallebuona, C. y Valdés, C. (2005). Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. *Rev. Chil. Infect.*, **22**(2): 131-140.
- Herrera, T. y Ulloa, M. (1970). Aspectos generales sobre la microbiología del pozol. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **12**, 103-108.
- Herrera, T. y Ulloa, M. (1975). Antagonismo del pozol y de *Agrobacterium azotophilum* sobre diversas especies de bacterias y hongos, algunas patógenas del hombre. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **17**, 143-147.
- Hersom, A. C. y Hulland, E. D. (1980). *Conservas alimenticias*. Editorial Acribia, España, Zaragoza, pp. 345-349.
- Hesseltine, C. W. (1992). Mixed-culture fermentations. En: *Applications of biotechnology to traditional fermented foods: report of an ad hoc panel of the Board on Science and Technology for International Affairs, National Research Council*. National Academy Press, Washington, D. C., pp. 52-57.
- Hesseltine, C. W. y Wang, H. L. (1979). Fermented foods. *Chemistry and Industry*, **12**, 393-399.
- Jay, J. M. (1992). *Microbiología moderna de los alimentos*. 3ª edición, Editorial Acribia, España, Zaragoza, pp. 153-155, 299-335, 441-449, 462-465, 537-564 y 590-593.

- Keenan, C. W., Kleinfelter, D. C. y Wood, J. H. (1985). *Química general universitaria*. 3ª edición en español, 5ª reimposición, México, D. F., p. 720.
- Keuth, S. y Bisping, B. (1993). Formation of vitamins by pure cultures of *tempe* moulds and bacteria during the *tempe* solid substrate fermentation. *Journal of Applied Bacteriology*, **75**, 427-434.
- Kramer, J. M. y Gilbert, R. J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. En: *Foodborne bacterial pathogens*. Doyle M. P. (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 22-70.
- Krupp, M. A., Sweet, N. J., Jawetz, E. y Biglieri, E. G. (1968). *Prontuario médico*. 2ª edición, El Manual Moderno, México, p. 321.
- Kumate, J., Gutiérrez, G., Biagi, F., Mercado, A., Muñoz, O., Peón, H., Rangel, L., Ruiz-Gómez, J., Santos, D., Serafín, F., Sánchez, R., Sánchez-Rebolledo, J. M., Troncoso, P. y Zapata, R. (1976). *Manual de infectología*. 4ª edición, Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, México, pp. 244-253, 259-264.
- Landa, D. de (1994). *Relación de las cosas de Yucatán*. 1ª edición, Dirección General de Publicaciones del Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, México, D. F., pp. 52 y 115.
- Layna, L. M., Arostegui, J., Ortuño, M. T., Mikeudale, K., Gastón, J., González, E., Rodríguez, R., Rayo, F., Sánchez, C. M. y González, L. (1983). *Mexicas*. Serie El hombre: origen y misterios. Vol. 12, Uteha (Impreso en España, Talleres Offset Nerecan, San Sebastián), pp. 1435-1476.
- Leal H., Wachter, M. C., Álvarez, E., López, A. y Saint-Phard, C. (1987). Estudio de cambios en el contenido proteico por fermentación con microfloras mixtas. *Memorias del Simposio Latinoamericano: Biotecnología para la Producción de Biomasa y Tratamiento de Desperdicios*. Antigua, Guatemala, pp. 289-304.
- Leardini, N. A., *Bacillus anthracis*. Pruebas de identificación. En: *Diagnóstico en vitro*. *Revista electrónica de la Federación Internacional de Química Clínica para los Países Iberoamericanos*. IFCC (Ed.). (Disponible en: <http://www.ifcc.org/ria/div/antrax2.pdf>)
- Leyer, G. J. y Johnson, E. A. (1993). Acid adaptation induces cross-protection



- against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**(6): 1842-1847. (Disponible en: [www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=182170](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=182170))
- Lin, J., Lee, I. S., Frey, J., Slonczewski, J. L. y Foster, J. W. (1995). Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **177**(14): 4097-4104. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC177142/pdf/1774097.pdf>
- Lindner, E. (1995). *Toxicología de los alimentos*. 2ª edición, Editorial Acribia, España, Zaragoza, pp. 14-19, 117-119, 128-129 y 147-154.
- López, G. (2006). *Estudio de la variabilidad microbiológica del pozol mediante PCR-DGGE con el gen rpoB*. Tesis de Maestría en Ciencias (Bioquímicas), Facultad de Química, UNAM, México, 136 pp.
- Lorri, W. y Svanberg, U. (1992). The potential role of fermented cereal gruels in reduction of diarrhoea among young children. En: *IFS (International Foundation for Science). Proceedings of a regional workshop on traditional African foods quality and nutrition. 25-29 nov., 1991*. Westby A., Reilly P. J. A. (Eds.), Echanis Press, Manila, pp. 33-38.
- Lynch, M. J., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D. e Inwood, M. J. H. (1990). *Métodos de laboratorio*. 2ª edición en español, 1ª reimpression, Editorial Interamericana, México, pp. 931-2.
- Martirani, L., Varcamonti, M., Naclerio, G. y De Felice, M. (2002). Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories*, **1**:1. (Disponible en: <http://www.microbialcellfactories.com/content/1/1/1>)
- Mbugua, S. K. y Njenga, J. (1992). Antimicrobial properties of fermented *uji* as weaning food. En: *IFS (International Foundation for Science). Proceedings of a regional workshop on traditional African foods quality and nutrition. 25-29 nov., 1991*. Westby A., Reilly P. J. A. (Eds.), Echanis Press, Manila, pp. 63-67.
- Mensah, P. A., Tomkins, A. M., Drasar, B. S. y Harrison, T. J. (1988). Effect of fermentation on Ghanaian maize dough on the survival and proliferation of

- 4 strains of *Shigella flexneri*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **82**, 635-636.
- Mensah, P. A., Tomkins, A. M., Drasar, B. S. y Harrison, T. J. (1990). Fermentation of cereals for reduction of bacterial contamination of weaning foods in Ghana. *Lancet*, **336**, 140-143.
- Mensah, P. A., Tomkins, A. M., Drasar, B. S. y Harrison, T. J. (1991). Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. *Journal of Applied Bacteriology*, **70**, 203-210.
- Montaño-Pérez, K. y Vargas-Albores, F. (2002). Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *INCI*. [online]. jan. 2002, vol.27, no.1, p.21-27. (Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442002000100004&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442002000100004&lng=pt&nrm=iso))
- Mossel, D. A. A. y Moreno, B. (1982). *Microbiología de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos*. Editorial Acribia, España, Zaragoza, pp. 26-29 y 88-89.
- Muñoz, A., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A. y Valdivia, E. (2004). Biocontrol of psychrotrophic enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a nonfat hard cheese by an enterococcal strain-producing enterocin AS-48. *Journal of Food Protection*, **67**(7): 1517-1521.
- Muñoz-González, D. y Viniegra-González, G. (1981). Fijación de nitrógeno atmosférico por un cultivo mixto de una bacteria láctica y *Azotobacter chroococcum*. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **23**, 213-217.
- Nanson, N. J. y Fields, M. L. (1982). Effect of *Lactobacillus fermentum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas maltophilia* singly and in combination on the relative nutritive value of fermented corn meal. *Journal of Food Science*, **47**, 1294-1295.
- Nazina, T. N., Tourova T. P., Poltarau, A.B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S. e Ivanov, M. V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and

- transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**(2): 433-446. (Disponible en: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/51/2/433>)
- Nieto E. y Vázquez E. (1993). Las fermentaciones tradicionales del maíz. Resultados de una encuesta. En: *Alimentos fermentados indígenas de México*. M. C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras), UNAM, pp. 47 –51.
- Nout M. J. R., Rombouts, F. M. y Havelaar, A. (1989). Effect of accelerated bacterial lactic fermentation of infant food ingredients of some pathogenic microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, **8**, 351-361.
- Nout M., J. R. (1992). Weaning food for tropical climates. En: *IFS (International Foundation for Science). Proceedings of a regional workshop on traditional African foods quality and nutrition. 25-29 nov., 1991*. Westby A., Reilly P. J. A. (Eds.), Echanis Press, Manila, pp. 23-31.
- Nuraida, L. (1988). *Studies on microorganisms isolated from pozol, a Mexican corn fermented maize dough*. MSc Thesis, Faculty of Agriculture and Food, Department of Food Science and Technology, University of Reading, U. K., 80 pp.
- Ofuya, C. O. y Nnajiolor, C. (1989). Development and evaluation of a starter culture for the industrial production of *gari*. *Journal of Applied Bacteriology*, **42**, 279-284.
- Okafor, N., Ijioma, B. y Oyolu, C. (1984). Studies on the microbiology of cassava retting for *foo-foo* production. *Journal of Applied Bacteriology*, **56**, 1-13.
- Olivares, V. (1998). *Caracterización de glicosiltransferasas de 15 diferentes cepas de Leuconostoc mesenteroides aisladas de pozol*. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, México, 63 pp.
- Olivares-Illana, V., López-Munguía, A. y Olvera, C. (2003). Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. *Journal of Bacteriology*, **185**(12): 3606-3612.

- Oliveira, J. C. de, Leite, T., Lourenço, M. C. y Rodrigues, H. (1996). Nosocomial occurrence of enterotoxigenic multiresistant *Staphylococcus* strains in Rio de Janeiro. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.*, **38**: 1-6.
- Onyekwere, O. O., Akinrele, I. A., Koleoso, O. A. y Heys, G. (1989). Industrialization of *gari* fermentation. En: *Industrialization of indigenous fermented foods*. K. H. Steinkraus (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 363-410.
- Ortiz, M. E., Olvera, C., Olivares, V., Wachter, M. C. y López-Munguía, A. (2003). La inulina: producción e importancia actual como nutracéutico y su papel en alimentos fermentados tradicionales. *XXXII Premio Nacional en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Coca Cola*. Archivo participantes, edición 2003. Categoría: Profesional en tecnología. Número 5. (Disponible en: [http://www.pncta.com.mx/pages/pncta\\_investigaciones\\_03i.asp?page=03e5](http://www.pncta.com.mx/pages/pncta_investigaciones_03i.asp?page=03e5))
- Oscáriz, J. C. y Pisabarro, A. G. (2001). Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.*, **4**: 13-19.
- Osol, A. (Coord.) (1983). *Diccionario breve de medicina de Blakiston*. 1ª edición en español. Traducida de la tercera edición en inglés. Avendaño, J. (Coord. de la edición en español), Ediciones Científicas, La Prensa Médica Mexicana, S.A. de C.V., México, D. F., p. 919.
- Oxoid (1981). *Manual de Oxoid; medios de cultivo, ingredientes para su preparación y otros elementos de laboratorio*. 4ª edición, Editado por Oxoid Limited, England, pp. 26-28, 90-91 y 155-6.
- Oxoid (1990). *The Oxoid manual*. Compiled by E. Y. Bridson (former Technical Director of Oxoid)/Unipath Ltd. Wade Road, Basingstoke RG24 0PN. Typset and Prod. by Alphaprint, Alton, Hants.
- Oyewole, O. B. (1990). Optimization of cassava fermentation for *fufu* production: effects of single starter cultures. *Journal of Applied Bacteriology*, **68**, 49-54.
- Oyewole, O. B. y Odunfa, S. A. (1990). Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during *fufu* production. *Journal of Applied Bacteriology*, **68**, 145-153.
- Padilla-Couttolenc, E., Antonio-Alcocer, J., Álvarez, J. R., Dau, E., Muñoz, R. A., Slim-Helú, J., Alemán-Velazco, M. y Quintero, A. (1985). *Todo México*;

- compendio enciclopédico*. Enciclopedia de México, Cd. de México MCMLXXXV, pp. 177-80.
- Paredes, O. y Gallardo, Y. (1981). La alimentación en América Latina. Una mirada al pasado, el presente y el futuro. *Comercio Exterior (Mex.)*, 31, 247-253.
- Pereyra, E. M. y Trejo, E. (1999). Detección de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas aisladas del pozol. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, México, 71 pp.
- Phister, T. G., O'Sullivan, D. J. y McKay, L. L. (2004). Identification of bacilysin, chlorotetaine, and iturin A produced by *Bacillus* sp. strain CS93 isolated from pozol, a Mexican fermented maize dough. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1): 631-634. (Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC321241/pdf/0661.pdf>)
- Piña, R. (1982). *Los olmecas antiguos*. 1ª edición, Editora del sureste, México, D. F., pp. 10-33.
- Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. A. y Piedrola-Angulo, G. (1994). *Microbiología y parasitología médica*. Reimpresión de la 2ª edición, Ediciones Científicas y Técnicas, S. A., Masson Salvat Medicina, España, Barcelona, pp. 71-79.
- RAE (2001). *Diccionario de la lengua española*. 22ª edición, Tomo I, Editorial Espasa Calpe, España, Madrid, p.184.
- Raevuori, M. T. y Genigeorgis, C. (1975). Effect of pH and sodium chloride on growth of *Bacillus cereus* in laboratory media and certain foods. *Applied Microbiology*, 29(1), 68-73. (Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=186913>)
- Ramakrishnan, C. V., Purushothaman, D., Dhanapal, N. y Rangaswami, G. (1983). Indian *idli*, *dosa (dosai)* (*puda*), *dhokla*, *khaman*, and related fermentation. En: *Handbook of indigenous fermented foods*. K. H. Steinkraus (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 132-146.
- Ramírez, J. F. (1987). *Biochemical studies on a Mexican fermented corn food pozol*. Tesis de Doctorado en Ciencias de Alimentos, Universidad de Cornell, Estados Unidos, 173 pp.
- Ramírez, S., Santos, E. M., Zúñiga, A., Román, A. D., Ortiz, M., Clavel, M., Neria, A.

- y Sánchez, I. (2005). Aislamiento y detección de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de quesos. *Memorias del VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos*. III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, Guanajuato, México, pp.279-284. (Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2005/ee-13-2005/index.html>, como CNA-42.pdf)
- Ray, P. (2000). *Classification of a pozol bacterium and optimization of production of its broad-spectrum antimicrobial agent(s)*. Tesis de Doctorado en Ciencias, Universidad de Minesota, USA, 158 pp.
- Recinos, A. (1988). *Popol Vuh. Las antiguas historias del Quiché*. 2ª edición, 20ª reimpresión, Fondo de Cultura Económica, México, D. F. pp. 7-32 y 103-107.
- Ribeiro de Souza da Cunha, M. L., Peresi, E., Oliveira Calsolari, R. A. y Pessoa Araújo, J. Jr. (2006). Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Braz. J. Microbiol.* **37**(1): 70-74. (Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822006000100013&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822006000100013&script=sci_arttext))
- Rivera, A. (2001). *Efecto de la acción de microorganismos amilolíticos en la fermentación del pozol*. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, México, 62 pp.
- Robelo C. A. (1948). *Diccionario de aztequismos o sea jardín de las raíces aztecas. Palabras del idioma náhuatl, azteca o mexicano, introducidas al idioma castellano bajo diversas formas (Contribución al diccionario nacional)*. 3ª edición, Ediciones Fuente Cultural, México, D. F., Lección CXXV, p. 449. (Disponible en la Biblioteca Digital Daniel Cosío Villegas en: <http://biblio2.colmex.mx/bibdig/aztequismos1/base1.htm>)
- Rodrigues, E., Pimenta, A., Dias, J. C., Barbosa, W. P. y da Silva, N. (2004). Identification and *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in Northeast of Brazil. En: *Small ruminant research*, Vol. 55, Issues 1-3, pp. 45-49.
- Rodríguez-Palenzuela, P. (2000). Los ácidos orgánicos como agentes antimicrobianos. XVI Curso de especialización FEDNA (Fundación

- Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal). España, pp. 155-167. (Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2375301> ó Disponible en: <http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/00CAP8.pdf>)
- Rojas, T. y Castillo, Z. (2003). Survival of strain of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized orange juice commercially expended. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* [online], Jan., vol.23, no. 1, p. 16-20. ISSN 1315-2556. (Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562003000100006&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562003000100006&lng=es&nrm=iso))
- Romero, T. (2000). *Tipificación de las cepas de Lactobacillus plantarum aisladas del pozol por medio del análisis de perfiles de restricción*. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 57 pp.
- Sainz, T. (1998). *Estudio de la presencia y sobrevivencia de enterobacterias patógenas en el pozol*. Tesis de Maestría en Ciencias (Bioquímicas), Facultad de Química, UNAM, México, 51 pp.
- Salinas, C. (1958). *Etnobiología e introducción a la bacteriología del pozol*. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 63 pp.
- Salinas., C. y Herrera, T. (1974). Aislamiento de *Aerobacter aerogenes* del pozol del Estado de Campeche. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **16**, 95-98.
- Sánchez, P. C., Tongananta, Q. y Orillo, C. A. (1983). Philippine puto. En: *Handbook of indigenous fermented foods*. K. H. Steinkraus (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 148-162.
- Santillana, R. (1995). *Desarrollo de un método por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para el análisis químico de nixtamal y pozol*. Tesis de Maestría en Ciencias de Alimentos (Química de Alimentos), Facultad de Química, UNAM, México, 84 pp.
- Scharlau.com, *Bacillus cereus* agar. Also known as Mannitol Egg Yolk-Polymyxin agar; MYP agar. En: Medios de cultivo deshidratados. Por parámetro/microorganismo. *Bacillus cereus*. Scharlau microbiology-technical data sheet. Reference: 01-262. Scharlau (Ed.). (Disponible en: [http://www.scharlau.com/DCM/en/01\\_262\\_tech\\_EN.pdf](http://www.scharlau.com/DCM/en/01_262_tech_EN.pdf))
- Silva, E. C. (1984). *Estudios preliminares sobre la fermentación del pozol en Tapachula, Chiapas*. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Químico

- Farmacéutico Biólogo, UNACH, Tapachula, Chiapas, 44 pp.
- Simango, C. y Rukure, G. (1992). Survival of enteric pathogens in traditional fermented foods. *Journal of Applied Bacteriology*, **73**, 37-40.
- Sodi, D. (1964). *La literatura de los mayas*. 1ª edición, Editorial Joaquín Mortiz, México, D. F., pp. 7-11.
- Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. y Painter, P. R. (1996). *Microbiología*. 2ª edición, Traducción de la 5ª edición en inglés of *The microbial world*, Director de la versión española: Villanueva, J. R., Editorial Reverté, S. A., Barcelona, España, pp. 188-192.
- Steinkraus, K. H. (1983a). Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes. *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**, 337-348.
- Steinkraus, K. H. (1983b). *Tempe (tempeh) kedale*. En: *Handbook of indigenous fermented foods*. K. H. Steinkraus (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 8-44.
- Steinkraus, K. H. (1985). Bio-enrichment production of vitamins in fermented foods. En: *Microbiology of fermented foods*. V. 1, J. B. Wood (Ed.), Elsevier Applied Science Publishers, USA., pp. 323-343.
- Steinkraus, K. H. (1993). Microbes, food and man. En: *Alimentos fermentados indígenas de México*. M. C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras), UNAM, pp. 1-4.
- Sue, D., Hoffmaster, A. R., Popovic, T. y Wilkins, P. P. (2006). Capsule production in *Bacillus cereus* strains associated with severe pneumonia. *J. Clin. Microbiol.*, **44**(9): 3426-3428. (Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1594739>)
- Taboada, J., Herrera, T. y Ulloa, M. (1971). *Rev. Lat-amer., Quím.* **2**, 188.
- Taboada, J., Salinas, C., Ulloa, M. y Herrera, T. (1975). Fijación de nitrógeno en cultivos mono-específicos y mixtos de *Aerobacter aerogenes* y *Aerobacterium azotophilum* usando distintas fuentes de carbono. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **17**, 157-159.
- Tercer mundo (Ed.) (1986). Salud: la tradición ayuda a curar los males del progreso. En: *Guía del 3º mundo, suplemento anual*. Editora 3º mundo (Montevideo, Río de Janeiro, México, Lisboa), pp. 592-594.
- Thomas, L. V. y Wimpenny, J. W. T. (1996). Investigation of the effect of



- combined variations in temperature, pH, and NaCl on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(6): 2006-2012. (Disponible en: [www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=167979](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=167979))
- Thompson, J. E. (1994). *Grandeza y decadencia de los mayas*. 3ª edición en español, de la segunda edición en inglés, 5ª reimpresión, Traducido por Lauro J. Zavala, Fondo de Cultura Económica, México, D. F. pp. 298-352, 384.
- U. S. FDA (1992). *Food and Drug Administration bacteriological analytical manual*. 7<sup>th</sup> edition, AOAC International, Arlington. USA. pp.161-165 y 191-197.
- U. S. FDA (1995). *Food and Drug Administration bacteriological analytical manual*. 8<sup>th</sup> edition, AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Ulloa, M. (1974). Mycofloral sucession in pozol from Tabasco, México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*, **8**, 17-48.
- Ulloa, M. y Herrera, T. (1970). Persistencia de las aflatoxinas durante la fermentación del pozol. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **131**, 113-124.
- Ulloa, M. y Herrera, T. (1972). Descripción de dos especies nuevas de bacterias aisladas del pozol: *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter pozolis*. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **14**, 15-24.
- Ulloa, M. y Herrera, T. (1976-1982). Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche y tepache. *Anales del Instituto de Biología serie Botánica, UNAM*, **47-53**, 145-163.
- Ulloa, M., Herrera, T. y Taboada, J. (1983). Mexican pozol. En: *Handbook of indigenous fermented foods*. K. H. Steinkraus (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 226-233.
- Ulloa, M., Herrera, T., Lappe, P. (1987). *Fermentaciones Tradicionales Indígenas de México*. Serie de Investigaciones Sociales Número 16, Instituto Nacional Indigenista, México, pp. 13-20.
- Valderrama P. y Ramírez C. (1993). Alimentos de maíz y fermentados en Cuetzalan, Puebla. En: *Alimentos fermentados indígenas de México*. M. C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras), UNAM, pp. 63-67.

- Valero, M., Leontidis, S., Fernández, P. S., Martínez, A. y Salmerón, M. C. (2000). Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5-30°C. *Food Microbiology*, **17**, 605-612.
- Vega, S. (1987). *Importancia e incidencia de Bacillus cereus en alimentos*. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, UNAM, México, 87 pp.
- Velázquez-Corona, R., Pozo, C., Raimbault, M. y Viniegra, G. (1984). Ecología de la fermentación láctica en alimentos amiláceos. En: *Simposio Internacional: las Fermentaciones de la Industria Alimentaria*. ONUDI/UAM Iztapalapa, 27-29 noviembre, México, D. F.
- Viedma, P. M., Abriouel, H., ben Omar, N., López, R. L., Valdivia, E. y Gálvez, A. (2009). Antibacterial protection by enterocin AS-48 in sport and energy drinks with less acidic values. *Journal of Food Protection*, **72**(4): 881-4.
- Viniegra, G. (1993). Oportunidades para las fermentaciones indígenas del maíz. En: *Alimentos fermentados indígenas de México*. M. C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras), UNAM, pp. 29-34.
- Wacher, M. C. (1995). *Estudios sobre la microbiología del pozol*. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas (Alimentos), Facultad de Química, UNAM, México, 174 pp.
- Wacher, M. C. y Santillana, R. (1990). La fermentación del pozol. *Cuadernos de posgrado; Alimentos y Biot.* #32 C. Durán de Bazúa (Ed.). Facultad de Química, México, pp. 101-110.
- Wacher, M. C., Cañas, A., Cook, P. E., Bárzana, E. y Owens, J. D. (1993). Sources of microorganisms in pozol, traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **9**, 226-274.
- Wacher, M. C., Lappe, P., Ulloa, M. y Taboada, J. (1991). Alimentos fermentados tradicionales. *NOTITEC-PUAL*, **1** (3): 9-15.
- Weller, B. (Ed.) (1997). *Diccionario enciclopédico de ciencias de la salud*. 1ª edic. esp., Editorial Mc Graw-Hill Interam., México, D. F., pp. 246, 523, 554 y 580.
- Wood, J. B. (1983). Traditional sourdough bread and *Lactobacillus*/yeast interaction. En: *Handbook of indigenous fermented foods*. K. H. Steinkraus (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 179-185.

- Wood, J. B. (1985). Miscellaneous food-related fermentations. En: *Microbiology of fermented foods*. V. 2, J. B. Wood (Ed.), Elsevier Applied Science Publishers, USA, pp. 213-235.
- Wood, J. B. y Holzappel, W. H. (Ed.) (1995). The genera of lactic acid bacteria. Vol. 2, Blackie Academic Professional, pp. 19-28.
- Yoon, J. H., Lee, K. C., Weiss, N., Kho, Y. H., Kang, K. H. y Park, Y. H. (2001). *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes, 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura, 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester, 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of the genus *Sporosarcina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**(3): 1079-1086. (Disponible en: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/51/3/1079>)
- Yusof, R. M., Morgan, J. B. y Adams, M. R. (1993). Bacteriological safety of a fermented weaning food containing L-lactate and nisin. *Journal of Food Protection*, **56**(5): 414-417.
- Zebadua, G. R. (1997, marzo 12) Pujante la industria del pozol. *Tabasco Hoy*, p. 12 A.
- Zhao, N., Qu, C., Wang, E., Chen, W. (1995). Phylogenetic evidence for the transfer of *Pseudomonas cocovenenans* (van Damme et al. 1960) to the Genus *Burkholderia* as *Burkholderia cocovenenans* (van Damme et al. 1960) comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **45**(3): 600-603. (Disponible en: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/45/3/600.pdf>)
- Zheng, G. y Slavik M. F. (1999). Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. *Letters in Applied Microbiology*, **28**, 363-367.
- Zheng, G., Yan, L. Z., Vederas, J. C. y Zuber, P. (1999). Genes of the *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilisin. *Journal of bacteriology*, **181**(23): 7346-7355. (Disponible en: <http://jb.asm.org/cgi/reprint/181/23/7346?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&fulltext=subtilis&searchid=1&FIRSTINDEX=3870&resourcetype=HWFIG>)