



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

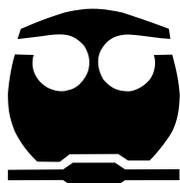
**ESTUDIO SOBRE INTERACCIONES NEGATIVAS DE BACTERIAS
LÁCTICAS DEL POZOL**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

CAROLINA RODRÍGUEZ SAAVEDRA



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: Olga del Carmen Velázquez Madrazo

VOCAL: Aurora Irma Ortegón Ávila

SECRETARIO: Gloria Díaz Ruiz

1er. SUPLENTE: Martha Giles Gómez

2° SUPLENTE: Beatriz Ruiz Villafán

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 324, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA**

ASESOR DEL TEMA: GLORIA DÍAZ RUIZ

SUPERVISOR TÉCNICO: MA. DEL CARMEN WACHER RODARTE

SUSTENTANTE: CAROLINA RODRÍGUEZ SAAVEDRA

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gloria Díaz Ruiz y a la Dra. Carmen Wachter por las oportunidades que me dieron, su paciencia, enseñanzas y por guiarme a través de la realización de este proyecto.

A Teresa Flores, por apoyarme y brindarme su ayuda para llevar a buen término el trabajo experimental que conllevó esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y darme el orgullo de haber estudiado en la mejor Universidad de Iberoamérica, así como por el invaluable conocimiento que me otorgó y la inolvidable experiencia de ser parte de ella.

A CONACyT por su apoyo económico para la realización del proyecto 24824 con el título: “Estudio sobre bacterias lácticas amilolíticas del pozol” así como por la beca otorgada.



*Agradezco a mi padre, mi madre, mi hermana, Teddy y Sam,
por estar siempre a mi lado para guiarme, corregirme, aplaudirme
y amarme. Es gracias a ustedes que llegué al final de este largo
camino.*

*Agradezco a mi novio, por su ayuda, tiempo, comprensión y
cariño. Sé que llego al final de ese camino junto a alguien en
quien confío, me fortalece y me hace ser mejor. Te amo.*



Para Maggie,

*Porque siempre estuviste
en todas mis alegrías, mis llantos y mis desvelos*



Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 El Pozol	3
2.1.1. Elaboración del pozol	3
2.1.2. Microbiología del pozol	6
2.2. Bacterias ácido lácticas	9
2.2.1. Metabolismo	10
2.2.1.1. Fermentación homofermentativa	10
2.2.1.2. Fermentación Heterofermentativa	11
2.2.2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	14
2.2.3. <i>Streptococcus sp.</i>	16
2.2.3.1. <i>Streptococcus infantarius</i>	18
2.2.4. <i>Weissella confusa</i>	18
2.3. Bacteriocinas	20
2.3.1. Características y clasificación	21
2.3.2. Biosíntesis y modo de acción	25
2.3.2.1. Biosíntesis	26
2.3.2.2. Modo de acción	30
2.3.3. Detección de actividad bacteriocinogénica	32
2.3.4. Aplicaciones en los alimentos	34
2.4. Bacterias Patógenas	35
2.4.1. <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium	35
2.4.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	37
3. Justificación	39
4. Hipótesis	40

5. Objetivos	41
5.1. Objetivo general	41
5.2. Objetivos particulares	41
6. Metodología	42
6.1. Interacciones negativas hacia bacterias patógenas	42
6.1.1. Reactivación de cepas	42
6.1.2. Identificación de bacterias ácido lácticas por comparación de secuencias del gen rRNA 16S	43
6.1.2.1. Extracción y purificación de ADN	43
6.1.2.2. Amplificación por PCR	45
6.1.2.3. Purificación de los productos de PCR	47
6.1.2.4. Comparación de secuencias	47
6.1.3. Interacciones negativas de las bacterias ácido lácticas aisladas del pozol contra <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Listeria monocytogenes</i>	47
6.1.3.1. Efecto de los sobrenadantes concentrados, neutralizados y con tratamiento térmico de las bacterias ácido lácticas (SCNTB) aisladas del pozol sobre la viabilidad de <i>Samonella</i> Typhimurium y <i>Listeria monocytogenes</i>	48
6.1.3.1.1. Preparación de los sobrenadantes de las bacterias ácido lácticas	48
6.1.3.1.2. Concentración de los sobrenadantes de las bacterias ácido lácticas	49
6.1.3.1.2.1. Concentración con rotavapor y bomba de vacío	49
6.1.3.1.2.2. Concentración con liofilizadora	49
6.1.3.1.3. Cuantificación de proteína de los concentrados	50
6.1.3.1.4. Efecto de los SCNTB sobre la viabilidad de <i>S. Typhimurium</i> y <i>L. monocytogenes</i>	51
6.1.3.1.4.1. Sobrevivencia de bacterias patógenas en los SCNTB concentrados con rotavapor	51
6.1.3.1.4.2. Sobrevivencia de bacterias patógenas en los SCNTB concentrados por liofilización	52
6.1.3.2. Pruebas de reto entre bacterias ácido lácticas y <i>S. Typhimurium</i> y <i>L. monocytogenes</i>	54

6.2.	Interacciones negativas entre bacterias ácido lácticas predominantes en la fermentación del pozol	58
6.2.1.	Método de difusión en agar	59
6.2.1.1.	Preparación de placa de medio BHI	59
6.2.1.2.	Preparación de sobrecapa de medio BHI	59
6.2.1.3.	Preparación y concentración de sobrenadantes de <i>L. plantarum</i> A6, <i>S. infantarius</i> 25124 y <i>W. confusa</i> L9	60
6.2.1.3.1.	Cuantificación de proteína de los concentrados	60
6.2.1.4.	Ensayo del método de difusión en agar	60
7.	Resultados	63
7.1.	Interacciones negativas hacia bacterias patógenas	63
7.1.1.	Identificación de bacterias ácido lácticas por comparación de secuencias del gen rRNA 16S	63
7.1.1.1.	Extracción y purificación de ADN	63
7.1.1.2.	Amplificación por PCR	65
7.1.1.3.	Purificación de los productos de PCR	66
7.1.1.4.	Comparación de secuencias	67
7.1.2.	Interacciones negativas de las bacterias ácido lácticas aisladas del pozol contra <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Listeria monocytogenes</i>	72
7.1.2.1.	Efecto de los SCNTB de sobre la viabilidad de <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Listeria monocytogenes</i>	72
7.1.2.1.1.	Preparación de los sobrenadantes de las bacterias ácido lácticas	72
7.1.2.1.2.	Concentración de los sobrenadantes de las bacterias ácido lácticas	73
7.1.2.1.3.	Cuantificación de proteína de los concentrados	75
7.1.2.1.4.	Efecto de los SCNTB sobre la viabilidad de <i>S. Typhimurium</i> y <i>L. monocytogenes</i>	78
7.1.2.2.	Pruebas de reto entre bacterias ácido lácticas y <i>S. Typhimurium</i> y <i>L. monocytogenes</i>	90
7.2.	Interacciones negativas entre bacterias ácido lácticas predominantes en la fermentación del pozol	100
7.2.1.	Método de difusión en agar	100
7.2.1.1.	Preparación y concentración de sobrenadantes de <i>L. plantarum</i> A6	

<i>S. infantarius</i> 25124 y <i>W. confusa</i> L9	100
7.2.1.1.1. Cuantificación de proteína de los concentrados	101
7.2.1.2. Ensayo del método de difusión en agar	103
8. Conclusiones	110
8.1. Interacciones negativas hacia bacterias patógenas	110
8.2. Interacciones negativas entre bacterias ácido lácticas predominantes en la fermentación del pozol	111
9. Perspectivas	112
10. Anexos	114
Anexo I. Reactivos	114
Anexo II. Medios de cultivo	118
Anexo III. Cuantificación de proteína con método de Bradford	122
11. Bibliografía	125

Índice de Tablas

Sección 2. Antecedentes

Tabla 2.1. Ejemplos de algunos microorganismos aislados del pozol	8
Tabla 2.2. División de las especies de <i>Lactobacillus</i> en grupos I, II y III	11
Tabla 2.3. Bacteriocinas aisladas de diversas cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i>	15
Tabla 2.4. Grupos serológicos del género <i>Streptococcus</i>	17
Tabla 2.5. Clasificación de las bacteriocinas según Klaenhammer	23

Sección 6. Metodología

Tabla 6.1. Cepas y origen de bacterias patógenas utilizadas en esta metodología	43
Tabla 6.2. Cebadores para PCR utilizados para la amplificación de la región V1 del gen rRNA 16S	45
Tabla 6.3. Reactivos empleados para amplificar por PCR el fragmento V1 del gen rRNA 16S	46
Tabla 6.4. Condiciones de PCR para amplificar la región V1 del gen rRNA 16S	46
Tabla 6.5. Cepas y origen de las bacterias lácticas utilizadas para el estudio de interacciones negativas entre BALs	58
Tabla 6.6. Ensayos practicados para observar las posibles inhibiciones entre <i>L. plantarum</i> A6, <i>S. infantarius</i> 25124 y <i>W. confusa</i> L9	61

Sección 7. Resultados

Tabla 7.1. Secuencia e identidad de las cepas de BAL estudiadas en este proyecto	68
Tabla 7.2. Ajuste de pH con NaOH de los sobrenadantes de las cepas de BAL	73
Tabla 7.3. Concentración de sobrenadantes por medio del uso de del rotavapor	74
Tabla 7.4. Concentración de sobrenadantes por liofilización	74
Tabla 7.5. Cuantificación de proteína de los liofilizados resuspendidos y los sobrenadantes concentrados con rotavapor	76
Tabla 7.6. Concentración de <i>S. Typhimurium</i> y <i>L. monocytogenes</i> tras 6 horas de crecimiento en caldo BHI	78

Tabla 7.7. Valores de pH de los sobrenadantes después de ajustar con NaOH	101
Tabla 7.8. Concentración de los sobrenadantes de las bacterias lácticas <i>L. plantarum</i> A6, <i>S. infantarius</i> 25124 y <i>W. confusa</i> L9	101
Tabla 7.9. Cuantificación de proteína de los sobrenadantes concentrados de <i>L. plantarum</i> A6, <i>S. infantarius</i> 25124 y <i>W. confusa</i> L9	102
Tabla 7.10. Crecimiento de las cepas de <i>L. plantarum</i> A6, <i>S. infantarius</i> 25124 y <i>W. confusa</i> L9 tras 24 horas de incubación a 30° C	103
Tabla 7.11. Diámetro de los halos de inhibición resultantes en los ensayos practicados con el método de difusión en agaren <i>L. plantarum</i> A6, <i>S. infantarius</i> 25124 y <i>W. confusa</i> L9	104

Índice de Figuras

Sección 2. Antecedentes

Figura 1. Diagrama de elaboración del pozol	6
Figura 2. Rutas metabólicas de fermentación	13
Figura 3. Estructura de la nisina A	23
Figura 4. Estructura de la leucocina A	24
Figura 5. Biosíntesis de lantibióticos	28
Figura 6. Biosíntesis de bacteriocinas de clase II	29
Figura 7. Modelo de formación de poros de las bacteriocinas	31

Sección 6. Metodología

Figura 8. Esquematización de la metodología empleada para obtener los sobrenadantes, concentrarlos y utilizarlos posteriormente para estudiar la viabilidad de <i>S. Typhimurium</i> y <i>L. monocytogenes</i>	53
Figura 9. Esquematización de la metodología empleada en las pruebas de reto en caldo MRS para estudiar el efecto de los cultivos de BALs sobre <i>S. Typhimurium</i>	56
Figura 10. Esquematización de la metodología empleada en las pruebas de reto en caldo MRS para estudiar el efecto de los cultivos de BALs sobre <i>L. monocytogenes</i>	57
Figura 11. Esquematización de la metodología empleada para buscar la posible actividad bacteriocinogénica de <i>L. plantarum</i> A6, <i>S. infantarius</i> 25124 y <i>W. confusa</i> L9 por medio del método de difusión en agar	62

Sección 7. Resultados

Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN extraído de las cepas de bacterias lácticas del pozol	64
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN extraído de las cepas 74g y 74ch de bacterias lácticas del pozol	64

Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) para probar el producto de PCR del gen rRNA 16S de las cepas 73, 74g y 77g	65
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) para probar el producto de PCR del gen rRNA 16S de las cepas 74ch y 77ch	66
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa (2%). Productos purificados de PCR del gen rRNA 16S de las cepas de bacterias ácido lácticas	67
Figura 17. Sobrevivencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium en los SCNTB de cada cepa estudiada	79
Figura 18. Sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en los SCNTB de cada cepa estudiada	80
Figura 19. Sobrevivencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Listeria monocytogenes</i> en presencia de los SCNTB de las cepas 73, 74g y 74ch	85
Figura 20. Sobrevivencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Listeria monocytogenes</i> en los SCNTB de las cepas de BAL 77g y 77ch	86
Figura 21. Sobrevivencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium en las pruebas de reto practicadas con cada una de las cinco cepas de bacterias lácticas estudiadas	91
Figura 22. Curvas del monitoreo de pH durante cada una de las pruebas de reto entre las BALs y <i>Salmonella</i> Typhimurium	92
Figura 23. Sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en las pruebas de reto practicadas con cada una de las cinco cepas de bacterias lácticas estudiadas	93
Figura 24. Curvas del monitoreo de pH durante cada una de las pruebas de reto entre las BALs y <i>Listeria monocytogenes</i> .	94
Figura 25. Actividad bacteriocinogénica de las bacterias lácticas por el método de difusión en agar con <i>Lactobacillus plantarum</i> como bacteria sensible	105
Figura 26. Actividad bacteriocinogénica de las bacterias lácticas por el método de difusión en agar con <i>Streptococcus infantarius</i> como bacteria sensible	105
Figura 27. Actividad bacteriocinogénica de las bacterias lácticas por el método de difusión en agar con <i>Weissella confusa</i> como bacteria sensible	106

1. Introducción

La fermentación es un proceso ampliamente utilizado desde la antigüedad como una forma de conservar los alimentos y brindarles características sensoriales especiales. En Latinoamérica son muy consumidas las papillas o masas de cereales fermentados, mismos que se elaboran a partir de una fermentación natural, la cual es considerada como una buena forma de aumentar la calidad nutritiva y la seguridad de los alimentos.

El pozol es una bebida tradicional proveniente del sureste de México, elaborada a partir de la fermentación de maíz nixtamalizado (Wacher, *et al.* 2000; Sainz, *et al.* 2001). Se utilizaba desde la época prehispánica como ofrenda en ceremonias relacionadas con el cultivo y la cosecha del maíz; y hasta la fecha se ha usado, no sólo como alimento básico, sino también con fines medicinales para controlar diarreas y reducir la fiebre (Ulloa, *et al.* 1987). Su microbiota es compleja, pues incluye diferentes tipos de bacterias, mohos y levaduras; sin embargo, son las bacterias ácido lácticas las que dominan en el alimento debido a su velocidad de crecimiento y, entre otros, a que producen diversos compuestos antagónicos. Dichos compuestos pueden ser aprovechados para mejorar la conservación y seguridad de los alimentos.

Las sustancias antagónicas que las bacterias ácido lácticas producen para dominar en su hábitat son muy diversas, y entre ellas se incluyen los ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno, el diacetilo y las bacteriocinas (Savadogo *et al.* 2006), las cuales se definen como proteínas biológicamente activas contra bacterias Gram positivas, aunque se han encontrado algunas capaces de inhibir también a bacterias Gram negativas.

En un estudio previo (Tavera Montes, 2010), se investigó la capacidad inhibitoria de una colección de bacterias lácticas aisladas del pozol hacia microorganismos patógenos encontrados en alimentos, como *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*. De manera general, se observó que un alto número de cepas presentaron una actividad

antimicrobiana contra dichos microorganismos, probablemente debida a compuestos tipo bacteriocinas. Dentro de dicha actividad, se obtuvo una mayor acción contra *Listeria*; y además, para *Salmonella*, se registraron sólo unos cuantos casos.

Para la realización de este proyecto, se seleccionaron cinco cepas de bacterias ácido lácticas de la colección: aquellas con mayor actividad antimicrobiana hacia bacterias Gram positivas y Gram negativas para estudiar su capacidad inhibitoria en un sistema alimentario modelo (Medio MRS). Además, se observó el efecto de sus sobrenadantes concentrados con el fin de investigar más sobre la posible producción de bacteriocinas.

Aunado a esto, se determinó si hay actividad inhibitoria entre cepas de *Streptococcus infantarius*, *Weissella confusa* y *Lactobacillus plantarum*, con el propósito de saber si es posible incluirlas como parte de un cultivo iniciador mixto, sin que presenten antagonismo entre ellas.

2. Antecedentes

2.1. El pozol

El pozol (del náhuatl *pozolli*, espumoso) es un alimento fermentado tradicional del sureste de México, que se elabora a partir de masa de maíz nixtamalizado, a la que se le puede o no adicionar algún saborizante, ya sea sal, azúcar, miel, cocoa o chile (Nuraida *et al.* 1995).

Se consume principalmente en los estados de Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo y Yucatán como parte de la dieta diaria entre los indígenas y mestizos de dichas regiones (Ampe *et al.*, 1999; Méndez-Albores *et al.* 2004), en donde, debido a la dificultad para almacenar productos lácteos, se han desarrollado procesos tradicionales en los que las fermentaciones espontáneas han sido la clave para conservar y consumir alimentos diariamente (Ben Omar *et al.* 2000).

El pozol se ha consumido desde la época prehispánica como parte de la comida, en el trabajo o a cualquier hora del día como una bebida refrescante. Asimismo, se ha utilizado de forma medicinal, ritual y como provisiones en caminatas o travesías largas, ya que se conserva en buen estado por varios días. En la selva Lacandona se utiliza el pozol, mezclándolo con miel, para bajar la fiebre y controlar la diarrea (Flores Ramírez, 2008).

La preparación del pozol comprende varias etapas, pero es la fermentación la más importante de todas ellas, debido a que ésta es la responsable de las características sensoriales del producto final, así como del valor nutricional del mismo y de su potencial para ser conservado por varios días.

2.1.1 Elaboración del pozol

La elaboración del pozol conlleva al menos ocho operaciones importantes (figura 1). En cada una de ellas, la carga microbiana se ve afectada de manera crucial

debido a la manera artesanal con que este producto es preparado, haciendo altamente probable la presencia de bacterias indeseables al final de su procesamiento.

El proceso de obtención del pozol inicia con la limpieza del grano de maíz, lo que comprende quitar la cascarilla, polvo, paja o cualquier otro agente extraño. Enseguida, los granos se cuecen utilizando agua del suministro municipal (agua de la llave) con 1 a 3% de hidróxido de calcio durante 60 a 180 minutos para llevar a cabo la nixtamalización, la cual es un proceso que data desde la época prehispánica y consiste en la lixiviación del grano de maíz, produciendo así importantes cambios físicos y químicos en el mismo, resultando en una masa apta para elaborar diversos productos, como tortillas, tamales y atole, entre otros. La nixtamalización incluye también un efecto nutricional sobre el grano de maíz, mismo que se ve reflejado en el incremento de su digestibilidad, mejoramiento en el balance isoleucina/leucina (favoreciendo así un mejor aprovechamiento de las proteínas) y la liberación de niacina (Camacho *et al.* 2007).

La cocción en hidróxido de calcio finaliza cuando se logra separar fácilmente el hollejo del grano de maíz; entonces se procede a lavar el nixtamal con agua de pozo, de río o potable, con el fin de eliminar la cal y el hollejo. Es importante que el lavado se realice antes de las cuatro horas de haber empezado la cocción ya que, de no ser así, el grano de maíz se impregna de cal, adquiere una tonalidad verde-azulosa y el sabor del pozol se vuelve picante (Cañas *et al.* 1993).

Según el tipo de productor, la elaboración del pozol puede llevar o no una segunda cocción (figura 1). El pozol indígena no comprende ésta última, mientras que el pozol mestizo sí. Esta segunda cocción consiste en cocer el nixtamal en agua durante 3-8 horas hasta que el grano de maíz “reviente”, con la finalidad de que el producto final adquiriera una textura más tersa (Cañas *et al.* 1993).

A continuación, los granos se dejan remojando con el agua del último lavado del nixtamal en el caso del pozol indígena; y en el agua de la segunda cocción para el pozol mestizo. Esto se hace durante toda la noche (aproximadamente 12 horas) con el fin de facilitar la remoción del pericarpio de los

granos, ya que el pH alcalino y el calor de la nixtamalización, así como las 12 horas de reposo, incrementan su humedad hasta 48-51%, debilitando las paredes celulares por la solubilización parcial de la hemicelulosa; además, suavizan la estructura del grano debido al hinchamiento, a la destrucción parcial de los gránulos de almidón y a su incipiente gelatinización (Camacho *et al.* 2007).

Tras el remojo, los granos son sometidos a una molienda gruesa para reducir el tamaño de los mismos y hacer posible su posterior procesamiento. La molienda se lleva a cabo generalmente en un pequeño molino comercial, el cual se usa también para moler lotes de granos destinados a otros productos, como tortillas o tamales. Es importante resaltar que el molino es usado y re-usado durante todo el día sin que se lave entre lote y lote. Se ha visto que esta costumbre provoca que una cantidad importante de masa se quede en los recovecos del molino. Al final del día, el molino sólo es desmontado para remover los restos de masa sin el uso de agua potable (Wacher *et al.* 1993).

Posteriormente, se lleva a cabo un amasado en el que se forman bolas de masa de 5-8 cm de diámetro y de 70-170 g (Méndez-Albores *et al.* 2004). Esta operación se hace con las manos, generalmente sobre una tabla de madera que es ocasionalmente lavada.

Las bolas de masa son enseguida envueltas en hojas de árbol de plátano y se dejan reposar a temperatura ambiente para permitir la fermentación durante 2 a 7 o más días (Ben Omar *et al.* 2000; Méndez-Albores *et al.* 2004). Finalmente se obtiene un producto con características sensoriales muy especiales, debido a los atributos que otorga el proceso de fermentación a los alimentos; asimismo, permite su conservación por varios días, así como un aumento en su valor nutritivo.

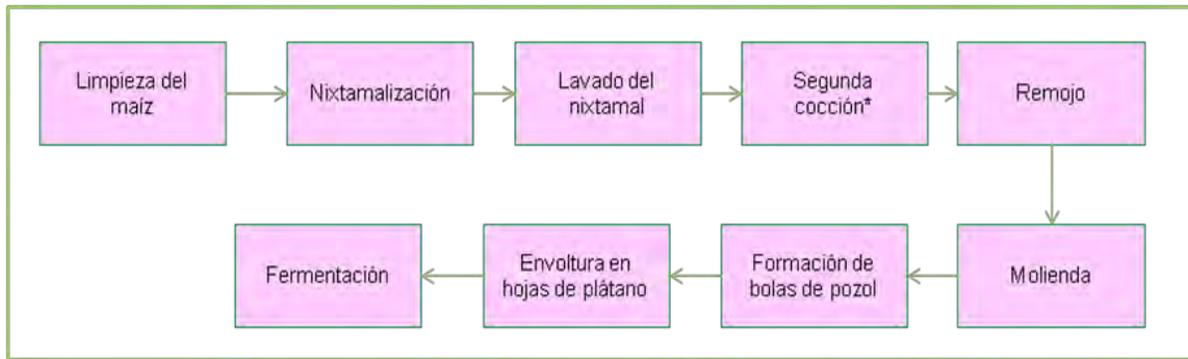


Figura 1. Diagrama de elaboración del pozol. * Sólo la realizan los productores mestizos (Cañas *et al.* 1993; Wachter *et al.* 1993)

Debido al proceso artesanal con que se elabora (en el que se ha visto que el remojo y la molienda aportan una considerable carga microbiana), el pozol posee una microbiota muy diversa compuesta de mohos, levaduras, enterobacterias, mesófilos aerobios y bacterias ácido lácticas (Wachter *et al.* 1993), mismas que son responsables de la fermentación espontánea, necesaria para obtener el producto final. Junto con dicha fermentación, se reduce el pH hasta valores de 4.5, los cuales logran la inhibición de un gran número de bacterias, incluidas, en parte, las patógenas; sin embargo, las enterobacterias logran mantenerse en cuentas de 1×10^3 UFC/g al final de la fermentación.

2.1.2. Microbiología del pozol

Como se mencionó anteriormente, es evidente que la carga microbiana inicial del pozol, así como el tipo de microorganismos, cambia a través del proceso de elaboración del mismo. Se ha visto que después del proceso de nixtamalización, la cantidad de microorganismos presentes es de menos de 1×10^1 UFC/mL para el caso de enterobacterias y bacterias ácido lácticas, mientras que para los mesófilos aerobios y los mohos y levaduras, es de menos de 1×10^2 UFC/mL. Sin embargo, tras los lavados y el remojo, la cuenta de bacterias ácido lácticas y de mesófilos aerobios aumenta, siendo dicho aumento aún más considerable tras la molienda. Al finalizar el proceso, el pozol posee una variedad de microorganismos, entre los que se encuentran tanto mohos y levaduras, como mesófilos aerobios,

enterobacterias y bacterias ácido lácticas, siendo éstas últimas las más abundantes (aproximadamente 2×10^9 UFC/mL) (Wacher *et al.* 1993; Nuraida *et al.* 1995). Además, se ha visto que, respecto a la población bacteriana, las bacterias lácticas tienen una participación importante (más del 70%) durante todo el proceso de fermentación (Ben Omar *et al.* 2000).

Se ha logrado establecer que la molienda del grano de maíz nixtamalizado es la operación clave para que el pozol adquiriera el inóculo que lo llevará a tener una microbiota compleja al final del proceso. La cantidad de masa que se va acumulando tras cada lote en el molino es la responsable de dicho inóculo, ya que, además de que la masa permanece ahí todo un día, los microorganismos en ella logran mantenerse los días subsecuentes, por tanto existe una fuente de microorganismos para los nuevos granos de maíz nixtamalizados que entran para ser molidos (Wacher *et al.* 1993)

Investigaciones realizadas sobre la microbiología del pozol, han logrado caracterizar diversos microorganismos que se pueden encontrar en este alimento (Tabla 2.1).

Como ya se dijo con anterioridad, las bacterias ácido lácticas son el grupo microbiano dominante en el pozol durante todas las etapas de su fermentación. En trabajos previos se han logrado encontrar bacterias ácido lácticas no amilolíticas: *Weissella confusa*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus delbrueckii*, entre otras (Ben Omar *et al.* 2000) (tabla 2.1), bacterias lácticas amilolíticas como *Streptococcus bovis*, *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus* (Díaz-Ruiz *et al.* 2003); así como *Bacillus lentus*, *Bacillus cereus* y *Bacillus mycoides* como bacterias no lácticas amilolíticas (Rivera, 2001). En este sentido, hay que resaltar que el maíz está compuesto principalmente por almidón como fuente de carbono, mientras que los azúcares libres (sacarosa principalmente) se encuentran en una baja concentración (2g/100g de grano entero), lo que implica que se requiere de la presencia de bacterias ácido lácticas amilolíticas en el pozol, que permitan la degradación del almidón, así como la fermentación láctica del mismo. Se ha reportado que el 40% de las bacterias ácido lácticas presentes en la

masa inicial son amilolíticas, siendo predominantes las bacterias del género *Streptococcus* (Díaz-Ruiz *et al.* 2003).

Tabla 2.1. Ejemplos de algunos microorganismos aislados del pozol.

Bacterias ácido lácticas	Enterobacterias	Hongos y levaduras
<i>Streptococcus bovis</i> ^{b, d}	<i>Escherichia coli</i> O88:H25 ^g	<i>Geotrichum candidum</i> ^{e, f}
<i>Streptococcus macedonicus</i> ^d	<i>Escherichia coli</i> O22:H2 ^g	<i>Trichosporon cutaneum</i> ^e
<i>Streptococcus infantarius</i> ^d	<i>Escherichia coli</i> O30:H45 ^g	<i>Candida krusei</i> ^e
<i>Streptococcus suis</i> ^b	<i>Escherichia coli</i> OR:H45 ^g	<i>Hansenula fabiani</i> ^e
<i>Lactobacillus fermentum</i> ^b	<i>Escherichia coli</i> O8:H7 ^g	<i>Candida guilliermondii</i> ^e
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ^{b, f}	<i>Escherichia coli</i> O8:H8 ^g	<i>Candida parapsilosis</i> ^e
<i>Lactobacillus plantarum</i> ^{a, b, c}	<i>Escherichia coli</i> O92:H6 ^g	<i>Candida tropicalis</i> ^e
<i>Lactobacillus pentosus</i> ^a	<i>Escherichia coli</i> O1:H6 ^g	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ^e
<i>Lactobacillus casei</i> ^{b, c}	<i>Escherichia coli</i> O18:H53 ^g	<i>Aspergillus flavus</i> ^e
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ^{b, c}	<i>Escherichia coli</i> H20:HNM ^g	<i>Fusarium sp.</i> ^e
<i>Lactococcus lactis</i> ^{c, d}		<i>Penicillium claviforme</i> ^e
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> ^b		
<i>Lactobacillus alimentarius</i> ^c		
<i>Weissella confusa</i> ^b		

Reportados por: ^a Ampe *et al.* (1999); ^b Ben Omar *et al.* (2000); ^c Escalante *et al.* (2001); ^d Díaz-Ruiz *et al.* (2003); ^e Méndez-Albores *et al.* (2004); ^f Nuraida *et al.* (1995); ^g Sainz *et al.* (2001)

Asimismo, las bacterias ácido lácticas juegan un rol muy importante en la inhibición de microorganismos indeseables, como son las bacterias patógenas.

Dado que, como ya se ha dicho, el pozol se elabora a través de un proceso artesanal, es común y de cierta manera, esperado, que el producto final pueda verse contaminado por bacterias patógenas, como se ha corroborado con la presencia de diversos serogrupos de *Escherichia coli* enterohemorrágicos (Sainz *et al.* 2001).

2.2. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos que comparten características importantes en común: son bacilos o cocos Gram positivos, no móviles, no esporulados y catalasa negativa, con la capacidad de fermentar los azúcares para originar, como producto final principal de su metabolismo, ácido láctico; en este sentido, pueden subdividirse en homofermentativas y en heterofermentativas (Cabeza Herrera, 2006). Este grupo de bacterias no posee porfirinas ni citocromos, por lo que obtienen su energía vía fosforilación a nivel de sustrato. Son bacterias anaerobias aerotolerantes, es decir que no utilizan el oxígeno como último aceptor de electrones; sin embargo, pueden crecer en presencia o ausencia de él. Son también nutricionalmente exigentes, pues obtienen su energía solamente del metabolismo de los azúcares, por lo que están restringidas a crecer en presencia de ellos, además de que requieren medios ricos en aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Brock, 2003).

Una característica importante de este grupo y que, además, las ha hecho un importante foco de estudio para la ciencia, la tecnología y la industria, es su capacidad de tolerar y generar, a través de la fermentación, niveles de pH tan bajos como lo hace el género *Lactobacillus*, que presenta valores de pH de 4.0, o incluso menores (Brock, 2003). Esta capacidad les ha permitido inhibir otras especies y géneros de bacterias para ser ellas las predominantes en un ecosistema microbiano. Además, en la industria de los alimentos han sido ampliamente utilizadas para la conservación y mejora tecnológica de los productos lácteos, cárnicos y vegetales fermentados (Cabeza Herrera, 2006).

Pese a que existen diversos microorganismos capaces de producir ácido láctico como producto final de su fermentación, el grupo de las bacterias ácido lácticas se restringe a géneros dentro del orden de los Lactobaciliares, incluyendo a: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Pediococcus*; además también se consideran como BAL a los géneros *Carnobacterium*,

Enterococcus, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Todar, 2011).

Aunque algunas bacterias ácido lácticas son patógenas oportunistas para el ser humano (como *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*), muchas han sido utilizadas para la elaboración y conservación de alimentos desde épocas remotas.

2.2.1. Metabolismo

Como se dijo anteriormente, según los productos finales de la fermentación, las bacterias ácido lácticas pueden dividirse en homofermentativas o heterofermentativas.

2.2.1.1. Fermentación homofermentativa

Cuando la lisis de carbohidratos se lleva a cabo a través de la vía Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) para producir dos moléculas de lactato a partir de una molécula de glucosa, se denomina fermentación homofermentativa. Los géneros que llevan a cabo este tipo de fermentación son: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* así como el grupo I y II de *Lactobacillus* (tabla 2.2) (Todar, 2011). Este género de bacterias posee la enzima fructosa-difosfato-aldolasa, que es necesaria para hidrolizar hexosas y convertirlas en dos moléculas de tres carbonos cada una.

En la vía EMP, con una glucosa como sustrato, dos moléculas de ATP son utilizadas para convertir la glucosa a fructosa-1,6-difosfato. La hidrólisis de ésta última, genera dos moléculas de tres carbonos, la cual sufre de una deshidrogenación para formar dos moléculas de NADH+. Posteriormente hay una fosforilación a nivel de sustrato para producir dos moléculas de ATP y fosfoenolpiruvato (PEP), el cual es convertido a piruvato y finalmente a lactato por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa. La reacción global comprende la

producción de dos moléculas de lactato y dos de ATP a partir de una molécula de glucosa (Figura 2) (Ray y Bhunia, 2008).

Tabla 2.2. División de las especies de *Lactobacillus* en Grupos I, II y III

Características	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Tipo de fermentación	Homofermentador obligado	Heterofermentador facultativo	Heterofermentador obligado
Productos finales de fermentación	Lactato	Lactato y/o acetato, etanol, CO ₂ y formiato	Lactato, acetato, etanol y CO ₂
Especies representativas	<i>L. curvatus</i> <i>L. sake</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>delbrueckii</i> , <i>bulgaricus</i> , <i>lactis</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i> , <i>ramnosus</i> ssp. <i>pseudoplanctarum</i> <i>L. divergens</i> <i>L. kefir</i> <i>L. confuses</i> <i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>

Tomado y modificado de Ray y Bhunia (2008).

2.2.1.2. Fermentación Heterofermentativa

En este tipo de fermentación, las hexosas son metabolizadas para producir una mezcla de ácido láctico, CO₂ y acetato o etanol. Los géneros reconocidos como heterofermentadores son *Leuconostoc*, el grupo III de *Lactobacillus* (tabla 2.2), el género *Oenococcus* y *Weisella* (Todar, 2011). Estas bacterias no poseen la enzima fructosa-difosfato-aldolasa, requerida en la vía EMP para formar las dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato; sin embargo, poseen a la glucosa-fosfato-deshidrogenasa y a la xilulosa-fosfocetolasa, que les permiten metabolizar a las hexosas a través de la vía de las pentosas-fosfato para generar energía.

La vía de las pentosas-fosfato consta de una fase inicial oxidativa, seguida de una fase no oxidativa. En la primera fase, la glucosa es oxidada a 6-fosfogluconato por la glucosa-fosfato-deshidrogenasa, y luego descarboxilada

para producir una molécula de CO₂ y una de ribulosa-5-fosfato. En la segunda fase (no oxidativa), este último compuesto es convertido a xilulosa-5-fosfato, mismo que, a través de hidrólisis, produce una molécula de gliceraldehído-3-fosfato y una de acetyl-fosfato. El gliceraldehído-3-fosfato es subsecuentemente convertido en lactato, mientras que el acetyl-fosfato puede ser oxidado para producir acetato, o reducido para generar etanol, dependiendo del potencial de óxido-reducción que se encuentre en el ambiente (figura 2) (Ray y Bhunia, 2008).

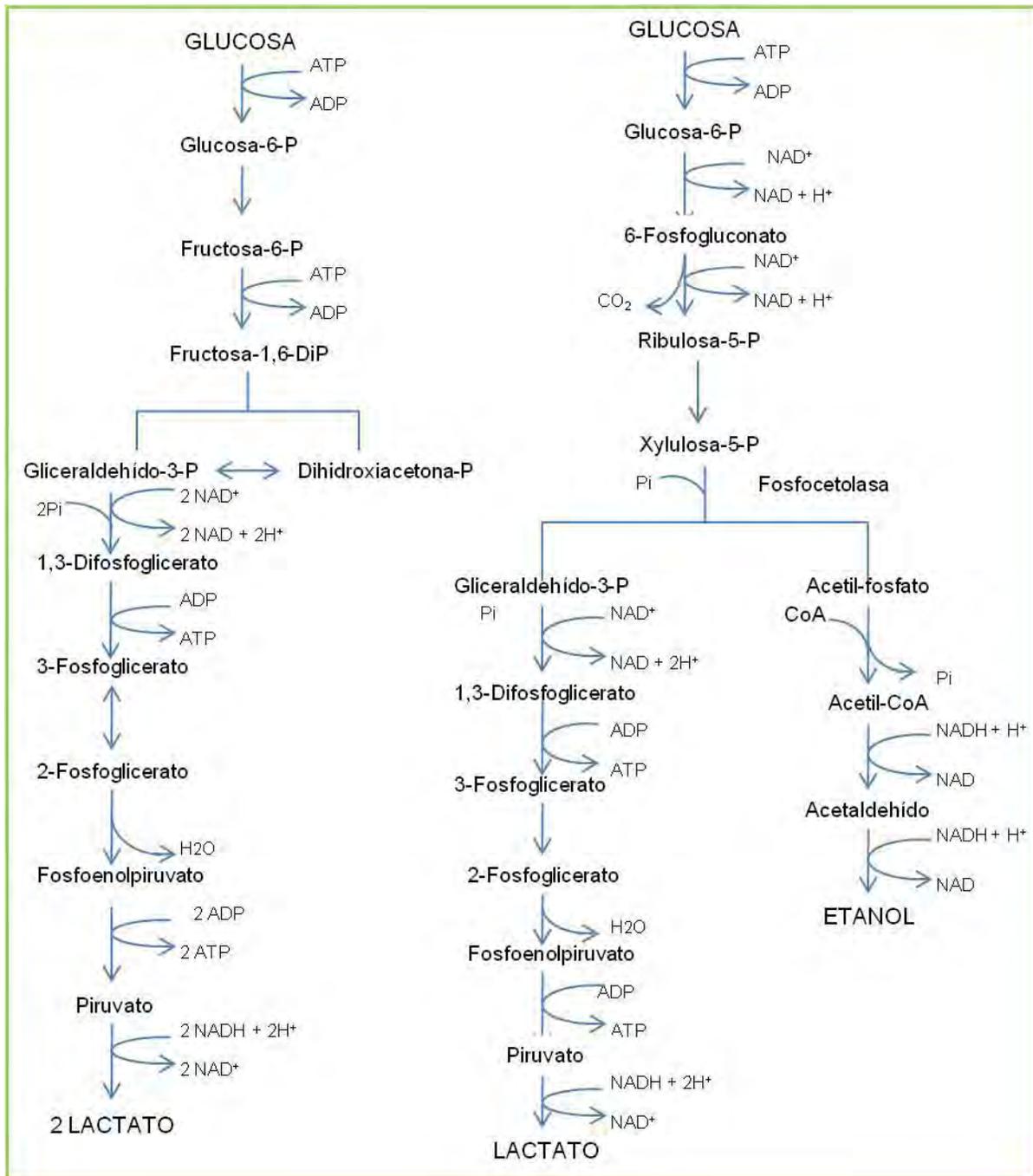


Figura 2. Izquierda: Vía Embden-Meyerhoff-Parnas para la producción de dos moléculas de lactato a partir de una molécula de glucosa (fermentación homoláctica). Derecha: Vía de las pentosas-fosfato para la producción de lactato, CO₂ y etanol a partir de una molécula de glucosa (fermentación heteroláctica) (Tomado y modificado de Todar, 2011)

2.2.2. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum es una bacteria del grupo de las bacterias ácido lácticas que fue aislada por primera vez de saliva humana, por lo que forma parte de la microbiota normal del organismo humano, además de que se ha encontrado en materia vegetal en condiciones de anaerobiosis. Es un bacilo Gram positivo, no esporulado, no móvil, aerotolerante que se encuentra clasificado dentro del grupo II de los Lactobacilos, indicando que es una bacteria heterofermentadora facultativa (tabla 2.2), es decir, que puede producir acetato, etanol y CO₂ además de ácido láctico como productos finales de la fermentación de carbohidratos. En este aspecto, es importante mencionar que el ácido láctico que produce es una mezcla de DL-ácido láctico, debido a que posee tanto a la L-lactato-deshidrogenasa, como a la D-lactato-deshidrogenasa (Ray y Bhunia, 2008), por esta razón no es usada en la producción comercial de ácido láctico para la industria alimentaria. En un sistema aerobio, *L. plantarum* es capaz de convertir el oxígeno en H₂O₂, del cual se defiende gracias a que cuenta con un sistema de defensa dependiente de manganeso, como lo es la pseudocatalasa que utiliza a dicho elemento como cofactor (Daeschel y Nes, 1994).

Esta bacteria crece óptimamente a 30° C y a un pH de 5.5-6, el cual logra reducir hasta 4.6-4.8, llegando a existir cepas que lo hacen hasta 3.0 y tolerando hasta valores de 2.0 (Zapata *et al.* 2009). Estos hechos la han caracterizado por ser la especie más ácido-tolerante del género, y se cree que ésta es la razón por la que *L. plantarum* se encuentra como la especie más importante de la fase terminal de la fermentación de diversos productos (Daeschel y Nes, 1994).

L. plantarum es frecuentemente usada en la fermentación de carnes debido a su capacidad para reducir los nitratos a nitritos para la formación del color rosado en las carnes curadas; así como por la producción de diacetilo a partir de la fermentación de ácido cítrico en los productos lácticos (yogurt y quesos). Debido a esto, es importante controlar la producción y los métodos de conservación de jugos y concentrados de frutas, ya que esta bacteria podría provocar la generación de diacetilo, cuyo aroma y sabor no es deseable en estos productos (Ray y

Bhunja, 2008; Daeschel y Nes, 1994). Asimismo, se ha encontrado en otros alimentos fermentados como pepinillos y aceitunas en salmuera, kimchi, sauerkraut, ogi nigeriano y masas fermentadas (Molin, 2001).

Como bacteria ácido láctica, *L. plantarum* no sólo es capaz de producir ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y diacetilo, mismos que ya la hacen un importante foco de estudio y de desarrollo en la industria alimentaria; sino que también es capaz de producir bacteriocinas, como la plantaricina W (Holo *et al.*, 2001). En la tabla 2.3 se enlistan algunas de las bacteriocinas que se han aislado de diferentes cepas de *L. plantarum*.

Lactobacillus plantarum también se ha logrado aislar de diversos productos fermentados ricos en almidón, como alimentos africanos fermentados a base de yuca, alimentos fermentados a base de cereales (maíz y sorgo), así como del pozol (Escalante *et al.* 2000; Díaz-Ruíz *et al.* 2003).

Tabla 2.3. Bacteriocinas aisladas de diversas cepas de *Lactobacillus plantarum*

Nombre	Cepa productora
Plantaricina A	<i>L. plantarum</i> C11 ^a
Plantaricinas E/F y J/K	<i>L. plantarum</i> C11 ^a
Plantaricina W	<i>L. plantarum</i> LMG 2379 ^b
Bacteriocina LPBM10	<i>L. plantarum</i> LPBM10 ^c
Plantaricina LR14	<i>L. plantarum</i> LR/14 ^d

^a Reportado por Ben Omar *et al.* (2006); ^b Holo *et al.* (2001); ^c Zapata *et al.* (2009); ^d Tiwari *et al.* (2008)

Existen varias cepas de *L. plantarum* con poder amilolítico, que se encuentran principalmente en la fase inicial de la fermentación de varios alimentos almidonosos, lo que permite que se empiecen a degradar las cadenas de almidón para dar paso después a azúcares más pequeños capaces de ser metabolizados por bacterias lácticas no amilolíticas (Díaz-Ruiz *et al.* 2003).

Debido a que *L. plantarum* se ha aislado de saliva y del tracto gastrointestinal del humano, además de que es común encontrarla en diversos productos fermentados, últimamente la investigación se ha dirigido hacia el desarrollo de productos probióticos, así como su aplicación como cultivo iniciador para el control de alimentos fermentados ya sean ricos en almidón o no.

2.2.3. *Streptococcus* sp.

El género *Streptococcus* comprende bacterias Gram positivas, no esporuladas, no móviles, oxidasa y catalasa negativa que forman parte del grupo de las bacterias ácido lácticas. Las bacterias de este género forman cadenas cortas o de pares de cocos con diámetros de 0.7-0.9 μ m, crecen a una temperatura óptima de 37-40° C aunque también logran hacerlo a 52°C. Muchas de las especies de este género son anaerobias facultativas y homofermentadoras, por lo que sólo producen ácido láctico a través de la vía EMP, logrando reducir el pH del medio hasta 4.0 (Ray y Bhunia, 2008).

El hábitat natural de los estreptococos son las plantas, en donde encuentran todos los nutrientes necesarios para su desarrollo. Por tanto, es lógico que algunas especies de este género se encuentren en leche cruda y logren crecer abundantemente en ella, pues es un alimento rico en nutrientes. Asimismo, su ocurrencia en derivados lácteos y productos fermentados derivados de cereales, es esperada (Gilliland, 2000).

Este género está dividido de acuerdo a los grupos de Lancefield, mismos que se basan en una clasificación serológica. Los grupos de Lancefield se asignan con una letra mayúscula de la A a la O. Los grupos A, B, C, F, H e I comprenden especies patógenas beta-hemolíticas como *S. pyogenes* y *S. agalactiae* (tabla 2.4). El grupo N de Lancefield, comprende aquellas bacterias del género *Streptococcus* no patogénicas y que se han encontrado en leche y productos fermentados: *S. lactis*, *S. cremoris* y *S. diacetylactis*, mismas que se han logrado desarrollar como cultivos iniciadores (Gilliland, 2000; Todar, 2011).

Por otro lado, en el grupo D se encuentran bacterias oportunistas como *S. bovis* (tabla 2.4) que, aunque se encuentran como parte de la microbiota normal en varios rumiantes y en humanos, pueden ser responsables de varias enfermedades (como septicemias, endocarditis o meningitis) si encuentran las condiciones óptimas para ello (Nobile y Figueroa, 2003; Todar, 2011).

Dentro de las cepas de *Streptococcus bovis*, se hacía la diferencia entre dos biotipos: *Streptococcus bovis* I, capaz de degradar el manitol; y *Streptococcus bovis* II, manitol negativo. Dentro de éstas últimas, el biotipo II.1 logra fermentar el almidón, la melobiosa y el glicógeno, pero no la trehalosa; no produce β -glucoronidasa o β -galactosidasa. Por otro lado, el biotipo II.2 fermenta la trehalosa, pero no el almidón ni el glicógeno; y además produce β -glucoronidasa y β -galactosidasa. Sin embargo, fue hasta que Schlegel *et al.* (2000) lograron establecer diferencias fenotípicas y genotípicas suficientes, que *Streptococcus bovis* II.1 se identificó como una nueva especie: *Streptococcus infantarius*, dentro de la que, además, se distinguen dos subespecies: *S. infantarius* subsp. *infantarius* y *S. infantarius* subsp. *coli*.

Tabla 2.4. Grupos serológicos del género *Streptococcus*

Grupo	Grupo de Lancefield	Organismos representativos
Piogénico	A	<i>S. pyogenes</i>
	B	<i>S. agalactiae</i>
	C	<i>S. equi</i>
	F	<i>S. anginosus</i>
	H	<i>S. sanguinis</i>
Viridans	D	<i>S. bovis</i> , <i>S. equinus</i>
Enterococcus	D	<i>S. faecalis</i> , <i>S. durans</i> , <i>S. faecium</i>
Láctico	N	<i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. diacetylactis</i>

Tomado y modificado de Gilliland, 2000.

2.2.3.1. *Streptococcus infantarius*.

Streptococcus infantarius se diferencia por ser una bacteria α -hemolítica, perteneciente al grupo D de Lancefield. No produce exopolisacáridos; es positiva en las pruebas de Voges-Proskauer, leucina aminopeptidasa y alanil-fenilalanil-prolina arilamidasa. Es negativa en las pruebas de arginina dihidrolasa, alcalinofosfatasa y pirrolidonil-arilamidasa. La hidrólisis de esculina es variable. La mayoría de las cepas son α -galactosidasa positiva y son N-acetil- β -glucosaminidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, glicil-triptofano-arilamidasa y β -manosidasa negativas. Todas las cepas de esta especie producen ácido a partir de lactosa, maltosa y sacarosa, pero no de arabinosa, arabitol, ciclodextrina, inulina, D-manitol, ribosa, sorbitol, D-tagatosa o trehalosa.

Streptococcus infantarius subsp. *infantarius* (aislada de heces fecales de niños) posee la característica de no hidrolizar la esculina, además de que es β -glucosidasa y metil β -D-glucopiranosidasa negativa. Produce, asimismo, ácido a partir de glicógeno, melibiosa, pululano y almidón (Schlegel *et al.* 2000).

Tanto *Streptococcus infantarius* como *Streptococcus bovis* se han logrado aislar del pozol, siendo ésta última de las bacterias predominantes durante todo el proceso de fermentación. Se ha visto, además, que ambas son bacterias importantes durante la primera etapa de fermentación en la que es necesaria la hidrólisis del almidón para dar paso a azúcares más sencillos. Se ha sugerido que el papel principal de *S. bovis* en la fermentación del pozol, es la de proveer de maltooligosacáridos de menor peso molecular a bacterias no amilolíticas durante las primeras etapas del proceso para que éste llegue a término (Díaz-Ruiz *et al.* 2003).

2.2.4. *Weissella confusa*

El género *Weissella* fue considerado como tal en 1990, después de que se logró ver que *Leuconostoc paramesenteroides* era filogenéticamente distinto a *Leuconostoc mesenteroides*, y que podía agruparse junto con cinco lactobacilos

heterofermentativos que se conocían entonces como: *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor* y *Lactobacillus viridescens*. En un estudio sobre microorganismos semejantes a *Leuconostoc* originarios de salsas fermentadas, se estudió exhaustivamente la taxonomía de las especies ya mencionadas, lo que resultó en la descripción del género *Weissella*, mismo que comprendió el antes *Leuconostoc paramesenteroides* y las cinco especies de *Lactobacillus* arriba indicadas, además de una nueva especie encontrada en ese momento: *Weissella hellenica*. Así pues, hoy en día existen varias especies del género *Weissella*: *Weissella confusa*, *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica*, *Weissella kandleri*, *Weissella minor*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella viridiscens*, *Weissella thailandesis*, *Weissella cibaria*, *Weissella fabaria* y *Weissella koreensis* entre otras (Tanasupawat *et al.* 2000; Björkroth *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002; De Bruyne *et al.* 2010).

Weissella confusa se ha detectado en caña de azúcar, jugo de zanahoria, cereales y ocasionalmente en leche cruda (Björkroth *et al.* 2002; Katina *et al.* 2009). Asimismo, se ha visto que está presente en el intestino humano, como parte de la microbiota normal (Nam *et al.*, 2002). Es un bacilo Gram positivo, catalasa negativo, no esporulado, no móvil y productor de ácido láctico por la vía de las pentosas-fostato (heterofermentador). Es capaz de utilizar la glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa y algunas pentosas de los cereales en los que se encuentra (Katina *et al.* 2009; Serna Cock *et al.* 2010). Esta especie, al igual que el resto de las bacterias ácido lácticas, es exigente nutricionalmente (Serna Cock *et al.* 2010).

Este microorganismo no ha sido estudiado muy ampliamente en cuanto a sus propiedades probióticas o como productor de bacteriocinas. Existen reportes sobre el uso de ciertas cepas de *Weissella confusa* como productoras de dextranos para su aplicación en la elaboración de pan (Katina *et al.* 2009); también se han encontrado cepas capaces de inhibir la adherencia de *Helicobacter pylori* a las células del intestino humano (Nam *et al.* 2002); e incluso se ha investigado su

potencial como productora de sustancias con actividad similar a las bacteriocinas mostrando inhibición contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* (Chavasirikunton *et al.* 2007) y contra *Streptococcus agalactiae* (Serna Cock *et al.* 2010). Es también importante destacar que se han reportado casos de bacteremia, endocarditis y otras enfermedades provocadas por ciertas cepas de *W. confusa*, lo cual ha sugerido que se considere como una bacteria oportunista (Olano *et al.* 2001; Flaherty *et al.* 2003).

Por otro lado, dicha bacteria se ha aislado de diferentes alimentos, como salami griego, chilli bo de Malasia (alimento no fermentado a base de chile y almidón de maíz) y leche cruda, así como también del pozol y otros alimentos fermentados (Ampe *et al.* 1999; Björk *et al.* 2002; Nam *et al.* 2002; Quadghiri *et al.* 2009). Se ha visto, sin embargo, que *W. confusa* no se encuentra presente durante todas las etapas de fermentación de los alimentos y además no es una especie dominante. En realidad, se ha reportado que, en general, la cepas de *Weissella* se encuentran presentes sólo en las etapas intermedias de la fermentación (Björkroth y Holzapfel, 2006), por lo que se ha sugerido que existen factores u otras especies bacterianas que pudieran inhibir su crecimiento.

2.3. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son compuestos proteicos con efecto antimicrobiano, producidos por muchas cepas bacterianas tanto Gram positivas, como Gram negativas (Savadogo *et al.* 2006; Ray y Bhunia, 2008). Su actividad antimicrobiana principalmente se ve dirigida hacia bacterias emparentadas o muy semejantes a la cepa productora (De Vuyst y Leroy, 2007) con el fin de ganar dominio en el nicho ecológico en el que se desarrollan, jugando así un papel fundamental en la dinámica de la población bacteriana de cualquier ambiente microbiano (Muñoz-Rojas, 2003, Chen y Hoover, 2003). Las bacteriocinas sintetizadas por bacterias ácido lácticas son de especial interés en la microbiología de los alimentos, debido a su efecto bactericida hacia diferentes bacterias Gram positivas patógenas o

relacionadas con el deterioro, además de que, bajo ciertas condiciones de estrés, poseen efecto hacia bacterias Gram negativas importantes en la inocuidad alimentaria (Ray y Bhunia, 2008).

Las bacteriocinas se sintetizan ribosomalmente, son de naturaleza catiónica, anfipáticas, con estructuras peptídicas en forma de α -hélice o β -plegadas, o ambas; pueden tener tioéteres, puentes disulfuro o grupos sulfhidrilo libres. Sus propiedades anfipáticas les han permitido interactuar tanto con la fase lipídica como con la fase acuosa de las membranas celulares de las bacterias sensibles, llevando así a su desestabilización funcional y a la subsecuente muerte de las mismas (Ray y Bhunia, 2008).

Es importante destacar que las bacteriocinas difieren de los antibióticos en que las primeras son, como ya se mencionó anteriormente, compuestos proteicos con una especificidad inhibitoria contra bacterias del mismo género o estrechamente relacionadas; mientras que los antibióticos, además de que pueden causar reacciones alérgicas en el huésped, poseen una actividad poco específica contra células vivas, pudiendo así afectar a las mismas células o a la microbiota normal del hospedero (Riley y Wertz, 2002; Chen y Hoover, 2003); además, los antibióticos son moléculas de bajo peso molecular, no-proteicos, producidos por diferentes microorganismos como metabolitos secundarios y clasificados según su estructura química, pues pueden ser sulfonamidas, quinolonas, tetraciclinas y gliciliclinas entre otras (Todar, 2011).

2.3.1. Características y clasificación

Las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas son péptidos pequeños de aproximadamente 3-6 KDa compuestos por 20 a 60 aminoácidos, cuyo efecto bactericida no está relacionado con el número total de éstos. Son además, como ya se había comentado, compuestos catiónicos cuya carga neta positiva es mayor a pH ácido. Asimismo, sus propiedades bactericidas se acentúan a valores de pH bajos, permanecen estables a temperaturas relativamente altas y no se ven afectadas por solventes orgánicos. En este sentido, son las enzimas proteolíticas

las que logran hidrolizarlas y, por tanto, inhibir su actividad. Son bastante estables bajo condiciones de refrigeración y congelación, pero si contienen metionina, ésta puede oxidarse a sulfóxido de metionina, el cual reduce el poder antimicrobiano (Chen y Hoover, 2003; Savadogo *et al.* 2006; Ray y Bhunia, 2008).

Dependiendo del organismo productor y el criterio de clasificación, las bacteriocinas pueden clasificarse en diferentes clases según lo propuesto por Klaenhammer (1993). En la tabla 2.5 se muestran las tres clases propuestas, sus características más importantes, así como las bacteriocinas representativas y los microorganismos productores.

La clase I de las bacteriocinas comprende a los lantibióticos que, como su nombre lo indica, poseen lantionina como parte de sus aminoácidos estructurales. Son péptidos pequeños (< 5 KDa), y además también poseen α -metil-lantionina, dehidroalanina y dehidrobutirina. La formación de los anillos de lantionina proviene de la deshidratación de los aminoácidos L-serina a dehidroalanina, y L-treonina a dehidrobutirina, con la subsecuente adición de átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos (González-Martínez *et al.* 2005; Ray y Bhunia, 2008). Se subdividen en los tipos A y B, dependiendo de su estructura química y su actividad antimicrobiana.

El tipo A son péptidos con 21-38 aminoácidos en su estructura, con una carga neta positiva; ejercen su actividad a través de la formación de poros en la membrana celular de las bacterias sensibles. Por otro lado, el tipo B son péptidos globulares más pequeños, con no más de 18 aminoácidos, que pueden tener una carga neta negativa o no tener ninguna; su capacidad bactericida está relacionada con la inhibición de enzimas específicas (Riley y Wertz, 2002; Chen y Hoover, 2003). Dentro de esta clase de bacteriocinas, destaca la nisina A, lantibiótico del tipo A producido por *Lactococcus lactis* ATCC11454 (figura 3). Esta bacteriocina es, hasta la fecha, la más importante en la industria de alimentos, pues es usada en alrededor de 45 países como aditivo para conservar algunos alimentos. Además, es la única bacteriocina aprobada por la FDA para su uso como aditivo en los Estados Unidos (Riley y Wertz, 2002).

Tabla 2.5. Clasificación de las bacteriocinas según Klaenhammer.

Clase	Características	Ejemplos representativos	BAL productora
Clase I:	< 5 KDa		
Lantibióticos	Estables al calor		
IA	Péptidos alargados. Forman poros en la membrana celular blanco	Nisina A Plantaricina A	<i>Lac. lactis</i> ATCC11454 ^a <i>Lb. plantarum</i> C11
IB	Péptidos globulares. Inhibición a nivel enzimático	Mersacidina	<i>Bacillus sp.</i> HILY-85,54728 ^b
Clase II: No lantibióticos	< 10 KDa Estables al calor		
Ila:	Secuencia N-terminal: -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys	Pediocina Ach Sakacina A	<i>Ped. acidilactici</i> H ^a <i>Lb. sake</i> Lb706 ^c
Cistibióticos	Forman poros en la membrana celular Actividad contra <i>Listeria</i>	Leucocina A	<i>Leu. gelidum</i> UAL 187 ^a
Ilb	Necesitan dos péptidos para generar actividad	Lactacina F Lactococcina G	<i>Lb. acidophilus</i> 11088 ^d <i>Lac. Lactis</i> LMG2081 ^e
Ilc	Sec-Dependientes	Acidocina B	<i>Lb. acidophilus</i> M46 ^f
Clase III	> 30 KDa Lábiles al calor	Helveticina J Lactacina B	<i>Lb. helveticus</i> J ^a <i>Lb. acidophilus</i> N2 ^g
Clase IV	Glicopéptidos y lipopéptidos	Leucocina S Lactocina 27	<i>Leu. paramesenteroides</i> Ox ^h <i>Lb. helveticus</i> LP27 ⁱ

Reportados por: ^a Ray y Bhunia, 2008; ^b Brötz *et al.* 1995; ^c Holck *et al.* 1992; ^d Muriana y Klaenhammer, 1991; ^e Moll *et al.* 1996; ^f Leer *et al.* 1995; ^g Barefoot y Klaenhammer, 1984; ^h Bruno y Montville, 1993; ⁱ Upreti y Hinsdill, 1975.

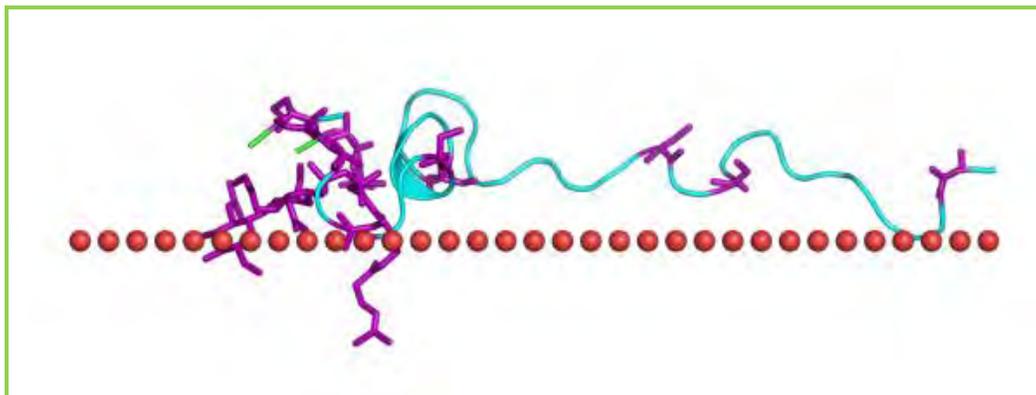


Figura 3. Estructura de la nisina A, bacteriocina de clase IA producida por *Lactococcus lactis* ATCC11454. Tomado de OPM Database.

En la clase II, se agrupan las bacteriocinas no lantibióticas, estables al calor, con menos de 10 KDa y aproximadamente 30-60 aminoácidos en su estructura. Están subdivididas en tres tipos: IIa, IIb y IIc. La subclase IIa, también llamados cistibióticos, es la subclase más grande. Se distinguen por poseer cuatro o dos cisteínas con dos o un puente disulfuro (Ray y Bhunia, 2008); conservan una secuencia N-terminal específica: -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys, además de que comparten actividad contra *Listeria*. Este tipo de bacteriocinas, al igual que los lantibióticos de tipo A, actúan a través de la formación de poros en la membrana citoplásmica de la célula blanco. Algunos ejemplos son la pediocina AcH, la sakacina A y leucocina A (tabla 2.5; figura 4) (Riley y Wertz, 2002). El tipo IIb se caracteriza por poseer dos péptidos necesarios para ejercer su actividad a través de la membrana. Por último, el tipo IIc se compone por bacteriocinas no lantibióticas de tipo sec-dependientes, es decir que el péptido líder (el cual se encuentra en todos los tipos de bacteriocinas), reconoce un sistema de secreción sec. Un ejemplo de éstas es la acidocina B (Riley y Wertz, 2002; Ray y Bhunia, 2008).

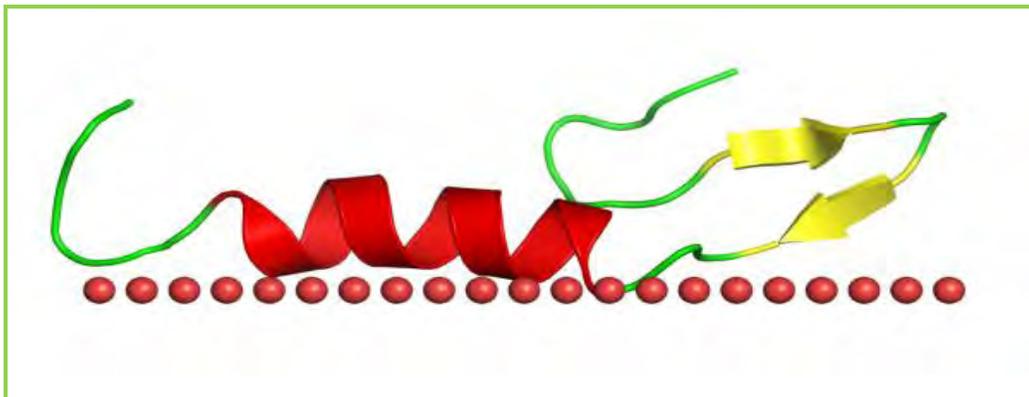


Figura 4. Estructura de la leucocina A, bacteriocina de clase IIa producida por *Leuconostoc gelidum* UAL 187. Tomado de OPM Database

La clase III de bacteriocinas está compuesta por péptidos lábiles al calor con más de 30 KDa, lo que las hace el tipo de bacteriocinas más grandes. Finalmente, una cuarta división ha sido propuesta: la IV, compuesta por péptidos complejos que requieren lípidos o carbohidratos como parte de su estructura para

tener actividad. Sin embargo, estas últimas clases no han sido muy estudiadas y se sabe muy poco sobre ellas y sus características estructurales y funcionales (Chen y Hoover, 2003).

2.3.2. Biosíntesis y modo de acción

Las bacteriocinas son sintetizadas como pre-propéptidos, los cuales son procesados y excretados mediante la maquinaria celular de transporte. En las bacterias ácido lácticas, la producción de bacteriocinas está asociada con el crecimiento: generalmente se da durante la fase exponencial y se detiene al término de la misma, aunque existen casos, como el de la nisina A, en los que la producción ocurre a la mitad de la fase log, llegando a su máximo cuando las células entran a la fase estacionaria; sin embargo, es importante tener claro que la regulación de la producción no depende de la fase de crecimiento, sino de la densidad celular (Riley y Wertz, 2002). En este sentido, se ha visto que algunas bacteriocinas trabajan como feromonas, pues regulan su propia expresión de acuerdo a su concentración en el medio. Dicha expresión es controlada por una señal de transducción de dos componentes, típico de muchos sistemas de quorum-sensing (Hauge *et al.* 1998; Riley y Wertz, 2002).

Por otro lado, la síntesis se puede ver afectada por el tipo y cantidad de las fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato, así como de cationes surfactantes (como el Tween 80). Asimismo, su producción neta puede verse afectada por el tipo de fuente de carbono utilizada, ya que, si bien las bacteriocinas pueden sintetizarse a través del uso de distintos azúcares (sacarosa o xilosa), se ha visto que, en general, la glucosa es la mejor fuente para una producción neta mayor (Muñoz-Rojas, 2003; Savadogo *et al.* 2006).

2.3.2.1. Biosíntesis

La mayoría de las bacteriocinas son sintetizadas como un pre-propéptido inactivo con una secuencia N-terminal líder enlazada al extremo C-terminal del propéptido; sin embargo, existen ciertas diferencias en cuanto al tipo de genes que necesitan para su liberación. Para el caso de los lantibióticos, los genes necesarios son los siguientes:

- ❖ Un gen estructural *lanA*, que codifica para el pre-propéptido
- ❖ Genes de inmunidad: *lanI*, *lanE*, *lanF* y *lanG*, que codifican para proteínas que protegen a la célula productora del lantibiótico a formar
- ❖ Un gen *lanT*, que codifica para las proteínas relacionadas con el sistema de transporte ABC
- ❖ Un gen *lanP*, el cual codifica para una proteinasa-serina encargada de remover la secuencia terminal líder del pre-propéptido
- ❖ Dos genes, *lanB* y *lanC* (y en algunos casos, sólo *lanM*), que codifican para enzimas responsables de la formación de la lantionina y metil-lantionina.
- ❖ Dos genes, *lanK* y *lanR*, que codifican para las proteínas regulatorias encargadas de transmitir la señal extracelular que induce la producción de lantibióticos (Chen y Hoover, 2003; Savadogo *et al.*, 2006).

La biosíntesis de los lantibióticos conlleva seis pasos generales (figura 5): formación del pre-propéptido, reacciones de modificación de los aminoácidos serina, treonina y cisteína para la formación de lantionina y metil-lantionina; escisión del péptido líder y el traslado del lantibiótico maduro (propéptido) a través de la membrana citoplásmica mediante un transportador de tipo ABC. Este transportador posee de 500 a 600 aminoácidos y se caracteriza por tener dos dominios asociados a la membrana. El dominio N-terminal consiste en 6 α -hélices que abarcan la membrana, capaces de reconocer el sustrato (el lantibiótico) y formar un acceso a través de la misma; mientras tanto, el dominio C-terminal posee dos sitios de unión para ATP, mismo que es necesario hidrolizar para

obtener la energía que se requiere para el proceso de excreción del lantibiótico (Chen y Hoover, 2003).

La regulación de la biosíntesis de las bacteriocinas de clase I está controlada por un sistema de regulación que incluye: dos péptido-señales, una protein-histidin-cinasa (HPK) ligada a la membrana y un regulador de respuesta citoplasmático (RR) (figura 5). La regulación se lleva a cabo de la siguiente manera: cuando la protein-histidin-cinasa percibe cierta concentración de bacteriocina en el ambiente, ésta se autofosforila; después, el grupo fosfato es transferido a un residuo de ácido aspártico en el sitio de unión del regulador de respuesta (RR), lo que desencadena la activación de los genes reguladores. Estos genes reguladores incluyen genes estructurales, de transporte, de inmunidad y, en algunos casos, genes para la regulación misma.

La inmunidad que posee la célula productora hacia sus propias bacteriocinas es mediada por las proteínas de inmunidad LanI o por el complejo LanF, LanE y LanG. Se sugiere que LanI, que se encuentra en la parte exterior de la membrana citoplasmática, confiere inmunidad previniendo la formación de poros por la bacteriocina en la célula productora; por otro lado, las proteínas LanFEG parece que actúan llevando a las bacteriocinas que logran insertarse en la membrana de la célula productora, de regreso al medio exterior.

Para el caso de las bacteriocinas de clase II, se ha logrado saber que los genes que codifican para su síntesis comparten muchas similitudes en su organización genética con los lantibióticos: consisten en un gen estructural que codifica para el pre-péptido (secuencia N-terminal Gly-Gly-), seguido por un gen de inmunidad, genes para el transporte de tipo ABC y genes que codifican para proteínas accesorio. Éstas últimas se ha visto que son esenciales para el transporte de la bacteriocina al exterior de la célula. La secuencia líder Gly-Gly- del extremo N-terminal mencionada se encuentra en las bacteriocinas IIa y IIb, pero no en las IIc. Éstas últimas, poseen una secuencia N-terminal que funge como señal para el transporte de tipo sec-dependiente (Chen y Hoover, 2003).

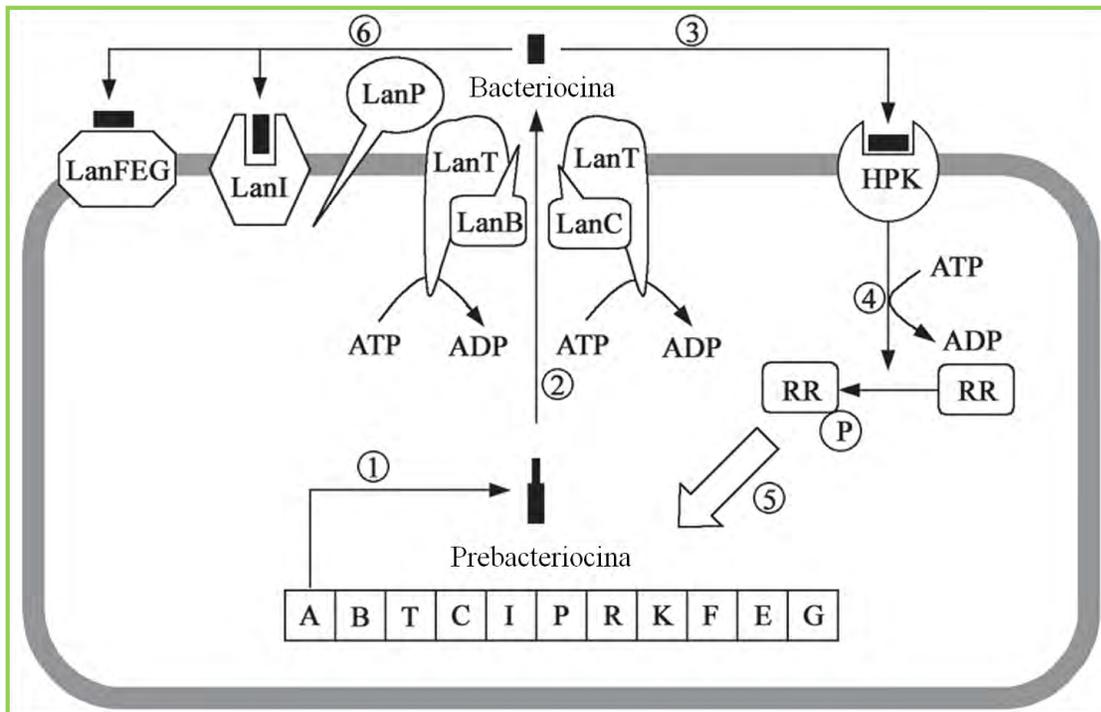


Figura 5. Biosíntesis de lantibióticos: 1) Formación de la prebacteriocina; 2) la prebacteriocina es modificada por LanB y LanC (las proteínas encargadas de la formación de lantionina y metil-lantionina), trasladada por LanT a través de un sistema de transporte ABC y procesada por LanP, para eliminar la secuencia N-terminal líder y así obtener la bacteriocina madura; 3) la histidin-proteín-cinasa (HPK) percibe cierta concentración de bacteriocina y se autofosforila; 4) el grupo fosfato (P) es transferido al regulador de respuesta (RR); 5) el regulador de respuesta (RR) activa los genes de regulación; 6) proteínas de inmunidad, LanI, LanE, LanF, LanG atrapan a la bacteriocina madura para dar protección a la célula productora (Tomado y modificado de Chen y Hoover, 2003).

A diferencia de los lantibióticos, las bacteriocinas de clase II no requieren modificaciones en sus aminoácidos para lograr estar activas. Tras la formación del pre-péptido, su secuencia terminal es removida, al mismo tiempo que es llevada hacia un transportador ABC junto con sus proteínas (figura 6). Su transportador ABC posee un dominio N-terminal de aproximadamente 150 aminoácidos y de naturaleza proteolítica que elimina la secuencia líder doble de glicina mientras la excreción de la bacteriocina se lleva a cabo.

La regulación de su síntesis está mediada por la producción de un péptido similar a la bacteriocina pero sin actividad antimicrobiana, que funge como factor de inducción (IF) para activar la transcripción de los genes de regulación (figura 6). El factor de inducción es un péptido pequeño, termoestable, de naturaleza

catiónica e hidrofóbico que es sintetizado como un pre-péptido que también posee la secuencia líder terminal Gly-Gly. El sistema de transporte ABC corta específicamente a dicha secuencia líder al mismo tiempo que traslada al péptido maduro al exterior de la célula. Ahí, el factor de inducción actúa como una señal externa que desencadena la transcripción de los genes involucrados en la producción de la bacteriocina.

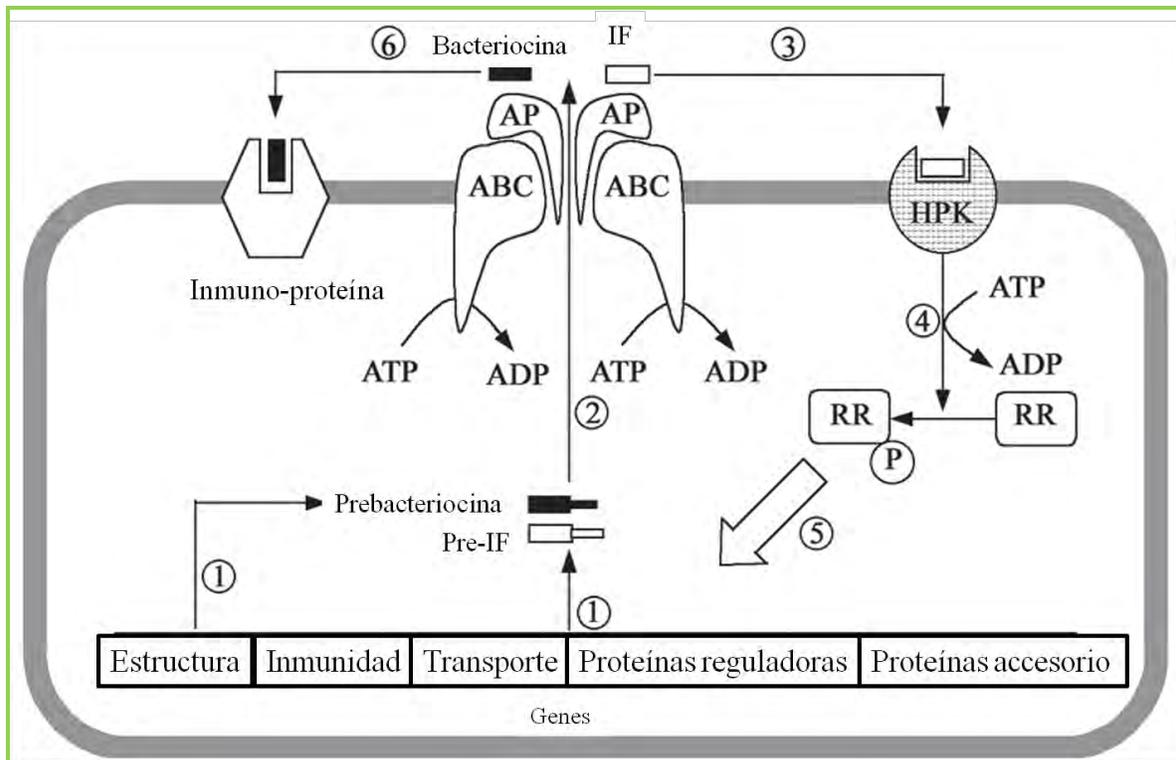


Figura 6. Biosíntesis de bacteriocinas de clase II: 1) Formación de la pre-bacteriocina y de un pre-factor de inducción (pre-IF); 2) la pre-bacteriocina y el pre-IF son procesados y trasladados mediante un sistema de transporte ABC, resultando en la formación de la bacteriocina madura y el factor de inducción (IF); 3) la histidin-proetin-cinasa percibe la presencia del IF y se autofosforila; 4) el grupo fosfato (P) es transferido al regulador de respuesta (RR); 5) el RR activa la transcripción de los genes reguladores; 6) la inmuno-proteína secuestra la bacteriocina para impedir su actividad mientras se encuentra en la membrana celular de la célula productora. (Tomado y modificado de Chen & Hoover, 2003)

El gen de inmunidad de este tipo de bacteriocinas codifica para una proteína estrechamente relacionada con la membrana citoplasmática que provee total inmunidad contra la bacteriocina sintetizada, al parecer, de la misma manera

que ocurre con la inmunoproteína LanI de los lantibióticos. Al parecer, la relación de las proteínas de inmunidad con la membrana citoplasmática es de gran importancia para que la célula productora no se vea afectada (Chen y Hoover, 2003).

2.3.2.2. Modo de acción

Se ha investigado bastante sobre el modo de acción de las bacteriocinas de clase IA y IIA, debido al interés que generan. En general, se ha visto que la actividad de las bacteriocinas va dirigida hacia la membrana celular de la bacteria sensible, y que esta actividad se traduce en la interrupción de la fuerza protón-motriz, la inhibición del transporte de aminoácidos y la liberación de moléculas (K^+ y aminoácidos) hacia el exterior debido a la formación de poros en la membrana, lo que subsecuentemente lleva a la despolarización de la misma y su total disfuncionalidad (Bierbaum y Sahl, 2009). Se ha visto además, que los niveles de ATP disminuyen debido a los esfuerzos inútiles de la célula por regenerar la fuerza protón-motriz (Bruno y Montville, 1993).

En el caso de las bacteriocinas de clase IA, para que éstas logren unirse e introducirse a la membrana celular para formar los poros, requieren de un potencial umbral en la membrana. Dicho potencial umbral puede verse influenciado por diversos factores como el pH (se han encontrado bacteriocinas que aumentan su actividad a valores de pH bajos con un potencial de membrana significativamente reducido) y el tipo de fosfolípidos que se encuentran en la membrana (Abee, 1995; Bierbaum y Sahl, 2009).

Como se mencionó en la sección 2.3, las bacteriocinas son de naturaleza catiónica, esto es, poseen cargas positivas en su superficie. Se ha sugerido entonces, que en la bacteriocina deben existir interacciones entre residuos de lisina, cargados positivamente, y los grupos fosfato aniónicos de la membrana como fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol, permitiendo así la unión de la bacteriocina a la membrana de la célula sensible. Asimismo, se ha tenido evidencia de que, así como el tipo de fosfolípidos en la membrana contribuye con

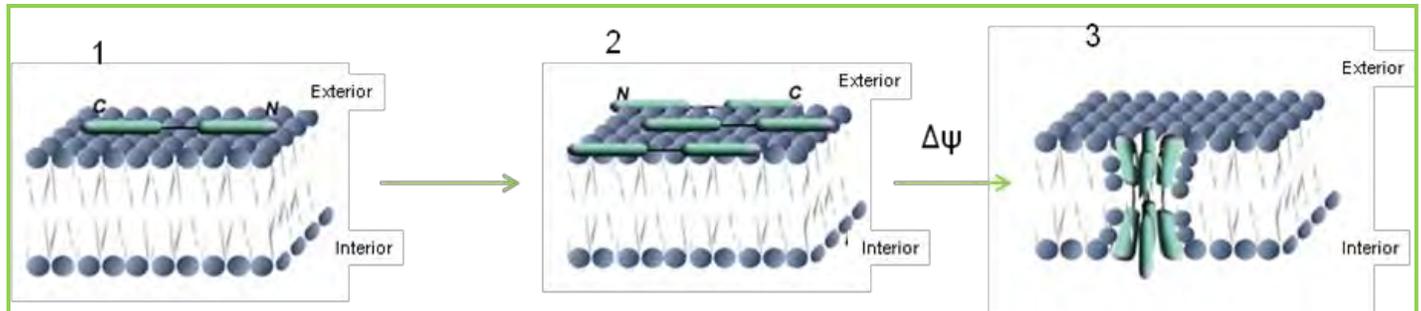


Figura 7. Modelo de la formación de poros de las bacteriocinas. 1) Representación de la membrana celular en cuya superficie exterior se encuentra un monómero de bacteriocina compuesto por una parte N-terminal con un residuo de lisina (+) unido a la parte C-terminal que contiene dos residuos de lisina (++) 2) varios monómeros de bacteriocina se unen a las cabezas fosfatadas de la membrana celular vía interacciones electrostáticas entre los grupos de lisina (+) de la bacteriocina y los grupos fosfato (-) de los fosfolípidos 3) los monómeros de la bacteriocina se introducen en la membrana celular mediante un potencial de membrana negativo (en el interior) ($\Delta\psi$) con las cabezas de los fosfolípidos incorporados en el poro (Tomado y modificado de Tavera Montes, 2010; Abee, 1995)

la unión de la bacteriocina, la fluidez de aquella también es de suma importancia. La presencia de ácidos grasos ramificados permite que la bacteriocina tenga mejor actividad, debido a que hacen de la membrana un medio menos rígido, permitiendo entonces que la formación de poros sea más eficiente (Abee, 1995).

Tras la unión de la bacteriocina a las cabezas de los fosfolípidos de la membrana, es necesaria una diferencia de potencial en ésta que, además, sea negativa para que la bacteriocina logre introducirse. Para esto, las interacciones electrostáticas entre los péptidos de la bacteriocina y los grupos fosfato obligan a éstos últimos a permanecer unidos a la bacteriocina, mientras ésta se va introduciendo en la membrana. La unión de varios monómeros de bacteriocina que actúan de la misma forma, permite la formación del poro (figura 7), con el cual la membrana citoplásmica pierde su capacidad de despolarizarse y su semi-permeabilidad, lo que conduce irremediablemente a la muerte de la célula (Abee, 1995; Oscáriz y Pisabarro, 2001).

Contrario a los lantibióticos, las bacteriocinas de clase II logran aumentar la permeabilidad de la membrana sin la necesidad de un potencial umbral en la misma. En vez, se ha evidenciado la presencia de receptores proteicos en la

superficie de la membrana capaces de unirse a la bacteriocina. El anclaje de la bacteriocina a la membrana celular es posible gracias a que algunos residuos de la bacteriocina se re-estructuran para formar una hélice cuya hidrofobicidad es mayor a la de la molécula completa, lo que le permite a la bacteriocina introducirse a la membrana. La unión de varias bacteriocinas ancladas en la membrana permite la formación del poro, el cual interrumpe la funcionalidad de la membrana llevando así a la muerte celular (Abee, 1995).

2.3.3. Detección de actividad bacteriocinogénica

Debido a que las bacterias ácido lácticas producen diferentes compuestos antagónicos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, toxinas y enzimas entre otros, es importante llevar a cabo metodologías de detección que excluyan la acción de este tipo de compuestos y se pueda entonces pensar en la inhibición debido a una sustancia tipo bacteriocina (Chen y Hoover, 2003).

Existen diversos métodos para la detección de la actividad bacteriocinogénica de las bacterias ácido lácticas, la mayoría se basan en la difusión de la bacteriocina a través de un medio de cultivo sólido o semisólido para inhibir el crecimiento de un organismo sensible (Hernández López, 2002). A continuación se describen algunos de los métodos más empleados en la detección de la actividad bacteriocinogénica.

- ❖ **Método de difusión en agar.** La bacteria indicadora se inocula en una sobrecapa de agar en sobrefusión (45° C) para después ser vertida en una placa de agar en cuya superficie deben estar sobrepuestos pozos de vidrio o acero inoxidable de aproximadamente 5 mm de diámetro. Los pozos en la sobrecapa de agar se forman retirando los pozos de acero o vidrio una vez enfriada la sobrecapa, o en su defecto, cortando el agar de la misma con algún instrumento estéril. El sobrenadante de la cepa productora se deposita en los pozos y se procede a incubar durante toda la noche. La formación de halos alrededor de los pozos indica la inhibición del

crecimiento por la presencia de una posible bacteriocina (Vignolo *et al.* 1994; Kang y Lee, 2005).

❖ **Método de difusión en disco en agar.** Para este método se utilizan discos de papel filtro de poro mediano que se impregnan con el sobrenadante de la bacteria productora; se depositan sobre agar inoculado previamente con la bacteria indicadora y se incuba toda la noche para observar después halos de inhibición alrededor de los discos (Zapata *et al.* 2009).

❖ **Efecto de la bacteriocina sobre cultivos líquidos.** Este método se utiliza para observar el efecto de una bacteriocina sobre la viabilidad celular de cultivos en medio líquido. El sobrenadante concentrado de la célula productora se adiciona al cultivo indicador durante la fase logarítmica de éste. Se incuba a la temperatura óptima y se hacen muestreos ya sea de densidad óptica o de cuenta en placa para determinar si existe inhibición (Vignolo *et al.* 1993; Alvarado *et al.* 2006)

El uso de sobrenadantes concentrados es recomendable en la mayoría de los métodos debido a que las bacteriocinas son compuestos extracelulares. Por otro lado, la eliminación de agua de dichos sobrenadantes permite una mayor eficiencia en la inhibición, así como en la apreciación visual de la misma.

Es importante tomar en cuenta que deben hacerse diversos tratamientos para eliminar la inhibición debida a otros metabolitos o agentes antagónicos. La neutralización de los medios o del sobrenadante, así como la adición de catalasa es importante para descartar la acción de ácidos orgánicos y del peróxido de hidrógeno respectivamente; por otro lado, la exposición del sobrenadante a un tratamiento térmico es importante para determinar la termo-estabilidad de la posible bacteriocina presente. Asimismo, realizar ensayos con enzimas proteolíticas permite saber si la naturaleza de los compuestos antagónicos es proteínica. Todo lo anterior permite sugerir la posible presencia de una

bacteriocina o de una sustancia tipo bacteriocina (Lewus *et al.* 1991; Hernández López, 2002).

2.3.4. Aplicaciones en los alimentos

La tendencia de los consumidores hoy en día es hacia productos cada vez más naturales y frescos, debido a que han crecido las preocupaciones y creencias de que los aditivos químicos en los alimentos pueden tener efectos nocivos en la salud. Como resultado, la industria alimentaria y la investigación científica se han ocupado en buscar opciones que interesen a la población consumidora y que además sirvan efectivamente como conservadores para una variedad importante de alimentos.

La bioconservación se refiere al uso de microorganismos antagónicos o sus productos metabólicos para inhibir o destruir bacterias indeseables en los alimentos, para que de esta manera la inocuidad del alimento aumente y su periodo de vida útil se prolongue (Chen y Hoover, 2003). En este sentido, las bacteriocinas pueden ser vistas como bioconservadores que cumplen con los requerimientos de los consumidores. Además, su estabilidad ante tratamientos térmicos, así como la prevalencia de su actividad inhibitoria a bajas temperaturas y a diferentes valores de pH, las hacen una herramienta muy útil en la industria de alimentos (Ray y Bhunia, 2008).

La nisina, como se ha mencionado anteriormente (sección 2.3.1), es la única bacteriocina aceptada por la FDA desde 1988 para ser adicionada en los alimentos como conservador. Sin embargo, existen otras alternativas del uso de las bacteriocinas además de su adición directa, ya que pueden ser producidas directamente en el alimento a través de la adición de un cultivo productor; de esta manera, las cepas productoras excretan su bacteriocina en la matriz del alimento y ejercen su actividad contra bacterias patógenas o de deterioro. Muchas investigaciones se han hecho para demostrar que esta posibilidad es factible en varios alimentos como en salsas, vegetales, aceitunas y masas fermentadas (masas ácidas), así como en productos lácteos (De Vuyst y Leroy, 2007).

Debido a la complejidad de los alimentos y la dificultad que genera la cuantificación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas en los mismos, existe la posibilidad de hacer estudios *in vitro* para simular y estudiar la funcionalidad y capacidad inhibitoria de diversos cultivos productores hacia otras bacterias, especialmente aquellas que han generado mayores problemas en la salud de la población (De Vuyst y Leroy, 2007).

2.4. Bacterias Patógenas

Las bacterias patógenas se definen como aquellas que pueden causar enfermedad en humanos, animales o plantas ya sea por contacto directo (a través de la piel, en el caso de los humanos), por infecciones en heridas o, muy comúnmente, por la ingestión de alimentos contaminados con ellas o por presencia de toxinas bacterianas en los mismos (Wassenaar, 2009; Todar, 2011)

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) siguen causando un impacto negativo en la salud de la población y en la economía a nivel mundial, debido a numerosos factores que incluyen la globalización del mercado alimentario, la exposición a patógenos desconocidos por parte de extranjeros, mutaciones en los patógenos y cambios en la población humana entre otros (WHO, 2011).

Existen diversas bacterias que son de especial importancia para la industria de los alimentos, debido a que, aún hoy en día, existe una incidencia importante en la transmisión de enfermedades por consumo de alimentos. Entre estas bacterias, se encuentran *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*.

2.4.1. *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium.

Salmonella es un género de la familia *Enterobacteriaceae*, cuyo nombre fue dado en honor a D.E. Salmon, un bacteriólogo y veterinario estadounidense que estudió casos de *Salmonella* en animales (Hu y Kopecko, 2003) Dicho género sigue

siendo hoy en día causante de infecciones importantes a nivel mundial. *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium es un microorganismo que ha generado resistencia al tratamiento con antibióticos, y se ha incrementado en Norteamérica y Europa en los últimos 30 años; debido a este hecho, es importante su constante estudio así como su control en la producción de alimentos (Hanes, 2003).

Salmonella es un bacilo Gram negativo, no esporulado, anaerobio facultativo, móvil, oxidasa negativo, reductor de nitratos a nitritos, que no requiere de NaCl para crecer. Puede ocupar el citrato como fuente de carbono, producir sulfuro de hidrógeno y descarboxilar la lisina y la ornitina. Es capaz de fermentar la glucosa, pero no la lactosa ni la sacarosa. Puede crecer en un rango amplio de temperatura que va de 8° a 45° C, en un pH de 4.0-9.0 y necesita una A_w arriba de 0.94. Es sensible al calor, y por lo general no sobrevive a temperaturas de 70° C o más, ni a valores de pH menores a 4.0; sin embargo, es resistente a la congelación y al secado, por lo que puede sobrevivir varios días en el polvo y la suciedad. Es, además, capaz de crecer en muchos tipos de alimentos sin alterar sus características sensoriales (Hanes, 2003; Ray y Bhunia, 2008).

El hábitat principal de esta bacteria es el tracto gastrointestinal de animales salvajes y domesticados. Se ha logrado aislar de agua, suelo y aguas residuales; además, se ha encontrado también en alimentos de origen animal como pollo, pavo, cerdo, huevos, leche y carne de res. Asimismo, diversos productos de origen vegetal como, jitomate, nueces y hortalizas han sido contaminadas por esta bacteria, debido principalmente a que son regadas con aguas residuales (Ray y Bhunia, 2008).

La salmonelosis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más comunes a nivel mundial. Millones de casos son reportados cada año, resultando en miles de muertes. *Salmonella* Typhimurium tiene la capacidad de causar dicha enfermedad a distintos tipos de hospederos. El cuadro clínico que genera en los humanos incluye fiebre aguda, dolor abdominal, diarrea, náusea y vómito. En infantes y personas mayores, la deshidratación puede resultar severa y, en algunos casos, letal (WHO, 2005).

Debido a que *Salmonella* Typhimurium continúa siendo la mayor causa de enfermedad transmitida por alimentos en todo el mundo, además de que representa un impacto fuerte en la economía de muchos países (se estima que en Estados Unidos, los costos totales asociados a *Salmonella* son de \$30 millones de dólares al año) (WHO, 2005), se han implementado programas para su control y vigilancia en las plantas de alimentos. Asimismo, se busca desarrollar nuevas estrategias para garantizar su ausencia en todo tipo de alimentos (Ray y Bhunia, 2008).

2.4.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes, la bacteria responsable de la listeriosis en humanos y animales, se ha convertido en uno de los patógenos más estudiados en los últimos 25 años. Existen reportes de este microorganismo desde 1891, pero es hasta 1926 que se describe como un agente patógeno. Debido a que uno de los síntomas que producía era la monocitosis, el organismo fue por primera vez llamado *Bacterium monocytogenes*, para que después, en 1940, se aceptara el nombre de *Listeria monocytogenes* en honor a Joseph Lister. El primer aislamiento de esta bacteria se remonta a 1929, pero fue hasta la década de los años 80 que el interés por ella aumentó debido a brotes sucesivos en alimentos (Datta, 2003).

Listeria monocytogenes se caracteriza por ser una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, catalasa positiva, no esporulada, en forma de bacilo con 0.5-2 μm de longitud y con cuatro flagelos peritricos que le confieren movilidad, no es una bacteria exigente, por lo que puede crecer óptimamente en cualquier medio de cultivo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 35-37° C, pero una de sus más importantes características es que mantiene su crecimiento en un rango muy amplio de 2.5-44° C; por otro lado, es capaz de crecer en un rango de pH de 5.0-9.0. Es capaz de fermentar la ramnosa, dextrosa, esculina y maltosa, pero no a la xilosa ni al manitol (Datta, 2003). Tiene, además, la capacidad de infectar y reproducirse en el citoplasma de diferentes tipos de células, lo que le permite atravesar las barreras intestinal, meníngea y placentaria (Vallejo *et al.* 2009).

La listeriosis es la enfermedad causada por *L. monocytogenes*. Dicha enfermedad es relativamente poco común, pero grave, con tasas de mortalidad altas a nivel mundial (30-40%), comparadas con las de otros microorganismos patógenos (OMS, 2004; Ray y Bhunia, 2008). Esta enfermedad afecta principalmente a mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos inmunosuprimidos, así como a enfermos de cáncer, del riñón o corazón. Las dos manifestaciones clínicas que puede producir son sepsis y meningitis, además de que fomenta nacimientos antes de término y abortos (Todar, 2011).

L. monocytogenes se ha aislado del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, comida para animales, pollo fresco y congelado, alimentos frescos y procesados, queso, helados, leche no procesada, salsas, huevo y vegetales, así como de varias especies de mamíferos, aves, peces, crustáceos e insectos. Debido a su amplia distribución, esta bacteria tiene la oportunidad de contaminar muchos alimentos en distintos pasos de la producción de los mismos (Ray y Bhunia, 2008).

La habilidad que tiene *L. monocytogenes* de crecer en muchos alimentos, así como en condiciones de refrigeración y diferentes valores de pH, le han permitido proliferar durante todo el periodo de almacenamiento, desde cuentas iniciales bajas hasta niveles de dosis infecciosa. Por tanto, debido a la alta letalidad de la enfermedad, tanto la industria alimentaria como la comunidad científica, buscan el desarrollo de nuevas implementaciones que garanticen un bajo nivel, o de ser posible, una ausencia de *Listeria monocytogenes* en los alimentos.

3. Justificación

Las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas poseen un potencial muy alto de ser explotadas para mejorar la conservación y la seguridad de los alimentos, ya que poseen mecanismos específicos de inhibición que, según estudios, han logrado ser efectivos contra bacterias patógenas importantes en los alimentos como *L. monocytogenes* y *Salmonella Typhimurium*. En el pozol se han logrado encontrar bacterias ácido lácticas capaces de inhibir a dichas bacterias patógenas, por lo que es importante ahondar en su estudio con el propósito de saber si la inhibición que ejercen es debido a posibles bacteriocinas que puedan ser útiles para mejorar la inocuidad del pozol o de otros alimentos.

Por otro lado, la inhibición que ejercen las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas, tiene también efecto sobre bacterias lácticas del mismo género o muy relacionadas con la cepa productora. Se pretende hacer estudios con las cepas de bacterias ácido lácticas predominantes durante el proceso de fermentación del pozol, *Streptococcus infantarius* y *Weissella confusa*, y de una bacteria láctica amilolítica aislada de otro alimento fermentado, *Lactobacillus plantarum*, con el propósito de saber si existen interacciones negativas entre ellas. De esta manera se logrará conocer su potencial como un cultivo iniciador mixto, que permita realizar una fermentación controlada en el pozol o en otros alimentos.

4. Hipótesis

Debido a que las bacterias ácido lácticas son capaces de inhibir a diversas bacterias patógenas, entonces será posible:

- ❖ Saber si la inhibición provocada por bacterias ácido lácticas aisladas del pozol es debido a compuestos metabólicos tipo bacteriocinas, capaces de inhibir a *S. Typhimurium* y a *L. monocytogenes*.

Por otro lado, si las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas actúan también contra bacterias muy relacionadas entre sí, entonces:

- ❖ Es posible que existan interacciones negativas entre *L. plantarum*, *S. infantarius* y *W. confusa* causadas por compuestos tipo bacteriocinas.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

- ❖ Determinar el efecto de la actividad bacteriocinogénica de las cepas: 73, 74g, 74ch, 77g y 77ch de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol sobre *Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes*.
- ❖ Determinar la posible existencia de interacciones negativas entre las bacterias lácticas predominantes en la fermentación del pozol, (*Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9) y una bacteria láctica con alta actividad amilolítica (*Lactobacillus plantarum* A6).

5.2. Objetivos particulares

- ❖ Identificar mediante la comparación de secuencias del gen rRNA 16S a las cinco bacterias lácticas que se utilizaron en este estudio.
- ❖ Observar el efecto que los cultivos de las bacterias ácido lácticas aisladas del pozol pueden ejercer sobre bacterias patógenas que se encuentran presentes como contaminación en un medio en el que las bacterias lácticas son dominantes y si la inhibición de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* es debido a la posible presencia de bacteriocinas.
- ❖ Estudiar el efecto de los sobrenadantes concentrados, neutralizados y con tratamiento térmico de las bacterias lácticas *L. plantarum*, *S. infantarius* y *W. confusa*, cuando se utilizan tanto como cepas sensibles como cepas productoras en ensayos de actividad bacteriocinogénica por el método de difusión en agar.

6. Metodología

6.1. Interacciones negativas hacia bacterias patógenas

En un estudio previo (Tavera Montes, 2010), se evaluó la producción de probables bacteriocinas producidas por bacterias lácticas aisladas del pozol. En dicho estudio, se demostró efecto de inhibición hacia bacterias Gram positivas, principalmente *Listeria monocytogenes*; y hacia Gram negativas, como *Salmonella* Typhimurium, provocado por bacterias lácticas de la colección. Se observó que cinco cepas, nombradas 73, 74g, 74ch, 77g y 77ch, mostraron inhibición tanto como para *S. Typhimurium* como para *L. monocytogenes*.

La inhibición de estas dos bacterias es de gran interés debido al estricto control que la industria alimentaria debe tener con ellas, pues ambos son microorganismos que afectan gravemente la salud y la economía mundial por su alta incidencia, en el caso de *S. Typhimurium*, y a su alta letalidad, en el caso de *L. monocytogenes* (OMS, 2004; WHO, 2005). Por tal motivo, este estudio se enfocó en la inhibición que las cinco cepas de BAL, mencionadas anteriormente, presentan ante estos dos patógenos con la finalidad de estudiar su potencial bioconservador tanto en el pozol como en otros alimentos. Las secciones subsecuentes describen la metodología empleada para tal propósito. En los anexos I y II se detallan las características de los reactivos y los medios de cultivo utilizados.

6.1.1. Reactivación de cepas

Tanto las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol, como las patógenas, se mantuvieron conservadas en glicerol a -65° C.

Para la reactivación de las bacterias lácticas aisladas del pozol, se tomaron 20 µL de cada una, se llevaron a 4 mL de caldo MRS (De Man-Rogosa-Sharpe)

marca Difco®, se agitó con un vórtex Bx BarnStead Thermolyne Maxi Mix II, y se incubaron a 30° C para posteriormente usarlas tras 18-24 horas de crecimiento.

En el caso de las bacterias patógenas, se llevaron a 4 mL de caldo BHI (infusión cerebro-corazón) marca BBL® tomando 20 µL de cada una y agitando con vórtex. Se incubaron a 35° C por 18-20 horas. Transcurrido dicho tiempo, se tomaron 20 µL de cada uno de estos cultivos y se llevaron a otros nuevos viales con caldo BHI estéril; se mantuvieron en incubación a 35° C durante 6 horas, para después utilizarlas.

En la siguiente tabla se detallan las cepas de las bacterias patógenas utilizadas, así como su laboratorio de procedencia.

Tabla 6.1 Cepas y origen de bacterias patógenas utilizadas en esta metodología

Bacteria patógena	Cepa	Origen
<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	14028	Colección de microorganismos de la Facultad de Química, UNAM
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	--	Colección de microorganismos de la Facultad de Química, UNAM

6.1.2. Identificación de bacterias ácido lácticas por comparación de secuencias del gen rRNA 16S.

Las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol 73, 74g, 74ch, 77g y 77ch se identificaron por comparación de secuencias del gen rRNA 16S. A continuación se describe la metodología para extraer y purificar el ADN, así como para llevar a cabo la reacción de PCR.

6.1.2.1. Extracción y purificación de ADN

Las cepas aisladas de bacterias ácido lácticas del pozol se reactivaron de la misma manera que se explica en la sección 6.1.1. Tras 24 horas de crecimiento,

se procedió a realizar la extracción de su ADN utilizando un método químico-enzimático (Lawson *et al.* 2001) como se describe a continuación:

Se recuperó la biomasa de 1.5 mL del cultivo líquido mediante micro-centrifugación a 10000 rpm por 10 minutos en una micro-centrifuga marca Hermle, modelo Z 160M. En seguida, el precipitado se lavó con 1.5 mL de agua estéril y se volvió a centrifugar. El remanente se re-suspendió en 500 μ L de buffer TES 1x, se adicionaron 20 μ L de lisozima (20 mg/mL) y se agitó vigorosamente, para después incubar a 37° C de 15 a 60 minutos en un termo-agitador marca Eppendorff Thermomixer, modelo Comfort. Una vez que la solución mostró viscosidad, se adicionaron 8 μ L de pronasa (20 mg/mL) y 8 μ L de RNAasa (20 mg/mL), se agitó en el vórtex y se mantuvo en incubación y agitación en un baño a 65° C por una hora usando el termo-agitador. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 120 μ L de SDS (10%) y, tras agitar, se colocaron los tubos en el baño con agitación de 65° C por 10 minutos más. En seguida se retiraron del baño y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, para después adicionar 600 μ L de mezcla fenol-cloroformo y formar una emulsión blanca. Se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm para poder recuperar la fase superior y colocarla en un tubo nuevo. Este último paso se repitió una vez más, de tal manera que se asegurara la mejor remoción de contaminantes de la solución. Finalmente se agregaron 500 μ L de etanol absoluto frío y se agitó suavemente. Se centrifugó una última vez a 14000 rpm por 10 minutos para obtener un precipitado pequeño. Se desechó el etanol y se dejaron reposando las muestras durante 12 horas para asegurar la completa evaporación del alcohol. Al día siguiente se re-suspendió el ADN en 50 μ L de agua estéril y se hidrató a 65° C durante una hora en el termo-agitador. El ADN se conservó en congelación hasta su uso, para después proceder a hacer una electroforesis en gel de agarosa y observar la integridad de la molécula extraída, así como su pureza.

Se preparó un gel de agarosa al 1%, en el que se colocaron 5 μ L de muestra junto con 1 μ L de buffer de carga colorante en cada uno de los pozos del gel, usando un pozo por muestra y uno extra para colocar 1 μ L de marcador de la

marca InvitroGen® con 1 µL de buffer de carga. A continuación se hizo correr el gel en una cámara para electroforesis de Pharmacia Biotech, modelo GNA 100 a 90 V por 30 minutos, usando el equipo Bio-Rad Power Pac 30 como fuente de poder. Transcurrido este tiempo, se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio al 3% por 15 minutos para después observarlo en un transiluminador marca Fotodyne modelo FotoUV/15. La imagen se capturó con el equipo Kodak Image Station y el programa CareStream. La formación de bandas en el gel mostró el ADN presente y su integridad, asimismo dio una idea de la pureza y concentración del mismo.

6.1.2.2. Amplificación por PCR

Para la amplificación del ADN extraído, se realizaron diluciones de cada una de las muestras de ADN de las cepas a estudiar.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador Biometra Tpersonal usando los cebadores pA y 3 para así poder amplificar la región V1 del gen ARNr 16S. La tabla 6.2 indica los cebadores utilizados para la reacción, mientras que las tablas 6.3 y 6.4 muestran los reactivos utilizados, las cantidades y las condiciones de la reacción.

Tabla 6.2. Cebadores para PCR utilizados para la amplificación de la región V1 del gen rRNA 16S

Cebador	Secuencia 5'-3'	Posición	Orientación
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	9-28	Reversa
3	GTTGCGCTCGTTGCGGGACT	1109-1090	Hacia adelante
Γ	ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG	358-339	Hacia adelante

Tabla 6.3. Reactivos empleados para amplificar por PCR el fragmento V1 del gen rRNA 16S

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer [10x]	5
MgCl ₂ [25mM]	5
dNTPs	1
Primer pA	0.5
Primer 3	0.5
Enzima Taq polimerasa [1U/ μL]	1
Templado	10
Agua destilada estéril	27
Total	50

Tabla 6.4. Condiciones de PCR para amplificar la región V1 del gen rRNA 16S

Número de ciclos	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)
1	94	3
34	94	1
	65	1.30
	72	2
1	72	15

Los productos de PCR se observaron vía una electroforesis en gel de agarosa preparado al 1.5%, a 70 volts durante 1 hora. En seguida, el gel se reveló con una solución de bromuro de etidio al 3%, sumergiendo el gel en dicha solución durante 15 minutos. Posteriormente el gel se observó a través del equipo Kodak Image Station y el programa CareStream para corroborar la presencia de producto.

6.1.2.3 Purificación de los productos de PCR

La purificación de los fragmentos amplificados por el gen rRNA 16S se realizó con el sistema Montage Genomics Millipore, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2% para verificar la limpieza e integridad de los productos. La electroforesis se efectuó a 70 V por 1 hora y se reveló con una tinción en bromuro de etidio al 3% sumergiendo el gel en dicha solución durante 15 minutos, para después observar el gel con el equipo Kodak Image Station y el programa CareStream.

6.1.2.4. Comparación de secuencias

Las muestras de las bacterias lácticas con los fragmentos amplificados del gen ribosomal se enviaron a la unidad de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, para obtener las secuencias de cada una de las cepas utilizadas. Los resultados obtenidos se compararon con la base de datos del NCBI utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

6.1.3. Interacciones negativas de las bacterias ácido lácticas aisladas del pozol contra *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*

En un estudio previo (Tavera Montes, 2010) se observó que las bacterias ácido lácticas aquí trabajadas (73, 74g, 74ch, 77g y 77ch) inhibieron, a las 24 horas, a *Salmonella* Typhimurium y a *Listeria monocytogenes* cuando se sometieron a una prueba de difusión en agar según la metodología mencionada por Lewus *et al.* (1992).

En este proyecto, se intentó saber si uno de los factores de inhibición del crecimiento se trataba de posibles bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas aisladas del pozol. Para ello se trabajó tanto con los cultivos de las BAL,

como con las posibles bacteriocinas concentradas en los sobrenadantes de cada BAL. En ambos casos, se inocularon a las dos bacterias patógenas estudiadas, para así observar su viabilidad a diferentes tiempos de incubación según los métodos usados por Vignolo *et al.* (1993) y Alvarado *et al.* (2006) (sección 2.3.3). En las siguientes secciones se describe la metodología usada para los propósitos buscados.

6.1.3.1. Efecto de los sobrenadantes concentrados, neutralizados y con tratamiento térmico de las bacterias ácido lácticas (SCNTB) aisladas del pozol sobre la viabilidad de *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*

Para observar el poder inhibitorio de las posibles bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas del pozol, se estudió la viabilidad de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* al crecer en los sobrenadantes concentrados, neutralizados y con tratamiento térmico de cada una de las cepas de BAL (SCNTB). A continuación se detalla el procedimiento para dicho estudio.

6.1.3.1.1. Preparación de los sobrenadantes de las bacterias ácido lácticas

Debido a que las bacteriocinas son compuestos extracelulares (sección 2.3.2.), el uso de medios líquidos libres de células es recomendado para su estudio (Vignolo *et al.* 1993; Alvarado *et al.* 2006; Vallejo *et al.* 2009). Para obtenerlo, se reactivaron las cepas de BAL según lo descrito en la sección 6.1.1. Tras 18-20 horas de crecimiento, cada una de las BAL se reinoculó en matraces Erlenmeyer con 100 mL de caldo MRS estéril (20 μ L de inóculo/4 mL de medio MRS). A continuación se incubaron cada una a 30° C por 24 horas.

Transcurridas las 24 horas, cada cepa de BAL, con un crecimiento de aproximadamente 10^9 UFC/mL, se colocó en tubos para centrífuga con el fin de separar las células por gravedad a 10000 rpm durante 15 minutos a 4° C en una centrífuga Beckman modelo J2-21M/E. Posteriormente, el sobrenadante de cada

una de las cepas se ajustó a un valor de pH de 6.5-7.0 adicionando alrededor de 2.25 mL de NaOH al 0.5 M y utilizando un potenciómetro marca Jenway, modelo 3020; esto con el fin de eliminar el efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos producidos por las bacterias lácticas. Finalmente, para verificar la termoestabilidad de la posible bacteriocina, se sometieron los sobrenadantes de cada BAL a un tratamiento térmico de 100-105° C durante 10 minutos, practicado en autoclave. La figura 9 muestra una esquematización para obtener los sobrenadantes.

6.1.3.1.2. Concentración de los sobrenadantes de las bacterias ácido lácticas

Para concentrar cada uno de los sobrenadantes de las bacterias ácido lácticas neutralizados y con tratamiento térmico, se utilizaron dos metodologías diferentes: una, eliminando el 50% del agua con el uso de un rotavapor marca Buchi, modelo R-215 y una bomba de vacío marca Buchi, modelo V-710; y otra, llevando a sequedad con una liofilizadora Labconco Freeze Dry System modelo Freezone 4.5. En la figura 9 se muestra un esquema gráfico de la manera en la que se obtuvieron los concentrados por medio de las dos metodologías empleadas.

6.1.3.1.2.1. Concentración con rotavapor y bomba de vacío

Cada uno de los sobrenadantes procesados como se describió en la sección 6.1.3.1.1, fue transferido a un matraz de bola estéril de 500 mL para colocarlo en el rotavapor y así eliminar aproximadamente el 50% del agua de cada uno. El agua se extrajo a 65 rpm, 65° C y bajo 90-100 mbar de presión.

Después de su concentración, los sobrenadantes se enfriaron y se mantuvieron a -4° C hasta su uso.

6.1.3.1.2.2. Concentración con liofilizadora

Los sobrenadantes obtenidos de acuerdo con lo descrito en la sección 6.1.3.1.2 se transfirieron a vasos de plástico con el propósito de congelarlos por capas utilizando hielo seco y etanol al 70%.

Una vez congelados los sobrenadantes, se introdujo cada uno en vasos especiales para liofilizar marca Labconco y se conectaron a la liofilizadora, la cual eliminó por completo el agua de los sobrenadantes hasta después de 24 horas, bajo condiciones de temperatura y presión de -40°C y 1.33×10^{-3} mbar respectivamente. Una vez terminado el proceso de liofilización, los sobrenadantes secos (liofilizados) se pesaron en una balanza analítica Ohaus Explorer y se transfirieron asépticamente a tubos de plástico estériles. Los liofilizados se mantuvieron a -4°C hasta su uso posterior.

Los liofilizados se resuspendieron en agua destilada estéril bajo una relación de 1 g de liofilizado/5 mL de agua, se agitaron hasta perfecta homogenización con ayuda de un vórtex.

6.1.3.1.3. Cuantificación de proteína de los concentrados

La medición de proteína es una manera indirecta de sugerir la presencia de una posible bacteriocina en los concentrados de los sobrenadantes de las BAL, debido a que dichos compuestos son de origen proteico. Por tal motivo se realizó un ensayo de proteína con los sobrenadantes concentrados por el método de Bradford (Bradford, 1976). En el anexo III se describe el fundamento químico, el método, y se muestra la curva patrón obtenida para cuantificar la proteína de las muestras.

Para realizar las mediciones se tomaron, de manera aséptica, 0.5 mL de cada uno de los sobrenadantes concentrados y se colocaron en microtubos de plástico. Asimismo se tomaron 0.5 mL de caldo MRS estéril como control, y 0.5 mL de agua destilada estéril como blanco. Se hicieron diluciones de cada uno de los concentrados según se necesitara. A cada uno de los tubos, incluyendo el control y el blanco, se adicionaron 0.2 mL de reactivo de Bradford (azul de Coomassie) del sistema para medición de proteína Quick Start Bio-Rad® Protein Assay; se agitó con vórtex y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Enseguida se leyeron las muestras en el espectrofotómetro Agilent 8453E a una longitud de onda de 595 nm.

6.1.3.1.4. Efecto de los SCNTB sobre la viabilidad de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*

Para observar el efecto que ejerció cada uno de los SCNTB sobre las bacterias patógenas en estudio, se realizó una curva de crecimiento de ambas bacterias patógenas durante 48 horas, tomando muestras a las 0, 24 y 48 horas de crecimiento. Para ello se procedió de la manera que se describe en las siguientes secciones. La figura 9 resume gráficamente la metodología empleada para estos muestreos.

6.1.3.1.4.1. Supervivencia de bacterias patógenas en los SCNTB concentrados con rotavapor

Para llevar a cabo el monitoreo de la viabilidad de las bacterias patógenas en los SCNTB se utilizaron, por SCNTB, cuatro matraces: dos matraces como controles positivos de las bacterias patógenas (*Salmonella* + ó *Listeria* +), en los que se inoculó a cada patógena en caldo MRS estéril, con el fin de observar su crecimiento normal sin la presencia de los SCNTB; y dos matraces más en los que se colocó, en cada uno, la mitad del SCNTB para inocular en uno a *Salmonella*, y en otro a *Listeria*.

Las bacterias patógenas se reactivaron según lo descrito en la sección 6.1.1. Transcurrido el tiempo, se inocularon los matraces de prueba (SCNTB) y los controles positivos (medio MRS sin concentrar) con los cultivos diluidos (1/1000) de cada bacteria patógena en una relación de 0.1 mL de bacteria patógena por cada 20 mL de caldo, con el fin de tener una cuenta inicial de 10^4 UFC/mL. Cada matraz se incubó a 35° C durante 48 horas. El conteo de células viables se realizó a las 0, 24 y 48 horas. Para el conteo de sobrevivientes se hicieron las diluciones sucesivas necesarias con solución salina al 0.85%. De las diluciones preparadas se tomaron 0.1 mL y se colocaron en placas de agar XLD (xilosa-lisina-desoxicolato) marca Difco® para el caso de *S. Typhimurium*, y en placas de medio

Oxford marca Acumedia® para el caso de *L. monocytogenes*. Las colonias que se consideraron en el conteo fueron, para el caso de *Salmonella*, colonias rojas con centro negro; mientras que para el caso de *Listeria*, fueron colonias blancas con un halo negro.

Finalmente se trazaron las curvas de crecimiento de ambas bacterias patógenas en las condiciones descritas.

6.1.3.1.4.2. Sobrevivencia de bacterias patógenas en los SCNTB concentrados por liofilización.

La mitad del volumen de los liofilizados resuspendidos (SCNTB concentrados por liofilización) en una relación de 1 g de liofilizado/5 mL de agua estéril fue usada para inocular a cada una de las bacterias patógenas en estudio. Para ello, se procedió de la misma manera que se describió en la sección anterior, usando cuatro matraces por sobrenadante: dos de ellos con 20 mL de caldo MRS como control positivo de cada bacteria; y dos más para colocar, en cada uno, la mitad de los liofilizados resuspendidos con el fin de inocular en ellos a cada patógena y monitorear su sobrevivencia. Una vez inoculados, los matraces también se incubaron a 35° C y se hicieron muestreos a las 0, 24 y 48 horas para el conteo de sobrevivientes, haciendo las diluciones sucesivas necesarias con solución salina al 0.85%. Se tomaron 0.1 mL de las diluciones preparadas y se colocaron en placas XLD para *S. Typhimurium* y en placas con medio Oxford para *L. monocytogenes*. Se trazaron las curvas de crecimiento de cada bacteria (controles y de prueba) para observar gráficamente la viabilidad de las mismas.

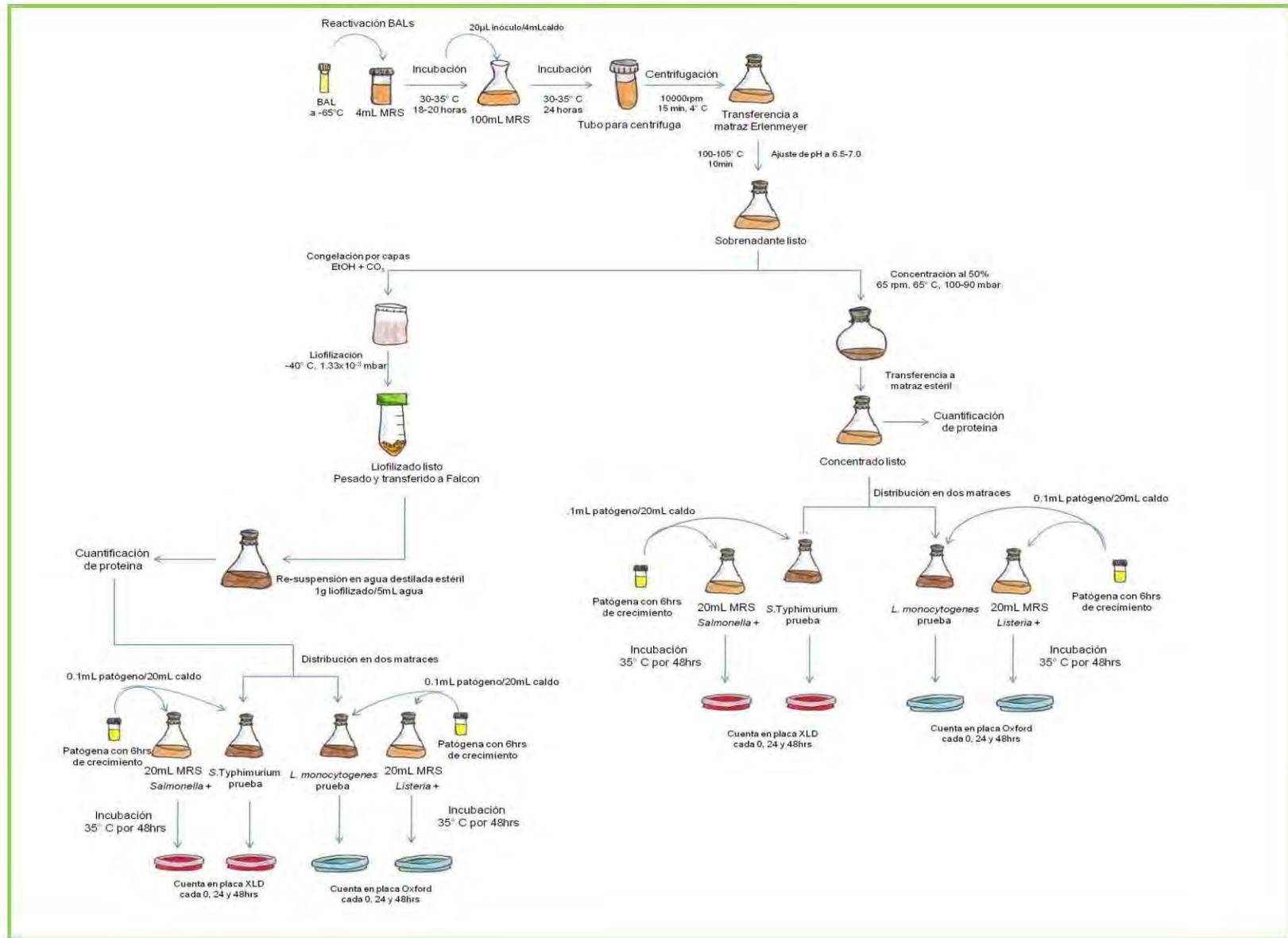


Figura 8. Esquematización de la metodología empleada para obtener los sobrenadantes, concentrarlos y utilizarlos posteriormente para estudiar la viabilidad de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* en presencia de ellos.

6.1.3.2. Pruebas de reto entre bacterias ácido lácticas y *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*

Para estudiar el efecto que los cultivos de las bacterias ácido lácticas aisladas del pozol pueden ejercer sobre bacterias patógenas que se encuentran presentes como contaminación en un medio en el que las bacterias lácticas son dominantes, se realizaron pruebas de reto en caldo MRS.

Para llevar a cabo el experimento, se hizo crecer cada una de las bacterias patógenas aquí estudiadas junto con cada una de las cinco cepas de bacterias ácido lácticas en matraces con 100 mL de caldo MRS. Por cada prueba se prepararon cuatro matraces con 100 mL de caldo MRS: uno de ellos para inocular únicamente a la cepa de BAL (control positivo de la cepa de BAL (BAL +)); otro para inocular solamente a la bacteria patógena (control positivo para patógena (*Salmonella* + o *Listeria* +)); uno más para inocular tanto a la cepa de BAL como a la bacteria patógena (matraz de prueba (mezcla)) y un último sin ningún inóculo agregado (control negativo) para asegurar que no existiera la presencia de otro microorganismo que pudiera afectar al crecimiento o inhibición de las bacterias en estudio.

Para inocular cada uno de los matraces se utilizaron las siguientes relaciones:

- ❖ Para inocular las **cepas de BALs** en su control positivo (BAL+) y en el matraz de prueba (mezcla), se reactivaron según lo indicado en la sección 6.1.1 y se incubaron durante 18 horas. Transcurrido dicho tiempo se hizo una dilución (1/10) en solución salina al 0.85% a partir del cultivo de BAL reactivado. La bacteria ácido láctica diluida se inoculó en cada uno de los matraces, excepto en el control negativo, en una relación de 0.5 mL de BAL por 20 mL de caldo. Esto, con el propósito de tener un inóculo inicial de 10^6 UFC/mL en cada matraz.
- ❖ En el caso de las **bacterias patógenas**, éstas se reactivaron tal y como se indica en la sección 6.1.1. A continuación, se hizo una dilución 1/1000 de

cada una en solución salina al 0.85%. En una relación de 0.1 mL de bacteria patógena diluida por cada 20 mL de caldo, se inocularon cada uno de los diferentes matraces, para tener así un inóculo inicial de 10^4 UFC/mL en cada matraz.

En cada una de las pruebas, se monitoreó el crecimiento de las bacterias de cada matraz tomando muestras a las 0, 12, 24 y 48 horas, haciendo tantas diluciones sucesivas como fueran necesarias en solución salina al 0.85% y realizando el conteo de células viables tanto de BAL, como de bacterias patógenas tal como se describió en las secciones 6.1.3.1.4.1 y 6.1.3.1.4.2. Para el caso de bacterias lácticas, el conteo de células se llevó a cabo en placas con agar MRS de la marca Difco®, en el que se consideraron para el conteo, aquellas colonias Gram+, catalasa negativa, de color marfil, brillantes y con borde uniforme. Se trazaron curvas de crecimiento de cada prueba, para observar los efectos de las cepas de BALs sobre cada bacteria patógena. A la par del conteo en placa se registró también el pH de los cultivos. Las figuras 10 y 11 muestran esquemáticamente la metodología empleada para este estudio

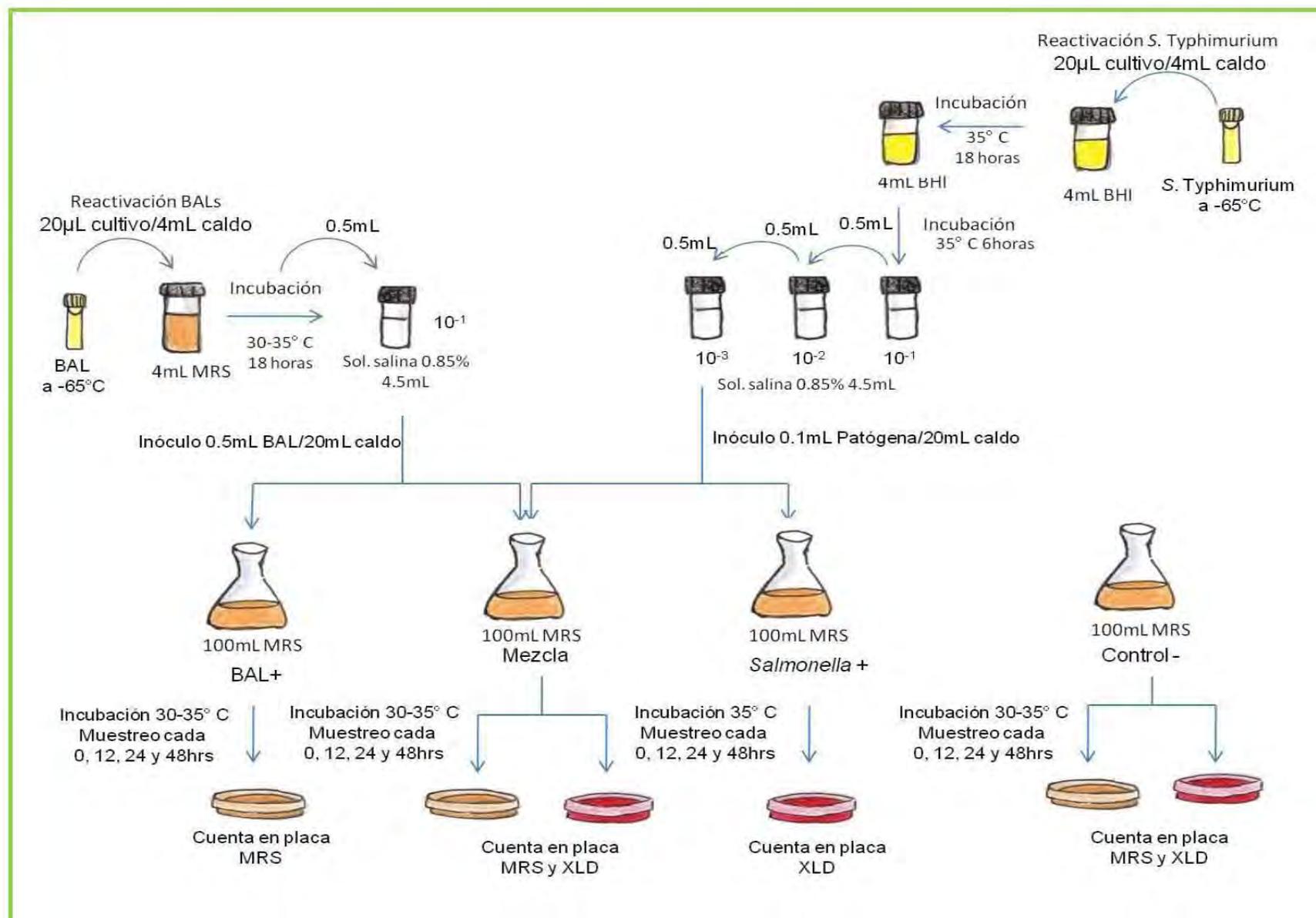


Figura 9. Esquemización de la metodología empleada en las pruebas de reto en caldo MRS para estudiar el efecto de los cultivos de BALs sobre *S. Typhimurium*.

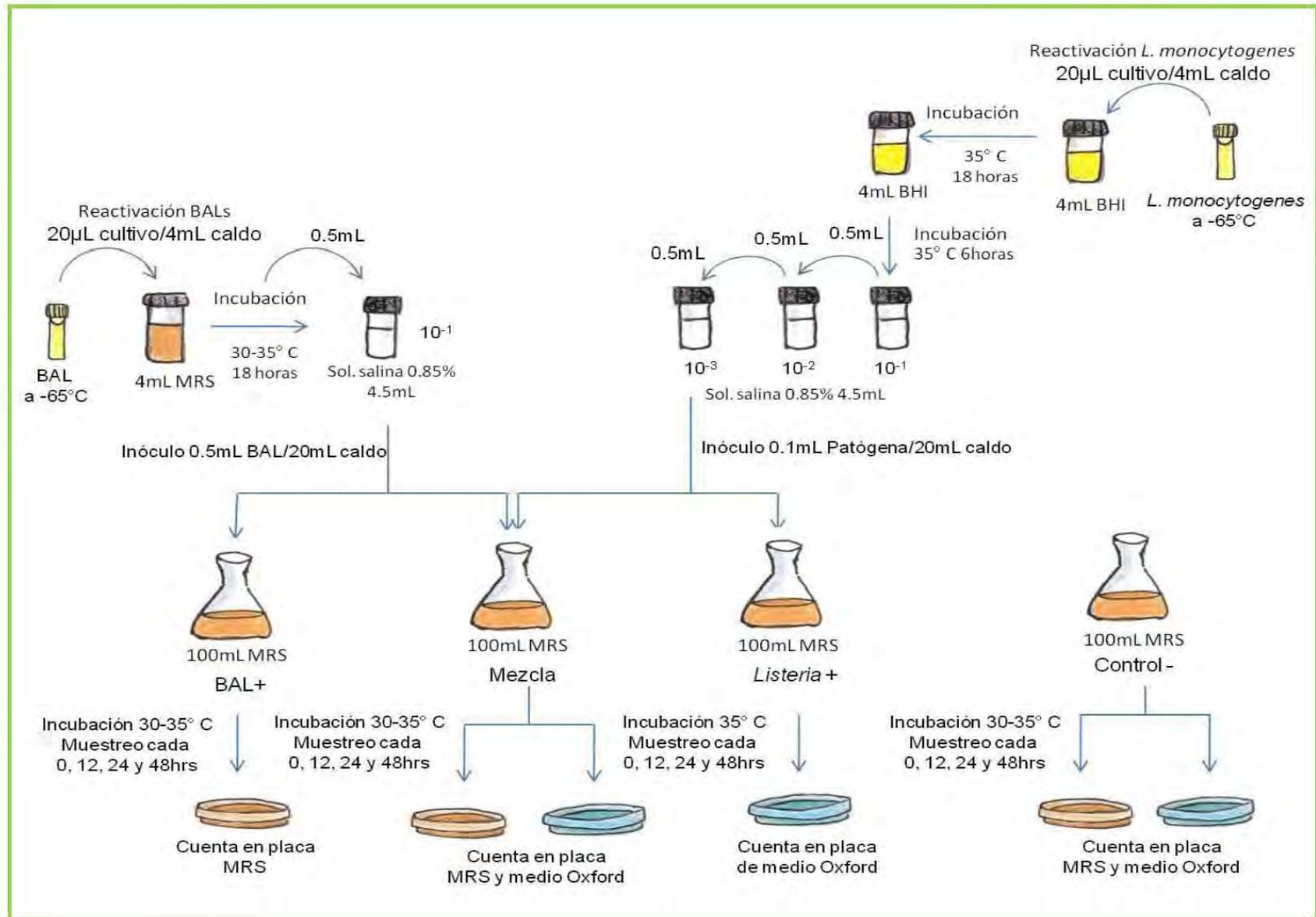


Figura 10. Esquemización de la metodología empleada en las pruebas de reto en caldo MRS para estudiar el efecto de los cultivos de BALs sobre *L. monocytogenes*.

6.2. Interacciones negativas entre bacterias ácido lácticas predominantes en la fermentación del pozol.

Según lo indicado en las secciones 2.2.3 y 2.2.4 *Streptococcus infantarius* y *Weissella confusa*, han sido encontradas como parte de la microbiota normal del pozol. Asimismo, se ha podido ver que están presentes durante la fermentación, siendo *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9 dos de los microorganismos dominantes y que se encuentran a lo largo de todo el proceso de fermentación de dicho alimento. Por su parte, la cepa de *L. plantarum* A6 utilizada en este proyecto es una cepa muy amilolítica, aislada de la yuca. Estas tres bacterias se han estudiado en cultivos mixtos con el propósito de investigar su potencial como cultivo iniciador.

Para estudiar dicho potencial, se necesita saber si existe inhibición entre estas tres bacterias ácido lácticas, y si dicha inhibición puede ser debida a la producción de bacteriocinas por parte de las mismas. Por tal motivo, se realizó una prueba con el fin de detectar la posible actividad antimicrobiana debida a bacteriocinas que estas bacterias pudieran ejercer sobre cualquiera de ellas mismas.

La tabla 6.5 muestra las cepas de las bacterias ácido lácticas utilizadas, así como su origen.

Tabla 6.5. Cepas y origen de bacterias lácticas utilizadas para el estudio de interacciones negativas entre BALs.

Bacteria ácido láctica	Cepa	Origen
<i>Lactobacillus plantarum</i>	A6	Aislada de yuca fermentada ^a
<i>Streptococcus infantarius</i>	25124	Aislada del pozol ^b
<i>Weissella confusa</i>	L9	Aislada del pozol ^c

Reportado por: ^a Giraud *et al.* (1991); ^b Díaz-Ruiz *et al.* (2003); ^c Ampe *et al.* (1999)

6.2.1. Método de difusión en agar

Para analizar si existió inhibición sobre alguna de las BALs en estudio y si ésta pudiera ser debida a posibles bacteriocinas, se llevó a cabo el método de difusión en agar mencionado en la sección 2.3.3, utilizando para ello una placa de medio BHI, una sobrecapa también de medio BHI y torres de vidrio con un diámetro de aproximadamente 5 mm, usadas para la formación de pozos en la sobrecapa de medio BHI. A continuación se describe la preparación de los medios, así como el ensayo de la prueba.

Los reactivos y medios de cultivo ocupados se detallan en los anexos I y II respectivamente.

6.2.1.1. Preparación de placa de medio BHI

Para hacer las placas de medio BHI, en un matraz se preparó caldo BHI siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo II.b). Se le adicionó, además, 1.7% de agar marca Bacto® para tener un medio sólido.

Cuando todos los componentes se disolvieron, se esterilizó el medio a 121° C y 1 atm durante 15 minutos. Una vez que enfrió a 40° C, se distribuyó en cajas petri, colocando 10 mL en cada una y dejando enfriar hasta temperatura ambiente. Por último, para comprobar la esterilidad del medio, las placas se incubaron a 30° C durante 24 horas.

6.2.1.2. Preparación de sobrecapa de medio BHI

Se preparó caldo BHI según las instrucciones del fabricante. Adicionalmente, se le agregó 0.8% de agar marca Bacto® para lograr tener un medio sólido. Se homogenizaron ambos componentes con ayuda de una parrilla con agitación marca Thermolyne, para después distribuir 7 mL de medio en tubos con tapón de

rosca. Finalmente, los tubos con medio se esterilizaron a 121° C y 1 atm por 15 minutos.

6.2.1.3. Preparación y concentración de sobrenadantes de *L. plantarum* A6, *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9.

Cada una de las bacterias lácticas utilizadas para esta prueba (*W. confusa* L9, *L. plantarum* A6 y *S. infantarius* 25124) se reactivó según lo indicado en la sección 6.1.1. Tras 24 horas de crecimiento, se procedió a obtener los sobrenadantes de cada una, de la misma manera que se describió en la sección 6.1.3.1.1. Asimismo, el sobrenadante de cada una de las BAL se concentró aproximadamente al 50% con el uso de un rotavapor y bomba de vacío, de la misma forma que se detalló en la sección 6.1.3.1.2.1. En la figura 12 se esquematiza la metodología empleada para concentrar los sobrenadantes

6.2.1.3.1. Cuantificación de proteína de los concentrados

La cuantificación de proteína de los sobrenadantes concentrados de *L. plantarum* A6, *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9, también se llevó a cabo de la misma manera que se describió en la sección 6.1.3.1.3 con el fin de medir, de manera indirecta, la presencia de posibles bacteriocinas en los sobrenadantes de estas cepas. El fundamento del método usado (ensayo de Bradford) así como la curva patrón obtenida, se muestran en el anexo III.

6.2.1.4. Ensayo del método de difusión en agar

Tras la obtención de los sobrenadantes concentrados, se procedió a realizar los ensayos. Se hicieron tres ensayos diferentes:

Tabla 6.6. Ensayos practicados para observar las posibles inhibiciones entre *L. plantarum* A6, *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9

Ensayos	Bacteria sensible	Sobrenadantes concentrados de bacterias productoras
P.1	<i>L. plantarum</i>	<i>S. infantarius</i>
		<i>W. confusa</i>
P.2	<i>S. infantarius</i>	<i>L. plantarum</i>
		<i>W. confusa</i>
P.3	<i>W. confusa</i>	<i>L. plantarum</i>
		<i>S. infantarius</i>

Para cada prueba, las bacterias sensibles se reactivaron como se indica en la sección 6.1.1 y tras 24 horas de incubación a 30° C se ocuparon para cada una de las pruebas.

La cuantificación de células vivas a las 24 horas de cada una de las bacterias lácticas aquí estudiadas, se realizó de la misma manera que se describió en la sección 6.1.3.2.

Para llevar a cabo la prueba se colocaron torres de vidrio estériles para cada uno de los sobrenadantes sobre cajas petri con medio BHI. A continuación, se tomó un tubo con 7 mL de sobrecapa BHI y en él se inocularon 20 µL de la BAL sensible con aproximadamente 10⁹ UFC/mL, se homogenizó en vórtex y se vertió sobre la placa BHI de tal manera que la cubriera por completo, excepto, claro, en los lugares en donde estaban colocadas las torres de vidrio. Una vez que la sobrecapa solidificó, se retiraron las torres con la ayuda de pinzas estériles, quedando así formados los pozos, en los cuales se colocaron 80 µL de cada uno de los sobrenadantes concentrados de las bacterias ácido lácticas productoras. Posteriormente, se mantuvieron en incubación a 30° C por 24 horas. Después de ese tiempo, se registraron los diámetros de halos de inhibición (mm) (figura 12). Cada una de las pruebas (P.1, P.2 y P.3) se hizo por triplicado.

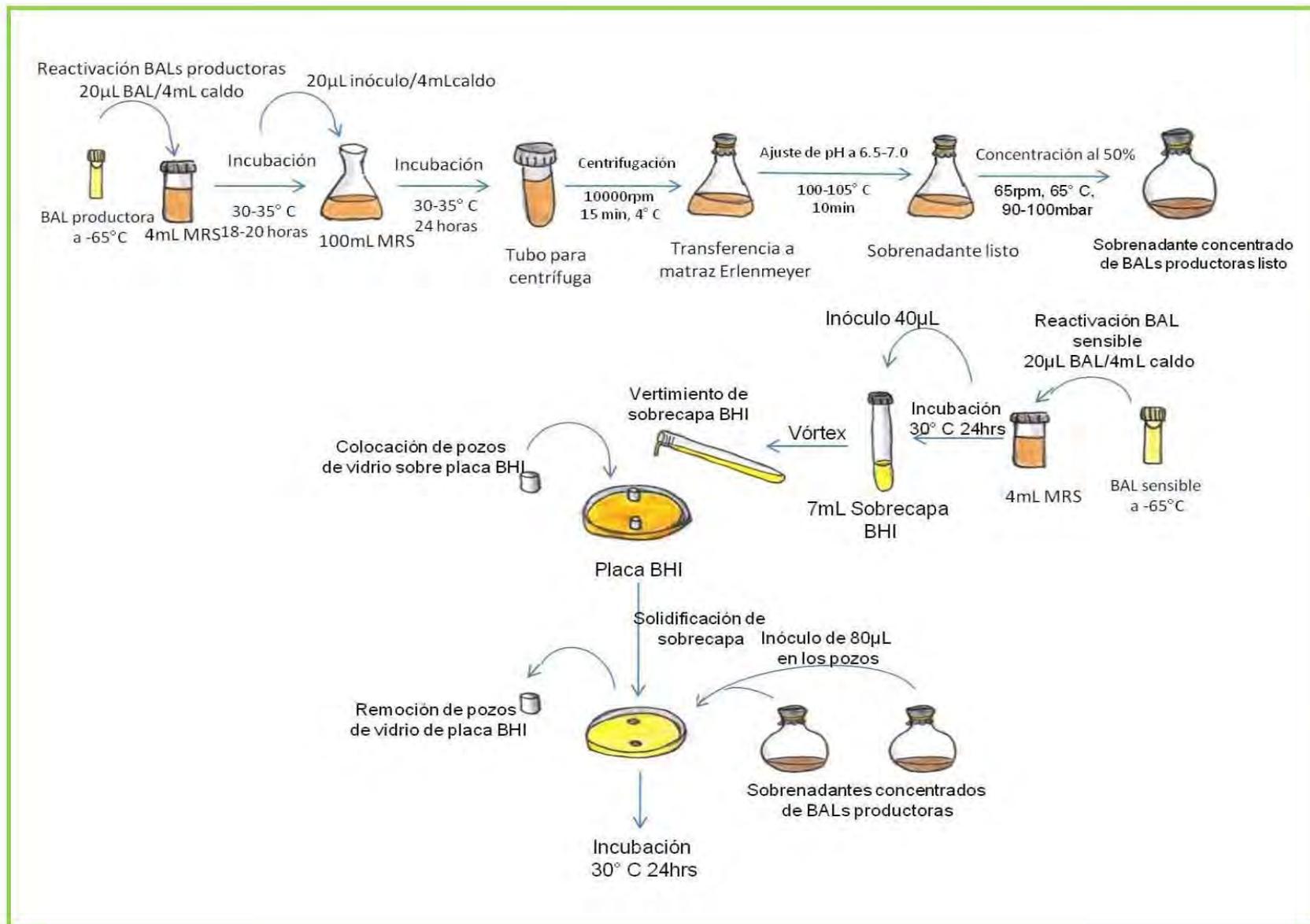


Figura 11. Esquemización de la metodología empleada para buscar la posible actividad bacteriocinogénica de *L. plantarum* A6, *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9 por medio del método de difusión en agar

7. Resultados

7.1. Interacciones negativas hacia bacterias patógenas

7.1.1. Identificación de bacterias ácido lácticas por comparación de secuencias del gen rRNA 16S

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la secuenciación del gen rRNA 16S de las cepas 73, 74g, 74ch, 77g y 77ch utilizadas en este proyecto.

7.1.1.1. Extracción y purificación de ADN

La extracción de ADN de las cinco cepas del pozol: 73, 74g, 74ch, 77g y 77ch se realizó por duplicado.

Para corroborar la eficiencia del método ensayado y verificar la integridad del ADN extraído, se realizó la electroforesis en un gel de agarosa que se muestra en las figuras 13 y 14. La presencia de bandas en los geles garantizó que en efecto se extrajo ADN de las cepas estudiadas, aunque fue importante escoger con qué muestras se trabajaría en la reacción de PCR, ya que la calidad del ADN puede ser diferente en cada extracción realizada.

De cada una de las muestras extraídas se escogió aquella que presentara una mayor intensidad y mejor definición de la banda resultante, ya que estas características implican mayor cantidad y mejor calidad (mayor pureza) respectivamente.

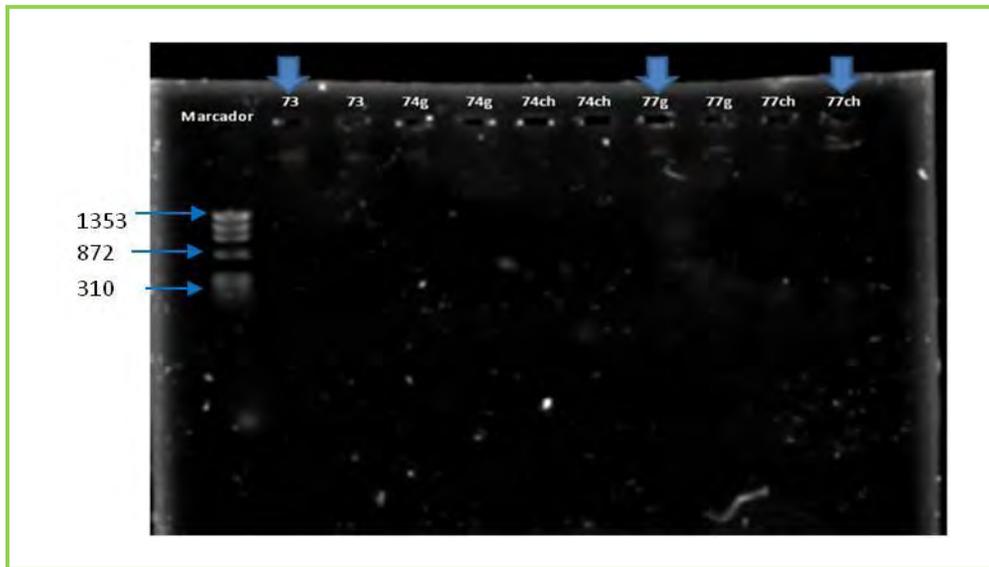


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN extraído de las cepas de bacterias lácticas del pozol. La extracción de ADN de cada cepa se realizó por duplicado. Las flechas azules en la parte superior indican la muestra que se ocupó para hacer la reacción de PCR. Las flechas azules en la parte izquierda indican el tamaño de las bandas del marcador usado (Φ x174 RF DNA/ Hae III Fragments de InvitroGen® con un tamaño de 310-1353 pb)



Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN extraído de las cepas 74g y 74ch de bacterias lácticas del pozol. La extracción de ADN de cada cepa se realizó por duplicado. Las flechas azules en la parte superior indican la muestra que se ocupó para hacer la reacción de PCR. Las flechas azules en la parte izquierda indican el tamaño de las bandas del marcador usado (Φ x174 RF DNA/ Hae III Fragments de InvitroGen® con un tamaño de 310-1353 pb)

7.1.1.2. Amplificación por PCR

La reacción de PCR de los templados de cada una de las bacterias lácticas seleccionadas, permitió copiar millones de veces la región V1 del gen ribosomal 16S, con el fin de tener la suficiente cantidad para poder secuenciarlo y compararlo con una base de datos.

El fragmento amplificado del gen ribosomal 16S con un tamaño de 1542 pb se pudo observar mediante el gel de agarosa preparado como se indicó en la sección 6.1.2.2. Al igual que con la extracción de ADN, la presencia de banda de tamaño característico indicó que la reacción de PCR fue exitosa y se obtuvieron productos con la calidad deseada (figuras 14 y 15).

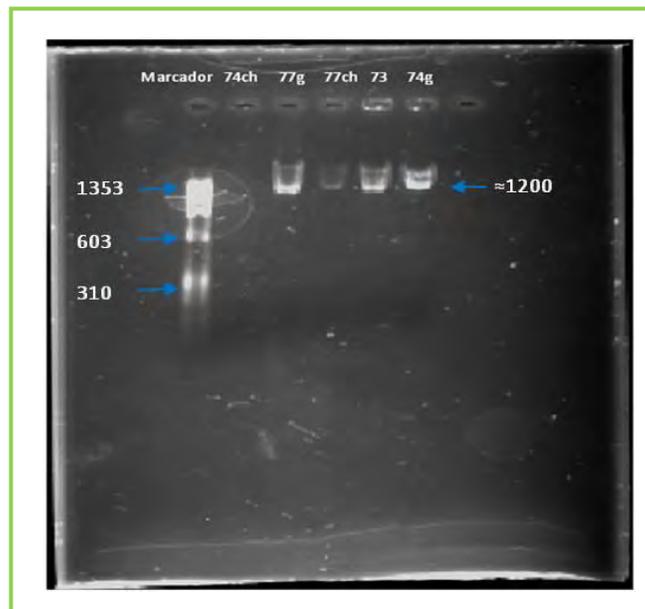


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) para mostrar el producto de PCR del gen rRNA 16S de las cepas 77g, 73 y 74g. En el carril del extremo izquierdo se muestran las bandas del marcador Φ x174 RF DNA/ Hae III Fragments de InvitroGen® con un tamaño de 310-1353 pb

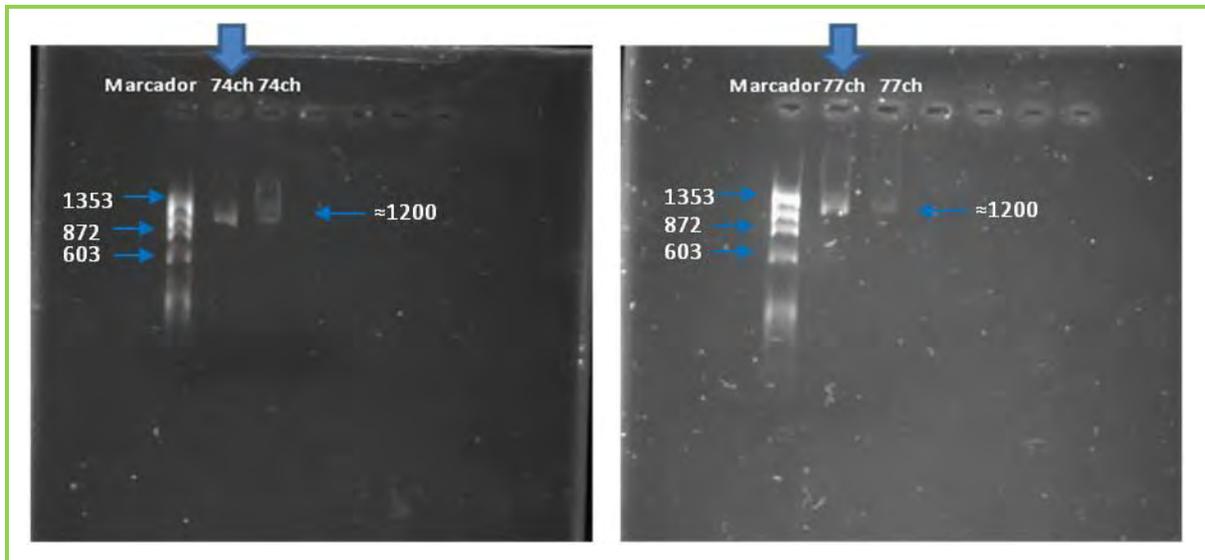


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) para mostrar el producto de PCR del gen rRNA 16S de las cepas 74ch y 77ch. Las flechas azules indican la muestra que se ocupó posteriormente para la purificación. En el carril “marcador” de cada gel se muestran las bandas del marcador Φ x174 RF DNA/ Hae III Fragments de InvitroGen® con un tamaño de 310-1353 pb

Las muestras que se ocuparon para purificar y posteriormente secuenciar, fueron aquellas que mostraron una mayor intensidad en los geles, debido a que era indicador de la mayor cantidad de ADN en la muestra.

7.1.1.3. Purificación de los productos de PCR

Tal y como se indicó en la sección 6.1.2.3, los productos de PCR de cada una de las muestras se purificaron con el sistema comercial Montage Genomics Millipore. Con el propósito de verificar la limpieza, integridad y concentración de los productos, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. La figura 16 muestra el gel de agarosa al 2% obtenido tras la purificación de cada uno de los productos de PCR de las cepas de BAL estudiadas.

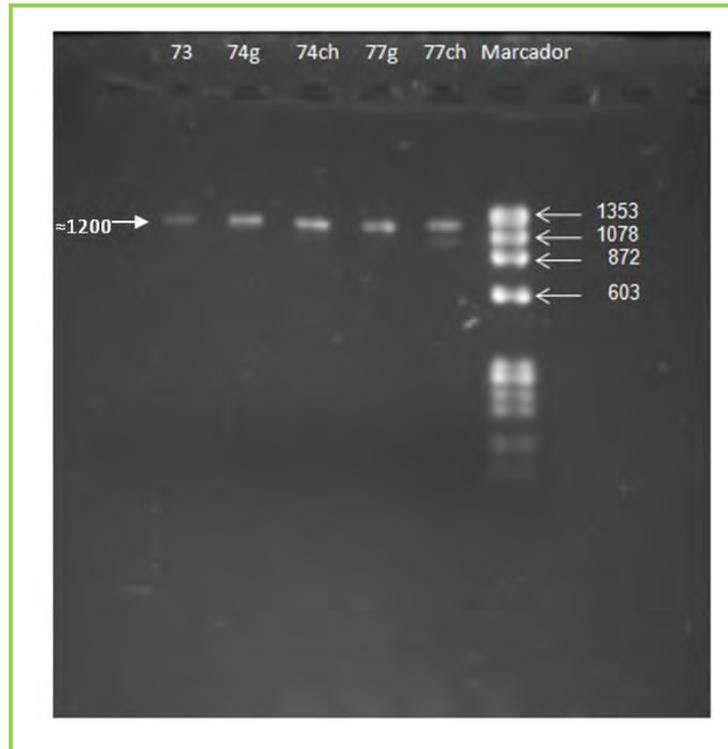


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Productos purificados del gen rRNA 16S de las cepas de bacterias ácido lácticas. Del lado derecho se incluyen los tamaños de las bandas del marcador Φ x174 RF DNA/*Hae* III Fragments de InvitroGen® con un tamaño de 310-1353 pb. En el carril “marcador” se muestra el tamaño aproximado de los fragmentos de ADN resultantes.

Según lo obtenido mediante el gel de agarosa de los productos de PCR purificados (figura 16), el tamaño resultante de cada una de las bandas se encuentra entre 1353 y 1078 pb.

7.1.1.4. Comparación de secuencias

Las secuencias obtenidas por el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para cada una de las cepas de BAL aisladas del pozol se muestran en la tabla 7.1. Asimismo, se presenta la identidad de cada cepa según la comparación de sus secuencias con el programa BLAST de la base de datos del NCBI.

Tabla 7.1. Secuencia e identidad de las cepas de BAL estudiadas en este proyecto

Cepa	Secuencia	Identidad	%
73	TTGGGCCGTGTCTCGTCCCATGTGGCCGATCACTCTCAACTCGGCTATGCATCATTG TCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAACTAATGCACCGCGGATCCATCTCTAGGT GACGCCAAAGCGCCTTTAACTTCGTGTATGCGACACTAAGTTTCATTCCGGTATTAG CATCTGTTTCAAATGTTATCCCCAGCCTTGAGGCAGGTTGCCACGTGTTACTCACC CGTTCGCCACTCACTTGAAGGTGCAAGCACCTTTCGCTGTGCGTTCGACTTGCATG TATTAGGCAGCGCCGACGCTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTAGAATCCGGGN GAGGAAGGGTNCCTGGTATAACNACGGTTCGGGCCCTAAAGGGGGTTCCAAAACCG GACACAAGAAATTTCTGCCGTTCCGAACTGAAAGGGGGTTAAACCTAACCGTAG TACCGGTCGACCGACTATATAGCCGGAACAGCGCAACGGGATTAGTCGATTAACCC CGCTCTGGGATGGCATAAAAATGTTACCTTGATTGGTTAGTTGGAACACGNGTGTAG AGTGAAGCGTTATAGAACGTGAGTTGGATGAATACGCCCTGGTAGGTTGTTCCGA CCACCGGTCTTCC	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	98
74g	GGGCCGGTCTCGTCCCAGTGGCCGATCGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATTGCT TGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAACTAATGCACCGCGGATCCATCTCTAGGTGAC GCCAAAGCGCCTTTAACTTCGTGTATGCGACACTAAGTTTCATTCCGGTATTAGCAT CTGTTTCAAATGTTATCCCCAGCCTTGAGGCAGGTTGCCACGTGTTACTCACCCG TTCGCCACTCACTTGAAGGTGCAAGCACCTTTCGCTGTGCGTTCGACTTGCATGTA TTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTA	<i>Leuconostoc pseudomesenter oides</i> KCTC3652	99
74ch	TGGGNGCGGTCTCATCCCAATGTGGCCGATCACTCTCAACTCGGCTATGCATCATTG TCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAACTAATGCACCGCGGATCCATCTCTAGGT GACGCCAAAGCGCCTTTAACTTCGTGTATGCGACACTAAGTTTCATTCCGGTATTAG CATCTGTTTCAAATGTTATCCCCAGCCTTGAGGCAGGTTGCCACGTGTTACTCACC CGTTCGCCACTCACTTGAAGGTGCAAGCACCTTTCGCTGTGCGTTCGACTTGCATG TATTAGGCAGCGCCGACGCTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTA	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	99
77g	GGCCGTGTCTCGTCCCTGTGGCCGATCATCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCC TTGGTAGGCCGTTACCCACCAACAAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAAGTGA TAGCGAGAAGCCATCTTTAAGCGTTGTTTCATGCGAACAACGTGTTATGCGGTATTAG CATCTGTTTCAAATGTTGTCGCCCGCTTCTGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACC CGTCCGCCACTCGTTGGCGACCAAAATCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTG GGCCAACGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCC AGGGATCAAACCTCTA	<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	99
77ch	GGCCGGTCTCGTCCCTGTGGCCGATCATCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTT GGTAGGCCGTTACCCACCAACAAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAAGTATA GCGAGAAGCCATCTTTAAGCGTTGTTTCATGCGAACAACGCTGTTATGCGGTATTAG CATCTGTTTCAAATGTTGTCGCCCGCTTCTGGGCAGGTTACCTACATGTTACTCACC CGTCCGCCACTCGTTGGCGACCAAAATCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTG GGCCAACGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCC AGGATCAAACCTCTAGATCTTCCAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGT GAGTGAAGAAGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAACACGTATGAGAGTA ACTGTTTATACTTTGACGGTAATTAACAAAAAGTCAAGTAACTACTGCCAGCAACCG CGGTAACACGTAGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAAAGTGGCGG GTTTTTCTAATCAGAGTGAAAGCCTTCCGCTTAACCGGAAAATGATCGAAACTGGATA ATATGAAAAGAGGGTATGAAACTCCATGTGTAGGGTGAATGCGATACGAAAACAC ACCAAAGCGACCCGGGAATGACCTGAACTAACATGGG	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	99

Como se puede observar, de las cinco cepas de BAL aquí estudiadas, se lograron identificar dos géneros distintos: *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Dentro de éstos, se encontraron dos especies de *Leuconostoc*: *L. mesenteroides* y *L. pseudomesenteroides*; mientras que de *Lactobacillus* sólo se encontró a *L. fermentum*.

Con 98% y 99% de identidad respectivamente, las cepas 73 y 74ch se identificaron como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (tabla 7.1). *Leuconostoc mesenteroides*, una bacteria ácido láctica heterofermentadora, fue aislada anteriormente del pozol de Chiapas por Nuraida *et al.* (1995) y por Wachter *et al.* (2000), por lo que no fue inesperada su identificación en este grupo de cepas. Se ha encontrado, además, en otro tipo de alimentos fermentados, como el sauerkraut, kimchi (alimento fermentado chino a base de col), salsas fermentadas, vegetales y cereales fermentados, ya que su presencia en vegetales es muy común debido a que es su hábitat natural (Choi *et al.* 2003; Ogier *et al.* 2008). A esta bacteria se le conoce por iniciar la fermentación de muchos productos de origen vegetal, convirtiendo los azúcares en ácido láctico, ácido acético (que disminuyen el pH del medio, inhibiendo así el crecimiento de otros microorganismos, incluidos los patógenos), etanol, CO₂ (que promueve el establecimiento de un ambiente anaeróbico que favorece el crecimiento de otro tipo de BALs necesarias para continuar la fermentación) y otros compuestos aromáticos que definen significativamente los sabores característicos finales del producto (Lu *et al.* 2010). Además, se han encontrado cepas de *L. mesenteroides* amilolíticas, que inician la fermentación de productos a base de almidón como el ogi africano, un producto fermentado a base de maíz que se usa para la preparación de muchos platillos típicos (Díaz-Ruiz *et al.* 2003; Ijabadeniyi, 2007). En la producción de bacteriocinas por parte de *L. mesenteroides*, se han logrado aislar y caracterizar bacteriocinas de clase IIa capaces de inhibir a diferentes especies de *Listeria*, incluida *L. monocytogenes*: la mesenterocina 5 (Daba *et al.* 1991), la leucocina C-TA33a y la leucocina A-TA33a (Papathanasopoulos *et al.* 1997); además de la mesenterocina 52, que también tiene actividad contra otras

especies de *Leuconostoc* y *Enterococcus* (Mathieu et al. 1993). Por otro lado se han encontrado bacteriocinas que poseen efecto inhibitorio hacia especies de *Weissella*, como la leucocina BTA33a (Papathanasopoulos et al. 1997).

Como se indica en la tabla 7.1, dos de las cepas aisladas del pozol con las que se trabajó en este proyecto, corresponden a *Lactobacillus fermentum* (77g y 77ch), la cual es una bacteria ácido láctica heterofermentadora que ya ha sido aislada anteriormente del pozol (Ampe et al. 1999; Ben Omar et al., 2000) y de otro tipo de masas fermentadas como el ogi y el mawè africanos, así como del gari del este de África (Agati et al. 1998, Díaz-Ruiz et al. 2003). Asimismo, se ha podido aislar de productos lácteos, vegetales fermentados, abono, aguas residuales, como también de la boca y heces de humanos (Dellaglio 2004). Esta bacteria se caracteriza por ser capaz de producir cantidades importantes de ácido en muy poco tiempo, por lo que ya se ha investigado su potencial como cultivo iniciador en algunos alimentos (Huch et al. 2008; Glover et al. 2009). Como bacteria probiótica, se sabe que existen cepas de *Lactobacillus fermentum* que exhiben capacidad antimicrobiana y antioxidante, además de que no produce hemolisinas ni afecta a la microbiota intestinal normal del humano (Järvenpää et al. 2007). Como productora de bacteriocinas, *L. fermentum* produce bacteriocinas capaces de inhibir a bacterias patógenas, como la bacteriocina de clase IIa ET35, activa contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Tomé et al. 2009); y la fermenticina B, con actividad hacia *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Micrococcus luteus* (Yan y Lee, 1997). Se ha visto, además, que algunas cepas de esta bacteria poseen actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas Gram negativas como *Escherichia coli* (Riaz et al. 2010). En este sentido, se ha logrado caracterizar parcialmente una bacteriocina, la bacteriocina L23, con actividad hacia otras bacterias Gram negativas además de *E. coli*, como *Proteus vulgaris* y *Klebsiella pneumoniae* (Pascual, 2008).

Finalmente, la cepa 74g fue identificada como *Leuconostoc pseudomesenteroides* con un porcentaje de identidad del 99% (tabla 7.1). *L. pseudomesenteroides* es una especie muy parecida a *L. mesenteroides*, y es muy difícil diferenciar una de otra con métodos tradicionales, por lo que siempre es más conveniente, rápido y seguro hacerlo a través de técnicas moleculares (Ogier *et al.* 2008). Es una bacteria heterofermentadora cuyo nicho natural son las plantas o vegetales frescos, por lo que su presencia en productos fermentados a base de cereales o vegetales es muy común, así como en diversos productos lácteos. Se ha logrado aislar de alimentos marroquíes hechos a base de leche cruda (Oquadhiri *et al.* 2009); de shmen, una mantequilla tradicional del Sahara argelino hecha a partir de leche de camella (Mourad y Nour-Eddine, 2006) y de nukadoko, un salvado de arroz fermentado tradicional en Japón que se usa para hacer encurtidos tradicionales (Sawa *et al.* 2010). En cuanto al pozol, no se tienen reportes de que *L. pseudomesenteroides* se haya aislado de éste anteriormente; sin embargo, como ya se comentó en los párrafos anteriores, el género *Leuconostoc* ha sido ampliamente identificado en este alimento.

Concerniente a la producción de bacteriocinas, aunque existe poca información, se tienen identificadas y caracterizadas al menos cuatro bacteriocinas: leucocina A y leucocina A-Q15, ambas identificadas como bacteriocinas de clase IIa; y leucocina Q y leucocina N, las cuales se han caracterizado por pertenecer, aparentemente, a un nuevo grupo de bacteriocinas: la clase IIId, que incluye bacteriocinas carentes de pediocina compuestas por un péptido lineal. Se ha visto que todas estas bacteriocinas inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *Lactobacillus sakei* (Sawa *et al.* 2010).

7.1.2. Interacciones negativas de las bacterias ácido lácticas aisladas del pozol contra *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*

Las secciones subsecuentes muestran los resultados obtenidos tras hacer crecer a *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* en los sobrenadantes concentrados, neutralizados y con tratamiento térmico de las bacterias lácticas aisladas del pozol (SCNTB) que se estudiaron en este proyecto (73, 74g, 74ch, 77g y 77ch); asimismo, se presenta la viabilidad de dichas bacterias patógenas al hacerlas crecer en un cultivo mixto con cada una de las BALs mencionadas (pruebas de reto).

El análisis sobre las interacciones observadas entre las bacterias lácticas y las patógenas, se incluye al mismo tiempo que se presentan los resultados. Cabe mencionar que el grupo de cinco cepas de bacterias lácticas del pozol aquí estudiadas se seguirá refiriendo a partir de su clave inicial (73, 74g, 74ch, 77g y 77ch) durante el análisis de los resultados.

7.1.2.1. Efecto de los SCNTB sobre la viabilidad de *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*

7.1.2.1.1. Preparación de los sobrenadantes de las bacterias ácido lácticas

Los 100 mL de sobrenadante de cada cepa de BAL fueron obtenidos vía centrifugación a 10000 rpm y 15 minutos, se ajustaron a un pH de 6.5-7.0 y se les aplicó un tratamiento térmico en autoclave a 100-105° C por 10 minutos (sección 6.1.3.1.1) La tabla 7.2 muestra el pH al que se logró ajustar cada sobrenadante.

Tabla 7.2. Ajuste de pH con NaOH de los sobrenadantes de las cepas de BAL

Cepa de BAL	pH logrado
73 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	6.52
74g (<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>)	6.56
74ch (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	6.61
77g (<i>Lactobacillus fermentum</i>)	6.61
77ch (<i>Lactobacillus fermentum</i>)	6.70

7.1.2.1.2. Concentración de los sobrenadantes de las bacterias ácido lácticas

Los sobrenadantes libres de células, con el pH ajustado y con tratamiento térmico, se concentraron mediante dos procedimientos (rotavapor y liofilización) con el fin de eliminar agua y lograr concentrar los compuestos extracelulares responsables de la inhibición hacia las bacterias sensibles. La concentración de los sobrenadantes con el fin de detectar la presencia de compuestos tipos bacteriocinas es una estrategia muy usada, debido a que permite apreciar o distinguir mejor las inhibiciones; los métodos más empleados son el del rotavapor (Vignolo et. al 1993) y la concentración por precipitación con sulfato de amonio (Daba et al. 1991; Coventry et al., 1997). En este estudio se usaron dos métodos distintos para ver las diferencias y conveniencias entre ellos, además de los efectos de la concentración sobre la inhibición de las bacterias patógenas.

Los volúmenes finales obtenidos tras la concentración de los sobrenadantes de las BALs con el uso de un rotavapor y bomba de vacío (sección 6.1.3.1.2.1) se muestran en la tabla 7.3. Estos sobrenadantes concentrados, neutralizados y con tratamiento térmico se utilizaron para las pruebas justo después de su obtención para el caso de *S. Typhimurium*; mientras que para el caso de *L. monocytogenes*, se utilizaron tras dos semanas, tiempo en el que se mantuvieron a -4° C.

Tabla 7.3. Concentración de sobrenadantes por medio del uso del rotavapor

Sobrenadante de cepa de BAL	Volumen inicial (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final del sobrenadante (%)
73 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	100	48	52
74g (<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>)	100	50	50
74ch (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	100	52	48
77g (<i>Lactobacillus fermentum</i>)	100	47	53
77ch (<i>Lactobacillus fermentum</i>)	100	55	45

Por otro lado, en la tabla 7.4 se muestran las masas obtenidas de cada uno de los sobrenadantes secos tras haber sido liofilizados según lo descrito en la sección 6.1.3.1.2.2; asimismo, se indica el volumen de agua añadida para resuspenderlos y utilizarlos en las pruebas, tomando en cuenta la relación ocupada y la concentración final obtenida.

Cabe destacar que los liofilizados se mantuvieron a -4° C durante 24 horas, hasta que se resuspendieron en agua estéril para ser utilizados en las pruebas. Para el caso de *S. Typhimurium*, los liofilizados resuspendidos se usaron inmediatamente después de haberseles agregado el agua; mientras que para el caso de *L. monocytogenes*, se usaron tras dos semanas de agregada el agua, tiempo en el que se mantuvieron a -4° C.

Tabla 7.4. Concentración de sobrenadantes por liofilización

Liofilizado de cepa de BAL	Masa obtenida (g)	Volumen de agua añadido con relación a 1g/5mL (mL)	Concentración obtenida (%)
73 (<i>L. mesenteroides</i>)	3.2259	16.13	83.87
74g (<i>L. pseudomesenteroides</i>)	3.0012	15.00	85.00
74ch (<i>L. mesenteroides</i>)	3.5522	17.76	82.24
77g (<i>L. fermentum</i>)	2.9020	14.51	85.49
77ch (<i>L. fermentum</i>)	3.2294	16.15	83.85

Como se puede observar en cada una de las tablas, las concentraciones finales de los sobrenadantes con cada uno de los métodos empleados, presenta variaciones importantes debidas principalmente a desventajas propias de la técnica empleada. Para el caso de la concentración con rotavapor y bomba de

vacío (tabla 7.3), las variaciones se presentaron debido a que la reducción del volumen del sobrenadante (eliminación de agua) en el matraz de bola hasta alcanzar el 50% se hacía de manera visual y aproximada; es decir, que no se contaba con una marca en el matraz que indicara en qué momento el volumen se había reducido en un 50%, lo que provocaba que se tuvieran concentraciones diferentes en las muestras

Por otro lado, en el caso de la concentración a través de la liofilización de los sobrenadantes (tabla 7.4), las variaciones pudieron ser mayores debido a que, una vez obtenidos los liofilizados, éstos se rehidrataron inmediatamente al entrar en contacto con la atmósfera debido a su alto contenido de carbohidratos. Por tal motivo, una masa importante de los liofilizados quedó adherida a las paredes de los recipientes e incluso a la espátula con la cual se transfería el contenido hacia otro contenedor, reduciendo aún más la masa disponible para resuspender y utilizar en las pruebas. Dada esta problemática, existieron algunos casos de contaminación, hecho que no ocurrió con el caso de los sobrenadantes concentrados con el rotavapor, pues el contacto con ellos fue escaso y se mantuvieron condiciones mucho más asépticas que con el caso de los liofilizados.

7.1.2.1.3. Cuantificación de proteína de los concentrados

A continuación, en la tabla 7.5 se muestran los resultados de la cuantificación de proteína realizadas tanto a los sobrenadantes concentrados como a los liofilizados resuspendidos. Las mediciones se realizaron por triplicado; en la tabla se muestra el promedio de cada una de las muestras evaluadas. La curva patrón que se ocupó como referencia, se muestra en el anexo III.b.

Tabla 7.5. Cuantificación de proteína de los liofilizados resuspendidos y los sobrenadantes concentrados con rotavapor.

Muestra	Proteína [$\mu\text{g/mL}$]
Caldo MRS (control negativo)	2.887
Liofilizados resuspendidos	
73 (<i>L. mesenteroides</i>)	75.555
74g (<i>L. pseudomesenteroides</i>)	107.19
74ch (<i>L. mesenteroides</i>)	37.059
77g (<i>L. fermentum</i>)	33.202
77ch (<i>L. fermentum</i>)	89.444
Sobrenadantes concentrados con rotavapor	
73 (<i>L. mesenteroides</i>)	25.229
74g (<i>L. pseudomesenteroides</i>)	18.791
74ch (<i>L. mesenteroides</i>)	14.935
77g (<i>L. fermentum</i>)	18.202
77ch (<i>L. fermentum</i>)	11.176

Como se mencionó en la sección 2.3 y 6.1.3.1.3, las bacteriocinas son compuestos proteicos de origen extracelular, por lo que su presencia en un medio líquido libre de células es esperada. Además, debido a su naturaleza proteica, es posible cuantificar su concentración, tomando en cuenta que es una cuantificación indirecta que sólo podría sugerir mayor cantidad de proteína si se compara con un medio sin presencia de microorganismos ni compuestos metabólicos (Hernández Alcántara, 2010); por tanto, considerando que las bacteriocinas, de haberse producido, están presentes en el medio libre de células podría atribuirse que parte de la concentración de proteína, es debido a la presencia de bacteriocinas.

En el caso de estudio, la concentración de proteína tanto en las muestras liofilizadas como en los sobrenadantes concentrados fue significativamente mayor que la concentración en caldo MRS estéril sin concentrar (control negativo), que fue de apenas 2.887 $\mu\text{g/mL}$, lo que indica que hubo un mayor contenido de proteínas en las muestras concentradas. La cantidad de proteína en los liofilizados resuspendidos varió entre las diferentes muestras, pues se tuvo como valor más bajo el de la cepa 77g, cuya concentración fue de 33.202 $\mu\text{g/mL}$; mientras que el

valor mayor fue de 107.19 $\mu\text{g/mL}$, correspondiente a la cepa 74g (tabla 7.5). Aunque estas diferencias bien podrían adjudicarse a la diferencia en la tasa de compuestos proteicos producidos por cada BAL, la mayor uniformidad en las concentraciones de los sobrenadantes concentrados con rotavapor indica que esa no es la razón, especialmente porque el contenido de proteína de la cepa 74g con el uso de rotavapor no fue de los resultados más altos. En este caso, la mayor concentración correspondió a la cepa 73, con 25 $\mu\text{g/mL}$. Las variaciones pudieron deberse entonces, en el caso de los liofilizados, a las mismas problemáticas del método que se mencionaron en la sección 7.1.2.1.2. Era de esperarse que las concentraciones de proteína en los liofilizados resuspendidos fueran mayores que en los sobrenadantes concentrados con rotavapor, debido a que los liofilizados estaban más concentrados; sin embargo, hay diferencias muy marcadas, como el mencionado caso de la cepa 74g, cuya concentración de proteína es muy alta en el liofilizado, y sin embargo, en comparación, es muy baja con aquella obtenida con el rotavapor (18.791 $\mu\text{g/mL}$). Dichas inconsistencias pueden adjudicarse a la pérdida de muestra durante el proceso de transferencia de los liofilizados de un recipiente a otro, además de que no hay que dejar de tomar en cuenta las alteraciones químicas que pueden producirse durante un proceso tan drástico como lo es la liofilización sobre compuestos tanto de origen proteico como de otro tipo. Dichas alteraciones pueden repercutir en la reacción que se lleva a cabo entre el reactivo de Bradford y los aminoácidos.

Tomando en cuenta los resultados de los sobrenadantes concentrados con rotavapor, puede decirse que fue la cepa 73 la que presentó una concentración de proteína más alta; mientras que la 77ch fue la de menor producción. En términos de posibles bacteriocinas, podría pensarse que la BAL 73 podría estar produciendo una cantidad mayor, o incluso, hasta más de un solo tipo de bacteriocina, pues se tienen reportes de que ciertas cepas de *L. mesenteroides* (especie a la que pertenece la cepa en cuestión) producen múltiples bacteriocinas al mismo tiempo (Papathanasopoulos *et al.* 1997).

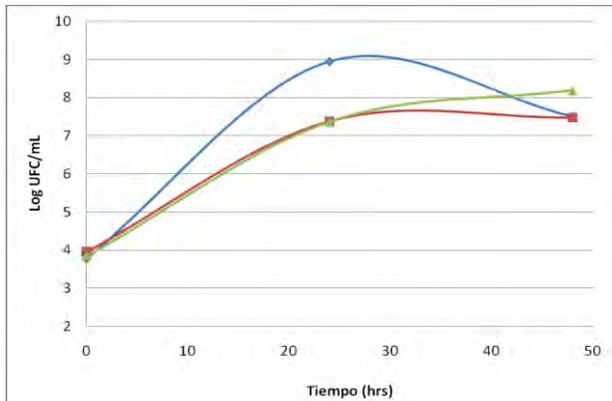
7.1.2.1.4. Efecto de los SCNTB sobre la viabilidad de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*

Las bacterias patógenas con 6 horas de incubación fueron utilizadas como se indica en las secciones 6.1.3.1.4.1 y 6.1.3.1.4.2. En la tabla 7.6 se muestra la concentración de cada una de las bacterias patógenas tras dicho periodo de incubación. Esta determinación permitió saber el crecimiento inicial de las bacterias patógenas, con el fin de controlar el inóculo a agregar a cada uno de los matraces de prueba (10^4 UFC/mL, sección 6.1.3.1.4.1 y 6.1.3.1.4.2)

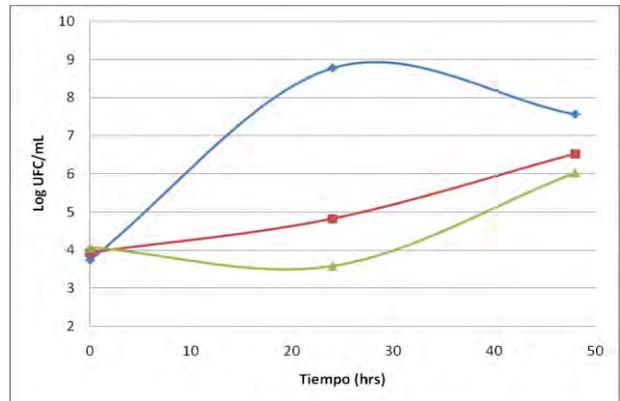
Tabla 7.6. Concentración de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* tras 6 horas de crecimiento en caldo BHI

Bacteria patógena	UFC/mL
<i>Salmonella Typhimurium</i>	1.7×10^8
<i>Listeria monocytogenes</i>	2.4×10^9

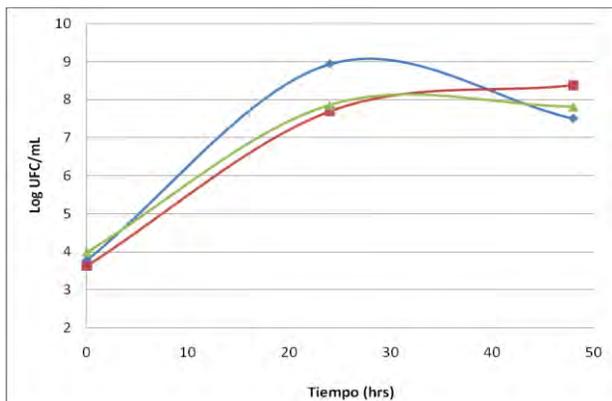
Las curvas de crecimiento obtenidas tanto de *S. Typhimurium* como de *L. monocytogenes* utilizando los SCNTB concentrados con rotavapor y los SCNTB concentrados por liofilización se muestran en las figuras 17, 18, 19 y 20.



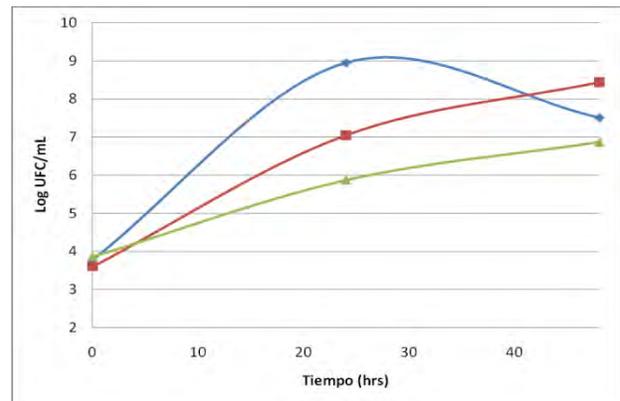
73 (*Leuconostoc mesenteroides*)



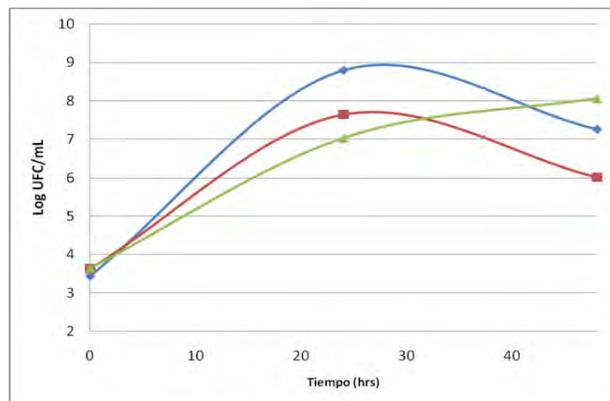
74g (*Leuconostoc pseudomesenteroides*)



74ch (*Leuconostoc mesenteroides*)



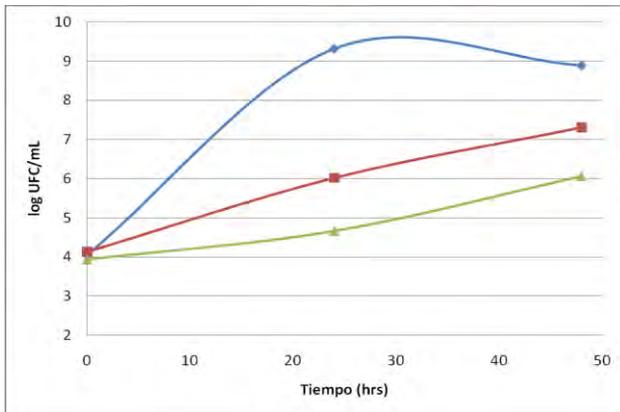
77g (*Lactobacillus fermentum*)



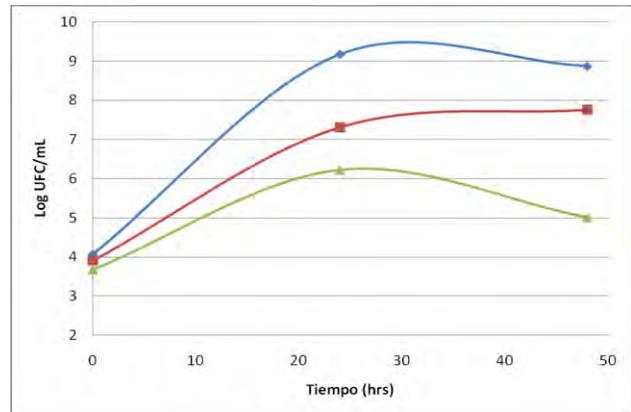
77ch (*Lactobacillus fermentum*)

Figura 17. Sobrevivencia de *Salmonella* Typhimurium en presencia de los SCNTB de cada cepa estudiada.

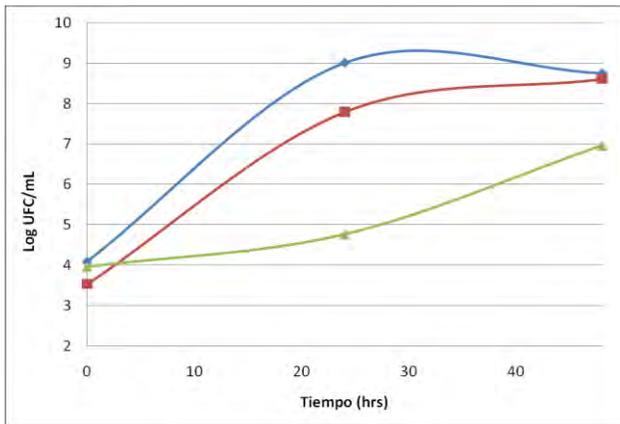
- Las curvas azules representan a la patógena creciendo en caldo MRS (*Salmonella* +)
- Las curvas rojas representan a *S. Typhimurium* creciendo en el SCNTB concentrado con rotavapor
- ▲— Las curvas verdes indican el crecimiento de la patógena creciendo en el SCNTB concentrado por liofilización.



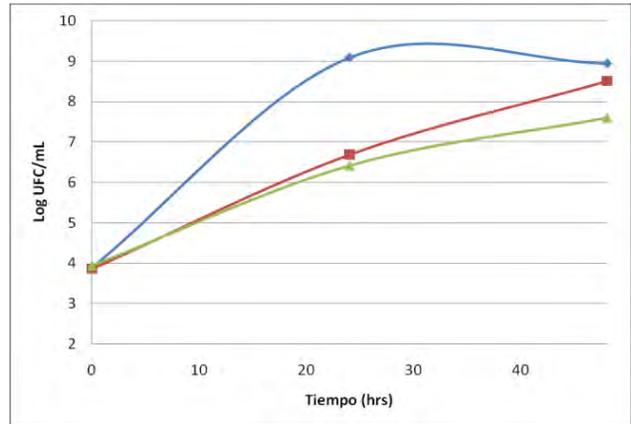
73 (*Leuconostoc mesenteroides*)



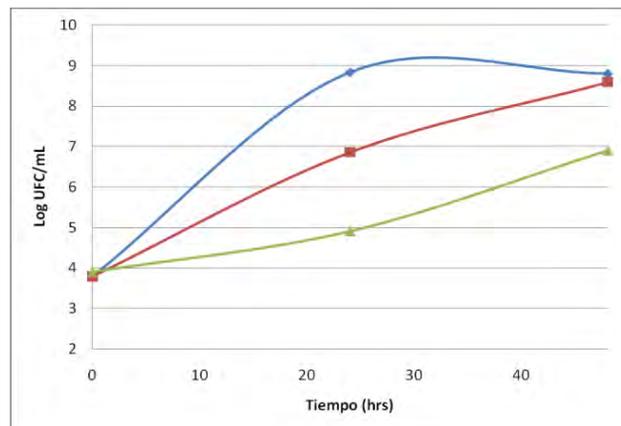
74g (*Leuconostoc pseudomesenteroides*)



74ch (*Leuconostoc mesenteroides*)



77g (*Lactobacillus fermentum*)



77ch (*Lactobacillus fermentum*)

Figura 18. Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en presencia de los SCNTB de cada cepa estudiada.

- Las curvas azules representan a la patógena creciendo en caldo MRS (*Listeria* +)
- Las curvas rojas representan a *L. monocytogenes* creciendo en el SCNTB concentrado con rotavapor
- ▲— Las curvas verdes indican el crecimiento de la patógena creciendo en el SCNTB concentrado por liofilización.

Como se puede observar en todas las curvas de crecimiento de *S. Typhimurium* y de *L. monocytogenes* (figuras 17 y 18), ninguno de los SCNTB inhibió por completo el desarrollo de las dos bacterias patógenas evaluadas. Lo que se observa es una inhibición parcial, es decir que el crecimiento de las patógenas en los concentrados es desde uno hasta cinco ciclos logarítmicos más bajo, lo que podría traducirse en un efecto bacteriostático.

Tomando en cuenta que las bacterias lácticas son importantes productoras de bacteriocinas y además que se han logrado identificar y caracterizar bacteriocinas producidas por *L. mesenteroides* (cepas 73 y 74ch) (Daba *et al.* 1991; Papathanasopoulos *et al.* 1997; Mathieu *et al.* 1993), *L. pseudomesenteroides* (cepa 74g) (Sawa *et al.* 2010) y *L. fermentum* (cepas 77g y 77ch) (Yan y Lee, 1997; Pascual *et al.* 2008; Tomé *et al.* 2009; Ríaz *et al.* 2010), podría pensarse que el efecto bacteriostático ejercido sobre las bacterias patógenas es debido a posibles bacteriocinas. En este sentido, hay que recordar que el pH de los sobrenadantes libres de células se ajustó a 6.5-7.0 con el propósito de descartar el efecto de los ácidos orgánicos como agentes inhibitorios (Vignolo *et al.* 1993; Vallejo *et al.* 2009). Dado que, aunque no fue total, hubo una reducción en el nivel de crecimiento de las patógenas, este efecto bacteriostático parece no estar influenciado por los ácidos orgánicos producidos por las BAL. Además, el tratamiento térmico realizado a los sobrenadantes (sección 6.1.3.1.1) no perjudicó dicha actividad.

Dentro de las inhibiciones producidas por los SCNTB sobre *S. Typhimurium* (figura 17) se puede observar que tienen un efecto a las 24 horas, en el que logran reducir a un valor mínimo el crecimiento de la patógena. En todos los casos, excepto en el de la cepa 74ch, el efecto parece estar muy vinculado a la concentración, pues los menores conteos de células vivas a las 24 horas corresponden a *S. Typhimurium* creciendo en los SCNTB concentrados por liofilización (concentrados en un 82-85%) (curvas verdes). El SCNTB de la cepa 74g fue la que mostró tener una mayor reducción en el crecimiento de dicha patógena: creciendo en el SCNTB concentrado al 85% (curva verde), la cuenta se redujo en cinco ciclos logarítmicos con respecto al control; mientras que al crecer en el SCNTB concentrado al 67% (curva roja), la reducción se dio en casi cuatro ciclos; por tanto, ambos efectos bacteriostáticos son

importantes al compararlos con la curva del crecimiento normal de la patógena (curva azul). La cepa 77g, también mostró un efecto bacteriostático importante, pues su SCNTB concentrado al 85.49% logró reducir la cuenta tres ciclos logarítmicos (curva verde, cepa 77g) con respecto al control positivo (curva azul); mientras que concentrada al 53% lo hace en dos ciclos (curva roja). Los SCNTB de las cepas 73, 74ch y 77ch mostraron un comportamiento muy similar entre sí. Ya que lograron reducir la cuenta de la patógena en un ciclo logarítmico o poco más, dependiendo de la existencia de un efecto por el factor de la concentración. Por ejemplo, en el caso de los SCNTB de las cepas 73 y 74ch, no pareció existir influencia por parte de la concentración, pues en ambos casos, las cuentas se redujeron en aproximadamente un ciclo logarítmico a las 24 horas tanto con los concentrados al 82-85% (curvas verdes, cepas 73 y 74ch) como con los de ~50% (curvas rojas), comparándolos con el control positivo. Finalmente, para el caso del SCNTB de la cepa 77ch, se observó un efecto bacteriostático ligado a una probable relación con la concentración del agente, ya que concentrado al 45%, el efecto bacteriostático fue de aproximadamente un ciclo logarítmico (curva roja, cepa 77ch), mientras que el concentrado al 83.85%, fue de casi dos ciclos (curva verde)

Se ha de destacar que, en la mayoría de los casos, las cuentas de la bacteria patógena a las 48 horas es muy similar a las del control positivo, con la diferencia de que en éste último, *S. Typhimurium* parece entrar a fase de muerte, pues la cuenta disminuyó; mientras que en los demás casos existió un aumento en el crecimiento, lo que podría indicar que el efecto bacteriostático es reversible después de determinado tiempo (Tomé *et al.* 2009), y que sólo parece ser efectivo a las 24 horas.

En el caso de las curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en los SCNTB (figura 18) se observó que cada uno mostró un efecto bacteriostático que se dio a las 24 horas del crecimiento. En todos los casos, excepto en el de la cepa 77g, el efecto pareció estar relacionado con la concentración del SCNTB, ya que a mayor concentración (curvas verdes), mayor fue la reducción del nivel de crecimiento de *L. monocytogenes* con respecto a su crecimiento en el control positivo (curvas azules). También es importante resaltar, que, mientras que con el SCNTB de la cepa 73, *L.*

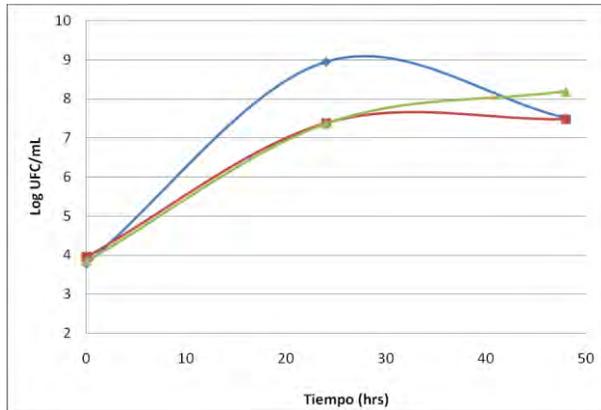
monocytogenes se recuperó, en el resto de los casos, la bacteria logró alcanzar niveles similares a los del control positivo creciendo en los SCNTB concentrados con rotavapor (curvas rojas). Por el contrario, al crecer en los SCNTB concentrados por liofilización (curvas verdes) hubo diferencias: en el caso de la cepa 74g, *L. monocytogenes* disminuyó su concentración a las 48 horas; en el liofilizado de la cepa 74ch, la patógena logró aumentar su concentración a las 48 horas, pero no de igual manera que en el control positivo o en el concentrado con rotavapor (curvas azul y roja respectivamente). En el liofilizado de la cepa 77g, hubo un comportamiento muy similar al de la bacteria creciendo en el concentrado con rotavapor (curva roja); y por último, en el caso de la cepa 74ch, *L. monocytogenes* aumentó su concentración a las 48 horas, pero un ciclo logarítmico menos que en el caso del control positivo y el concentrado con rotavapor (curvas azul y roja respectivamente).

En este caso también se vio que ciertos SCNTB poseen un efecto más pronunciado y consistente a las 24 horas que otras: el efecto bacteriostático en el caso del SCNTB de la cepa 73 redujo el crecimiento de *L. monocytogenes* en casi cuatro ciclos logarítmicos con el concentrado al 83.87% (curva verde en gráfico 73), y en poco más de tres ciclos con el concentrado al 52% (curva roja en gráfico 73), manteniendo una cuenta baja incluso a las 48 horas, ambos con respecto al control positivo de la bacteria patógena (curva azul). En cuanto al resto de los SCNTB se observó que los de las cepas 74g y 77g lograron reducir en aproximadamente tres ciclos logarítmicos la cuenta de *L. monocytogenes* a las 24 horas con los concentrados al 85% (curvas verdes, cepas 74g y 77g), con el notable caso de que la bacteriocina de la cepa 77g no pareció verse alterada por la concentración, pues también logró reducir en tres ciclos el crecimiento a una concentración de 53% (curva roja cepa 77g). Finalmente, en el caso de los SCNTB de las cepas 74ch y 77ch, el efecto de la concentración pareció ser más importante porque, en ambas, el concentrado al 82.24% y 83.85% respectivamente (curvas verdes cepas 74ch y 77ch) logró reducir la cuenta hasta cinco ciclos logarítmicos con respecto al control positivo; mientras que los concentrados al ~50% (curvas rojas) lo hicieron en un ciclo, en el caso de la 74ch, y en dos, para el caso de la 77ch. En estos dos casos, el crecimiento de la patógena a las 48 horas en los concentrados al 82 y 83% no logró alcanzar por

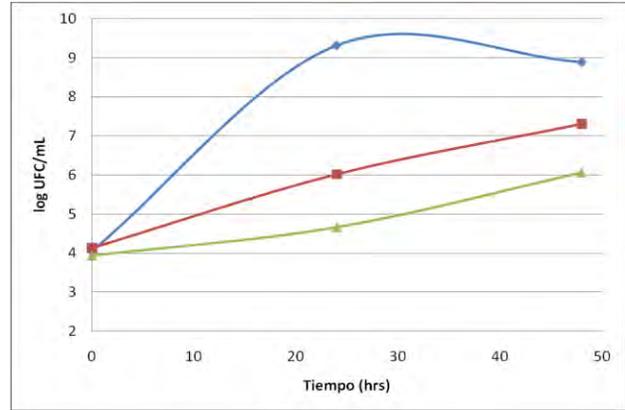
completo los niveles que alcanza el control positivo, crecimiento que, en cambio, sí alcanzó la patógena al crecer en los concentrados al ~50%.

Las figuras 19 y 20 permiten observar las diferencias entre las inhibiciones logradas por cada cepa de BAL hacia *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*. Se observó que, en general, la mayoría de los SCNTB de las cepas de BALs inhibieron mejor a *Listeria* que a *Salmonella*, lo cual podría considerarse normal o esperado, ya que, de ser sustancias tipo bacteriocinas, aquellas producidas por bacterias lácticas poseen efecto hacia bacterias Gram positivas, como lo es *L. monocytogenes* (Riley y Wertz, 2002 ; Chen y Hoover, 2003; Ray y Bhunia, 2008); mientras que son pocos los casos que se dan hacia bacterias Gram negativas, como lo es *S. Typhimurium*; sin embargo, sí existen reportes de inhibiciones hacia bacterias Gram negativas, como lo es el de la bacteriocina L23, que logra inhibir a *E. coli*, *P. vulgaris* y *K. pneumoniae* (Pascual *et al.* 2008); y el de la nisina A y mutacina B-Ny266, con actividad hacia *Helicobacter*, *Haemophilus* y *Neisseria* (Riley y Wertz, 2002).

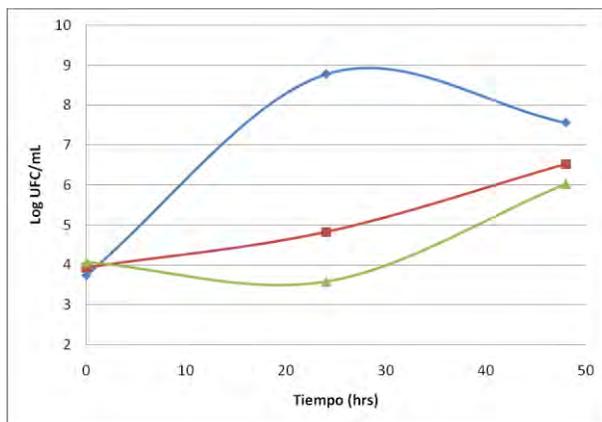
Analizando cada una de los SCNTB en las figuras 19 y 20, se observa una mejor inhibición por parte de los SCNTB de las cepas 73 (figura 19), 77g y 77ch (figura 20) hacia *L. monocytogenes*; mientras que por parte de la cepa 74g (figura 19), la inhibición fue mejor para *Salmonella*. El caso del SCNTB de la cepa 74ch (figura 19) es interesante, pues se observó una inhibición mayor para *Listeria* pero con el SCNTB concentrado al 82.24% (curva verde), pues en el caso del concentrado al 48% (curva roja), el crecimiento de *Listeria* fue muy similar al de su control positivo. En cuanto al de *Salmonella* ambas concentraciones de los sobrenadantes, son similares y las dos sólo reducen en un ciclo logarítmico el crecimiento de la patógena con respecto al control positivo (curva azul, cepa 74ch)



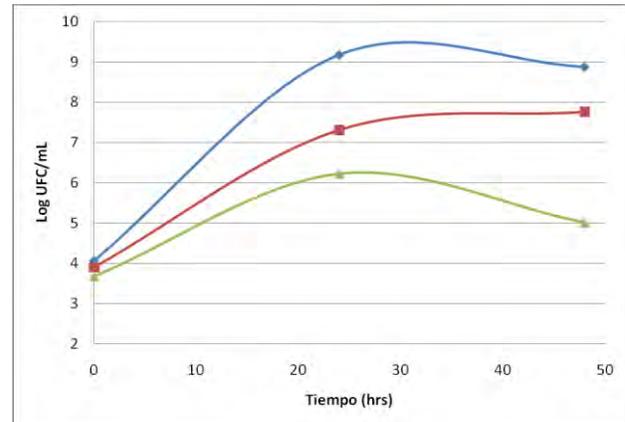
Salmonella en 73 (*Leuconostoc mesenteroides*)



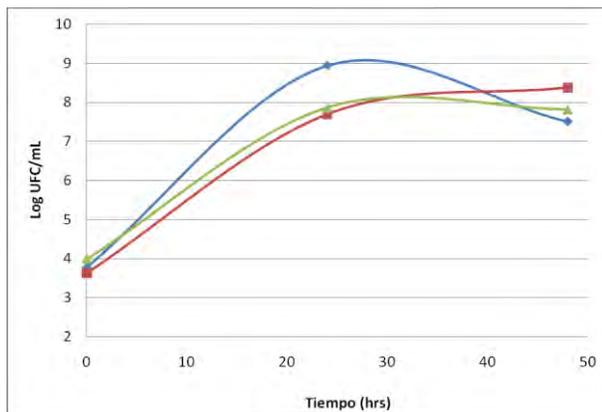
Listeria en 73 (*Leuconostoc mesenteroides*)



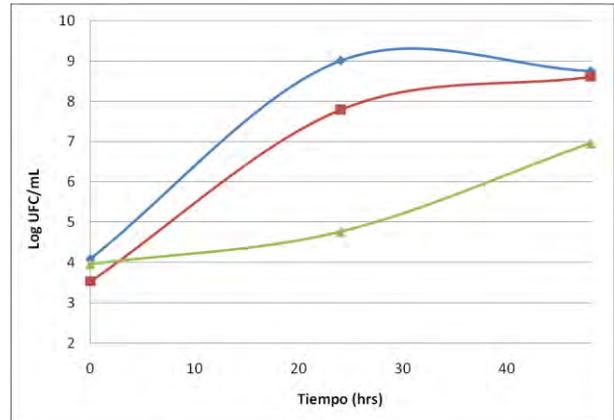
Salmonella en 74g (*Leuconostoc pseudomesenteroides*)



Listeria en 74g (*Leuconostoc pseudomesenteroides*)



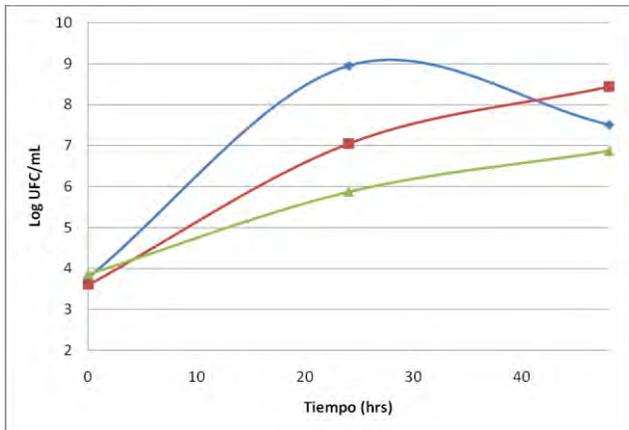
Salmonella en 74ch (*Leuconostoc mesenteroides*)



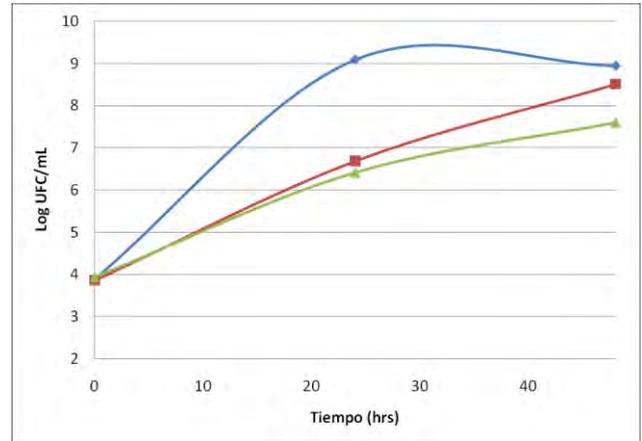
Listeria en 74ch (*Leuconostoc mesenteroides*)

Figura 19. Sobrevivencia de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* en los SCNTB de las cepas 73, 74g y 74ch.

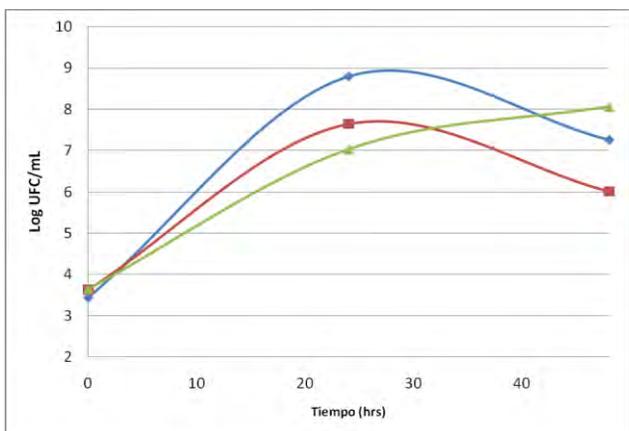
- Las curvas azules representan a las patógenas creciendo en caldo MRS
- Las curvas rojas representan a las patógenas creciendo en el SCNBT concentrado con rotavapor
- ▲— Las curvas verdes indican el crecimiento de las bacterias creciendo en el SCNTB concentrado por liofilización.



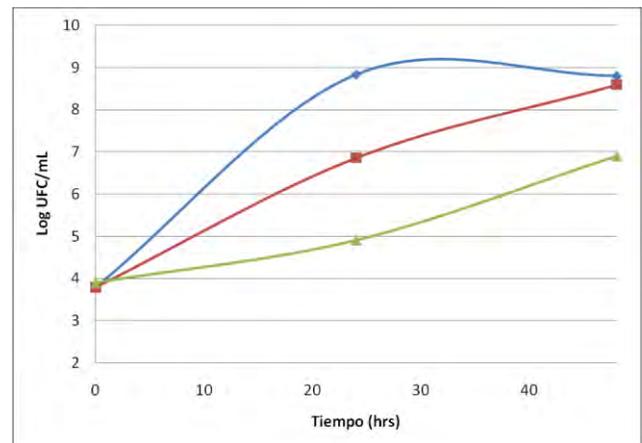
Salmonella en 77g (*Lactobacillus fermentum*)



Listeria en 77g (*Lactobacillus fermentum*)



Salmonella en 77ch (*Lactobacillus fermentum*)



Listeria en 77ch (*Lactobacillus fermentum*)

Figura 20. Sobrevivencia de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* en presencia de los SCNTB de las cepas 77g y 77ch.

- Las curvas azules representan a las patógenas creciendo en caldo MRS
- Las curvas rojas representan a las patógenas creciendo en el SCNTB concentrado con rotavapor
- Las curvas verdes indican el crecimiento de las bacterias creciendo en el SCNTB concentrado por liofilización.

El hecho de que existiera inhibición por parte de los SCNTB hacia *L. monocytogenes*, podría indicar que se trata de compuestos tipo bacteriocinas, ya que ni la neutralización de los ácidos orgánicos, ni el tratamiento térmico aplicado lograron eliminar la actividad antimicrobiana ejercida sobre esta patógena, indicando, además, que se trata de compuestos termo-resistentes (Vignolo *et al.*, 1993; Chen y Hoover, 2003; Vallejo, *et al.* 2009). Aunado a esto, las bacteriocinas que se han logrado aislar y caracterizar de diferentes cepas de *Leuconostoc mesenteroides* (cepas 73 y 74ch), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (cepa 74g) y *Lactobacillus fermentum* (cepas 77g

y 77ch) han sido identificadas como bacteriocinas de clase IIa, con actividad contra *L. monocytogenes*. Como ejemplos se tiene a la mesenterocina 5, la leucocina C-TA33a y la leucocina A-TA33a producidas por *L. mesenteroides* (Daba *et al.* 1991; Papathanasopoulos, *et al.* 1997); de las producidas por *L. pseudomesenteroides* se encuentran la leucocina Q y leucocina N (Sawa *et al.* 2010); mientras que *L. fermentum* se sabe que produce a la bacteriocina ET35 (Tomé *et al.* 2009).

Dentro de las características de esta última bacteria láctica, resalta el hecho de que se han encontrado bacteriocinas, como la L23, capaces de inhibir a bacterias Gram negativas (Pascual *et al.*, 2008), además de que se sabe que esta bacteria es capaz de producir compuestos antimicrobianos extracelulares que han inhibido a *Salmonella* Typhimurium hasta en un 30% (Afdora *et al.* 2010). Por tanto, es posible que la cepa de *L. fermentum* aislada del pozol e investigada en este proyecto, tenga un efecto bacteriostático sobre *S. Typhimurium*. Asimismo, las demás cepas pueden ser posibles productoras de bacteriocinas capaces de causar un efecto bacteriostático sobre dicha patógena, pese a que no haya aún reportes sobre cepas que lo hagan. Aunado a esto, se tiene el antecedente de que en un estudio previo (Tavera Montes, 2010) la doble actividad antimicrobiana aparentemente debida a bacteriocinas de las cinco cepas aquí estudiadas, ya había sido probada contra *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* con el método de difusión en agar. Este ensayo se realizó inoculando a *Salmonella* y *Listeria* en una placa semisólida de infusión cerebro-corazón (BHI) amortiguada, en la que se practicaron pozos con el fin de agregar en ellos los cultivos activos de cada cepa de BAL con 24 horas de crecimiento. De esta forma, se logró observar, tras 24 horas de incubación, la formación de halos de inhibición alrededor de cada uno de los pozos, indicando un efecto antimicrobiano que no estaba relacionado con la producción de ácidos orgánicos, pues el medio estaba tamponado, lo que permitió sugerir la posible acción de otro tipo de compuestos antimicrobianos, como las bacteriocinas.

Como ya se ha mencionado, los SCNTB de las cepas aquí estudiadas parecen ejercer sólo un efecto bacteriostático sobre *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*. Los efectos bacteriostáticos, aunque no son muy comunes, son también propios de las

bacteriocinas. Se han encontrado algunas bacteriocinas, como la ET05 y ET12 producidas por *Enterococcus faecium*, así como la ET06 sintetizada por *Lactobacillus curvatus*, que logran disminuir los crecimientos de diversas especies de *Listeria* y *Enterococcus*, pero no los inhibe totalmente e, incluso, se observa una reversibilidad entre las 24-48 horas (Tomé *et al.* 2009). Por otro lado, se tiene el caso de la mesenterocina 5, producida por *L. mesenteroides* UL5, que también ejerce un efecto bacteriostático a las 18 horas sobre varias especies de *Listeria* (Daba *et al.* 1991).

Es importante mencionar que diversos estudios han dado a conocer que algunas células de *Listeria monocytogenes* son capaces de sobrevivir a diferentes tratamientos con bacteriocinas en diferentes matrices alimentarias, por lo que, si se les somete a una concentración de bacteriocina menor a la concentración mínima inhibitoria, dicha patógena puede desarrollar resistencia y desarrollarse en presencia del agente antimicrobiano. Esto parece ser debido a que algunas de las células de *L. monocytogenes* en una población dada, responden de manera diferente a la exposición de bacteriocinas comparadas con otras células de la misma población, lo que se observa vía la sobrevivencia de unas, y muerte de otras (Nielsen *et al.* 2010). En este sentido, el efecto bacteriostático encontrado en los experimentos de este proyecto, pudo verse influenciado debido a lo mencionado, teniendo directa repercusión la concentración de la posible bacteriocina presente. Puede ser posible que por esta razón se hayan encontrado casos, como el de la cepa 74g (figura 18), en el que la concentración al 85% (curva verde cepa 74g) fue suficiente para reducir la cuenta de *Listeria* y, además, de impedir que a las 48 horas aumentara su cuenta, pues el número de células sí se ve reducido como si la bacteria entrara a fase de muerte, contrario a lo ocurrido en el caso del concentrado al 50% (curva roja). Dadas estas circunstancias, sería recomendable hacer más experimentos con el objetivo de encontrar una concentración mínima inhibitoria que impidiera la recuperación de las patógenas a las 48 horas.

Por otro lado, cabe resaltar que las bacteriocinas son sensibles a enzimas proteolíticas que pueden ser sintetizadas tanto por las cepas productoras, como por las bacterias sensibles. La evidencia sugiere que existe degradación proteolítica de las bacteriocinas, y que ésta es causante de que las bacterias sensibles “renazcan”.

Este caso ya se ha presentado en experimentos con *Listeria monocytogenes* como bacteria blanco (Kouakou *et al.* 2010), por lo que es una posible razón más para explicar los resultados obtenidos en los ensayos del presente trabajo.

Hay que tomar en cuenta que el proceso de liofilización llevado a cabo para obtener los sobrenadantes concentrados al 82-85%, puede tener diversos efectos químicos sobre los componentes del medio e incluso de las posibles bacteriocinas presentes, pues el eliminar la totalidad del agua presente, irremediablemente conlleva un cambio sobre las características químicas de las moléculas. Siendo un tratamiento tan drástico por las bajas presiones y temperaturas que maneja, es probable que la actividad antimicrobiana se vea de alguna manera alterada. En este sentido, el concentrar usando un rotavapor permitió tener un mejor control del sobrenadante final, de sus componentes y de su asepsia, además de que es un método que ya ha sido empleado por otros investigadores (Vignolo *et. al.* 1993). Estas cuestiones pueden ser también responsables de los comportamientos observados en las curvas de crecimiento de *S. Typhimurium*, sobre todo en la obtenida al hacerla crecer en el concentrado al 83.85% de la cepa 77ch (figura 17, curva verde cepa 77ch). Como se puede ver, el comportamiento del crecimiento en el concentrado al 45% de la cepa 77ch (curva roja) posee la misma tendencia que el del control positivo (curva azul), sólo que un ciclo logarítmico por debajo; por otro lado, el aumento observado en el concentrado al 83.85% resultó distinto a lo esperado, ya que en vez de disminuir de la misma manera en que se observó al crecer en el concentrado con rotavapor (curva roja), aumentó dos ciclos logarítmicos con respecto a éste último, y un ciclo logarítmico con respecto al control positivo (curva azul).

Los resultados obtenidos a partir de los sobrenadantes concentrados de las bacterias lácticas del pozol son prometedores, pues según lo mostrado en las figuras 17-20, los SCNTB de las cepas son capaces de generar un efecto bacteriostático importante a las 24 horas, mismo que, de ser más estudiado, puede ser aprovechado para una conservación del pozol o de algún otro alimento.

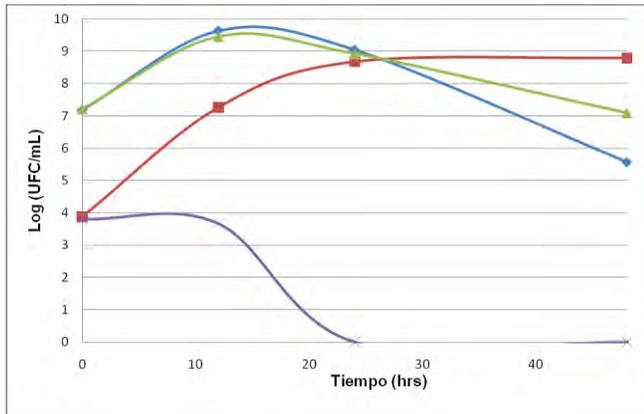
Se ha de considerar que las concentraciones de las bacterias patógenas evaluadas en el presente trabajo son elevadas, mientras que en el alimento podrían estar en una concentración baja, por lo que el efecto de inhibición aquí observado puede presentarse de manera diferente. Además, es importante tomar en cuenta la presencia de otras posibles bacteriocinas producidas por otras bacterias lácticas diferentes, lo que podría provocar un efecto sinérgico entre ellas.

7.1.2.2. Pruebas de reto entre bacterias ácido lácticas y *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*

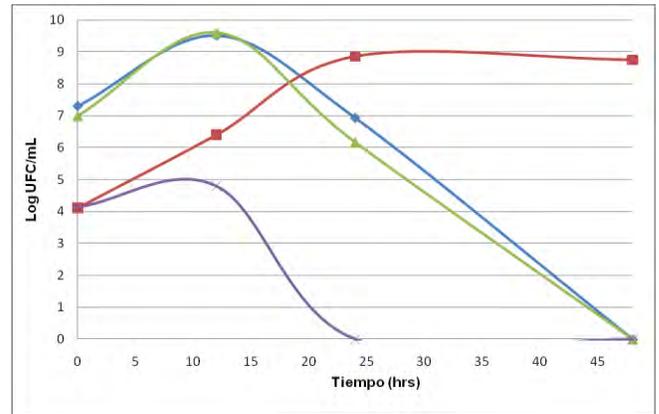
Las figuras 21 y 23 muestran las curvas de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*, respectivamente, creciendo en caldo MRS junto con cada una de las cepas de BALs aquí estudiadas. Las bacterias patógenas se inocularon en menor cantidad debido a que debía simularse su presencia como una contaminación en un modelo alimentario en donde las bacterias lácticas son dominantes.

En las figuras 22 y 24 se presentan las curvas del descenso de pH para cada uno de los cultivos durante todo el desarrollo de las pruebas.

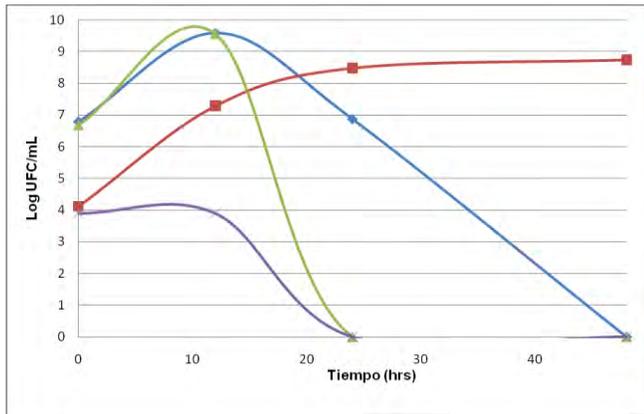
Según la figura 21, se puede observar que, en general, las curvas de crecimiento muestran similitudes. En todos los casos, *Salmonella* Typhimurium únicamente consigue mantener su cuenta inicial a las 12 horas de incubación, para después verse inhibida por completo a las 24 horas al crecer en el cultivo mixto junto a las bacterias lácticas (curvas moradas). Este comportamiento resalta al comparar su desarrollo al crecer sola en el control positivo (curvas rojas), en el que alcanza valores de hasta 10^9 UFC/mL a las 48 horas, cuando al parecer se encuentra en su fase estacionaria.



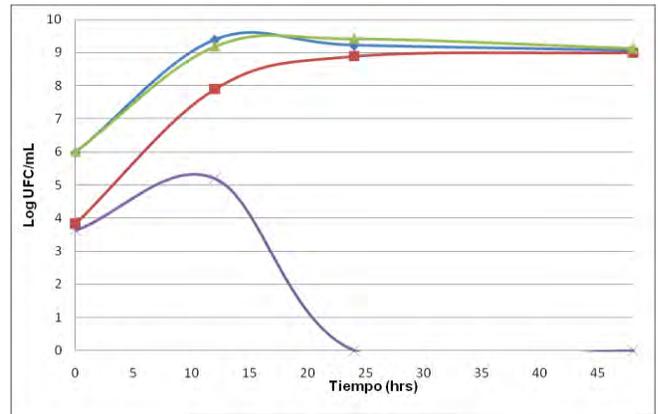
73 (*Leuconostoc mesenteroides*)



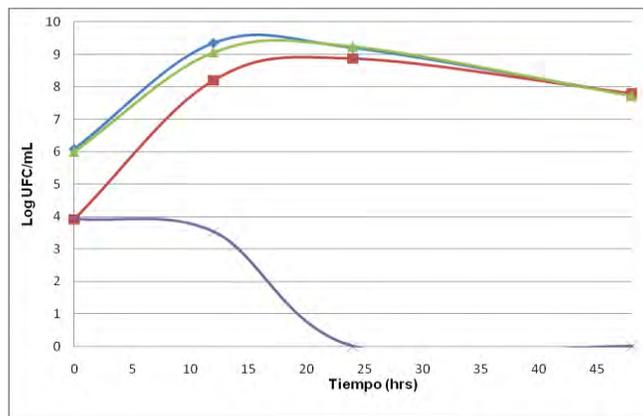
74g (*Leuconostoc pseudomesenteroides*)



74ch (*Leuconostoc mesenteroides*)



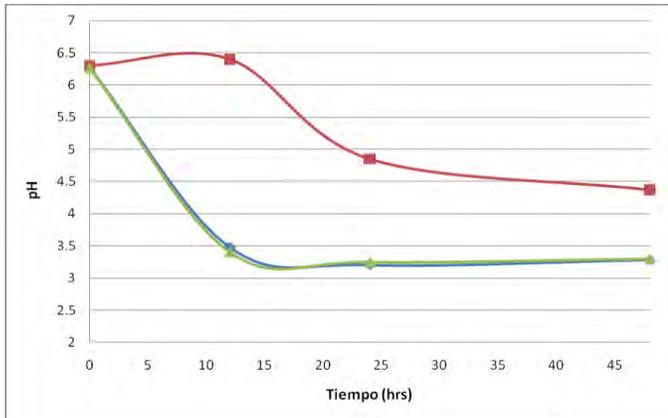
77g (*Lactobacillus fermentum*)



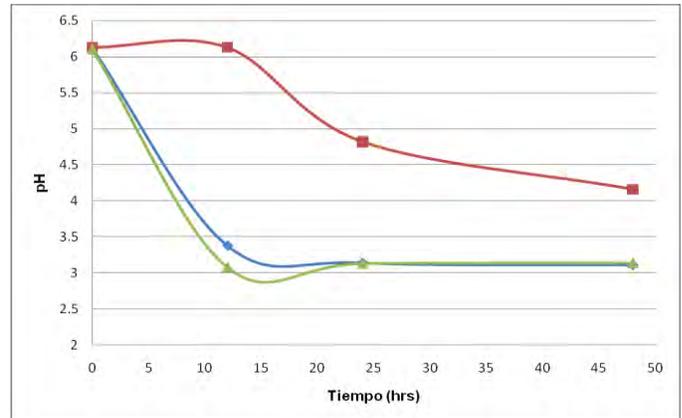
77ch (*Lactobacillus fermentum*)

Figura 21. Sobrevivencia de *Salmonella* Typhimurium en las pruebas de reto practicadas con cada una de las cinco cepas de bacterias lácticas estudiadas en este proyecto.

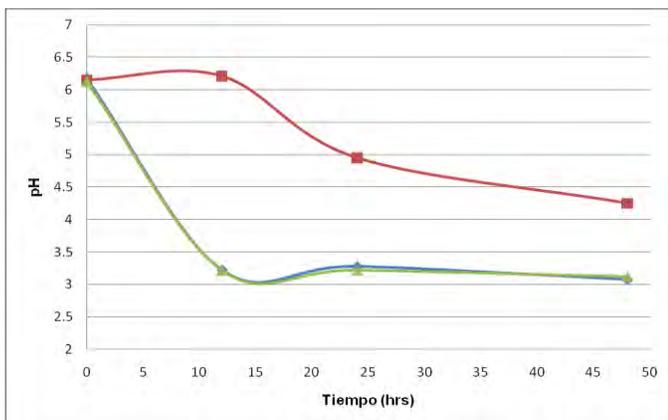
- Las curvas azules representan el crecimiento de las BAL en cultivo puro en caldo MRS (BAL+)
- Las curvas rojas indican el crecimiento de *S. Typhimurium* en cultivo puro en caldo MRS (*Salmonella* +)
- ▲— Las curvas verdes muestran el crecimiento de las BALs creciendo en cultivo mixto con *S. Typhimurium* (Mezcla BAL)
- ✕— Las curvas moradas indican el crecimiento de la bacteria patógena en cultivo mixto con la BAL correspondiente (Mezcla *Salmonella*)



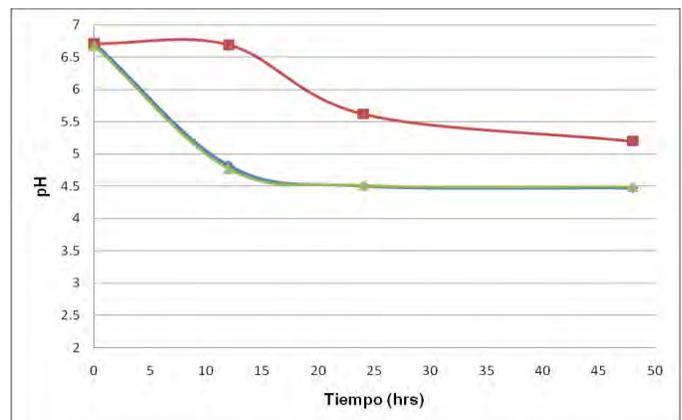
73 (*Leuconostoc mesenteroides*)



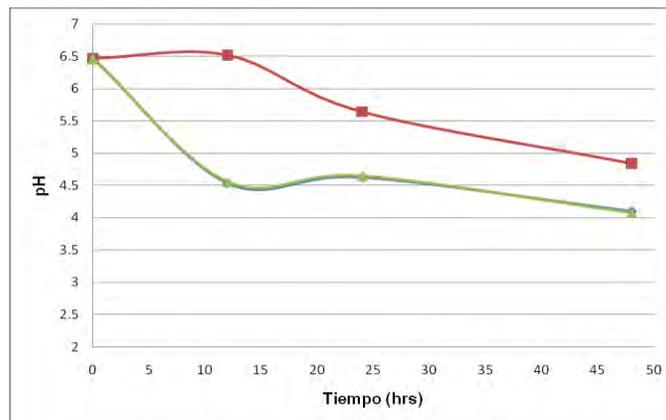
74g (*Leuconostoc pseudomesenteroides*)



74ch (*Leuconostoc mesenteroides*)



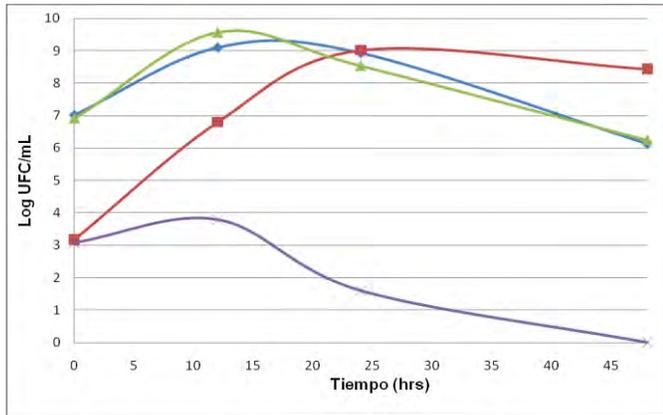
77g (*Lactobacillus fermentum*)



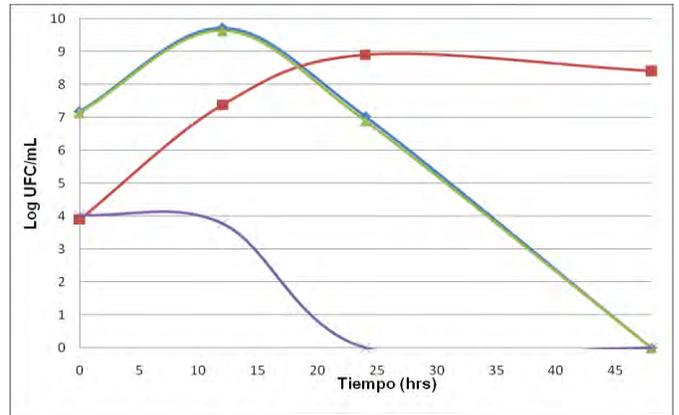
77ch (*Lactobacillus fermentum*)

Figura 22. Curvas del monitoreo de pH durante cada una de las pruebas de reto entre las BALs y *Salmonella* Typhimurium.

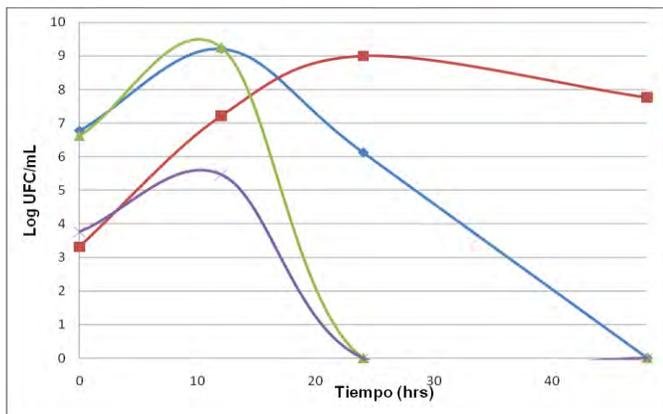
- Las curvas azules indican el descenso de pH provocado por la BAL como cultivo puro en caldo MRS (BAL),
- Las curvas rojas indican el de *S. Typhimurium* como cultivo puro (*Salmonella*+)
- Las curvas verdes representan el descenso del pH producido en el cultivo mixto entre la BAL y *S. Typhimurium* (Mezcla)



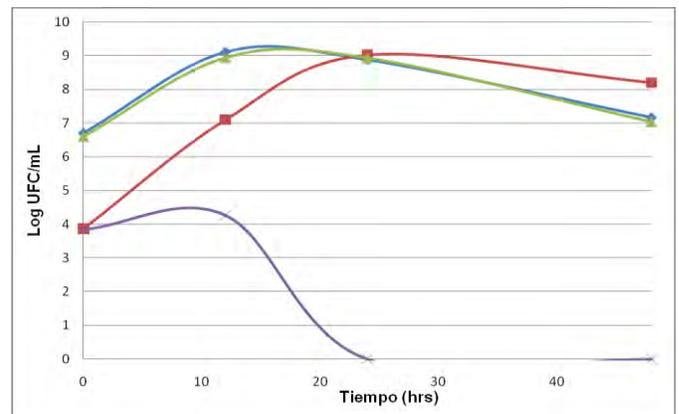
73 (*Leuconostoc mesenteroides*)



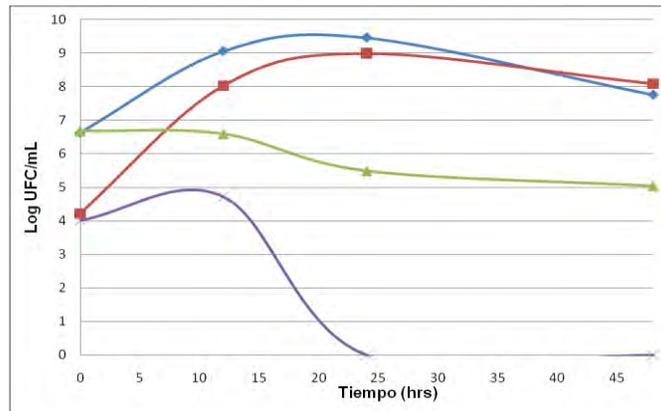
74q (*Leuconostoc pseudomesenteroides*)



74ch *Leuconostoc mesenteroides*



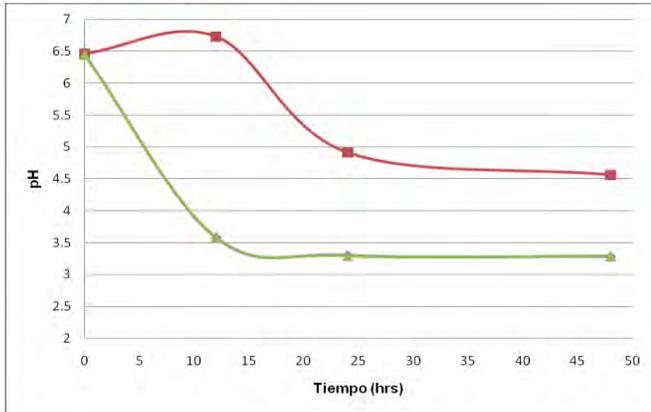
77g (*Lactobacillus*)



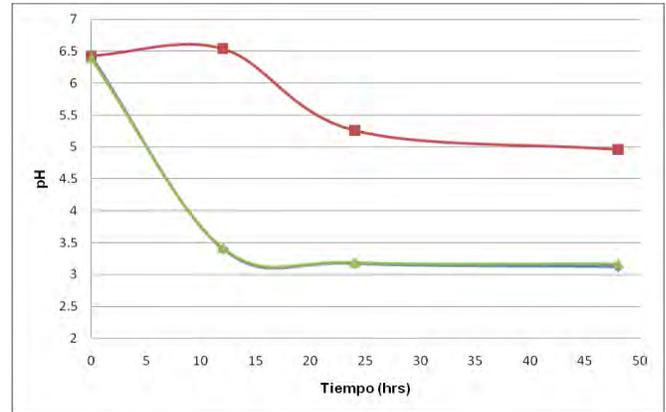
77ch (*Lactobacillus fermentum*)

Figura 23. Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en las pruebas de reto practicadas con cada una de las cinco cepas de bacterias lácticas estudiadas en este proyecto.

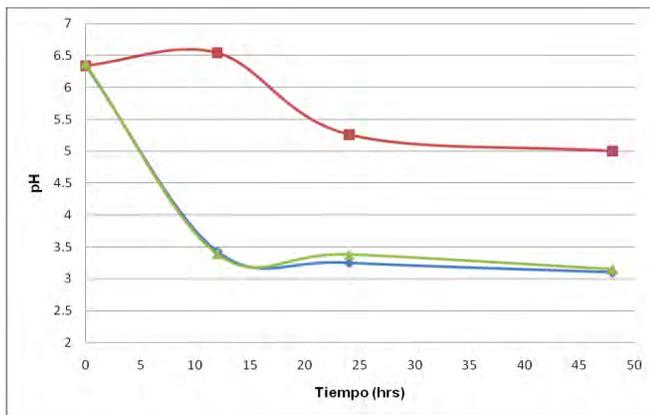
- ◆— Las curvas azules representan el crecimiento de las BAL como cultivo puro en caldo MRS (BAL+)
- Las curvas rojas indican el crecimiento de *L. monocytogenes* como cultivo puro en caldo MRS (*Listeria*+))
- ▲— Las curvas verdes muestran el crecimiento de las BALs en cultivo mixto con *L. monocytogenes* (Mezcla BAL)
- ×— Las curvas moradas indican el crecimiento de la bacteria patógena en cultivo mixto con la BAL correspondiente (Mezcla *Listeria*)



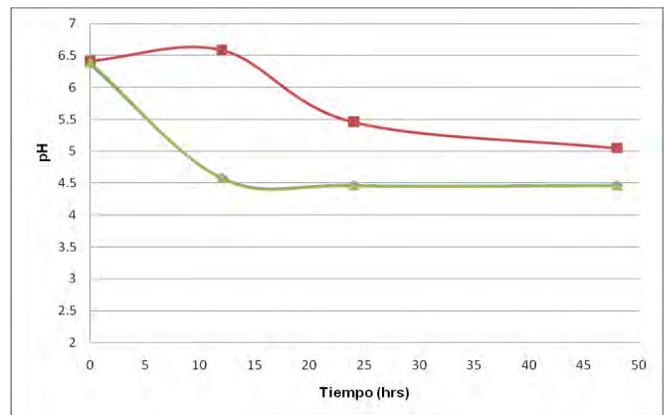
73 (*Leuconostoc mesenteroides*)



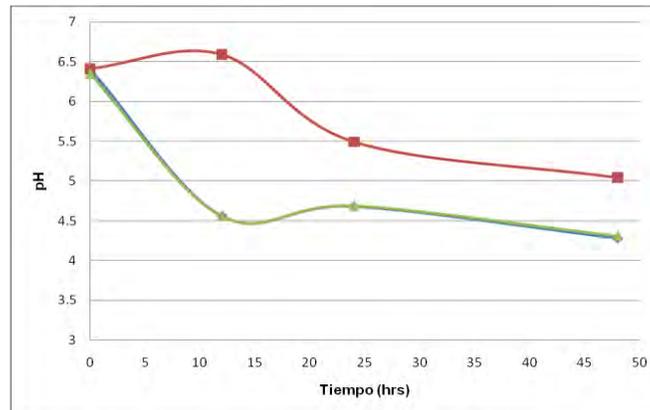
74g (*Leuconostoc pseudomesenteroides*)



74ch (*Leuconostoc mesenteroides*)



77g (*Lactobacillus fermentum*)



77ch (*Lactobacillus fermentum*)

Figura 24. Curvas del monitoreo de pH durante cada una de las pruebas de reto entre las BALs y *Listeria monocytogenes*.

- Las curvas azules indican el descenso de pH provocado por la BAL como cultivo puro en caldo MRS (BAL+),
- Las curvas rojas indican el descenso de pH de *L. monocytogenes* como cultivo puro (*Listeria*+)
- Las curvas verdes representan el descenso del pH producido en el cultivo mixto con la BAL y *L. monocytogenes* (Mezcla)

En cuanto a las curvas obtenidas para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en las pruebas de reto (figura 23) se observa que al igual que con *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* logró ser inhibida por completo por la mayoría de las cepas de BALs desde las 24 horas (curvas moradas). La cepa 73, sin embargo, no la inhibió sino hasta las 48 horas. En todos los casos, es muy importante este resultado, ya que al comparar el crecimiento de la patógena con su control positivo (curvas rojas), se observa que en éste, *Listeria* crece hasta 10^9 UFC/mL al alcanzar las 24 horas y mantiene esta cuenta hasta las 48 horas, tiempo en el que inició su fase de muerte.

Por el contrario, las bacterias lácticas fueron las que presentaron algunas diferencias. Se observó que las cepas 74g y 74ch, murieron a las 48 horas al crecer solas en caldo MRS. La cepa 74g mostró el mismo comportamiento incluso al crecer junto a *Salmonella* y junto a *Listeria*; pero la 74ch se inhibió por ambas patógenas, pues murió a las 24 horas junto con éstas, con la diferencia de que la bacteria láctica alcanzó una concentración máxima mucho más alta a las 12 horas que *Salmonella* y que *Listeria*. En ambos casos, las bacterias lácticas tuvieron un crecimiento máximo a las 12 horas tanto en su control negativo como en el cultivo mixto (mezcla) logrando crecer hasta casi 1×10^{10} UFC/mL. Por otro lado, las cepas 73, 77g y 77ch, aunque también alcanzaron un crecimiento máximo similar a los casos anteriores, no murieron a las 48 horas, sino que, en el caso de las cepas 77g y 77ch, entraron en fase estacionaria; mientras que la cepa 73 pareció entrar a su fase de muerte. Nótese, sin embargo, que el comportamiento de la cepa 77ch en presencia de *L. monocytogenes* (curva verde cepa 77ch, figura 23) fue diferente al de su control positivo (curva azul). Junto con la bacteria patógena, la BAL redujo su crecimiento desde las 12 horas en aproximadamente tres ciclos logarítmicos con respecto a su control positivo. Las concentraciones de la bacteria ya no se recuperaron durante el transcurso de la prueba, sino que sólo se mantuvieron. Considerando las diferencias descritas, se han de seleccionar los cultivos que presentaron mayor actividad y resistencia en caso de querer seleccionarlos como bio-conservadores.

Las concentraciones bajas alcanzadas por las BALs a las 48 horas, así como la muerte de las bacterias lácticas 74g y 74ch al mismo tiempo de incubación, probablemente están muy relacionadas con el pH que lograron. Las figuras 22 y 24 muestran los valores de pH producidos por las BALs durante todo el desarrollo de las pruebas. Lo que se observó inmediatamente en todos los gráficos, es que el pH generado tanto en los controles positivos de las BALs (curvas azules) como en la mezcla de cultivos (curvas verdes) fueron prácticamente los mismos, indicando que el pH en los cultivos mixtos fue impuesto por la bacteria láctica. El pH logró ser reducido hasta poco más de 3.0 desde las 24 horas, y descendió más a las 48 horas por las cepas 73, 74g y 74ch. Las cepas 77g y 77ch redujeron el pH hasta 4.5 y 4.0 respectivamente. Los valores de pH tan bajos son, como se sabe, un factor de inhibición para muchas bacterias, en este caso para *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*; sin embargo, pueden ser también responsables de la muerte de las bacterias lácticas, en este caso, de las cepas 73, 74g y 74ch, las cuales fueron las que produjeron valores de pH más bajos. Las cepas 77g y 77ch, en cambio, sobrevivieron por más tiempo, probablemente por no alcanzar un pH tan bajo; aún así, lograron inhibir a las bacterias patógenas desde las 12 horas de incubación. En cuanto a estas últimas, se ha de considerar que, aunque no a los mismos niveles, también lograron reducir el pH del medio a valores de 4.0-4.5, en el caso de *Salmonella* (figura 22); y a un valor de 5.0 en el caso de *Listeria* (figura 24). Ambos son descensos importantes que, sin embargo, no parecen contribuir en los cultivos mixtos, pues debido a la muerte de las patógenas a las 24 horas, el pH del medio fue establecido por las bacterias lácticas durante toda la prueba (figuras 23 y 24, curvas azules y verdes)

Las especies de *Leuconostoc* son comúnmente encontradas y utilizadas al inicio de la fermentación de diversos alimentos, debido a que logran reducir el pH rápidamente. Esto permite dar lugar a que otras bacterias lácticas continúen el proceso, mientras también inhiben a bacterias indeseables. Las bacterias que generalmente son las que se encuentran en los puntos intermedios de la fermentación son del género *Lactobacillus*, pues muchas de sus especies son más ácido-tolerantes y logran incluso encontrarse en los tiempos finales de dicho proceso (Steinkraus,

1992). Esta información corresponde a lo observado en los resultados presentados, pues fueron precisamente las cepas identificadas como parte del género *Leuconostoc* (73, 74g y 74ch) las que lograron reducir el pH a niveles bajos de forma más rápida; mientras que las cepas identificadas como *Lactobacillus fermentum* (77g y 77ch), fueron menos rápidas en reducir el pH y además, más ácido-tolerantes.

Comparando estos resultados con los que se muestran en las figuras 17-20 de la sección 7.1.2.1.4, lo más notable es la diferencia que existe entre las inhibiciones producidas a las bacterias patógenas, ya que éstas en presencia de los cultivos vivos de las bacterias lácticas sí logran ser inhibidas por completo, mientras que en presencia sólo de los compuestos extracelulares concentrados en los sobrenadantes, sólo hay un efecto bacteriostático. El pH parece ser uno de los factores más importantes para la inhibición de *S. Typhimurium*, pues como se observa en la figura 22, el patógeno creciendo solo, alcanza únicamente valores de pH de poco menos de 5.0; además, varias investigaciones han concluido que la reducción de pH debido a la producción de ácidos orgánicos es el principal efecto inhibitorio por parte de las bacterias ácido lácticas (Carrasco *et al.*, 2002; Martín del Campo, *et al.*, 2008). Sin embargo, para el caso de *L. monocytogenes* podría pensarse que el pH no es del todo el responsable de la inhibición de ésta, pues es una bacteria que logra tolerar niveles de pH menores a 5.2 en los alimentos, y aunque presenta una disminución en su crecimiento, se mantiene viable (Wagner y McLauchlin, 2008), lo que podría indicar que, en los resultados obtenidos para este proyecto, son otros factores los responsables de que este patógeno muriera, pudiéndose tratar de bacteriocinas u otros compuestos antagónicos generados por las BAL.

Considerando la posible presencia de bacteriocinas, dados los resultados obtenidos con el uso de los sobrenadantes concentrados (sección 7.1.2.1.4), debe considerarse que se ha visto que dichos compuestos proteicos tienen una mayor actividad a valores de pH bajos, es decir, que hay una relación entre el pH del medio y la actividad de las bacteriocinas. Este fenómeno es obvio tomando en cuenta que las bacteriocinas, siendo compuestos proteicos, se ven afectadas por el pH del medio en

su estructura y, en consecuencia, en su actividad (Ray y Bhunia, 2008). Se sabe que las bacteriocinas ejercen una mejor actividad inhibitoria a un valor de pH alrededor de 5.0, por ejemplo la curvacina A, producida por *Lactobacillus curvatus*, posee una mayor producción y actividad a valores de pH de 5.1-5.4 (Messens *et al.* 2002). Otro ejemplo es la bacteriocina sintetizada por *Leuconostoc mesenteroides* L124, cuya mayor inhibición hacia *L. monocytogenes* la mostró a un valor de pH de 5.5 (Mataragas *et al.* 2002). En el caso de los experimentos aquí presentados, existe la posibilidad de que el efecto de las posibles bacteriocinas presentes en los sobrenadantes concentrados de las cepas de BALs aisladas del pozol no haya sido óptimo debido a que el ajuste del pH en los sobrenadantes fue más cercano a la neutralidad (6.5-7.0, sección 6.1.3.1.1) que a la acidez. Por el contrario, pudieron verse favorecidas, en parte, al encontrarse en los cultivos vivos a causa del pH ácido provocado por las bacterias lácticas.

La posible acción de las bacteriocinas en la inhibición presentada, puede ser argumentada también vía las curvas de crecimiento. Muñoz-Rojas (2003) declara que la producción de bacteriocinas se ha visto estar asociada a la transición entre la fase logarítmica de crecimiento y la fase estacionaria. En los experimentos realizados en este proyecto se pudo observar que, según las curvas de crecimiento obtenidas, las bacterias ácido lácticas mostraron su efecto inhibitorio hacia *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* a las 12 horas, momento en el que se vio un cambio de la fase logarítmica a la fase estacionaria de cada BAL, lo que daría indicios del efecto debido a las bacteriocinas.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en esta sección y en la 7.1.2.1.4, se observó que la inhibición hacia *Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes* fue mejor cuando se hicieron crecer en presencia de los cultivos vivos de las bacterias lácticas del pozol, pues de esta manera, el efecto fue letal (figuras 21 y 23); mientras que al hacerlas crecer en los SCNTB, el efecto sólo fue bacteriostático (figuras 17-20 de la sección 7.1.2.1.4). Las aplicaciones de las bacteriocinas como bio-conservadores, bien puede darse agregando el compuesto purificado directamente al alimento, o bien usando a la cepa productora con el propósito de que lo sintetice *in situ* (Riley y Wertz, 2002; Chen y Hoover, 2003). Para la conservación del alimento

(en este caso, del pozol), es necesario seleccionar a las mejores cepas, es decir, a aquellas que mostraron una inhibición más pronunciada hacia las dos patógenas. En este caso, las cepas 73 y 77g mostraron una mejor inhibición y comportamiento hacia ambas bacterias indeseables, al hacerlas crecer directamente con el cultivo vivo (prueba de reto), pues no sólo mataron a las patógenas, sino que también se mantuvieron vivas hasta las 48 horas (figuras 21 y 23). En cuanto a los SCNTB, los mejores efectos se obtuvieron con los de la cepa 73, para *L. monocytogenes*, y la cepa 74g, para *S. Typhimurium*. Sin embargo, en este caso, es necesario seguir realizando pruebas, sobre todo para encontrar un pH óptimo para la actividad de las posibles bacteriocinas, así como el de la concentración mínima inhibitoria.

7.2. Interacciones negativas entre bacterias ácido lácticas predominantes en la fermentación del pozol

Como se mencionó en la sección 6.2 *S. infantarius* 25124, una cepa amilolítica, y *W. confusa* L9, una cepa no amilolítica, son bacterias ácido lácticas aisladas del pozol que se ha reportado que predominan durante todo el proceso de fermentación de dicho alimento (Díaz-Ruiz *et al.* 2003.). Por otro lado, *Lactobacillus plantarum* A6 es una cepa aislada de yuca fermentada que también posee una alta actividad amilolítica (Giraud *et al.* 1991). Se ha propuesto que estas tres bacterias podrían constituir un cultivo iniciador para llevar a cabo una fermentación controlada en el pozol, por lo cual es necesario confirmar que no existan interacciones negativas entre ellas.

A continuación se presentan los resultados obtenidos tras haber ensayado el método de difusión en agar para observar las posibles inhibiciones producidas entre *Lactobacillus plantarum* A6, *Streptococcus infantarius* 25124 y *Weissella confusa* L9.

7.2.1. Método de difusión en agar

7.2.1.1. Preparación y concentración de sobrenadantes de *L. plantarum* A6, *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9

Como se indicó en la sección 6.2.1.3, se obtuvieron los sobrenadantes de *L. plantarum* A6, *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9 con el fin de estudiar en ellos la posible producción de bacteriocinas por parte de dichas bacterias. Esto, debido a que las bacteriocinas son compuestos extracelulares, y por tanto es más apreciable su efecto al trabajar con ellas en un medio libre de células y, de ser posible, concentrado (Vignolo *et al.* 1993; Vallejo *et al.* 2009). Además, es necesario eliminar el efecto de otro tipo de compuestos antagónicos producidos por las mismas BALs, con el fin de incrementar la posibilidad de que sean bacteriocinas las responsables de la inhibición generada. Los ácidos orgánicos son compuestos que influyen mucho en la actividad

antimicrobiana de las bacterias, por ello se recomienda neutralizarlos para descartarlos y corroborar que la inhibición se debe a otro tipo de sustancias (Lewus *et al.* 1991; Hernández López, 2002).

Los valores de pH final de los sobrenadantes de las bacterias lácticas obtenidos según lo descrito en la sección 6.2.1.3 se indican en la tabla 7.7. Además, los volúmenes de sobrenadante obtenidos tras concentrarlos con el uso del rotavapor y bomba de vacío (sección 6.1.3.1.2.1), se muestran en la tabla 7.8

Tabla 7.7. Valores de pH de los sobrenadantes después de ajustar con NaOH

Bacteria ácido láctica	pH final
<i>L. plantarum</i> A6	6.89
<i>S. infantarius</i> 25124	6.6
<i>W. confusa</i> L9	6.7

Tabla 7.8. Concentración de los sobrenadantes de las bacterias lácticas *L. plantarum* A6, *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9.

Sobrenadante de cepa de BAL	Volumen inicial (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final del sobrenadante (%)
<i>L. plantarum</i> A6	100	45	55
<i>S. infantarius</i> 25124	100	36	64
<i>W. confusa</i> L9	100	52	48

7.2.1.1.1. Cuantificación de proteína de los concentrados

En la tabla 7.9, se muestran los resultados de las mediciones de proteína realizadas a los sobrenadantes concentrados de *L. plantarum* A6, *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9. Esta cuantificación se hizo con el fin de observar la existencia de compuestos proteicos de origen extracelular. Ya que las bacteriocinas son compuestos proteicos extracelulares, la cuantificación de proteína en los sobrenadantes concentrados es un indicativo indirecto de la

posible presencia de las mismas. Las mediciones se realizaron por triplicado; en la tabla se muestra el promedio de cada una de las muestras evaluadas. La curva patrón que se ocupó como referencia, se muestra en el anexo III.b.

Tabla 7.9. Cuantificación de proteína de los sobrenadantes concentrados de *L. plantarum* A6, *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9.

Muestra	Proteína [$\mu\text{g/mL}$]
Caldo MRS (control negativo)	2.887
<i>Lactobacillus plantarum</i> A6	13.268
<i>Streptococcus infantarius</i> 25124	27.124
<i>Weissella confusa</i> L9	49.052

De acuerdo con lo presentado en la tabla 7.9, es notoria una diferencia en el contenido de proteína entre el control negativo (caldo MRS sin concentrar), que resultó con 2.887 $\mu\text{g/mL}$, y los sobrenadantes concentrados al ~50% de las bacterias lácticas utilizadas, los cuales resultaron tener arriba de 10 $\mu\text{g/mL}$, lo que pudo ser como consecuencia de una producción extracelular de proteína por parte de las tres bacterias. Considerando que las bacteriocinas son compuestos extracelulares de tipo proteico, la posibilidad de que estos compuestos se encuentren en los sobrenadantes es factible (Ray y Bhunia, 2008).

Haciendo una comparación entre el contenido de proteína de los tres sobrenadantes de las diferentes bacterias, se observa una diferencia entre el sobrenadante de *W. confusa* L9 y el de los dos sobrenadantes restantes. *W. confusa* L9 parece haber producido mayor cantidad de proteína extracelular (49.052 $\mu\text{g/mL}$) que el resto, seguida de *S. infantarius* 25124 (27.124 $\mu\text{g/mL}$), y finalmente *L. plantarum* A6 (13.268 $\mu\text{g/mL}$). Estos resultados son interesantes pues, considerando la presencia de posibles bacteriocinas, se esperaría un resultado más alto en la cuantificación de proteína para el caso de *L. plantarum* A6, pues ya es conocida la producción de dichos compuestos antimicrobianos por parte de esta bacteria (Zapata *et al.* 2008; Smaoui *et al.* 2009); mientras que la producción por parte de *W. confusa* L9 no ha sido muy estudiada, aunque se sabe de la posible producción de sustancias tipo bacteriocinas (Chavasirikunton *et al.* 2007; Serna *et al.* 2010) Sin embargo, los

resultados indican lo contrario, como si fuera ésta última la mayor productora de posibles bacteriocinas. En cuanto al caso de *S. infantarius* 25124, aunque no existe información de esta bacteria como productora de bacteriocinas, el resultado de la cuantificación de proteínas podría sugerir su presencia.

7.2.1.2. Ensayo del método de difusión en agar

En la tabla 7.10 se muestran los resultados de la concentración de *L. plantarum* A6, *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9 a las 24 horas de crecimiento en el caldo MRS que se usó para reactivarlas (sección 6.1.1). Esta cuantificación se realizó con el propósito de conocer el nivel de concentración alcanzado por cada BAL al tiempo de incubación indicado.

Las bacterias con el crecimiento señalado en la tabla 7.10, fueron utilizadas como bacterias sensibles en cada una de las pruebas ensayadas (sección 6.2.1.4), y para obtener sus sobrenadantes con el propósito de concentrarlos y usarlos en cada prueba para estudiar las interacciones negativas entre ellas.

Tabla 7.10. Crecimiento de las cepas de *L. plantarum* A6, *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9 tras 24 horas de incubación a 30° C

Cepa de BAL	UFC/mL
<i>Lactobacillus plantarum</i> A6	5.1x10 ⁹
<i>Streptococcus infantarius</i> 25124	3.7x10 ⁹
<i>Weissella confusa</i> L9	4.0x10 ⁷

Con el propósito de estudiar las interacciones negativas dadas entre las tres cepas de BAL, se consideraron, para un primer ensayo, a los sobrenadantes concentrados de *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9 como extractos con presencia de posibles bacteriocinas, mientras que *L. plantarum* A6 se consideró bacteria sensible (P.1). En un segundo ensayo, los sobrenadantes concentrados de *L. plantarum* A6 y *W. confusa* L9 fueron tomados como extractos con actividad antimicrobiana debida a posibles bacteriocinas, y *S. infantarius* 25124 como la cepa

sensible (P.2). Finalmente, un tercer ensayo consideró a *W. confusa* L9 como cepa sensible, y a los sobrenadantes concentrados de *L. plantarum* A6 y *S. infantarius* 25124 como extractos con posibles bacteriocinas (P.3). Las bacterias sensibles fueron inoculadas en la sobrecapa de BHI; mientras que los sobrenadantes concentrados se colocaron en los pozos practicados en la placa de BHI (sección 6.2.1.4). En cada ensayo, se evaluó la formación de halos de inhibición tras 24 horas de incubación.

Los resultados de cada uno de los tres ensayos (P.1, P.2 y P.3, sección 6.2.1.4) se muestran en las figuras 25, 26 y 27. Los diámetros promedio de los halos de inhibición resultantes en cada prueba se presentan en la tabla 7.11

Tabla 7.11. Diámetro de los halos de inhibición resultantes en los ensayos practicados del método de difusión en agar en *L. plantarum* A6, *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9

Ensayo	Bacteria sensible	Sobrenadante de bacterias productoras	Diámetros promedio de halos de inhibición (mm)
P.1	<i>L. plantarum</i> A6	<i>S. infantarius</i> 25124	17.3
		<i>W. confusa</i> L9	14.3
P.2	<i>S. infantarius</i> 25124	<i>L. plantarum</i> A6	15.6
		<i>W. confusa</i> L9	12.3
P.3	<i>W. confusa</i> L9	<i>L. plantarum</i> A6	---
		<i>S. infantarius</i> 25124	---

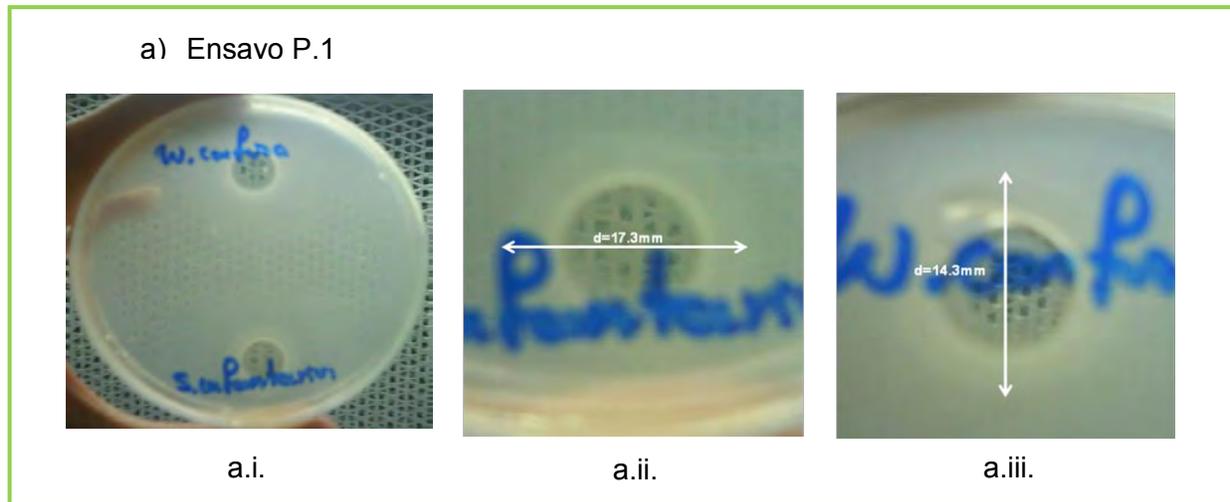


Figura 25. Actividad bacteriocinogénica de las bacterias lácticas por el método de difusión en agar. Ensayo P.1 con *Lactobacillus plantarum* A6 como bacteria sensible; y los sobrenadantes de *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9 como bacterias productoras de posibles bacteriocinas. En a.i se muestran los halos producidos por los sobrenadantes concentrados de ambas bacterias; a.ii muestra el halo generado por el sobrenadante de *S. infantarius* 25124; finalmente, a.iii muestra el halo producido por el sobrenadante de *W. confusa* L9.

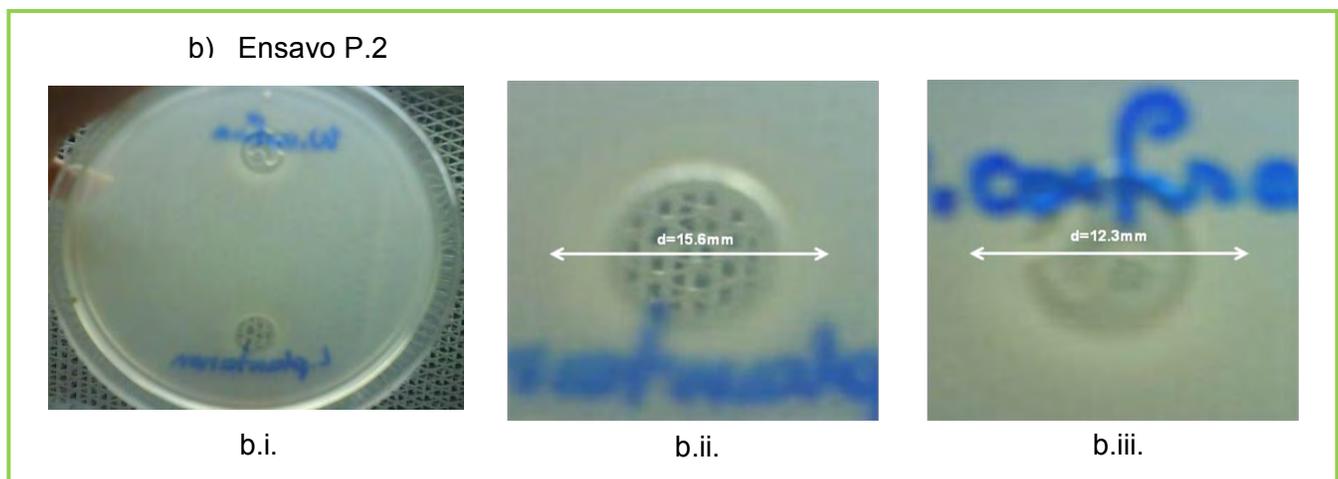
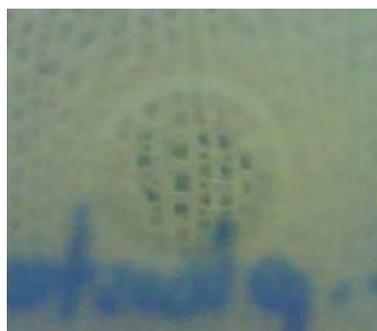


Figura 26. Actividad bacteriocinogénica de las bacterias lácticas por el método de difusión en agar. Ensayo P.2 con *Streptococcus infantarius* 25124 como bacteria sensible y los sobrenadantes concentrados de *L. plantarum* A6 y *W. confusa* L9 como bacterias productoras de posibles bacteriocinas. En b.i se muestran los halos producidos por ambas bacterias; b.ii muestra el halo generado por *L. plantarum* A6; finalmente, b.iii muestra el halo producido por *W. confusa* L9.

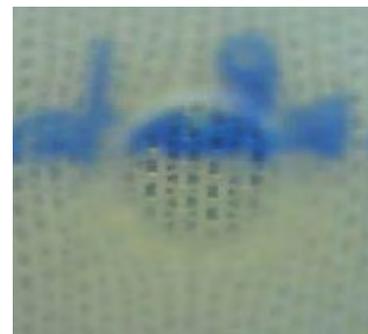
c) Ensayo P.3



c.i.



c.ii.



c.iii.

Figura 27. Actividad bacteriocinogénica de las bacterias lácticas por el método de difusión en agar. Ensayo P.3 con *Weissella confusa* L9 como bacteria sensible y los sobrenadantes concentrados de *L. plantarum* A6 y *S. infantarius* 25124 como bacterias productoras de posibles bacteriocinas. En c.i se muestra la placa obtenida, en la que no se distinguen halos; en c.ii se muestra el pozo en el que se colocó el sobrenadante concentrado de *L. plantarum* A6; finalmente, c.iii muestra el pozo de *S. infantarius* 25124.

Los resultados obtenidos tras los ensayos para ver la posible inhibición entre *L. plantarum* A6, *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9 con el uso del método de difusión en agar indicaron la posible producción de bacteriocinas que, al parecer, pudieron producir para detener el crecimiento entre ellas. Estas suposiciones se ven respaldadas con los resultados de la cuantificación de proteína que se realizó al mismo tiempo (sección 7.2.1.1.1), ya que se tuvo una producción extracelular de proteína importante. Además, la inhibición se dio a partir del uso de sobrenadantes concentrados, es decir que se trató de compuestos extracelulares; por otro lado, el ajuste de pH de dichos sobrenadantes, así como el tratamiento térmico al que se sometieron (sección 6.2.1.3), no afectaron la inhibición, por lo que el efecto de ácidos orgánicos se ve descartado, y se puede considerar la presencia de compuestos termo-resistentes. Todos estos resultados permiten hacer la suposición de que se podría tratar de posibles bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas (Vignolo *et al.* 1993; Vallejo *et al.* 2009).

En los dos ensayos en donde se obtuvieron halos (ensayos P.1 y P.2), éstos resultaron ser halos opacos en vez de claros (figuras 25 y 26), lo que es un indicativo de que la inhibición no fue total, sino parcial; es decir, que los agentes antimicrobianos encontrados en los sobrenadantes concentrados de las bacterias, que posiblemente

son bacteriocinas, no mostraron tener un efecto bactericida, sino bacteriostático, ya que la opacidad en los halos fue menos intensa que la opacidad en el resto de la placa, en la que los microorganismos de prueba crecieron sin problemas; por tanto, una opacidad menor indicó un detenimiento de dicho crecimiento (Daba *et al.* 1991).

Analizando lo obtenido en cada ensayo, se tuvo que en el ensayo P.1 (*L. plantarum* A6 como bacteria sensible, tabla 7.11.) existieron halos de inhibición con los sobrenadantes de *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9 (figura 25), indicando que ambas bacterias lograron un efecto bacteriostático sobre *L. plantarum* A6. El diámetro de los halos (tabla 7.11) indicó que *S. infantarius* 25124 provocó un diámetro de inhibición más grande (17.3 mm) que *W. confusa* L9 (14.3 mm); es decir, que *S. infantarius* 25124 pareció tener un mayor efecto sobre *Lactobacillus plantarum* A6. Aunque *S. infantarius* 25124 no ha sido muy estudiada en cuanto a su producción de bacteriocinas, otras especies del género sí, y se sabe que *Streptococcus bovis* (con quien comparte muchas similitudes) produce varias bacteriocinas, entre ellas las bovicinas 255 y HJ50, la primera una bacteriocina de clase II, mientras que la segunda un lantibiótico (Nes *et al.*, 2007). Ésta última se ha visto tener actividad antimicrobiana hacia *Lactobacillus curvatus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus flavus*, *Leuconostoc dextranicum* y *Leuconostoc mesenteroides* (Xiao *et al.* 2004). Por tanto, la cepa de *S. infantarius* 25124 analizada en este proyecto, bien pudo presentar actividad antimicrobiana debida a posibles bacteriocinas hacia *Lactobacillus plantarum* A6. Por otro lado, *W. confusa* L9, de quien tampoco se han caracterizado bacteriocinas, aunque sí se sabe de sustancias tipo bacteriocinas con actividad antimicrobiana hacia *B. cereus*, *S. aureus* y *S. agalactiae* (Chavasirikunton *et al.* 2007; Serna *et al.* 2010), mostró también un efecto bacteriostático hacia *L. plantarum* A6, aunque, según el promedio de los diámetros obtenidos (tabla 7.11), fue menos intenso que el de *S. infantarius* 25124.

En el ensayo P.2 (*S. infantarius* 25124 como bacteria sensible), se observó la producción de halos de inhibición por parte de los sobrenadantes de *L. plantarum* A6 y *W. confusa* L9 (figura 26), los cuales tuvieron un efecto bacteriostático hacia *S. infantarius* 25124. *L. plantarum* A6 provocó los halos de inhibición más grandes, pues

su promedio fue de 15.6 mm; mientras que los producidos por *W. confusa* L9 fueron de 12.3 mm, con lo que podría decirse que *L. plantarum* A6 tuvo un mejor efecto para inhibir a la bacteria sensible.

Como ya se ha mencionado con anterioridad (secciones 2.2.2 y 7.2.1.1.1), *L. plantarum* A6 ha sido estudiada como una bacteria con gran potencial para producir bacteriocinas. Se han logrado caracterizar diversos tipos de bacteriocinas, como las plantaricinas, con un amplio espectro de inhibición hacia bacterias Gram positivas (Holo *et al.* 2001; Ben Omar *et al.* 2008); la bacteriocina LPBM10, con actividad hacia *B. subtilis*, *B. pumilus*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*, e incluso hacia bacterias Gram negativas, como *S. Typhi*, *E. coli*, *Klebsiella spp.* y *S. marcescens* (Zapata *et al.* 2009); la bacteriocina BacTN635, con actividad también hacia bacterias Gram negativas: *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Hafnia sp.*, y *Serratia sp.*; además de que también presenta inhibición hacia *Candida tropicalis* (Smaoui *et al.* 2009). Dados estos antecedentes, no es difícil pensar que la cepa de *L. plantarum* A6 utilizada en este estudio produzca bacteriocinas con el potencial de inhibir a *S. infantarius* 25124.

Finalmente, en el ensayo P.3 (figura 27), en donde *W. confusa* L9 se probó como bacteria sensible, no se observaron halos por la presencia de los sobrenadantes de *L. plantarum* A6 y *S. infantarius* 25124, lo que sugeriría que ninguna de estas bacterias es capaz de inhibir a *W. confusa* L9. Como se ha mencionado antes, existen muchas cepas de las dos bacterias que se probaron como productoras (Holo *et al.* 2001; Xiao *et al.* 2004; Nes *et al.* 2007; Ben Omar *et al.* 2008) que sí son capaces de producir bacteriocinas, e incluso, por los resultados dados en los ensayos P.1 y P.2 aquí realizados, podría decirse que existe un efecto bacteriostático que podría ser causado por bacteriocinas; sin embargo, ninguna de ellas pareció tener actividad contra *W. confusa* L9.

Un cultivo iniciador puede definirse como preparaciones que contienen gran cantidad de microorganismos que son añadidos a cierto producto para acelerar y asegurar su proceso de fermentación. Al ser microorganismos adaptados al sustrato alimenticio al que se agregan, facilitan el control de la fermentación además de que

permiten predecir los productos finales (Holzapfel, 2000). Las tres bacterias lácticas aquí estudiadas, podrían considerarse como cultivos iniciadores potenciales para la fermentación controlada del pozol, debido a que se han logrado aislar de él, por lo que se considera como uno de sus nichos naturales; y por otro lado, se sabe que *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9 son especies dominantes durante la fermentación de dicho alimento (Díaz-Ruiz *et al.* 2003; Ben Omar *et al.* 2000).

Weissella confusa ha sido ya probada como cultivo iniciador en la fermentación de alimentos a base de cereales, como el gowé (alimento fermentado a base de sorgo consumido en Benin), y otras masas ácidas a base trigo, teniendo éxito al lograr producir un alimento muy similar al obtenido tras la típica fermentación espontánea, así como al inducir una rápida colonización por otras bacterias lácticas y reducir la cuenta de las bacterias patógenas (Vieira-Dalodé *et al.* 2008; Galle *et al.* 2010). Por otro lado, la cepa de *L. plantarum* A6 utilizada para estas pruebas, es una bacteria amilolítica aislada de la yuca capaz de sintetizar cantidades importantes de α -amilasa extracelular con el poder de degradar almidón crudo de una manera casi tan rápida como degrada la glucosa. La producción de amilasas es una característica muy poco común en las bacterias ácido lácticas, lo que hace a *L. plantarum* A6 un importante foco de estudio, porque además, produce cantidades de ácido láctico mayores en comparación con otras cepas, lo que permite obtener productos fermentados con características organolépticas deseables. Aunado a esto, se considera prometedor su uso como cultivo iniciador en alimentos tradicionales fermentados a base de materia prima rica en almidón crudo (es decir, gránulos de almidón cristalinos e insolubles) (Giraud *et al.* 1994). Dadas estas características *L. plantarum* A6 podría ayudar durante la primera etapa para degradar el alto contenido de almidón, sustrato principal en el maíz nixtamalizado utilizado para preparar el pozol. Esta bacteria ha sido ampliamente investigada como cultivo iniciador en la producción de masas ácidas a base de trigo (Todorov *et al.* 2003), así como en la fermentación de alimentos a base de maíz como el ogi, logrando tener éxito en su producción, debido a la rápida fermentación generada, así como a sus propiedades organolépticas, que no muestran diferencia significativa entre los productos obtenidos vía la fermentación tradicional (Adebawo *et al.* 2000). Finalmente, aunque de *Streptococcus infantarius* no se tienen

reportes de su uso como cultivo iniciador, *Streptococcus bovis*, una bacteria con quien está cercanamente emparentada, ha sido evaluada como tal en la fermentación de productos lácteos, como el dahi, un producto de leche fermentada originario de Bangladesh (Harun-ur-Rashid *et al.* 2007); asimismo, en la fermentación y producción de gari africano (alimento a base de yuca), esta bacteria se tiene considerada como un buen cultivo iniciador debido a su gran capacidad amilolítica (Olasupo *et al.* 2010). Sin embargo, dado el efecto bacteriostático que se dio entre los sobrenadantes concentrados, neutralizados y con tratamiento térmico de *L. plantarum* A6 y *S. infantarius* 25124; así como entre los de *W. confusa* L9 y *L. plantarum* A6 y *S. infantarius* 25124 (tabla 11 y figuras 25 y 26), es necesario hacer más estudios para corroborar si en un cultivo mixto, en efecto hay inhibiciones sobre el crecimiento de estas tres bacterias.

8. Conclusiones

8.1. Interacciones negativas hacia bacterias patógenas

- ❖ Las cinco cepas de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol y utilizadas para este estudio fueron identificadas como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (cepas 73 y 74ch), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (cepa 74g) y *Lactobacillus fermentum* (cepas 77g y 77ch).
- ❖ Los sobrenadantes libres de células concentrados, neutralizados y con tratamiento térmico de cada una de las cinco cepas de BAL utilizadas (SCNTB), mostraron un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium después de 24 horas de incubación. Dicho efecto, se vio influido por la concentración de los sobrenadantes.
- ❖ El efecto bacteriostático mostrado por los SCNTB, pudo ser causado por posibles bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas utilizadas en este proyecto.
- ❖ Los SCNTB de las cepas 73, 77g y 77ch mostraron un mayor efecto bacteriostático sobre *L. monocytogenes*.
- ❖ El SCNTB de la cepa 74g mostró una inhibición mayor sobre *S. Typhimurium*.
- ❖ Los cultivos de las cepas de bacterias ácido lácticas 73, 74g, 74ch, 77g y 77ch lograron inhibir por completo a *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* a las 24 horas al hacerlas crecer juntas en un sistema alimentario modelo (caldo MRS)

- ❖ Las cepas de bacterias ácido lácticas 73, 74g, 74ch, 77g y 77ch aisladas del pozol y utilizadas en este proyecto, tienen un gran potencial para ser usadas como bioconservadores si se considera aplicarlas como cultivos vivos directamente en el alimento.

8.2. Interacciones negativas entre bacterias ácido lácticas predominantes en la fermentación del pozol

- ❖ Se encontró que el sobrenadante concentrado, neutralizado y con tratamiento térmico de *Weissella confusa* L9 fue capaz de producir un efecto bacteriostático en el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* A6 y *Streptococcus infantarius* 25124 con el uso del método de difusión en agar.
- ❖ Se observó, asimismo, una inhibición de tipo bacteriostático entre los sobrenadantes concentrados, neutralizados y con tratamiento térmico de *Lactobacillus plantarum* A6 y *Streptococcus infantarius* 25124 usando el mismo método.
- ❖ Las inhibiciones producidas entre *L. plantarum* A6, *S. infantarius* 25124 y *W. confusa* L9 pudieron ser debidas a posibles bacteriocinas producidas por cada una de las bacterias ensayadas, debido a que el efecto se obtuvo a través del uso de sobrenadantes libres de células, que mostraron un contenido importante de proteína, manifestaron termorresistencia y no hubo inhibición de la actividad al neutralizar el pH de los ácidos orgánicos.

9. Perspectivas

- ❖ Ahondar en el estudio de las posibles bacteriocinas producidas por las cinco cepas de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol, vía el uso de enzimas proteolíticas que garanticen su naturaleza proteica; así como el de otras bacterias Gram positivas como cepas sensibles que permitan un mejor conocimiento de su espectro de inhibición.
- ❖ Buscar la concentración mínima inhibitoria de los sobrenadantes concentrados, neutralizados y con tratamiento térmico de las bacterias lácticas del pozol (SCNTB), suficiente para inhibir a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium, con el propósito de observar si, de esta manera, el efecto bacteriostático encontrado en este proyecto no es reversible a las 48 horas.
- ❖ Caracterizar y purificar las posibles bacteriocinas producidas por las cinco cepas de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol, y estudiar su posible adición al pozol u otros alimentos con el propósito de mejorar su inocuidad.
- ❖ Llevar a cabo pruebas de reto semejantes a las realizadas en este estudio, pero con el uso de un sustrato más similar al pozol. Esto, con el fin de observar el comportamiento de las cinco cepas de bacterias ácido lácticas aquí estudiadas y su efecto hacia las mismas bacterias patógenas, en una matriz alimentaria parecida a dicho alimento.
- ❖ Estudiar el comportamiento de *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus infantarius* y *Weissella confusa* al crecer juntas en una matriz alimentaria semejante a la del pozol, con el propósito de utilizarlos como cultivo iniciador mixto en dicho alimento.

- ❖ Realizar más experimentos en cuanto a la posible producción de bacteriocinas por parte de *L. plantarum*, *S. infantarius* y *W. confusa*, usando enzimas proteolíticas, ensayando su actividad inhibitoria frente a otras bacterias e intentando purificar y caracterizar los agentes antimicrobianos presentes en sus sobrenadantes.

10. Anexos

Anexo I. Reactivos

En la siguiente tabla se enlistan los reactivos utilizados en la metodología (sección 6) por orden de aparición.

Tabla 9.1. Reactivos utilizados en la metodología (sección 6)

Reactivo	Marca
Buffer TES	Ver I.a.
Lisozima (20 mg/mL)	Sigma®
Pronasa (20 mg/mL)	Sigma®
RNAasa (20 mg/mL)	Sigma®
SDS (10%)	Ver I.b.
Fenol.cloroformo	Sigma®
Etanol absoluto	J.T. Baker®
Agarosa	InvitroGen®
Buffer TBE	Ver I.c.
Buffer de carga (colorante para electroforesis)	Ver I.d.
Marcador para electroforesis	Φx174 RF DNA/Hae III Fragments de InvitroGen®
Bromuro de etidio (3%)	Bio-Rad®
Cebador pA	InvitroGen® (según especificaciones)
Cebador 3	InvitroGen® (según especificaciones)
Cebador γ	InvitroGen® (según especificaciones)
Buffer PCR (10x)	Applied BioSystems®
Cloruro de magnesio (MgCl ₂ 25 mM)	Applied BioSystems®
dNTPs	InvitroGen®
Taq polimerasa	Applied BioSystems®
Hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 M	Ver I.e.
Reactivo de Bradford (azul de Coomassie)	Bio-Rad®
Solución salina 0.85%	Ver I.f.
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O)	J.T. Baker®
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O)	J.T. Baker®

I.a. Buffer TES (Tris-EDTA-Cloruro de sodio) 10x

Para preparar 100 mL de buffer TES 10x se pesaron 0.605 g de tris marca Sigma® y 0.2922 g de cloruro de sodio marca J.T. Baker®. Se colocaron en un matraz aforado de 100 mL al que se adicionó 1mL de EDTA 0.5 M (pH = 8) (ver II.g) de la marca J.T. Baker® y finalmente se llevó al aforo con agua destilada. Se trasvasó a un recipiente de vidrio con tapa, y se mantuvo a 4° C.

I.b. SDS (Dodecil sulfato de sodio) 10%

Para preparar 1 L de SDS al 10% (p/v) se pesaron 100 g de SDS marca Bio-Rad®, se colocaron en 900 mL de agua destilada. Se calentó a 68° C para lograr disolver. Posteriormente se ajustó el pH a 7.2 agregando gotas de ácido clorhídrico concentrado de la marca J.T. Baker®. Finalmente, la solución se trasvasó a un matraz aforado de 1000 mL y se llevó hasta el aforo, se agitó y se guardó la solución en un recipiente cerrado.

I.c. Buffer TBE (Tris-Ácido bórico-EDTA) 10x

Para preparar 500 mL de buffer TBE 10x se colocaron 34 g de tris de la marca Sigma® y 27.7 g de ácido bórico marca J.T. Baker® en un matraz aforado de 500 mL. A continuación se agregaron 2 mL de EDTA 0.5 M (pH = 8) preparada con EDTA sal sódica cristal de J.T. Baker®. Se agregó agua destilada hasta el aforo y se homogenizó. Finalmente se transfirió a un recipiente de vidrio con tapa y se mantuvo en refrigeración a 4° C.

I.d. Buffer de carga (colorante para electroforesis)

Para preparar 25 mL de colorante, en un matraz aforado de 25 mL se agregaron 12.5 mL de glicerol anhidro marca J.T. Baker® diluido al 50% en agua; 1 mL de buffer TAE 2x (ver II.h.) y 0.0625 g de azul de bromofenol. En seguida se llenó el

matraz hasta el aforo, se homogenizó, se repartieron alícuotas de 0.5 mL en micro-tubos de plástico estériles y se mantuvieron a -10° C.

I.e. Hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 M

Se prepararon 100 mL pesando 20 g de lentejas de hidróxido de sodio grado analítico de la marca Mallinckrodt AR®. Se colocaron en un matraz aforado de 100 mL y se homogeneizó lentamente con agua destilada hasta total disolución. Se siguió agregando agua hasta el aforo, se agitó y finalmente se colocó la solución en un frasco ámbar etiquetado.

I.f. Solución salina 0.85%

Para preparar 100 mL de solución salina al 0.85% se pesaron 0.85 g de cloruro de sodio de la marca J.T. Baker®, en seguida, se colocaron en un matraz aforado de 100 mL y se agregó agua destilada hasta el aforo. Se homogeneizó y posteriormente se llenaron viales con 4.5 mL de la solución preparada. En seguida se procedió a esterilizarlos con autoclave a 121° C y 1 atm de presión por 15 minutos. Finalmente, los viales con solución salina se sometieron a prueba de esterilidad a 30° C durante 24 horas

I.g. EDTA 0.5 M (ácido etilendiaminotetracético)

Para preparar 100 mL de EDTA 0.5 M se pesaron 18.612 g de cristales de EDTA de la marca J.T. Baker®. Se agregó agua hasta lograr disolverlo para posteriormente ajustar el pH a 8.0 utilizando lentejas de hidróxido de sodio de la marca Mallinckrodt AR®. Finalmente se trasvasó a un matraz aforado de 100 mL y se llevó hasta el aforo con agua destilada. Se agitó bien y se guardó la solución en un recipiente cerrado.

I.h. Buffer TAE (Tris-ácido acético-EDTA) 50x

Para preparar 1 L de buffer TAE 50x, se pesaron 242 g de tris marca Sigma® y se colocaron en un matraz aforado de 1 L. Se agregaron 57.1 mL de ácido acético glacial de la marca J.T. Baker® y 100 mL de EDTA 0.5 M pH = 8.0. Se homogenizó y finalmente se agregó agua destilada hasta el aforo. La solución se trasvasó después a un recipiente cerrado.

Anexo II. Medios de Cultivo

A continuación se enlistan los medios de cultivo empleados en la metodología (sección 6) por orden de aparición.

II.a. Caldo De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) Difco®

Medio de cultivo base para el crecimiento, aislamiento y cuenta de lactobacilos.

Para prepararlo se suspendieron 55 g del polvo en 1 L de agua destilada. Se calentó con agitación frecuente hasta llegar a ebullición durante 1 minuto, con el fin de homogenizar perfectamente. Posteriormente se esterilizó a 121° C por 15 minutos. Finalmente, el medio se mantuvo en prueba de esterilidad a 30° C por 24 horas antes de usarlo.

II.b. Infusión-cerebro corazón (Brain-heart infusion, BHI) BBL®

Base para el cultivo de bacterias como *Streptococos* y *Neumococos*, así como para el aislamiento de hongos.

Para preparar 1 L de medio se suspendieron 37 g del polvo y se mezclaron con agua destilada en un matraz Erlenmeyer. Se llevó a ebullición con agitación frecuente durante 1 minuto para disolver todos los componentes y posteriormente se esterilizó a 121° C por 15 minutos y 1atm de presión. El medio se sometió a prueba de esterilidad a 30° C por 24 horas antes de ser usado en las pruebas.

II.c. Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) Difco®

Base para el aislamiento y diferenciación de patógenos entéricos, especialmente *Shigella* y *Salmonella*.

Se suspendieron 55 g del polvo por cada litro de medio a preparar. Se mezcló con agua destilada en un matraz Erlenmeyer y se calentó en una parrilla con agitación constante hasta que el medio llegó a punto de ebullición. Se dejó enfriar el medio hasta 45-50° C y, bajo condiciones asépticas, se distribuyó en cajas petri estériles. Las cajas se sometieron a prueba de esterilidad a 30° C por 24 horas antes de ser usadas.

II.d. Medio Oxford para *Listeria Acumedia*®

Base para usarse con suplemento de antibióticos, con el fin de promover el crecimiento y aislamiento selectivo de *Listeria sp.* (tabla 9.2)

Por cada litro de medio a preparar se suspendieron 57.5 g del polvo en agua destilada. Se calentó con agitación frecuente en una parrilla eléctrica hasta que el medio se encontrara completamente disuelto. Posteriormente se esterilizó a 121° C por 10 minutos y 1atm de presión. En seguida se dejó que el medio enfriara hasta 45-50° C, para entonces adicionar de manera aséptica una solución acuosa del suplemento de antibióticos para *Listeria* de Dalynn Biologicals®. Tras homogenizar gentilmente el suplemento en el medio, se distribuyó asépticamente en cajas petri estériles, las cuales se sometieron a prueba de esterilidad a 30° C por 24 horas antes de poder ser usadas.

Tabla 9.2. Composición del medio Oxford para *Listeria* por cada litro de preparación

Fórmula por litro	
Base de agar sangre Columbia	39.0 g
Esculina	1.0 g
Citrato férrico de amonio	0.5 g
Cloruro de litio	15 g
Agar	2 g
pH final = 7.2 ± 0.2	

II.d.i. Suplemento para *Listeria* Dalynn Biologicals®

El suplemento liofilizado se encuentra distribuido en viales de 5 mL. Para re-suspenderlo y poder agregarlo asépticamente al medio Oxford Acumedia®, se agregaron 2.5 mL de etanol absoluto, se agitó, y posteriormente se agregaron 2.5 mL de agua destilada estéril y se volvió a agitar. Los 5 mL finales se agregaron asépticamente a 500 mL del medio Oxford Acumedia® estéril y temperado a 45-50° C. Se homogenizó para permitir que el suplemento se incorporara a todo el medio, y se procedió a distribuirlo en cajas petri estériles.

Tabla 9.3. Composición del suplemento de antibióticos para el medio Oxford para *Listeria*

Formula por 5mL de suplemento	
Acriflavina	2.5 mg
Colistina	10 mg
Ciclohexamida	200 mg
Cefotetano	1 mg
Fosfomicina	5 mg

II.e. Agar De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) Difco®

Base de agar para el crecimiento y aislamiento de lactobacilos.

Para prepararlo se suspendieron 55 g del polvo en 1 L de agua destilada. Se calentó con agitación frecuente hasta llegar a ebullición durante 1 minuto, con el fin de homogenizar perfectamente. Posteriormente se esterilizó a 121° C por 15 minutos y 1 atm de presión. Una vez finalizado el proceso, el medio se dejó enfriar a 45-50° C para distribuirlo en cajas petri estériles. Las placas solidificadas se mantuvieron en prueba de esterilidad a 30° C por 24 horas antes de usarlo.

II.f. Agar Bacto®

Agente solidificante con material extraño, partes pigmentadas y sales reducidas al mínimo.

Para usar en la preparación de medios de cultivos sólidos.

Anexo III. Cuantificación de proteína con método de Bradford

III.a. Fundamento químico

El ensayo de Bradford es un método para medir proteína que se basa en el enlace del colorante azul brillante de Coomassie G-250 y los residuos de aminoácidos de las proteínas, especialmente residuos básicos (arginina) y aromáticos. El colorante existe en tres formas: la forma catiónica (roja), la neutra (verde) y la aniónica (azul). Bajo condiciones de acidez, el colorante se encuentra en la forma catiónica roja ($A_{\max}=470$ nm); sin embargo, cuando el colorante se une a una proteína, vira a azul al adquirir una conformación estable desprotonada, misma que puede ser detectada con un espectrofotómetro a 595 nm.

El método puede sufrir interferencias si existen detergentes, flavonoides y buffers básicos de origen proteico, debido a que éstos estabilizan la forma neutral del colorante por enlace directo, o debido a un cambio del pH en la muestra (Quick Start™ Bradford Protein Assay, Manual de instrucciones)

III.b. Curva patrón de Bradford

Para obtener la curva patrón con el ensayo de Bradford se partió de un stock de albúmina de suero bovino (BSA) Bio-Rad® Standard de 1.42 mg/mL. De este stock se tomaron 70.42 μ L y se colocaron en un micro-tubo de plástico estéril con 929.58 μ L de agua destilada. De esta forma se logró tener una solución con una concentración de 100 μ g/mL de BSA, que se usó como stock en la preparación de la curva patrón como se indica en la tabla 9.4.

A cada preparación de la curva patrón se le agregaron 200 μ L de azul de Coomassie Bio-Rad®, se agitaron en el vórtex Bx Barnstead Thermolyne Maxi Mix II y se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de cada solución de la curva patrón se leyó en el espectrofotómetro Agilent 8453E a 595 nm. Tanto las preparaciones de las soluciones para la curva patrón, como la

lectura de absorbancia se hicieron por duplicado, para obtener la absorbancia promedio y de ésta obtener la curva patrón (gráfico 1)

Tabla 9.4. Preparación de la curva patrón de Bradford utilizando un stock de BSA de 100 µg/mL

Volumen de Stock BSA [100 µg/mL] (µL)	Agua (µL)	[BSA] (µg/mL)	Abs1	Abs2	Promedio
0	800	0	0.0	0.0	0.0
16	784	2	0.1004	0.0804	0.0904
32	768	4	0.1532	0.1472	0.1502
48	752	6	0.2077	0.1953	0.2015
64	736	8	0.2821	0.2442	0.2632
80	720	10	0.3350	0.2949	0.3150

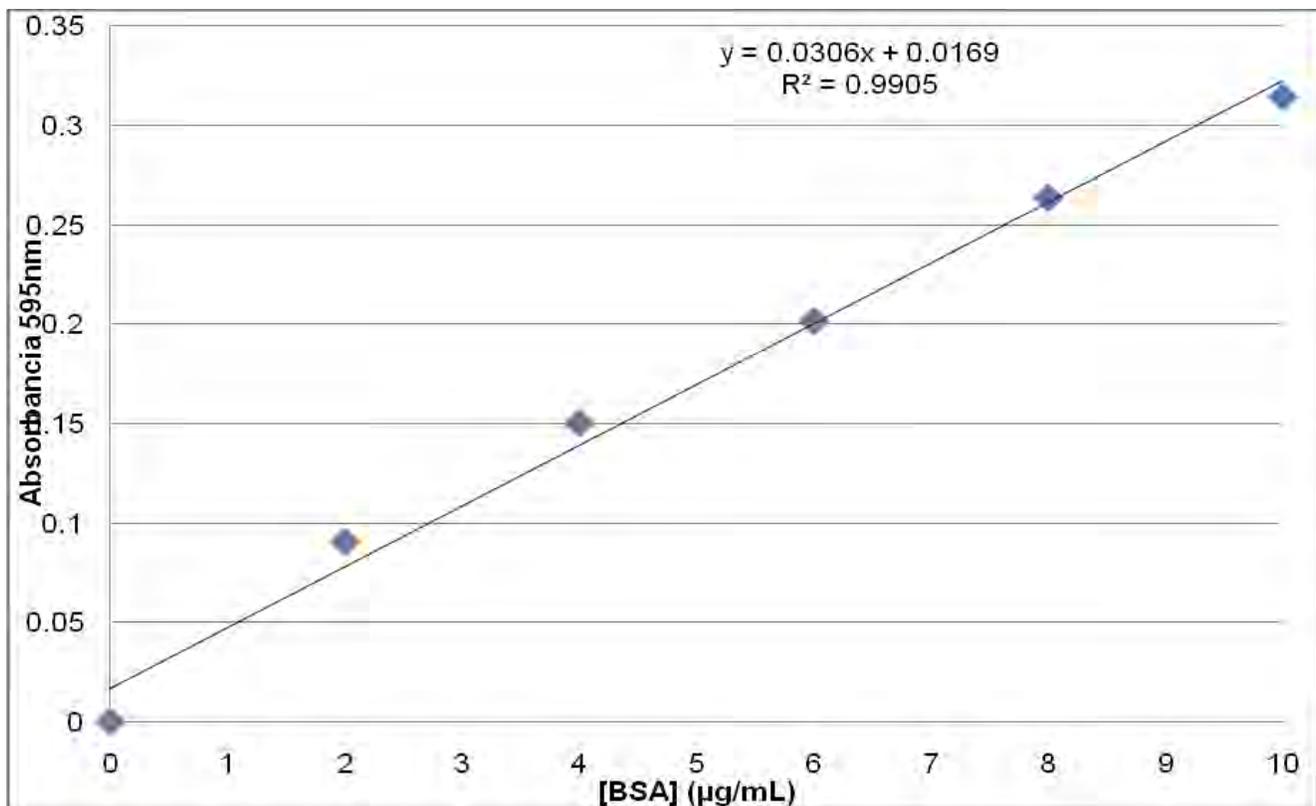


Gráfico 1. Curva patrón para el ensayo de Bradford. Se muestra la regresión lineal de la curva, así como la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación R²

Para obtener los datos de concentración de proteína en $\mu\text{g/mL}$ de las muestras a trabajar, se utilizó la ecuación de la recta, en donde y es el valor de absorbancia leído en el espectrofotómetro y x la concentración de proteína buscada en $\mu\text{g/ml}$.

11. Bibliografía

- ❖ Abee, T. (1995) *Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms*. FEMS Microbiology Letters, Vol. 129, pp.1-10
- ❖ Adebawo, O.O.; Akingbala, J.O.; Ruiz-Barba, J.L. y Osilesi O. (2000) *Utilization of high lysine-producing strains of Lactobacillus plantarum as starter culture for nutritional improvement of ogi*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 16, No. 5, pp. 451-455
- ❖ Afdora, P.T.; Ardiyati, T.; Sjojfan, O. y Kalsum, U. (2010) *Potential antibacterials compounds of lactic acid bacteria (LAB) from quail intestine (Coturnix japonica) in inhibition growth of Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Journal of Tropical Life Science Vol. I, No. 1 pp. 28-31
- ❖ Agati, V.; Guyot, J.P.; Morlon-Guyot, J.; Talamond, P. y Hounhouigan, D.J. (1998) *Isolation and characterization of new amylolytic strains of Lactobacillus fermentum from fermented maize doughs (mawè and ogi) from Benin*. Journal of Applied Microbiology, Vol. 85, pp. 512-520
- ❖ Ampe, F.; Ben Omar, N.; Moizan, C.; Wachter, C. y Guyot, J.P. (1999) *Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maize Dough, Demonstrates the Need for Cultivation-Independent Methods To Investigate Traditional Fermentations*. Applied And Environmental Microbiology, Vol. 65, No. 12 pp. 5464–5473
- ❖ Alvarado C.; García Almendárez, B.E.; Martín, S..E. y Regalado, C. (2006) *Food-associated lactic acid bacteria with antimicrobial potential from traditional Mexican foods*. Revista Latinoamericana de Microbiología, Vol. 48, Nos. 3-4, pp. 260-268

- ❖ Barefoot, S. F. y Klaenhammer, T. R. (1984) *Purification and characterization of the Lactobacillus acidophilus bacteriocin lactacin B*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 26, No. 3, pp. 328-334
- ❖ Ben Omar, N. y Ampe F. (2000) *Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 9 pp. 3664–3673
- ❖ Ben Omar, N.; Abriouel, H.; Lucas, R.; Martínez-Cañamero, M.; Guyot, J.P.; Gálvez, A. (2006) *Isolation of bacteriocinogenic Lactobacillus plantarum strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from Burkina Faso*. International Journal of Food Microbiology Vol. 112 pp. 44–50
- ❖ Bierbaum, G y Sahl, H-G (2009) *Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering*. Current Pharmaceutical Biotechnology Vol. 10, pp.2-18
- ❖ Björkroth, K.J.; Schillinger, U.; Geisen, R.; Weiss, N.; Hoste, B.; Holzapfel, W. H.; Korkeala, H.J. y Vandamme, P. (2002) *Taxonomic study of Weissella confusa and description of Weissella cibaria sp. nov., detected in food and clinical samples* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 52, pp.141-148
- ❖ Björkroth, K. y Holzapfel, W. (2006) “Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*” en *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. Editado por Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, KH. y Stackebrandt. Springer, 3a ed. Vol. 4. Singapore. pp. 281-285

- ❖ Bradford, M.M (1976) *Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry Vol. 72, pp. 248-254
- ❖ Brock T.D.; Madigan, M.T.; Martinko, J.M. y Parker, J. (2003) “La diversidad procariótica: bacteria” en *Biología de los microorganismos*, 10ª edición, Pearson-Prentice Hall, España, pp.420-422
- ❖ Brötz, H.; Bierbaum, G.; Markus, A.; Molitor, E. y Sahl, H.G. (1995) *Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism?* Antimicrobial Agents and Biotherapy, Vol. 39, No. 3, pp.714-719
- ❖ Bruno, M.E.C y Montville, T.J. (1993) *Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59, No. 9, pp. 3003-3010
- ❖ Cabeza Herrera, E.A. (2006) *Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estériles para la industria láctea y cárnica*. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona, España.
- ❖ Camacho de la Rosa, N.A.; Díaz Gutiérrez, K.M.; Santillana Hinojosa, M.R. y Velázquez Madrazo, O.C. (2007) “Nixtamalización” en *Manual de Prácticas. Productos de Cereales y Leguminosas*. 4ª ed. Comité Editorial de la Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, pp.95-97
- ❖ Cañas Urbina, A.O.; Bárzana García, E.; Owens, D.J; Wachter Rodarte, M.C. (1993) “Estudio de la variabilidad en los métodos de producción del pozol en los altos de Chiapas” en *Alimentos Fermentados Indígenas de*

México. Compilado por Wachter Rodarte, M. C y Lappe, P. Universidad Nacional Autónoma de México. Dirección General de Publicaciones, pp. 69-74

- ❖ Chavasirikunton, V.; Vatanyoopaisarn, S. y Phalakornkule, C. (2007) *Bacteriocin-like activity from Weissella confusa and pediococcus acidilactici isolated from traditional thai fermented sausages*, Journal of Culture Collections, Vol. 5, pp. 64-72
- ❖ Carrasco, M.S., Scarinci, H.E. and Simonetta, A.C. (2002). *Antibacterial Activity of Lactic Acid bacteria Isolated from Argentinian Dairy Products*. The Australian Journal of Dairy Technology. Vol. 57.No. 1, 15-19
- ❖ Chen, H. y Hoover, D.G. (2003) *Bacteriocins and their foods applications* Comprehensive Reviews in Food Science And Food Safety, Vol. 2, Institute of Food Technologists
- ❖ Choi, I.K.; Jung, S.H.; Kim, B.J.; Park, S.Y.; Kim, J. y Han, H.U. (2003) *Novel Leuconostoc citreum starter culture system for the fermentation of kimchi, a fermented cabbage product*. Antoine Van Leeuwenhoek Vol. 84, pp. 247-253
- ❖ Coventry, M.J; Gordon J.B; Wilock, A.; Harmark, H.; Davidson, B.E.; Hickey, M.W; Hillier, A.J. y Wan, J. (1997) *Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin*. Journal of Applied Microbiology, Vol. 83, pp. 248-258
- ❖ Daba, H.; Pandian, S.; Gosselin, J.F.; Simard, R.E.; Huang, J. y Lacroix, C. (1991) *Detection and activity of a bacteriocin produced by Leuconostoc mesenteroides*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 57, No. 12, pp. 3450-3455

- ❖ Datta, A.R. (2003) “*Listeria monocytogenes*” en *International Handbook of Foodborne Pathogenes*. Editado y compilado por Miliotis, Marianne D. y Bier, Jeffery W. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos pp. 116-132
- ❖ Daeschel, M.A. y Nes, I.F. (1995) “*Lactobacillus plantarum*: Physiology, genetics, and applications in foods” en *Food Biotechnology: Microorganisms*. Editado por Hui, Yiu H. y Khachatourians, George G. Wiley-VCH, Estados Unidos. pp. 720-727
- ❖ De Bruyne, N.; Camun, K.; De Vuyst, L. y Vandamme, P. (2010) *Weissella fabaria* sp. nov., from a Ghanaian cocoa fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* Vol. 60, pp.1999-2005.
- ❖ De Vuyst, L. y Leroy, F. (2007) *Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*; Vol. 13, pp.194–199.
- ❖ Dellaglio, F.; Torriani, S. y Felis, G. E. (2004) *Reclassification of Lactobacillus cellobiosus Rogosa et. al. 1953 as a later synonym of Lactobacillus fermentum Beijerinck 1901*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 54, pp. 809-812
- ❖ Díaz-Ruiz, G.; Guyot, J.P.; Ruiz-Terán, F.; Morlon-Guyot, J; y Wachter, C. (2003) *Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage*. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 69, No. 8 pp. 4367–4374.
- ❖ Díaz-Ruiz, G.; Guyot, J.P.; Ruiz-Terán, F.; Morlon-Guyot, J. y Wachter, C. (2003) *Amylolytic lactic acid bacteria from pozol: a natural potential to produce complementary foods?* *Food-based Approaches for a Healthy Nutrition*, pp. 23-28

- ❖ Escalante, A.; Wachter, C. y Farrés A. (2001) *Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis*. International Journal of Food Microbiology Vol. 64, pp.21–31
- ❖ Flaherty, J.D.; Levett, P.N.; Dewhirst, F.E.; Troe, Theodore E.; Warren, J.R. y Johnson, S. (2003) *Fatal case of endocarditis due to Weissella confusa* Journal of Clinical Microbiology Vol. 41, No. 5, pp. 2237-2239
- ❖ Flores Ramírez, E. (2008) *Pozol: una bebida fermentada tradicional de México*. Cienciorama, Una Imagen Del Universo. Universidad Nacional Autónoma de México [En línea] México. Disponible en:
<http://www.cienciorama.unam.mx/index.jsp?pagina=vida&action=vrArticulo&aid=238>
[Fecha de consulta: 17 Marzo 2011]
- ❖ Galle, S.; Schwab, C.; Arendt, E. y Gänzle, M. (2010) *Exopolysaccharide-forming Weissella strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs*. Journal of Agriculture and Food Chemistry Vol. 58, No. 9, pp. 5834-5841
- ❖ Gilliland, S.E. (2000) “The Streptococci: milk products” en *Bacterial Starter Cultures for Foods*. CRC-Press, Florida, Estados Unidos pp. 5-8
- ❖ Giraud, E.; Brauman, A.; Keleke, S.; Lelong, B. y Raimbault, M. (1991) *Isolation and physiological study of an amylolytic strain of Lactobacillus plantarum*. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 36, No. 3, pp. 379-383.
- ❖ Giraud, E.; Champailier, A. y Raimbault, M. (1994) *Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of Lactobacillus plantarum*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 60, No.12, pp. 4319-4323

- ❖ Glover, R.L.K.; Savadogo-Lingani, H.; Diawara, B.; Jespersen, L. y Jakobsen, M. (2009) *Utilization of Lactobacillus fermentum and Saccharomyces cerevisiae as starter cultures in the production of dolo*. Journal of Applied Biosciences Vol. 22, pp. 1312-1319
- ❖ González-Martínez, B.; Gómez-Treviño, M. y Jiménez-Salas, Z. (2005) *Probióticos: características, propiedades antibacterianas y modos de acción*. Mundo Alimentario. Noviembre/Diciembre pp.14-18
- ❖ Hanes, D. (2003) “Nontyphoid *Salmonella*” en *International Handbook of Foodborne Pathogenes*. Editado y compilado por Miliotis, M.D. y Bier, J.W. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos pp. 146-158
- ❖ Harun-ur-Rashid, Md.; Togo, K.; Ueda, M. y Miyamoto, T. (2007) *Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk “dahi” in Bangladesh*. Pakistan Journal of Nutrition Vol. 6, No. 6, pp. 647-652
- ❖ Hauge, H.H.; Mantzilas, D.; Moll, G.N.; Konings, W.N.; Driessen, A.J.M.; Eijsink, V.G.H.; Nissen-Meyer, J. (1998) *Plantaricin A is an amphiphilic α -helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms*. Biochemistry Vol. 37, pp. 16026-16032
- ❖ Hernández Alcántara, A.M. (2010) *Caracterización de la actividad bactericida de péptidos producidos por bacterias ácido lácticas aisladas de un queso tradicional mexicano*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México
- ❖ Hernández López, J.C. (2002) *Caracterización parcial de la bacteriocina producida por Pediococcus parvulus MXVK133*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.

- ❖ Holck, A.; Axelsson, L.; Birkeland, S-E; Aukrust, T. y Blom, H. (1992) *Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from Lactobacillus sake Lb706*. Journal of General Microbiology. Vol. 138 pp. 2715-2720
- ❖ Holo, H.; Jeknic, Z.; Daeschel, M.; Stevanovic, S.; Nes, I.S. (2001) *Plantaricin W from Lactobacillus plantarum belongs to a new family of two-peptide lantibiotics*. Microbiology Vol. 147, pp. 643-651
- ❖ Holzapfel, W.H. (2000) *Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries*. International Journal of Food Microbiology Vol. 75, pp. 197-121
- ❖ Hu, L. y Kopecko, D.J. (2003) “Typhoid *Salmonella*” en *International Handbook of Foodborne Pathogenes* Editado y compilado por Miliotis, M.D. y Bier, J.W. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos pp. 159-173
- ❖ Huch, M.; Hanak, A.; Specht, I.; Dortu, C.M.; Thonart, P.; Mbugua, S.; Holzapfel, W.H.; Hertel, C. y Franz, C. (2008) *Use of Lactobacillus strains to start cassava fermentations of gari production*. International Journal of Food Microbiology Vol. 128, pp. 258-267
- ❖ Ijabadeniyi, A.O. (2007) *Microorganisms associated with ogi traditionally produced from three varieties of maize*. Research Journal of Microbiology, Vol. 2, No. 3, pp. 247-253
- ❖ Järvenpää, S.; Tahvonen, R.L.; Ouwehand, A.C.; Sandell, M.; Järvenpää, E. y Salminen, S. (2007) *A probiotic, Lactobacillus fermentum ME-3, has antioxidative capacity in soft cheese spreads with different fats*. American Dairy Science Association, Vol. 90, pp. 3171-3177.

- ❖ Kang, J.H. y Lee, M.S. (2005) *Characterization of a bacteriocin produced by Enterococcus faecium GM-1 isolated from an infant*. Journal of Applied Microbiology Vol. 98, pp. 1169-1178
- ❖ Katina, K.; Maina, N.H.; Juvonen, R.; Flander, L.; Johansson, L.; Virkki, L.; Tenkanen, M. y Laitila, A. (2009) *In situ production and analysis of Weissella confusa dextran in wheat sourdough*. Food Microbiology Vol. 26, pp. 734-743
- ❖ Klaenhammer, T.R. (1993) *Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. FEMS Microbiology Reviews Vol. 12 pp. 39-86
- ❖ Kouakou, P.; Dortu, C.; Dubois-Douphin, R.; Vandebol, M. y Thonart, P. (2010) *Plasmid associated bacteriocin production by Lactobacillus LMG21688 suppresses Listeria monocytogenes growth reborn in a food system*. FEMS Microbiology Letters Vol. 306, pp.37-44
- ❖ Lawson P.; A. Falsen; E. Ohlén; M. y M. D. Collins (2001) *Aerococcus urinaehominis sp. Nov. isolated from human urine*. Journal of Applied Bacteriology Vol. 51, pp. 683-686
- ❖ Lee, J.S.; Lee, K.C.; Ahn, J.S.; Mheen, T.I.; Pyun, Y.R. y Park, Y.H (2002) *Weissella koreensis sp. nov., isolated from kimchi*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology Vol. 52, pp. 257-1261.
- ❖ Leer, R.J.; van der Vossen, J.M.B.M; van Giezen, M.; van Noort, J.M. y Powels, P.H. (1995) *Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus*. Microbiology, Vol. 141, pp. 1629-1635

- ❖ Lewus, C.B.; Kaiser, A.; Montville, T.J. (1991) *Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins lactic acid bacteria isolated from meat*. Applied and Environmental Microbiology, Vol.57, No.6, pp. 1683-1688
- ❖ Lewus, C.B.; Sun, S. y Montville, T.J. (1992) *Production of an amylase-sensitive bacteriocina by an atypical Leuconostoc paramesenteroides strain*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59 pp.1842-1847
- ❖ Lu, Z.; Altermann, E.; Breidt, F. y Kozyavkin, S. (2010) *Sequence analysis of Leuconostoc mesenteroides bacteriophage ϕ 1-A4 isolated from an industrial vegetable fermentation*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 76, No. 6, pp. 1955-1966
- ❖ Mataragas, M.; Metaxopoulos, J.; Galiotou, M. y Drosinos, E.H. (2002) *Influence of pH and temperature on growth and bacteriocina production by Leuconostoc mesenteroides L124 and Lactobacillus curvatus L442*. Meat Science Vol. 64, pp. 256-271
- ❖ Mathieu, F.; Sudirman Suwandhi I.; Rekhlf, N.; Millière, J.B. y Lefebvre, G. (1993) *Mesenterocin 52, a bacteriocina produced by Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides FR52*. Journal of Applied Bacteriology Vol. 74, pp.372-379
- ❖ Martín del Campo C.I.; Gómez H., H.E.; Alaníz de la O, R. (2008) *Bacterias Ácido Lácticas con Capacidad Antagónica y Actividad Bacteriocinogénica Aisladas de Quesos Frescos*. Universidad de Guadalajara, México. Disponible desde URL:
<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/730/73011197005.pdf> [Fecha de consulta: 30 Abril 2011]

- ❖ Méndez-Albores, J.A; Arámbula-Villa, G; Preciado-Ortiz, R.E y Moreno-Martínez E. (2004) *Aflatoxins in pozol, a nixtamalized, maize-based food*. International Journal of Food Microbiology Vol. 94, pp. 211 – 215
- ❖ Messens, W.; Verluyten, J.; Leroy, F. y De Vuyst, L. (2002) *Modeling growth and bacteriocina production by Lactobacillus curvatus LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes*. International Journal of Food Microbiology Vol.81, pp. 41-52
- ❖ Molin, G. (2001) *Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to Lactobacillus plantarum 299v*. American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 73, No. 2, 380s-385s
- ❖ Moll, G.; Ubbink-Kok, T.; Hildeng-Hauge, H.; Nissen-Meyer, J.; Nes, I.F.; Konings, W.N.; Driessen, A.J.M. (1996) *Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two-component bacteriocin*. Journal of Bacteriology, Vol. 178, No. 3, pp.600-605
- ❖ Mourad, K. y Nour-Eddine, K. (2006) *Physicochemical and microbiological study of “shmen”, a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts*. Grasas y Aceites Vol. 57, No. 2, pp. 198-204
- ❖ Muñoz-Rojas, J. (2003) *Bacteriocinas: una Estrategia de Competencia Microbiana Propuesta como Alternativa de Antibióticos Dirigidos para el Futuro Humano*. Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México.
Disponibile desde URL:
http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_03/Capitulo03.pdf
[Consultada: 21 Marzo 2011]

- ❖ Muriana, P.M. y Klaenhammer, T.R. (1991) *Purification and partial characterization of lacticin F, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus 11088*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 57, No.1, pp. 114-121
- ❖ Nam, H.; Ha, M.; Bae, O. y Lee, Y. *Effect of Weissella confusa Strain PL9001 on the Adherence and Growth of Helicobacter pylori*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, No. 9, pp.4642-4646
- ❖ Nes, I.F.; Diep, D.B. y Holo, H. (2007) *Bacteriocin diversity in Streptococcus and Enterococcus*. Journal of Bacteriology Vol.189, No. 4, pp. 1189-1198
- ❖ Nielsen, D.S.; Cho, G.S.; Hanak, A.; Huch, M.; Franz, C.M.A.P. y Arneborg, N. (2010) *The effect of bacteriocin-producing Lactobacillus plantarum strains of the intracellular pH of sessile and planktonic Listeria monocytogenes singles cells*. International Journal of Food Microbiology Vol. 141, pp. S53-S59
- ❖ Nobile, C. y Figueroa, M. (2003) *Ovarian abscess due to Streptococcus bovis in a patient with unnoticed colonic cancer*. Revista Chilena de Infectología. Vol.20, No.2, pp. 133-135
- ❖ Nuraida, L.; Wachter, M.C. y Owens, J.D. (1995) *Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough*. World Journal of Microbiology and Biotechnology Vol. 11, pp. 567-571
- ❖ Ogier, J.C.; Casalta, E.; Farrokh, C.; Saihi, A. (2008) *Safety assessment of dairy microorganisms: The Leuconostoc genus*. International Journal of Food Microbiology Vol. 126, pp. 286-290

- ❖ Olano, A.; Chua, J.; Schroeder, S.; Minnari, A.; La Salvia, M. y Hall, G. (2001) *Weissella confusa* (*Basonym: Lactobacillus confusus*) *Bacteremia: a Case Report*. *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 39, No. 4, pp. 1604-1607
- ❖ Olasupo, N.A.; Odunfa, S.A. y Obayori, O.S. (2010) "Ethnic african fermented foods" en *Fermented Foods and Beverages of the World*. Editado por: Tamang, J.P y Kailasapathy, K. CRC Press, pp. 323-352
- ❖ Organización Mundial de la Salud (OMS) (2004) *Evaluación de riesgos de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo*. Serie de Evaluación de Riesgos Microbiológicos, No. 4 ISBN 92 4 156261 Disponible desde URL:
http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra_listeria/en/index.html
[Consultada: 28 Marzo 2011]
- ❖ Orientations of Proteins in Membranes (OPM) Database (2005-2010) Lomize, Andrei; Lomize, Mikhall y Pogozheva, Irina. Universidad de Michigan, Estados Unidos. [En línea] Disponible en: <http://opm.phar.umich.edu/> [Consultada: 21 Marzo 2011]
- ❖ Oscáriz, J.C. y Pisabarro, A.G. (2001) Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *International Microbiology* Vol. 4, pp.13-19
- ❖ Ouadghiri, M.; Vancanneyt, M.; Vandamme, P.; Naser, S.; Gevers, D.; Lefebvre, K.; Swings, J. y Amar, M. (2009) *Identification of lactic acid bacteria in Moroccan milk and traditionally fermented skimmed milk „Jben“* *Journal of Applied Microbiology* Vol. 106, pp.486-495

- ❖ Pascual, L.M.; Giordano, W.; Pájaro, M.C. y Barberis, I.L. (2008) *Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by Lactobacillus fermentum L23*. Current Microbiology Vol. 56, pp. 397-402
- ❖ Papathanasopoulos, M.A.; Krier, F.; Revol-Junelles, A.M.; Lefebvre, G.; Le Caer, J.P.; von Holy, A.; Hastings, J.W. (1997) *Multiple bacteriocina production by Leuconostoc mesenteroides TA33a and other Leuconostoc/Weissella strains*. Current Microbiology Vol. 35, pp. 331-335
- ❖ Ray, B. y Bhunia, A. (2008) “Microorganisms used in food fermentations”, “Biochemistry of some beneficial traits” “Food biopreservatives of microorganisms” y “Foodborne infections” en *Fundamental Food Microbiology*, 4^a ed. CRC Press, Estados Unidos, pp.99-106, 107-112, 178-185 y 283-293
- ❖ Riaz, S.; Nawaz, S.K. y Hasnian, S. (2010) *Bacteriocins produced by L. fermentum and L. acidophilus can inhibit cephalosporin resistant E. coli*. Brazilian Journal of Microbiology Vol. 41, pp. 643-648
- ❖ Riley, M.A y Wertz, J.E (2002) *Bacteriocins: evolution, ecology and application*. Annual Reviews of Microbiology Vol. 56. pp. 117-137
- ❖ Rivera Noriega, A. (2001) *Efecto de la acción de microorganismos amilolíticos en la fermentación del pozol*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México
- ❖ Sainz, T; Wachter, C; Espinoza, J; Centurión, D.; Navarro, A.; Molina, J.; Cravioto, A.; Eslava, C. (2001) *Survival and characterization of Escherichia coli strains in a typical Mexican acid-fermented food*. International Journal of Food Microbiology Vol. 71, pp. 169-176

- ❖ Savadogo, A.; Ouattara, C.; Bassole, I.; Traore, S. A. (2006) *Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview*. African Journal of Biotechnology Vol. 5, No.9, pp. 678-683.
- ❖ Sawa, N.; Okamura, K.; Zendo, T.; Himeno, K.; Nakayama, J.; Sonomoto, K. (2010) *Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by Leuconostoc pseudomesenteroides QU15*. Journal of Applied Microbiology Vol. 109, pp. 282-291
- ❖ Schlegel, L.; Grimont, F.; Collins, M.D.; Régnault, B.; Grimont, Patrick A. D. y Bouvet A. (2000) *Streptococcus infantarius sp. nov., Streptococcus infantarius subsp. infantarius subsp. nov. and Streptococcus infantarius subsp. coli subsp. nov., isolated from humans and food*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 50, pp. 1425-1434
- ❖ Serna Cock, L.; Valencia Hernández, L.J.; y Campos Gaona, R. (2010) *Kinetic of fermentation and antimicrobial activity of Weissella confusa against Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae*. Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia, No.55, pp. 55-65
- ❖ Smaoui, S.; Elluch, L.; Bejar, W.; Karray-Rebai, I.; Ayadi, I.; Jaouadi, B.; Mathieu, F.; Chouayekh, H.; Bejar, S.; Mellouli L. (2009) *Inhibition of Fungi and Gram Negative Bacteria by Bacteriocin BacTN635 Produced by Lactobacillus plantarum sp. TN635*. Applied Biochemistry and Biotechnology Vol. 62, pp. 1132-1146
- ❖ Steinkraus, K.H. (1992) “Lactic acid fermentations” en *Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods*. Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development. National Academy Press. Estados Unidos, pp. 43-46

- ❖ Tavera Montes, F.L. (2010) *Producción de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol para la inhibición de bacterias patógenas*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- ❖ Tiwari, S.K. y Srivastava, S. (2008) *Purification and characterization of plantaricin LR14: a novel bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum LR/14*. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 79, Number 5, pp. 759-767
- ❖ Todar, K. (2011) "Lactic acid bacteria" en *Todar's Online Textbook Of Bacteriology* [En línea] Estados Unidos. Disponible en: <http://textbookofbacteriology.net/lactics.html> [Fecha de consulta:17 Marzo 2011]
- ❖ Todorov, S.D.; Daniel, P.; Dousset, X.; Ivanova, I. y Onno, B. (2003) *Behaviour of Lactobacillus plantarum ST31, bacteriocin producer, in sourdough*. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry Vol. 2, No. 5, pp. 586-592
- ❖ Tomé, E.; Todorov, S.D.; Gibbs, P.A. y Teixeira, P.C. (2009) *Partial characterization of nine bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from cold-smoked salmon with activity against Listeria monocytogenes*. Food Biotechnology Vol. 23, No. 1 pp. 50-73
- ❖ Ulloa, M.; Herrera, T. y Lappe, P. (1987) *Fermentaciones tradicionales indígenas de México*. Serie de Investigaciones Sociales. Instituto Nacional Indigenista, Vol. 16, pp. 13-20
- ❖ Upreti, G.C y Hinsdill, R.D (1975) *Production and mode of action of lactocin LP27: bacteriocina from homofermentative Lactobacillus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 7, No. 2, pp.139-145

- ❖ Vallejo, M.; Olivera, N.; Sequeiros, C. y Marguet, E. (2009) *Actividad antilisteria de bacterias ácido lácticas aisladas de peces marinos*. *Analecta Veterinaria* Vol.29, No. 2 pp. 19-23
- ❖ Vieira-Dalodé, G.; Madodé, Y.G.; Hounhouigan, L. y Jakobsen, M. (2008) *Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts as inoculums enrichment for the production of gowé, a sour beverage from Benin*. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 2, pp. 179-186
- ❖ Vignolo, G.M.; Suriani, F.; Pesce de Ruiz Holgado, A. y Oliver, G. (1993) *Antibacterial activity of Lactobacillus strains isolated from dry fermented sausages*. *Journal of Applied Bacteriology* Vol. 75, pp. 344-349
- ❖ Wachter, C.; Cañas, A.; Cook, P.E.; Barzana, E. y Owens, J.D. (1993) *Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 9, pp. 269-274
- ❖ Wachter, C.; Cañas, A.; Bárzana, E.; Lappe, P.; Ulloa, M. y Owens, J. D. (2000) *Microbiology of indian and mestizo pozol fermentations*. *Food Microbiology*, Vol. 17, pp. 251-256
- ❖ Wagner, M. y McLauchlin, J. (2008) "Biology" en *Handbook of Listeria monocytogenes*, editado por Dongyou Lui, CRC Press, Florida, U.S, pp. 3-20
- ❖ Wassenaar, T.M. (2009) *Pathogenic bacteria* The Virtual Museum of Bacteria [En línea] Estados Unidos. Disponible en: <http://www.bacteriamuseum.org/cms/Pathogenic-Bacteria/pathogenic-bacteria.html> [Fecha de consulta: 28 Marzo 2011]

- ❖ World Health Organization (WHO) (2005) *Drug-resistant Salmonella*, Hoja de datos (fact sheet) No.139 [En línea] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/> [Fecha de consulta: 28 Marzo 2011]

- ❖ World Health Organization (WHO) (2011) *Foodborne diseases, emerging*. Hoja de datos (fact sheet) No. 124 [En línea] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en/> [Fecha de consulta: 28 Marzo 2011]

- ❖ Xiao, H.; Chen, X.; Chen, M.; Tang S.; Zhao, X. y Huan, L. (2004) *Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by Streptococcus bovis HJ50*. Microbiology Vol. 150, pp. 103-108

- ❖ Yan, T.R. y Lee, C.S. (1997) *Characterization of a partially purified bacteriocina, fermenticin B, from Lactobacillus fermentum*. Biotechnology Letters, Vol. 19, No.8, pp. 741-744

- ❖ Zapata, S.; Muñoz, J.; Ruiz, O.S.; Montoya, O.I.; Gutiérrez, P.A. (2009) *Aislamiento de Lactobacillus plantarum LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina*. VITAE, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica ISSN 0121-4004. Vol. 16, No. 1. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, pp.75-82