



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE
Pediococcus acidilactici ATCC 8042 SOBRE LA EXPRESIÓN DE
ALGUNOS FACTORES DE VIRULENCIA DE *Pseudomonas aeruginosa*
ATCC 9027”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

PATXI MACHÍN MUNGUÍA VILLAVICENCIO

TUTOR PRINCIPAL:

ADRIANA LLORENTE BOUSQUETS, FES-CUAUTITLAN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

GUILLERMO VALDIVIA ANDA, FES-CUAUTITLAN

AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA, FACULTAD DE QUIMICA

JORGE LÓPEZ PÉREZ, FES-CUAUTITLAN

MÉXICO, D.F., AGOSTO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 290671 recibida durante el periodo 2012-2 a 2014-1.

Al Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y Salud Animal de la UNAM por los apoyos recibidos durante los estudios de maestría.

Al proyecto DGAPA-PAPIIT IT 202312 “Aplicación de alternativas de bioconservación y conservación para mejorar la calidad de la carne y los productos cárnicos”.

Al proyecto DGAPA-PAPIME PE202010-2 “Taller de Procesos Tecnológicos y Control de Calidad de Productos Cárnicos”.

Al Proyecto 7.5.4: “Elaboración de alimentos a través de procesos microbianos” del Macroproyecto 7 de la UNAM: “Productividad sostenible de los hatos de cría en pastoreo”.

Este proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio 7 de Bioconservación en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

A mi tutora: Dra. Adriana Llorente Bosquets, por la paciencia y dedicación a mi desarrollo profesional, por dejarme andar solo pero sin perderme de vista y por todos sus comentarios constructivos que me hicieron mejor persona, académico e investigador.

A mi comité tutorial, Dr. Guillermo Valdivia Anda, Dra. Amelia Farrés González Sarabia y al M. en A. Jorge López Pérez por sus observaciones y guía durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros de mi jurado Dr. Carlos Gerardo García Tovar, Dra. Carmen Wachter Rodarte, Dr. Jorge Francisco Monrroy López, M. en C. Inda Marcela por sus aportaciones, consejos y recomendaciones para perfeccionar este trabajo.

Al RUMEN y al Instituto de Neurobiología por la oportunidad de conocerlos y aprender otra visión de trabajo.

Al Dr. Francisco Montiel Sosa y la la M. en C. Ana Elvia Sanchez Mendoza por permitirnos realizar la PCR en su laboratorio.

A la Dra. Virginia Lara Sagahon por sus sabios consejos el diseño experimental y en el análisis estadístico

A todos los profesores de las asignaturas del programa por sus conocimientos y experiencias.

A mis amiguitos de la Maestría Ricardo, Jhonatan, Aura, Anita, Bruno, Daniel, Rita, Ari por las tonterías, apoyos, críticas y consejos.

A la Jefa y al Gordow...

A Elina, Samy y Elise, ellos saben...

A Paco...

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ABREVIATURAS	XXIII
RESUMEN	XXV
ABSTRACT	XXVII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. Contaminación de Carne y Derivados	1
1.2. Microorganismos alterantes.....	1
1.2.1. <i>Pseudomonas</i> spp.....	2
1.2.1.1. Factores de virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.2.1.1.1. Biopelículas.....	4
1.2.1.1.2. Exopolisacáridos	6
1.2.1.1.3. Alginato.....	7
1.2.1.1.4. Pigmentos.....	9
a) Piocianina	9
b) Pioverdina.....	10
1.3. Conservación de productos cárnicos	12
1.3.1. Bioconservación.....	12
1.3.2. Bacterias Ácido Lácticas	12
1.3.2.1. Clasificación de las BAL.....	12
1.3.2.2. Sustancias antibacterianas producidas por las Bacterias Ácido Lácticas	15
1.3.2.2.1. Bacteriocinas.....	15
a) Clasificación de las bacteriocinas	15
b) Mecanismo de acción	16
1.3.2.2.2. Ácidos orgánicos.....	18
a) Ácido láctico:.....	18
b) Ácido acético, propiónico y piroglutámico:	18

1.3.2.2.3. Otras sustancias con actividad antibacteriana.....	18
a) Dióxido de carbono:	18
b) Peróxido de hidrógeno:.....	18
c) Diacetilo:	19
d) Reuterina:	19
1.3.3. <i>Pediococcus</i> spp.....	19
1.3.3.1. <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	20
1.3.3.1.1. Proteasas extracelulares producidas por <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	20
1.3.3.1.2. Otras proteasas producidas por <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	21
1.4. Identificación bacteriana mediante la comparación de secuencias del gen ribosomal 16S por PCR.....	22
ANTECEDENTES	23
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS.....	29
Objetivo general	29
Objetivos particulares.....	29
2. MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1. Microorganismos.....	33
2.2. Medios de Cultivo y soluciones.....	33
2.2.1. Medio MRS modificado para el cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	33
2.2.2. Medios de cultivo para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	34
2.2.2.1. Luria Bertani fortificado (LBf).....	35
2.2.2.2. King “A” (<i>Pseudomonas</i> P).....	35
2.2.2.3. King “B” (<i>Pseudomonas</i> F).....	36
2.2.3. Agua Peptonada	37
2.2.4. Solución Buffer de fosfatos de Dulbecco (Dulbecco’s PBS)	37

2.3. Reactivación y verificación de pureza de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 y de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	37
2.3.1. Reactivación de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 y de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.....	37
2.3.2. Criopreservación de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 y de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.....	38
2.3.3. Verificación de la pureza de las cepas microbiológicas	39
2.3.3.1. Pureza del cultivo en agar, morfología colonial y producción de pigmentos	39
2.3.3.2. Tinción de Gram.....	39
2.4. Identificación de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 y de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 mediante PCR tiempo final	40
2.4.1. Identificación de los genes 16S y <i>ldh</i> de <i>Pediococcus acidilactici</i>	40
2.4.2. Identificación del gen 16S <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
2.5. Cinéticas de crecimiento bacteriano.....	44
2.5.1. Cinética de crecimiento de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	44
2.5.2. Cinéticas de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 en medio Luria Bertani fortificado, King “A” y King “B”	45
2.6. Caracterización del sobrenadante de cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 con actividad antibacteriana	48
2.6.1. Obtención del sobrenadante de cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 liofilizado.....	48
2.6.2. Determinación de concentración de proteína de los sobrenadantes por el método de Bradford	48
2.6.3. Determinación del perfil electroforético por SDS-PAGE de las proteínas de los sobrenadantes de cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i>	49
2.6.4. Determinación de la actividad bacteriolítica por técnicas zimográficas... ..	50
2.6.5. Difusión en agar.....	51
2.6.6. Cinéticas de inhibición.....	52

2.7. Evaluación del efecto de los sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 sobre la producción de exopolisacáridos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	54
2.7.1. Cuantificación de carbohidratos totales	55
2.7.2. Cuantificación de ácidos Urónicos	55
2.8. Evaluación del efecto de los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 sobre la producción de pirocianina de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	57
2.9. Evaluación del efecto de los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 sobre la producción de pioverdina de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	58
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
3.1. Reactivación y verificación de la pureza de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	61
3.2. Identificación de las cepas problema mediante la amplificación por PCR del gen 16S y <i>lhdD</i> de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 y la región variable 16S de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	63
3.3. Cinética de crecimiento de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	64
3.4. Cinéticas de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	66
3.5. Caracterización de los sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	68
3.5.1. Cuantificación de proteínas por método de Bradford	68
3.5.2. Perfil electroforético (SDS/PAGE) de los sobrenadantes.....	70
3.5.3. Zimogramas copolimerizados con <i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698	74
3.5.4. Zimogramas copolimerizados con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.	77
3.5.5. Difusión en agar.....	79
3.5.6. Cinéticas de inhibición.....	83
3.6. Efecto en la producción de Exopolisacáridos.....	92
3.6.1. Efecto en la producción de carbohidratos totales	94

3.6.2. Efecto en la producción de ácidos urónicos.....	96
3.7. Efecto en la producción de Pigmentos	101
3.7.1. Efecto en la producción de piocianina.....	103
3.7.2. Efecto en la producción de pioverdina.....	105
4. CONCLUSIONES.....	109
5. LITERATURA CITADA.....	111
6. ANEXOS.....	124

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Contenido de Exopolisacáridos (EPS) en biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
Cuadro 2. Características diferenciales de las bacterias ácido lácticas	14
Cuadro 3. Clasificación de las Bacteriocinas	17
Cuadro 4. Formulación del caldo MRS y agar MRS.....	34
Cuadro 5. Formulación para caldo y agar Luria Bertani fortificado	35
Cuadro 6. Formulación para el caldo y agar King “A”	36
Cuadro 7. Formulación para el caldo y agar King “B”	36
Cuadro 8. Formulación de la Solución Bufferada de Fosfatos de Dulbecco.....	37
Cuadro 9. Secuencia y posición de los <i>primers</i> utilizados en la PCR.....	41
Cuadro 10. Resumen de tiempos y temperaturas por ciclos para la PCR de <i>Pediococcus acidilactici</i>	42
Cuadro 11. Primers para la identificación de el gen 16S rDNA de <i>Pseudomonas</i> spp. y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
Cuadro 12. Resumen de tiempos y temperaturas por ciclos para la PCR de <i>Pseudomonas</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
Cuadro 13. Duración de las fases de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	68
Cuadro 14. Concentración de proteína de los sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 en diferentes etapas de su crecimiento.....	69
Cuadro 15. Pesos Moleculares de las bandas encontradas en los perfiles electroforéticos de las proteínas de los sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	73
Cuadro 16. Dimensiones de los halos de Inhibición de los ingredientes del medio MRS y MRSm en los diferentes medios de cultivo.....	83
Cuadro 17. Tratamientos de las cinéticas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 en las que no se encontró evidencia estadística para aseverar que eran diferentes. 87	
Cuadro 18. Tratamientos de las cinéticas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en las que no se encontró evidencia estadística para aseverar que eran diferentes.	89

Cuadro 19. Método Micro Bradford.....	124
Cuadro 20. Análisis de Varianza de los modelos de Weibull para las cinéticas de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 en medio LBf.....	126
Cuadro 21. Análisis de Varianza de los modelos de Weibull para las cinéticas de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 en medio King “A”.....	134
Cuadro 22. Análisis de Varianza de los modelos de Weibull para las cinéticas de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 en medio King “B”.....	142
Cuadro 23. Análisis de Varianza de los modelos Logísticos para las cinéticas de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm en medio LBf.....	150
Cuadro 24. Análisis de Varianza de los modelos Logísticos para las cinéticas de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm en medio King “A”.....	157
Cuadro 25. Análisis de Varianza de los modelos Logísticos para las cinéticas de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm en medio King “B”.....	164
Cuadro 26. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	173
Cuadro 27. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 36 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	175
Cuadro 28. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 48 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	177
Cuadro 29. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	179

Cuadro 30. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 36 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	181
Cuadro 31. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 48 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	183
Cuadro 32. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.	185
Cuadro 33. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.	187
Cuadro 34. Prueba de Tukey para la producción de Píocianina a las 12 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	189
Cuadro 35. Prueba de Tukey para la producción de Píocianina a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	191
Cuadro 36. Prueba de Tukey para la producción de Píocianina a las 48 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	193
Cuadro 37. Prueba de Tukey para la producción de Píocianina a las 60 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	195
Cuadro 38. Prueba de Tukey para la producción de Píocianina a las 72 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	197
Cuadro 39. Prueba de Tukey para la producción de Píocianina a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.	199

Cuadro 40. Prueba de Tukey para la producción de Piocianina a las 72 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.	201
Cuadro 41. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 12 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.	203
Cuadro 42. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.	205
Cuadro 43. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 48 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.	207
Cuadro 44. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 12 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.	209
Cuadro 45. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.	211

Índice de Figuras

Figura 1. Comunicación intraespecie	5
Figura 2. Etapas de la formación de una biopelícula, 1) Adherencia Inicial, 2) Formación de microcolonias, 3) Formación de macrocolonias, 4) Maduración de la biopelícula y 5) Separación de la biopelícula.....	6
Figura 3. Estructura del Alginato (G) Glucoronato, (M) Manuronato	8
Figura 4. Biosíntesis del alginato	8
Figura 5. Mecanismo de síntesis de piocianina por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
Figura 6. Los tres tipos de PVD de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
Figura 7. Mecanismo de acción de las bacteriocinas en bacterias Gram Positivas y Gram Negativas	16
Figura 8. Representación esquemática del sitio de acción de las peptidoglicano hidrolasas	21
Figura 9. Resumen Metodológico	31
Figura 10. Ejemplos de Formas, elevaciones y márgenes.....	40
Figura 11. Resumen de la metodología para la reactivación y cinética de crecimiento de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	46
Figura 12. Resumen de la metodología de la reactivación y cinéticas de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	47
Figura 13. Distribución de los penicilindros y los sobrenadantes en cajas de Petri para la prueba de difusión en agar.....	51
Figura 14. Resumen de la metodología para la caracterización del sobrenadante del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 con actividad antibacteriana.....	53
Figura 15. Resumen de la metodología para la evaluación del efecto de los sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 sobre la producción de biopelícula de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.....	56
Figura 16. Resumen de la metodología para la demostración del efecto del sobrenadante de cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 sobre la producción de piocianina y pioverdina de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	59

Figura 17. a) Colonias de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 en agar MRS, b) Tinción de Gram de las colonias de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	61
Figura 18. Identificación morfológica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027. a) Colonias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 en agar Lbf., b) Colonias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 en agar King “A”, c) Colonias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 en agar King “B”, d) Tinción de Gram de las colonias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.	62
Figura 19. Electroforesis de la PCR para la identificación de las cepas de interés. 64	
Figura 20. Cinética de Crecimiento de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 en medio MRSm.....	65
Figura 21. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 en medio Luria Bertani Fortificado.....	66
Figura 22. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 en medio King “A”.....	67
Figura 23. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 en medio King “B”.....	67
Figura 24. Concentración de proteínas de los sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 durante diferentes etapas del crecimiento celular en medio MRSm.....	70
Figura 25. Perfil electroforético de los sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 en gel de Bis/Acrilamida 12% T, 3.3% C, 1mm, tinción Azul de Coomassie.....	71
Figura 26. Análisis de las imágenes de los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 con Image Lab 3.0™.....	72
Figura 27. Zimograma de los sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 en gel de Bis/Acrilamida 10% T, 3.3% C, 1mm, copolimerizado con células liofilizadas de <i>Micrococcus Lysodeikticus</i> (0.02% w/v), teñido con Azul de Metileno.....	74
Figura 28. Análisis de las imágenes de los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 con Image Lab 3.0™.....	76

Figura 29. Zimograma de los sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 en gel de Bis/Acrilamida 10% T, 3.3% C, 1mm, copolimerizado con células liofilizadas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (0.02% w/v), teñido con Azul de Metileno	77
Figura 30. Análisis de las imágenes de los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 con Image Lab 3.0™.....	78
Figura 31. Pruebas de Difusión en Agar de los Sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 en cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027. A) Agar Müller Hinton, B) Agar Antibióticos No. 11 con sobrecapa de Agar Suave Nutritivo (0.6%).	79
Figura 32. Pruebas de Difusión en Agar de los componentes del medio MRSm en cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027. A) Agar Müller Hinton, B) Agar Müller Hinton con sobrecapa de Agar Suave Luria Bertani Fortificado (0.6%). C) Agar Müller Hinton con sobrecapa de Agar Suave King “A” (0.6%). D) Agar Müller Hinton con sobrecapa de Agar Suave King “B” (0.6%).....	82
Figura 33. Cinéticas de Inhibición en caldo Luria Bertani fortificado de los cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratados con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042. A) Inhibición con los sobrenadantes de fase logarítmica (10X) (4, 6 y 8 h); B) Inhibición de los sobrenadantes de fase estacionaria (10X) (12, 16 y 24 h); C) Testigos negativos (Medios sin inocular MRS y MRSm 10X).....	84
Figura 34. Cinéticas de Inhibición en caldo King “A” de los cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratados con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042. A) Inhibición con los sobrenadantes de fase logarítmica (10X) (4, 6 y 8 h); B) Inhibición de los sobrenadantes de fase estacionaria (10X) (12, 16 y 24 h); C) Testigos negativos (Medios sin inocular MRS y MRSm 10X).....	84
Figura 35. Cinéticas de Inhibición en caldo King “B” de los cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratados con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042. A) Inhibición con los sobrenadantes de fase logarítmica (10X) (4, 6 y 8 h); B) Inhibición de los sobrenadantes de fase estacionaria (10X) (12, 16 y 24 h); C) Testigos negativos (Medios sin inocular MRS y MRSm 10X).....	85

Figura 36. Cinéticas de Inhibición en caldo Luria Bertani fortificado de los cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratados con los ingredientes de los medios MRS y MRSm.	88
Figura 37. Cinéticas de Inhibición en caldo King “A” de los cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratados con los ingredientes de los medios MRS y MRSm.	88
Figura 38. Cinéticas de Inhibición en caldo King “B” de los cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratados con los ingredientes de los medios MRS y MRSm.	88
Figura 39. Adaptación al método de Masuko <i>et al.</i> , (2005) para la cuantificación de Carbohidratos Totales y Ácidos Urónicos. A) Tubo de cultivo con 50 perlas de Borosilicato sin inocular; B) Tubo de cultivo despues del crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en medio Luria Bertani fortificado; C) Primer lavado de la Biopelícula con PBS frío; D) Biopelícula lista para cuantificar; E) Tubos de cultivo previos al la cuantificación de CT y AU; F) Tubos tratados con Ácido Sulfúrico; G) Tubos trtados con Ácido Sulfúrico-Tetraborato de Sodio-Carbazol.	93
Figura 40. Producción de Ácidos Urónicos ($\mu\text{g/mL}$) y Carbohidratos Totales ($\mu\text{g/mL}$) de los cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 en medio LBf.	93
Figura 41. Producción de Carbohidratos Totales de los cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 en medio LBf tratados con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042. A) Producción con los sobrenadantes de fase logarítmica (10X) (4, 6 y 8 h); B) Producción con los sobrenadantes de fase estacionaria (10X) (12, 16 y 24 h); C) Producción con los testigos negativos (Medios sin inocular MRS y MRSm 10X).	95
Figura 42. Producción de Ácidos Urónicos de los cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 en medio LBf tratados con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042. A) Producción con los sobrenadantes de fase logarítmica (10X) (4, 6 y 8 h); B) Producción con los sobrenadantes de fase estacionaria (10X) (12, 16 y 24 h); C) Producción con los testigos negativos (Medios sin inocular MRS y MRSm 10X).	97

Figura 43. Producción de Ácidos Urónicos ($\mu\text{g/mL}$) y Carbohidratos Totales ($\mu\text{g/mL}$) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tras 24 h de cultivo en medio LBf tratados con los ingredientes del medio MRS y MRSm.	99
Figura 44. Operones <i>pel</i> , <i>alg</i> y <i>psl</i> y la estructura propuesta del complejo de biosíntesis del Alginato, Pel y Psl polisacáridos	100
Figura 45. Cuantificación de pigmentos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027. A) Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> en medio King “A”, extracción de piocianina (azul) con cloroformo y Ácido Clorhídrico (Rojizo). B) Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> en medio King “B” y obtención de la pioverdina por filtración (amarillo fluorescente).	102
Figura 46. Producción de Piocianina y Pioverdina en cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 en medios King “A” y King “B”	102
Figura 47. Producción de Piocianina de los cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9025 en medio King “A” tratados con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042. A) Producción con los sobrenadantes de fase logarítmica (10X) (4, 6 y 8 h); B) Producción con los sobrenadantes de fase estacionaria (10X) (12, 16 y 24 h); C) Producción con los testigos negativos (Medios sin inocular MRS y MRSm 10X).	103
Figura 48. Producción de Piocianina de los cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9025 en medio King “A” tratados con los ingredientes de los medios MRS y MRSm.....	104
Figura 49. Producción de Pioverdina de los cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9025 en medio King “A” tratados con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042. A) Producción con los sobrenadantes de fase logarítmica (10X) (4, 6 y 8 h); B) Producción con los sobrenadantes de fase estacionaria (10X) (12, 16 y 24 h); C) Producción con los testigos negativos (Medios sin inocular MRS y MRSm 10X).	106
Figura 50. Producción de Pioverdina de los cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9025 en medio King “A” tratados con los ingredientes de los medios MRS y MRSm.....	107

Figura 51. Curva Patrón de Albumina Sérica Bovina por método de Micro-Bradford	124
Figura 52. Prueba de Tukey para la concentración de proteínas de los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	125
Figura 53. Curvas Patrón de Glucosa por método de Ácido Sulfúrico-Fenol.....	171
Figura 54. Curvas Patrón de Ácidos Urónicos Tetraborato de Sodio-Ácido Sulfúrico-Carbazol.....	172
Figura 55. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	174
Figura 56. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 36 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	176
Figura 57. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 48 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	178
Figura 58. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	180
Figura 59. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 36 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	182
Figura 60. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 48 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	184
Figura 61. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.	186
Figura 62. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.	188

Figura 63. Prueba de Tukey para la producción de Piocianina a las 12 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	190
Figura 64. Prueba de Tukey para la producción de Piocianina a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	192
Figura 65. Prueba de Tukey para la producción de Piocianina a las 48 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	194
Figura 66. Prueba de Tukey para la producción de Piocianina a las 60 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	196
Figura 67. Prueba de Tukey para la producción de Piocianina a las 72 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	198
Figura 68. Prueba de Tukey para la producción de Piocianina a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.....	200
Figura 69. Prueba de Tukey para la producción de Piocianina a las 72 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.....	202
Figura 70. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	204
Figura 71. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	206
Figura 72. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 48 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	208

Figura 73. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 12 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.....	210
Figura 74. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 24 h de cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.....	212

Abreviaturas

±: más-menos

≠: diferente

ATCC: American Type Culture Collection

AU: Ácidos Urónicos

BAL: Bacteria Ácido Láctica

BHI: Brain Heart Infution (Infusión Cerebro Corazón)

CIE: Comission Internationale de l'Eclairege (Comisión Internacional del Color)

CT: Carbohidratos totales

D.O: Densidad Óptica

EPS: Exopolisacáridos

g: gramo

L: litro

LBf: Medio Luria Bertani Fortificado con 1% glucosa

mg: miligramo

mL: mililitro

MRSm: Medio MRS modificado

MRS: Medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe)

nm: nanómetro

nmol: nanomol

PCR: Polimerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

PVD: pioverdina

PYO: piocianina

QS: *quorum sensing*

v/v: volumen/volumen

w/v: peso/volumen

xg: fuerzas g

μL: microlitro

μg: microgramo

Resumen

En el presente trabajo se caracterizó el efecto que los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 podrían provocar en el crecimiento y producción de algunos factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (exopolisacáridos y pigmentos pioverdina y piocianina). Utilizando el MRS modificado para la obtención de los sobrenadantes de *P. acidilactici* en fase logarítmica y estacionaria se observó por SDS/PAGE que las proteínas producidas, en concentración, cantidad y pesos moleculares diferían en cada fase de crecimiento. Se comprobó la actividad de Peptidoglicano hidrolasas en zimogramas de actividad en SDS/PAGE sobre *Micrococcus lysodeikticus* con bandas de 115 y 110kDa, ya reportadas y otra no reportada a 61 kDa. Adicionalmente, en zimogramas con células de *P. aeruginosa* se observaron dos proteínas, de 21 y 17 kDa, capaces de lisarlas y que sólo están presentes en los sobrenadantes de fase estacionaria. Mediante las pruebas de inhibición en agar no se pudo determinar el efecto de los sobrenadantes, ya que los resultados dependían del medio de cultivo. En las cinéticas de crecimiento de *P. aeruginosa* se demostró que los sobrenadantes provocaban un efecto retardador en el que se prolongaba la fase *lag* de 4 a 8 h, aunque a las 24 h de cultivo se alcanzaban concentraciones (UFC/mL) sin diferencia estadística respecto del control, se evidenció que el Acetato de Sodio, Ácido Ascórbico o Tween 80 provocaban un efecto similar. Al adicionar los sobrenadantes de los cultivos de *P. acidilactici* de ambas fases, logarítmica y estacionaria se observó que provocaron un aumento de más de 107 veces en la producción de equivalentes de glucosa y de 164 veces más de ácidos urónicos, respecto del control, sin embargo todos los sobrenadantes redujeron drásticamente la producción de piocianina hasta en un 89% de la producción del control. Todos los sobrenadantes provocaron una mayor producción de pioverdina en términos de absorbancia $A_{405/600\text{nm}}$ a las 12 h de cultivo, sin embargo a las 24 h los niveles observados no presentaron diferencias estadísticas respecto del control.

Abstract

In this paper was characterized the effect of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 supernatants in the growth and production of some virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (exopolysaccharides and pigments pyocyanin-pyoverdin). Using MRS modified media to obtaining the logarithmic and stationary phase supernatants of *P. acidilactici*, was observed by SDS / PAGE the proteins produced, concentration, amount and molecular weights which differed in each growth phase. The activity of peptidoglycan hydrolase in SDS / PAGE zymograms on *Micrococcus lysodeikticus* with 115 and 110kDa bands, as reported and another 61 kDa unreported was found. Additionally, zymograms with *P. aeruginosa* cells two proteins of 21 and 17 kDa, able to lyse them were observed, present only in the stationary phase supernatant. Inhibition tests by agar could not determine the effect of supernatants, since the results were dependent on culture medium. In *P. aeruginosa* the kinetics of growth was shown that the supernatants caused a retarding effect on the lag phase stretched 4 to 8 h, but after 24 h of culture concentrations (CFU / mL) were achieved without statistical difference to the control, it was shown that sodium acetate, ascorbic acid or Tween 80 caused a similar effect. By adding the supernatants of *P. acidilactici* of both phases, logarithmic and stationary, were observed an increase of over 107 times of glucose equivalents and 164 times more uronic acids production, compared to the control. But all supernatants slashed production pyocyanin up to 89% of the production control. All supernatants led to increased production of pyoverdin in terms of absorbance $A_{405 / 600\text{nm}}$ at 12 h of culture, but at 24 hours the levels observed were not statistically different compared to the control.

Introducción

El principio de la bioconservación de alimentos es el uso de compuestos naturales, microbiota natural o controlada, sus metabolitos o ambos como herramientas biológicas para en el control sanitario de los mismos (Zhou *et al.*, 2010). *Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo alterante de la carne, capaz de producir grandes pérdidas económicas; estos microorganismos considerados como oportunistas, producen exopolisacáridos (EPS), principales constituyentes de las biopelículas que facilitan su sobrevivencia. Debido a que es parte de la microbiota de origen en la carne, a sus características y en especial a la producción de dichas biopelículas, es un reto garantizar la calidad y la inocuidad de la carne al asegurar su ausencia en estos alimentos (Borch *et al.*, 1996; Gram *et al.*, 2002).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son capaces de producir diferentes metabolitos con actividad antibacteriana; *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, ha sido estudiado por su capacidad de inhibir a otros microorganismos al adicionarse como cultivo iniciador en la fermentación de productos cárnicos (Quiroz, 2004). Llorente (2008) demostró que la cepa ATCC 8042 produce varias hidrolasas que actúan sobre sustratos proteicos y sobre el peptidoglicano de la pared celular de bacterias Gram positivas, posteriormente, Martínez (2011) observó *in vitro* el efecto inhibitorio que el sobrenadante neutralizado tuvo sobre microorganismos de interés sanitario tales como *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 y sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Particularmente, en el caso de *P. aeruginosa* se observó un efecto antagónico con el aumento en la fase de latencia, la disminución del crecimiento en la fase logarítmica y por consiguiente en la concentración bacteriana, además se observó que ya no fue capaz de producir pigmentos, relacionados con los factores de virulencia de este microorganismo.

En la presente investigación se continuará con la identificación del efecto que tiene la actividad antibacteriana del sobrenadante de la cepa ATCC 8042, sobre la expresión de algunos de los factores de virulencia en *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

1. Marco Teórico

1.1. Contaminación de Carne y Derivados

La carne es definida como la estructura compuesta por fibra muscular estriada, acompañada o no de tejido conjuntivo elástico, grasa, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos, de las especies animales autorizadas para el consumo humano (Modificación de la Norma Oficial Mexicana NOM-009-ZOO-1994, 2007). El alargamiento de la vida de anaquel y el mantener las características organolépticas y de calidad de la carne (color, olor, textura y sabor), están asociadas con un gran número de factores interrelacionados, entre los que destacan la microbiota del alimento y los factores intrínsecos a él, tales como la temperatura, la cantidad de oxígeno, las enzimas endógenas y la humedad (Zhou *et al.*, 2010).

El músculo como tal se considera estéril, sin embargo, se puede contaminar con microorganismos indeseables durante el procesamiento de la canal, donde los microorganismos presentes en el ambiente, en los utensilios y operarios durante el desollado y eviscerado, o por el contacto con la piel o con el contenido del tracto gastrointestinal del animal, así como el agua utilizada para la limpieza, las superficies de contacto durante el almacenamiento y procesado, el equipo de trabajo y las puertas y paredes de la planta de sacrificio pueden producir cierto grado de contaminación (FAO, 2007).

1.2. Microorganismos alterantes

El deterioro de los alimentos es un proceso complejo y grandes cantidades de alimentos se pierden debido a las alteraciones que provocan los microorganismos, incluso con las modernas técnicas de conservación. La microbiota presente está dada en función de las condiciones del proceso, conservación y almacenamiento del producto (Gram *et al.*, 2002).

El deterioro de las carnes rojas puede ocurrir tanto a temperatura ambiente, como en condiciones de refrigeración, por la acción de microorganismos mesófilos y psicrófilos, en la superficie del alimento, aunque éste se puede producir en el interior cuando se trata de

productos cárnicos crudos, curados o madurados. En condiciones de refrigeración y mesofilia pueden intervenir las especies de los géneros *Alcaligenes*, *Acinetobacter* y especialmente *Pseudomonas* cuyos miembros producen compuestos de olor desagradable debido a la degradación de aminoácidos (Gram *et al.*, 2002; Nychas *et al.*, 2008).

Adicionalmente se pueden producir biopelículas por bacterias ubicuas, patógenas y alterantes, que les confieren propiedades de adhesión a superficies y supervivencia a condiciones de estrés formando comunidades uni o multiespecie con funciones complejas (Chmielewsky y Frank, 2003); una de ellas es la activación de los sistemas *quórum sensing* que derivan en la producción de sustancias que favorecen la virulencia de patógenos y la actividad de las bacterias alterantes de los alimentos, por lo que nuevos estudios se han llevado a cabo para generar nuevas tecnologías para su control (Jamuna Bai y Ravishankar Rai, 2011).

Ejemplo de lo anterior es la aparición de brotes de enfermedades debidos a la presencia de patógenos dentro de las biopelículas de *Pseudomonas* spp. como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, derivados de una limpieza y desinfección pobres, que favorecen la acumulación de suciedad y presencia de humedad en superficies, equipos y ambientes en los que los alimentos puede tener contacto (Chmielewsky y Frank, 2003).

1.2.1. *Pseudomonas* spp.

Son bacilos rectos o ligeramente curvos, Gram negativos, aerobios, catalasa y oxidasa positivos, con un flagelo polar, aunque en forma ocasional pueden tener dos o tres flagelos; son psicrotróficos y pueden crecer a 5°C. Por sus simples requerimientos nutricionales, pueden sobrevivir y crecer en casi cualquier ambiente con cantidades mínimas de compuestos orgánicos. Se encuentran en suelo, agua, tierra, plantas, animales y sobre superficies de frutas y verduras (Cornellis, 2008).

El género *Pseudomonas* spp., es en la mayoría de los casos el responsable de la alteración de la carne y productos cárnicos almacenados en condiciones aerobias y a temperaturas de refrigeración (Borch *et al.*, 1996; Arnaut-Rollier *et al.*, 1999y Doulgeraki *et al.*, 2012), y son tres las especies más importantes de *Pseudomonas*: *P. aeruginosa*, *P. fragi*, *P. fluorescens* y *P. lundensis* (Nychas *et al.*, 2008). Estas bacterias utilizan primeramente la glucosa como fuente de carbono con la producción de acetoína, ácido acético, ácido isobutírico y ácido isovalérico. Cuando la glucosa se agota, utilizan los aminoácidos dando lugar a la formación de sulfuros (H₂S, metil sulfuro), ésteres, ácidos, etc. Cuando estas alcanzan un nivel de 10⁸ UFC/g, se activa el sistema *quórum sensing* y la producción de exopolisacárido, responsable de la formación de biopelículas, así la superficie del tejido muscular comienza a ser pegajosa; además se producen olores afrutados cuando las cuentas se incrementan a 10⁹ UFC/g., haciendo al producto indeseable para consumo humano (Ercolioni *et al.*, 2006 y Chmielewsky y Frank, 2003). También es considerado como un patógeno oportunista en infecciones císticas, respiratorias e intrahospitalarias (Waters y Bassler, 2005).

1.2.1.1. Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*

Durante la última década se han hecho esfuerzos por comprender y detectar las señales de *quórum sensing* que permitan contrarrestar en la industria alimentaria el fenómeno de la producción de enzimas, pigmentos y más importante, las biopelículas.

Entre los factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* más estudiados, se tienen a los productos finales del sistema *quórum sensing* como la producción de biopelícula y de los pigmentos piocianina y pioverdina, se denominan así ya que gracias a ellos *P. aeruginosa* puede actuar como patógeno oportunista evadiendo el sistema inmunitario y resistiendo a químicos y antibióticos (Chmielewsky y Frank, 2003, Waters y Bassler, 2005 y Jamuna Bai y Ravishankar Rai, 2011).

1.2.1.1.1. Biopelículas

P. aeruginosa son microorganismos alterantes ubicuos y han sido el modelo bacteriano en los que se ha realizado la mayoría de los estudios de formación de biopelículas, cuya estructura es compleja e involucra tres componentes:

- a) la masa de bacterias, la cual está formada por una sola especie o por múltiples especies;
- b) los espacios extracelulares o canales
- c) y la matriz extracelular que la rodea (De Kievit *et al.*, 2001).

La cercanía entre las bacterias facilita la transferencia horizontal de genes, plásmidos o fagos, lo cual favorece la diversidad genética de las comunidades microbianas (Figura 1), a través de los canales se intercambia oxígeno, agua y nutrientes. La matriz extracelular está constituida por diversas sustancias como proteínas, ácidos nucleicos, y una mezcla de exopolisacáridos (EPS) como el alginato, tienen diversas funciones: actúan como un mecanismo de concentración de nutrientes, previenen el acceso de ciertos agentes antimicrobianos o restringen su difusión hacia el interior de la biopelícula, debido a sus cualidades impermeables y actúan como protectores contra factores ambientales desfavorables o condiciones de estrés ambiental como rayos ultravioleta, cambios de pH, choque osmótico y desecación (Golovlev, 2002; Knezevic y Petrovic, 2008).

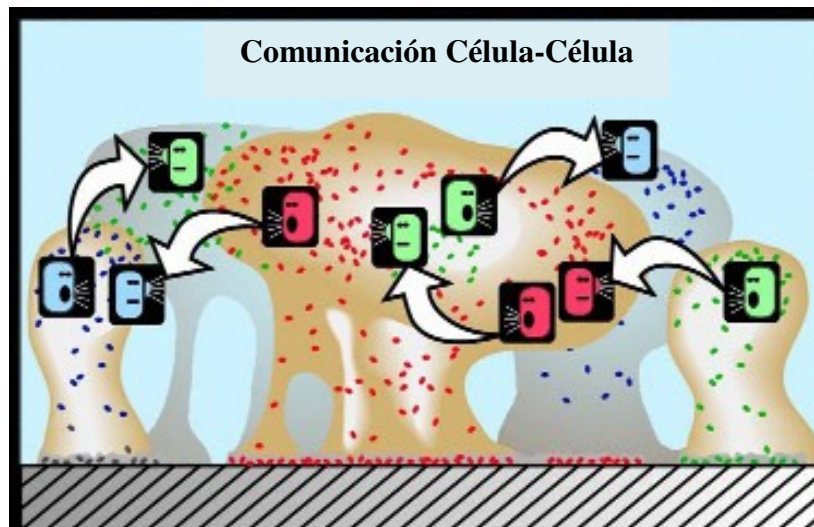


Figura 1. Comunicación intraespecie

Fuente: Cunningham *et al.*, 2010

Las biopelículas se desarrollan sobre cualquier superficie húmeda con una mínima presencia de materia orgánica. La unión a la superficie es acompañada por la formación de microcolonias y finalmente se da la maduración de éstas dentro de una cápsula de exopolisacáridos. Esta población de bacterias funciona de un modo complejo y coordinado, en la cual cada una actúa como parte integral de una comunidad. La formación de una biopelícula incluye diferentes etapas (Figura 2): 1) fijación bacteriana sobre la superficie por medio de adhesinas, fimbrias, de flagelos o de ambos; 2) tras la adhesión comienza la multiplicación y las células hijas se esparcen sobre la superficie formando microcolonias; 3) la colonia comienza a secretar una matriz de exopolisacáridos que dan lugar a un complejo de estructura tridimensional; 4) se forman canales por los cuales las bacterias de capas profundas pueden adquirir nutrientes y 5) finalmente, si las condiciones ambientales lo permiten se pueden extender hacia otras áreas o liberarse algunas células con capacidades planktónicas para colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de formación de la biopelícula(Stoodley *et al.*, 2002, Toutain *et al.*, 2004; Lembre *et al.*, 2012).

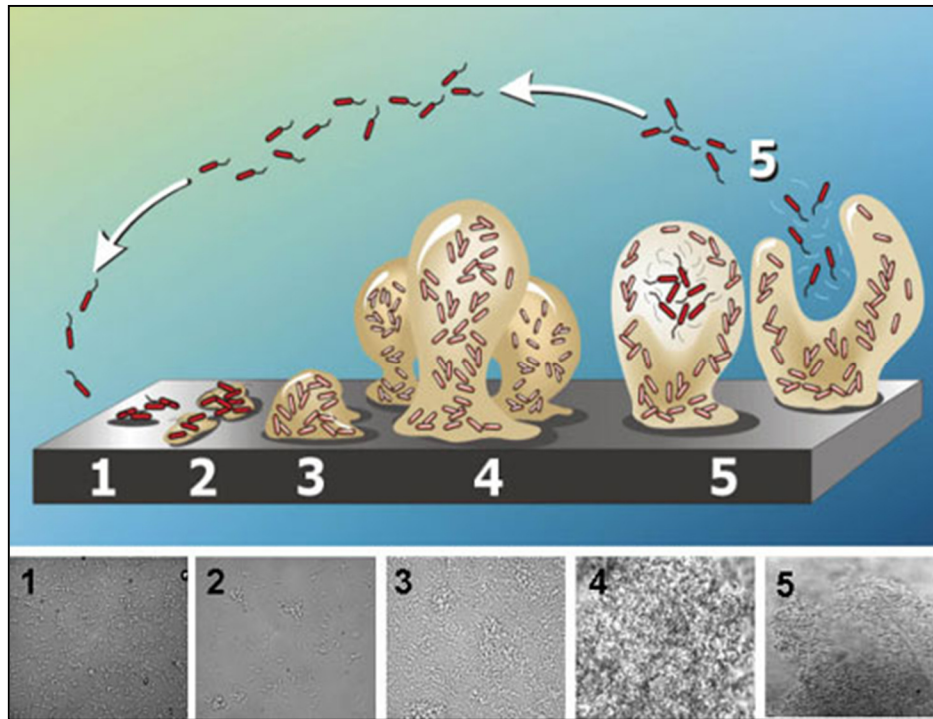


Figura 2. Etapas de la formación de una biopelícula, 1) Adherencia Inicial, 2) Formación de microcolonias, 3) Formación de macrocolonias, 4) Maduración de la biopelícula y 5) Separación de la biopelícula

Fuente: Stoodley *et al.*, 2002

1.2.1.1.2. Exopolisacáridos

Uno de los factores claves de la estructura de la biopelícula es la matriz polimérica extracelular o polisacáridos extracelulares (EPS) (Cuadro 1). Los EPS proveen la matriz en la que se localizan las células actuando también como una cubierta protectora, así como una fuente de carbono y energía de reserva (Toutain *et al.*, 2004). Las señales celulares que le permiten a la bacteria identificar el momento óptimo para sintetizar los exopolisacáridos son multifactoriales, destacan la presencia o ausencia de ciertos nutrientes, la de sustratos a los cuales se puedan adherir las células plasmónicas y el mismo contacto con dicha superficie. De este modo la ruta de señales desencadena la activación del operón *alg*, encargado de transformar la manosa en ácido manurónico y de excretarlo al medio para generar la matriz

extracelular de alginato (Davies *et al.*, 1993). Plata Stapper *et al.*, (2004) han demostrado que no siempre los exopolisacáridos son esenciales en la formación de la biopelícula, sin embargo la falta de producción de alginato tiene efectos importantes en la arquitectura de la misma.

Cuadro 1. Contenido de Exopolisacáridos (EPS) en biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*

Fuente de la Biopelícula	Naturaleza de los carbohidratos	Concentración (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ácido Manurónico (Alginato)	0-100
	Glucosa	0-56.0
	Ramanoza	0-20.7
	Galactosa	0-12.4
PAO1	Manosa	0-13.9
PDO300	Xilosa	0- 9.7
<i>algD</i>	Ketodeoxioctulosanato	0- 9.1
PA14	N-acetyl galactosamina	0- 1.9
ATCC 9027	N-acetyl fructosamina	0- 7.5
	N-acetyl glucosamina	0- 3.8
	N-acetyl quinovosamina	0-18.1
	Amino azucares desconocidos	0- 5.0

Fuente: Modificado de Lembre, *et al.*, 2012

1.2.1.1.3. Alginato

Los alginatos de origen bacteriano son polisacáridos producidos por microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* y han sido ampliamente estudiados. Se trata de un exopolisacárido de un peso molecular relativamente alto, que está constituido de residuos de ácidos urónicos como β -D-manuronato (M) y su epímero en C-5, α -L-glucuronato (Figura 3). Generalmente, los monómeros forman un bloque copolimérico con regiones homopoliméricas de poli- β -D-manuronato (Bloques-M) y poli- α -L-glucuronato (Bloques-G) así como regiones heteropoliméricas (Bloques-MG) (Golovlev, 2002; Lembre *et al.*, 2012).

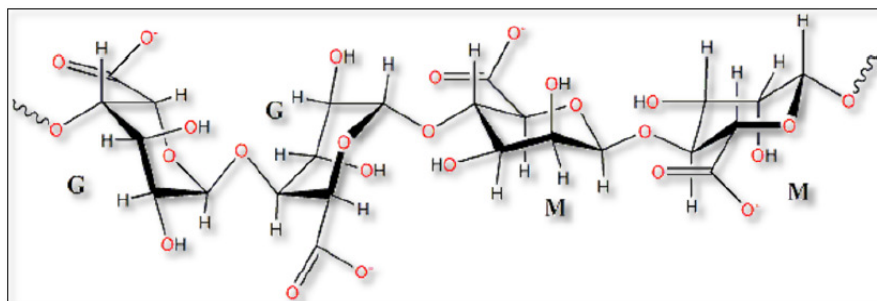


Figura 3. Estructura del Alginato (G) Glucoronato, (M) Manuronato

Fuente: Lembre *et al.*, 2012

Pseudomonas aeruginosa tiene 24 genes involucrados en la producción y secreción del alginato, ocho de los cuales están implicados en la exportación de los ácidos algínicos, doce se encargan de su biosíntesis y sólo 4 se involucran en la regulación de su síntesis (Figura 4) (Lembre *et al.*, 2012).

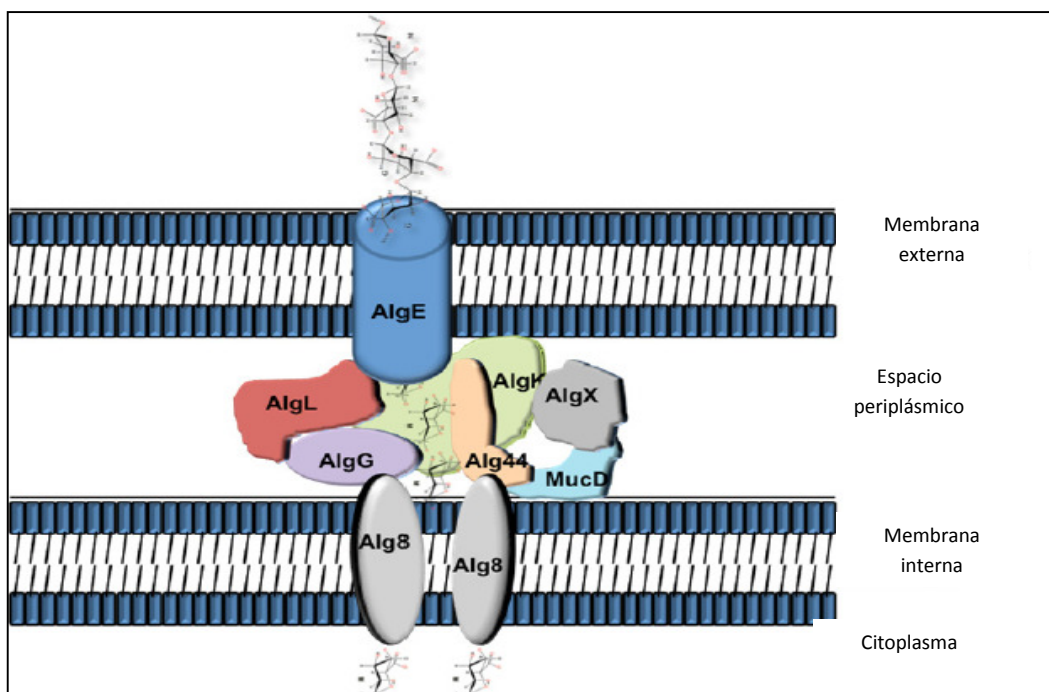


Figura 4. Biosíntesis del alginato

Fuente: de Lembre *et al.*, 2012

1.2.1.1.4. Pigmentos

Entre las bacterias productoras de pigmentos hay algunas que producen fenazinas y/o sideróforos, que pueden funcionar como factores de virulencia porque facilitan el crecimiento en condiciones limitadas de hierro. Las fenazinas, como el ácido phenazina-1-carboxílico (PCA), el ácido 2-hidroxiphenazina-1-carboxílico, la phenazina-1-carboxamida (PCN) y la piocianina (PYO), generan potenciales *redox* que ayudan a los microorganismos a combatir a otros para poder establecerse. Los sideróforos, como los ferricromos, las desferrioxaminas, fusarininas, ornibactinas, enterobactinas, bacillibactinas, vivriobactinas, azotobactinas, pioverdinas (PVD) y yersinibactinas, son quelantes del hierro, que ayudan a sobrevivir a los microorganismos en un medio escaso de nutrientes (Mavrodi *et al.*, 2001; Mavrodi *et al.*, 2010 y Nadal Jiménez *et al.*, 2012).

a) Piocianina

La piocianina (PYO) es un derivado de las fenazinas, metabolito activo que tiene una función *redox* que actúa como competidor bacteriano y factor de virulencia; se estima que del 90 al 95% de las *Pseudomonas aeruginosa* aisladas la producen (Pichardo Reyes, *et al.*, 1981). Su síntesis depende de los sistemas *las* y *rhl* del *quórum sensing* de *Pseudomonas aeruginosa* y de que este promueva a los genes del operón *phz* (Figura 5) (Mavrodi *et al.*, 2001).

Las propiedades antibióticas de las feniácinas fueron estudiados por Pietrich *et al.*, en 2006, quienes descifran que en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* la piocianina es un metabolito secundario que está implicado como autoregulator del *quórum sensing* en la fase estacionaria de crecimiento, mismo que activa la transcripción del factor SoxR, encargado de regular la super oxidación del microorganismo impidiendo que a él mismo lo afecte la piocianina (Dietrich *et al.*, 2006).

Este compuesto es soluble en dimetil sulfóxido (DMSO), etanol, cloroformo y acetona, por lo que su extracción de cultivos en donde se produzca, debe de hacerse con alguno de estos

disolventes. Su cuantificación se puede realizar por métodos colorimétricos usando una curva patrón con el compuesto purificado (Sigma-Aldrich Co. LLC. *b*, 2012).

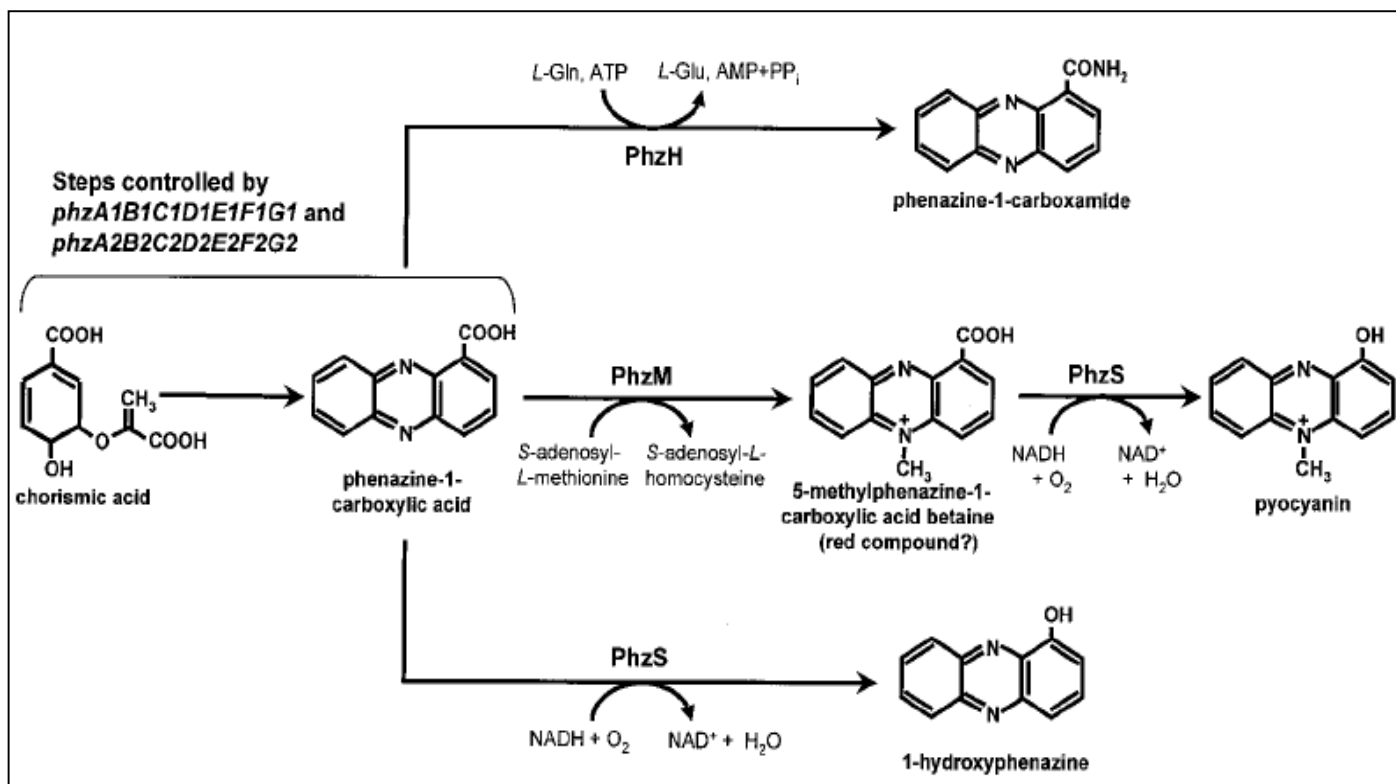


Figura 5. Mecanismo de síntesis de piocianina por *Pseudomonas aeruginosa*

Fuente: Mavrodi *et al.*, 2001

b) Pioverdina

La pioverdina (PVD) es un pigmento, soluble en agua de color verde-fluorescente, perteneciente al grupo de compuestos denominados sideróforos, fue descrito por primera vez en 1942 por Turfreij y ha recibido muchos nombres (fluoresceína, pseudobactina). Su función es la de transportar y quelar hierro del medio ambiente que rodea al microorganismo. *Pseudomonas aeruginosa* lo secreta y está asociado al biocontrol de hongos patógenos en la biósfera, además de que es requerido en las infecciones oportunistas en mamíferos (Visca *et al.*, 2006; Nadal Jiménez *et al.*, 2012).

Los sideróforos consisten en un cromóforo tipo quinolona unido a un ácido dicarboxílico y a un residuo peptídico corto y específico de la especie. En *P. aeruginosa* el péptido contiene dos residuos, uno de D-serina, L-treonina y N-formil-N-hidroxiornitina, y el otro de L-arginina y L-lisina (McMorran *et al.*, 2001). A la fecha se han descrito más de 50 tipos de pioverdina del género *Pseudomonas* clasificados en tres tipos (Figura 6) (Visca *et al.*, 2006; Nadal Jiménez *et al.*, 2012).

Este compuesto es soluble en agua, lo que facilita su cuantificación del sobrenadante de los cultivos, la cual se puede realizar por lectura de absorbancia usando una curva patrón con el compuesto purificado disuelto en los medios de cultivo y extraídos según las recomendaciones del fabricante (Sigma-Aldrich Co. LLC. *a.*, 2012).

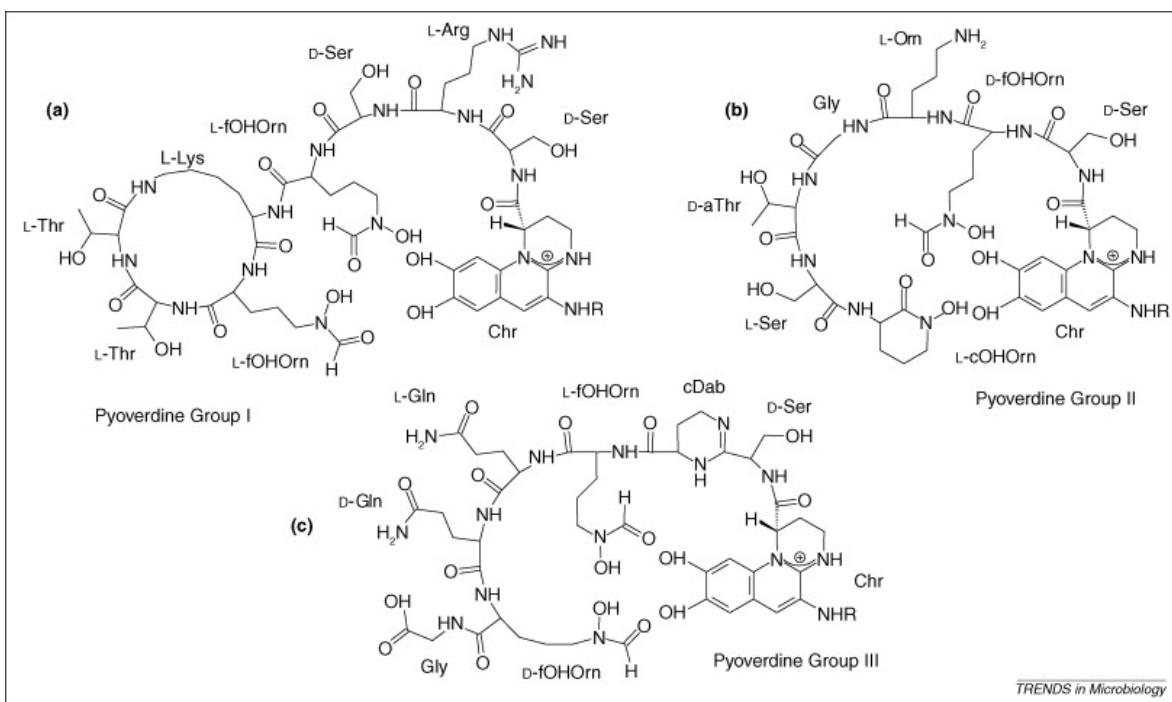


Figura 6. Los tres tipos de PVD de *Pseudomonas aeruginosa*

Fuente: Visca *et al.* 2006

1.3. Conservación de productos cárnicos

Tradicionalmente los métodos de conservación de la carne y los derivados cárnicos han sido clasificados en tres grupos, los basados en el control de la temperatura o la humedad y los procesos directos de inhibición (bioconservación) y los métodos de procesamiento mínimo, que incluyen el uso de radiación inozante y modificación de atmósferas en el envasado de alimentos (Zhou, *et al.*, 2010).

1.3.1. Bioconservación

La definición de bioconservación se puede aplicar al proceso por el cual la vida de anaquel se extiende y la inocuidad de producto se ve favorecida mediante el uso de microbiota natural o controlada, así como sus metabolitos tales como la nisina y lisozima que han sido usados con el fin de reemplazar a los productos químicos. Las bacterias ácido lácticas (BAL) y sus productos antimicrobianos, como el ácido láctico, diacetilo, peróxido de hidrógeno, reuterina y las bacteriocinas han sido estudiadas extensamente y pueden presentar sinergismo en la inhibición, tanto de microorganismos alterantes, como de patógenos. Así mismo, nuevas biotecnologías basadas en el uso de compuestos naturales, tales como aceites esenciales y quitosán y han tomado relevancia en la conservación de alimentos (Zhou, *et al.*, 2010).

1.3.2. Bacterias Ácido Lácticas

Las BAL se utilizan en alimentos fermentados consumidos por el hombre desde siglos atrás. Se encuentran asociadas con los alimentos e incluyen microorganismos de los géneros *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus* y *Weisella* y bacilos de los géneros *Lactobacillus*, *Sporolactobacillus* y *Carnobacterium* (Klein *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 2002).

1.3.2.1. Clasificación de las BAL

Orla-Jensen, en 1919, clasificó a las BAL en dos grupos, según el tipo de fermentación de la glucosa como: homofermentativas y heterofermentativas, dependiendo del producto final de la fermentación, las homofermentativas producen ácido láctico como producto principal a partir

de la fermentación de la glucosa. Por otro lado, las heterofermentativas además pueden producir otros ácidos orgánicos y etanol (Klein *et al.*, 1998; Axelsson, 2004). La clasificación que propone Carr *et al.*,(2002) obedece a la morfología, temperaturas, tipo de fermentación de la glucosa, la configuración del ácido láctico producido, la capacidad de crecer a altas concentraciones de sal y la tolerancia a la acidez o a la alcalinidad (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características diferenciales de las bacterias ácido lácticas

Características	Bacilos		Cocos							
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus Vagococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Leuconostoc Oenococcus</i>	<i>Weisella</i>	
Fermentación	Homofermentativas		Homofermentativas						Heterofermentativas	
Crecimiento:										
10° C	+	±	+	+	±	-	+	+	+	
45° C	-	±	+	-	±	±	-	-	-	
6.5% NaCl	ND	±	+	-	±	-	+	±	±	
18% NaCl	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
pH 4.4	ND	±	+	±	+	-	-	±	±	
pH 9.6	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
Ác. láctico ^a	L	L, D,DL	L	L	L,DL	L	L	D	L,DL	
Formación de tétradas	-	-	-	-	+	-	+	-	-	

(+) positiva; (-) negativa; (±) varía entre especies

ND = No determinado

^a = Configuración del ácido láctico producido durante la fermentación: (D) dextrógiro; (L) Levógiro; (DL) forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas D y L.

Fuente: Modificado de Carr *et al.*, 2002.

1.3.2.2. Substancias antibacterianas producidas por las Bacterias Ácido Lácticas

La mayoría de las BAL tienen la propiedad de sintetizar sustancias con actividad antimicrobiana como parte de un mecanismo de defensa y de competencia ante otros microorganismo denominadas bacteriocinas (Magnusson, 2003).

1.3.2.2.1. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son polipéptidos de diferente peso molecular, biológicamente activos, sintetizados por los ribosomas durante la fase exponencial de crecimiento de la célula productora. Una característica relevante de estos compuestos con actividad bactericida, es que los microorganismos que las producen son resistentes a sus propias bacteriocinas, propiedad que se encuentra mediada por proteínas inmunes muy específicas (Klaenhammer, 1993).

Ejemplos bien conocidos de bacteriocinas son la nisina (Nisaplin™), la cual es producida industrialmente por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y la pediocina PA-1 (ALTA 2341™) producida por especies tales como *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. parvulus* y *Lactobacillus plantarum*; ambas son las únicas bacteriocinas aprobadas (Nisaplin™ desde 1988 y ALTA 2341™ desde 2001) por la FDA (Food and Drug Administration) para ser utilizada como conservadoras de alimentos ofreciendo una amplia gama de posibilidades de prevención del desarrollo de especies de bacterias indeseables en alimentos (Cintas *et al.*, 2001 y Cotter *et al.*, 2005).

a) Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas han sido agrupadas bajo diferentes criterios tales como espectro de inhibición, mecanismo de acción, estructura química, tamaño y resistencia a la temperatura. Cotter *et al.*, en 2013, proponen una clasificación en la cual considera dos clases: la clase I pertenece a los péptidos que sufren una modificación post-traducciona l y la clase II péptidos, que en su mayoría no sufren modificaciones o sufren algunas menores como la formación de algunos puentes disulfuro. Esta clasificación excluye a péptidos de gran peso molecular que dejan de ser considerados como bacteriocinas y de igual manera a las sustancias antimicrobianas sintetizadas por los ribosomas de bacterias Gram negativas tales como las

pequeñas microcinas y las grandes colicinas ahora clasificados dentro de los RiPPs (Ribosomally Synthesized, Post-Translationally Modified Peptides) (Cuadro 3) (Cotter *et al.*, 2013).

b) Mecanismo de acción

Por lo general actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), de ATP y aminoácidos, pérdida de la fuerza motriz de protones (FPM), e inhibición de la síntesis de macromoléculas y producción de energía, otras actúan impidiendo la síntesis correcta de la pared celular, otras más rompiendo los enlaces glucosídicos o peptídicos del peptidoglicano; todos estos mecanismos conducen a una rápida muerte de la célula (Figura 7) (Cotter *et al.*, 2005 y 2013).

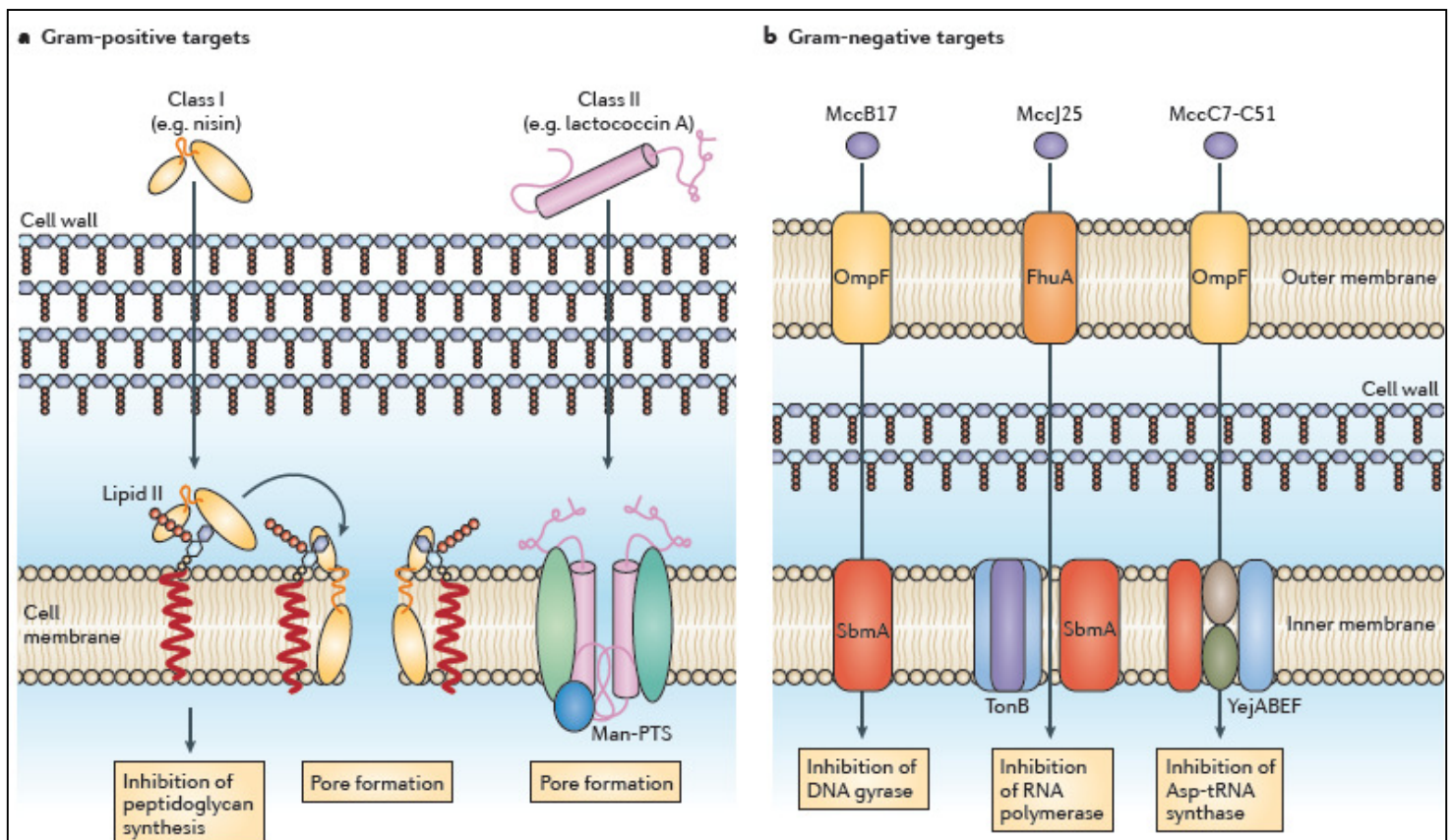


Figura 7. Mecanismo de acción de las bacteriocinas en bacterias Gram Positivas y Gram Negativas

Fuente: Cotter *et al.*, 2013

Cuadro 3. Clasificación de las Bacteriocinas

GRUPO	RASGO DISTINTIVO	EJEMPLOS
<i>Clase I (péptidos modificados postraducción)</i>		
Bacteriocinas tipo MccC7-C51	Covalentemente unido a un ácido aspártico de carbón terminal	MccC7-C51
Péptidos Lasso	Tiene una estructura lasso	MccJ25
Péptidos lineares que contengan azole o azolina	Posee un heterociclo sin otras modificaciones	MccB17
Lantibióticos	Tiene puentes de lantionina	Nisina, planosporicina, mersacidina, actagardina, mutacina 1140
Linaridinas	Estructura lineal que contiene aminoácidos deshidratados	Cipemicina
Proteusinas	Contiene múltiples hidroxilaciones, epimerizaciones y metilaciones	Politheonamida A
Sactibióticos	Contiene uniones sulfuro- α carbón	Subtilosina A, thuricina CD
Cianobactinas parecidas a la Patelloamida	Tiene heterociclos y sufre una macrociclización	Patellamida A
Cianobactinas parecidas a Anaciclamida	Péptidos cíclicos consistentes en aminoácidos proteínogenicos con uniones prenil	Anaciclamida A10
Thiopeptidos	Contiene una piridina o dihidropiridina central o anillada como heterocíclico	Thiostrepton, nocathiacina I, GE2270 A, philipimicina
Botromicinas	Tiene una amidina macrocíclica, una terminal tiazol descarboxilada y aminoácidos carbón-metilados	Botromicina A2
Glicocinas	Contain S-linked glycopeptides	Sublancina 168
<i>Clase II (sin modificar)</i>		
IIa (Bacteriocinas parecidas a Pediocina A-1)	Posee un motive conservado YGNGV (N representa cualquier aminoácido)	Pediacina PA-1, enterocina CRL35, carnobacteriocina BM1
IIb	Dos péptidos modificación son necesarios para su actividad	ABP118, lactacina F
IIc	Péptidos cíclicos	Enterocina AS-48
IId	Bacteriocinas lineares sin parecido a las Pediocinas de un solo péptido	MccV, MccS, epidermicina NI01, lactococcina A
IIe	Contienen una carboxi terminal rica en serina con un a region no ribosomal con una modificación tipo de sideróforo	MccE492, MccM

Fuente: Modificado de Cotter *et al.*, 2013

1.3.2.2.2. Ácidos orgánicos

a) Ácido láctico:

Es el metabolito que producen en mayor cantidad las BAL; es capaz de difundir a través de la membrana celular por ser liposoluble y una vez dentro, dependiendo del pH intracelular, puede disociarse en mayor o menor medida liberando iones de H^+ que acidifican el citoplasma causando con ello la muerte de las bacterias susceptibles (Alakomi *et al.*, 2000).

b) Ácido acético, propiónico y piroglutámico:

Las BAL heterofermentativas también son capaces de producir ácido acético y propiónico. De la misma manera que el ácido láctico, ambos interaccionan con la membrana celular al neutralizar el potencial electroquímico. Sin embargo, éstos ácidos tienen un efecto antibacteriano más fuerte (Magnusson, 2003).

1.3.2.2.3. Otras sustancias con actividad antibacteriana

a) Dióxido de carbono:

El dióxido de carbono tiene un doble efecto antibacteriano. En su formación se crea un ambiente anaeróbico y además como tal, tiene actividad antibacteriana, ya que puede inhibir las descarboxilaciones enzimáticas y su acumulación en la bicapa lipídica causando una disfunción en la permeabilidad de la membrana (Salminen *et al.*, 2004).

b) Peróxido de hidrógeno:

En presencia de oxígeno, la mayoría de las BAL debido a que son catalasa negativa, son capaces de generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), sin embargo no se acumula en cantidades significativas, pues es descompuesto por la acción de peroxidasas, flavoproteínas y pseudocatalasas. El efecto antibacteriano del peróxido se atribuye a su efecto altamente oxidante, mediante la peroxidación de los lípidos de la membrana, lo cual genera cambios irreversibles en la membrana celular. También destruye las estructuras moleculares básicas de los ácidos nucleicos y las proteínas de la célula. La actividad contra las bacterias Gram positivas es bacteriostática, mientras que para las Gram negativas es bactericida (Magnusson *et al.*, 2003).

c) Diacetilo:

El citrato puede convertirse en diacetilo (2,3-butanodiona) vía piruvato. El diacetilo es responsable del aroma característico asociado con la mantequilla. Se produce por una gran variedad de microorganismos de los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Salminen *et al.*, 2004). Es más efectivo contra bacterias Gram negativas, levaduras y mohos, que contra las Gram positivas. Sin embargo, las cantidades necesarias para que se presente actividad antibacteriana son tan altas que afectarían dramáticamente el aroma y sabor de los productos. Se ha mostrado actividad antibacteriana del diacetilo a nivel de 200 µg/mL para bacterias Gram negativas y levaduras y 300 µg/mL para bacterias Gram positivas no lácticas (Hugenholtz, 1993 y Salminen *et al.*, 2004).

d) Reuterina:

La reuterina o hidroxipropionaldehído, es una sustancia de bajo peso molecular y altamente soluble, producida por las especies heterofermentativas de *Lactobacillus reuteri* que se encuentran principalmente en el tracto gastrointestinal humano y en algunos productos cárnicos. La reuterina tiene actividad antibacterial (*Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*), antifúngica (*Candida*), antiprotozoaria (*Trypanosoma*) y antiviral. Las mismas BAL son sensibles a la reuterina, pero son más resistentes que los demás microorganismos. Actúa inhibiendo la enzima ribonucleótido reductasa, lo que puede explicar su amplio espectro de inhibición (Magnusson *et al.*, 2003).

1.3.3. *Pediococcus* spp.

El género *Pediococcus* pertenece al grupo de las bacterias ácido lácticas asociadas con la fermentación de carnes, donde juega un papel importante en la producción de ácido láctico y desarrollo de sabor. A este género pertenecen siete especies (*P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. inopinatus*, *P. claussenii* y *P. cerevisiae*). (Carr y Chill, 2002). Son cocos Gram positivos y homofermentativos. Normalmente se presentan en tétradas o pares, no móviles, anaerobios facultativos. Todas las especies de este género crecen a 30 ± 2° C, su temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 40° C, con un máximo de 52° C. Se

destruyen por calentamiento a 72° C durante 10 min. El pH óptimo del medio de crecimiento es de 6 a 6.5 (Holzapfel *et al.*, 2006).

1.3.3.1. *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

1.3.3.1.1. Proteasas extracelulares producidas por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Llorente (2008), describe la producción de tres enzimas extracelulares obtenidas de los sobrenadantes de cultivos de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Dos con actividad únicamente proteolítica (200 y 50 KDa) sobre gelatina, caseína y elastina, y una más con actividad gelatinolítica (107 kDa) y péptidoglicano hidrolasa (110 kDa), lo cual se demostró por técnicas zimográficas en geles (SDS/PAGE) copolimerizados con células de *Micrococcus lisodeikticus* (Llorente *et al.*, 2008).

Las peptidoglicano hidrolasas (PGHs) son enzimas endógenas que intervienen en la remodelación recambio e inserción de monómeros de peptidoglicano de la pared celular en bacterias; dependiendo del tipo de enlace que hidrolicen, las peptidoglicano hidrolasas se clasifican en: muramidásas, glucoamidásas, amidásas, carboxipeptidasas y endopeptidasas. (Figura 8). Muchas de ellas coexisten en la pared celular de las bacterias tomando funciones de enzimas de recambio en la pared celular o autolisinas que causan la muerte celular (Lortal *et al.*, 1997; Miranda *et al.*, 2004; Lortal y Chapot-Chartier, 2005; Camiade *et al.*, 2010; y Szweda *et al.*, 2012).

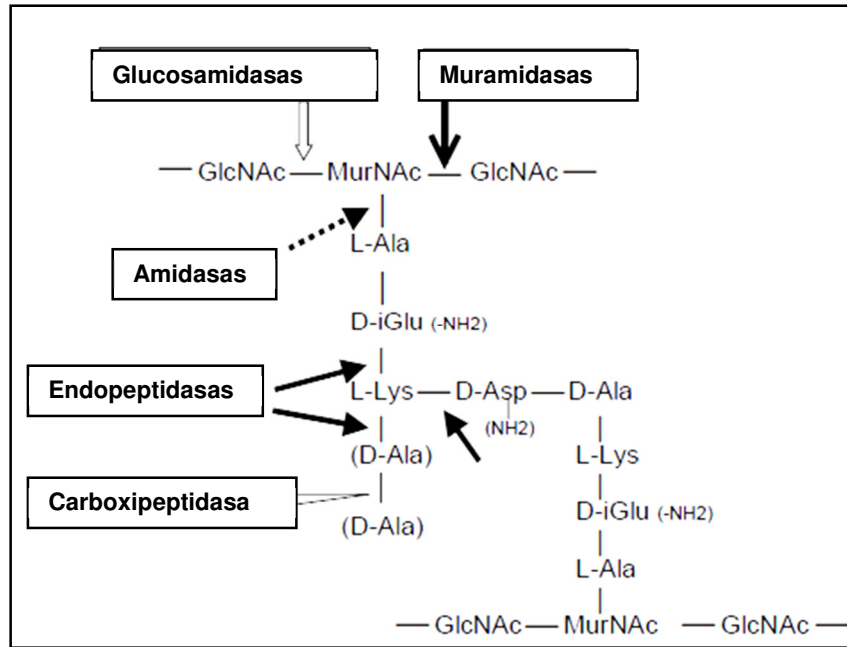


Figura 8. Representación esquemática del sitio de acción de las peptidoglicano hidrolasas

Fuente: Modificado de Lortal y Chapot-Chartier, 2005

1.3.3.1.2. Otras proteasas producidas por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Mora *et al.*, (2003) describen la presencia de enzimas autolíticas con actividad de peptidoglicano hidrolasa (116 kDa) en extractos proteicos de membranas celulares de *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici*, donde las N-acetilmuramidasas (AcmA) juegan un papel muy importante en la separación celular después de la división de las bacterias ácido lácticas y en la liberación de otras enzimas al autolisarlas (Lortal *et al.*, 2005). Garcia *et al.*, (2010) describen que de las proteínas unidas a la membrana celular y detritos celulares de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 existen dos con actividad peptidoglicano hidrolasas (de 110 y 99 kDa), las cuáles fueron analizadas por espectrometría de masas (LC /ESI-MS /MS) determinando que la proteasa de 110 kDa tenía una región homóloga a un transportador ABC (ATP-Binding Cassette) y la de 99 kDa es una N-acetilmuramidasas.

1.4. Identificación bacteriana mediante la comparación de secuencias del gen ribosomal 16S por PCR

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias.

Dado que los ARNr 16S y 18S proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas, el acrónimo ARNr SSU (del inglés, small subunit) se utiliza para ambos, estos se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones que se concentran en zonas específicas. El análisis de la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos permite identificar la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte de) los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo. Esta macromolécula presenta una serie de características, en base a las cuales fue considerado como un cronómetro molecular definitivo:

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas y, junto con las variaciones en los ARNr 18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr SSU contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
4. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1.500 nucleótidos) minimiza las fluctuaciones estadísticas.

5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento.

La especie bacteriana se define, en taxonomía, como el conjunto de cepas que comparten una similitud del 70% o más, en experimentos de reasociación ADN-ADN. Se ha demostrado que cepas con este nivel de relación presentan típicamente una identidad del 97% o más entre sus genes ARNr 16S. Así, cepas con menos del 97% de identidad en las secuencias de sus ADNr 16S es improbable que lleguen a estar relacionadas a nivel de especie. Sin embargo, existen cepas que comparten una similitud inferior al 50% en experimentos de reasociación, y son por tanto clasificadas en especies diferentes, pero presentan una identidad del 99-100% a nivel de ADNr 16S. Por ello, en taxonomía, actualmente se recomienda la identificación polifásica, que utiliza criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación¹⁰. En microbiología clínica, esto implica que la secuenciación del ADNr 16S no aportará siempre una identificación definitiva a nivel de especie.

Antecedentes

Llorente Bousquets (1998) demostró que *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 produce un efecto antagónico contra la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p inhibiéndola en un 66% en 10 h; al mismo tiempo identificó la presencia de un plásmido de 2,700 kDa y logró establecer una mejor composición del medio MRS con el objetivo de aumentar la producción de proteínas de efecto antagónico.

Rivera-Quiróz, en 2004, utilizó a *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como cultivo bioprotector en salamis, obteniendo una mejor calidad sanitaria de estos productos, al lograr una disminución de la cuenta total de mesófilos; y al desafiar estos modelos cárnicos con *Staphylococcus aureus* logró una disminución de 2 log UFC/g asociado a usar las bacterias completas. Al utilizar, tanto las células completas, como los sobrenadantes de cultivo se determinó que su actividad inhibitoria es mucho menor comparada con el Nisaplin™.

Hernández-Olvera (2005) cultivó *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en dos tipos de medios, observando mejores resultados en la producción de sustancias inhibitorias en medio MRS modificado, al utilizarlos se vieron afectadas bacterias Gram negativas como *E. coli*, *Salmonella enterica* var.. Typhimurium y Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua*, sin embargo *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus* no fueron afectados, lo que reforzó la hipótesis de que el compuesto producido difiere de las pediocinas.

Llorente *et al.*, (2008), demostraron que *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 es una cepa que no posee el gen *pedB* ni los plásmidos que se encuentran presentes en las cepas productoras de pediocinas y reportaron que el efecto bioconservador de la cepa ATCC 8042 se debe a tres compuestos con actividades proteolíticas (>200, 107 y 50 kDa) identificadas en el sobrenadante del cultivo en fase logarítmica, capaces de hidrolizar distintos sustratos proteicos (caseína, gelatina y elastina) y a una actividad peptidoglicano hidrolasa extracelular (110 kDa) dependiente de metales demostrada por una banda lítica al utilizar *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus lysodeikticus* copolimerizados como sustratos en zimogramas de actividad *in situ* (SDS-PAGE) y que por los resultados la sugieren como una autolisina producida por las bacterias lácticas (Llorente, 1998).

Granados-Pérez (2009) concluyó que el medio MRS modificado (por Llorente, 1998) es el que permite a *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 tener una mayor actividad enzimática contra elastina y gelatina, frente a caseína y colágeno. Logró caracterizar una metaloproteasa dependiente de Zinc con un peso molecular >200 kDa; sin embargo en la membrana celular de *P. acidilactici* encontró una metaloproteasa de 80 kDa y dos enzimas de alrededor de 110 kDa con efecto lítico en *Micrococcus lysodeikticus* y *Staphylococcus aureus*, que habían sido reportados por Llorente (2008); la proteasa mayor a 200 kDa tuvo efecto proteolítico aunque no bacteriolítico.

Velazco-Pérez (2010) obtuvo las proteínas adheridas a las membranas celulares (buffer de extracción), las adheridas a detritos celulares y las del citosol (sonicación) posteriormente las ultrafiltró por membranas de 50 kDa y de 100 kDa. Del filtrado de las proteínas adheridas a las membranas celulares pudo identificar una proteína con actividad de peptidoglicano

hidrolasa con un peso molecular de 110 kDa (por técnicas zimográficas en *Micrococcus lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus*, *P. acidilactici* y *E. coli*) y el mismo filtrado tuvo actividad antibacteriana contra bacterias patógenas, indicadoras y de colección Gram positivas y negativas; para *Pseudomonas aeruginosa* no se obtuvo evidencia de actividad inhibitoria.

Martínez-Trejo (2011), utilizó los sobrenadantes del cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 en medio MRS modificado, obtenidos de fase logarítmica, los cuales fueron procesados según Llorente (2008) en pruebas de dilución en caldo, de difusión y dilución en agar contra cultivos de *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*, observando en todas las pruebas inhibición positiva de ambos microorganismos. En pruebas de dilución en caldo hubo una inhibición total para *L. monocytogenes* y para *P. aeruginosa*, una reducción en la velocidad de crecimiento en fase logarítmica, aumento en la fase de latencia y reducción de UFC/ml, así como la inhibición en la producción de un pigmento verdoso (tentativamente pioverdina).

Justificación

Pediococcus acidilactici ATCC 8042 y sus sobrenadantes han demostrado la capacidad de bioconservación “*in vitro*” e “*in situ*” (salamis) al inhibir bacterias alterantes y patógenas Gram positivas como *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 entre otras y, ha mostrado algunos efectos antagónicos en Gram negativas como *E. coli* O157:H7 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Martínez Trejo (2011) observó que los sobrenadantes de *P. acidilactici* ATCC 8042 generaron efectos antagónicos prometedores sobre *P. aeruginosa* por lo que evaluar *in vitro* el efecto que tienen en la formación de biopelículas y pigmentos de esta bacteria oportunista, deteriorante y causante de pérdidas en productos cárnicos y sus derivados (estimándose hasta en un 8.5% de la producción total) (Doyle, 2007) permitirá elucidar su posible utilización como alternativa de bioconservación y control contra esta bacteria.

Hipótesis

La actividad inhibitoria que el sobrenadante de la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 tiene sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 afecta la expresión de algunos factores de virulencia de *P. aeruginosa*, como son la producción de exopolisacáridos y de pigmentos pioverdina y piocianina de interés sanitario en alimentos.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar *in vitro* el efecto de la aplicación de sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre algunos factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Objetivos particulares

- Caracterizar la actividad antibacteriana del sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.
- Determinar el efecto del sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre la producción de exopolisacáridos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.
- Analizar el efecto del sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre la producción de piocianina de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.
- Analizar el efecto del sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre la producción de pioverdina de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

2. Materiales y Métodos

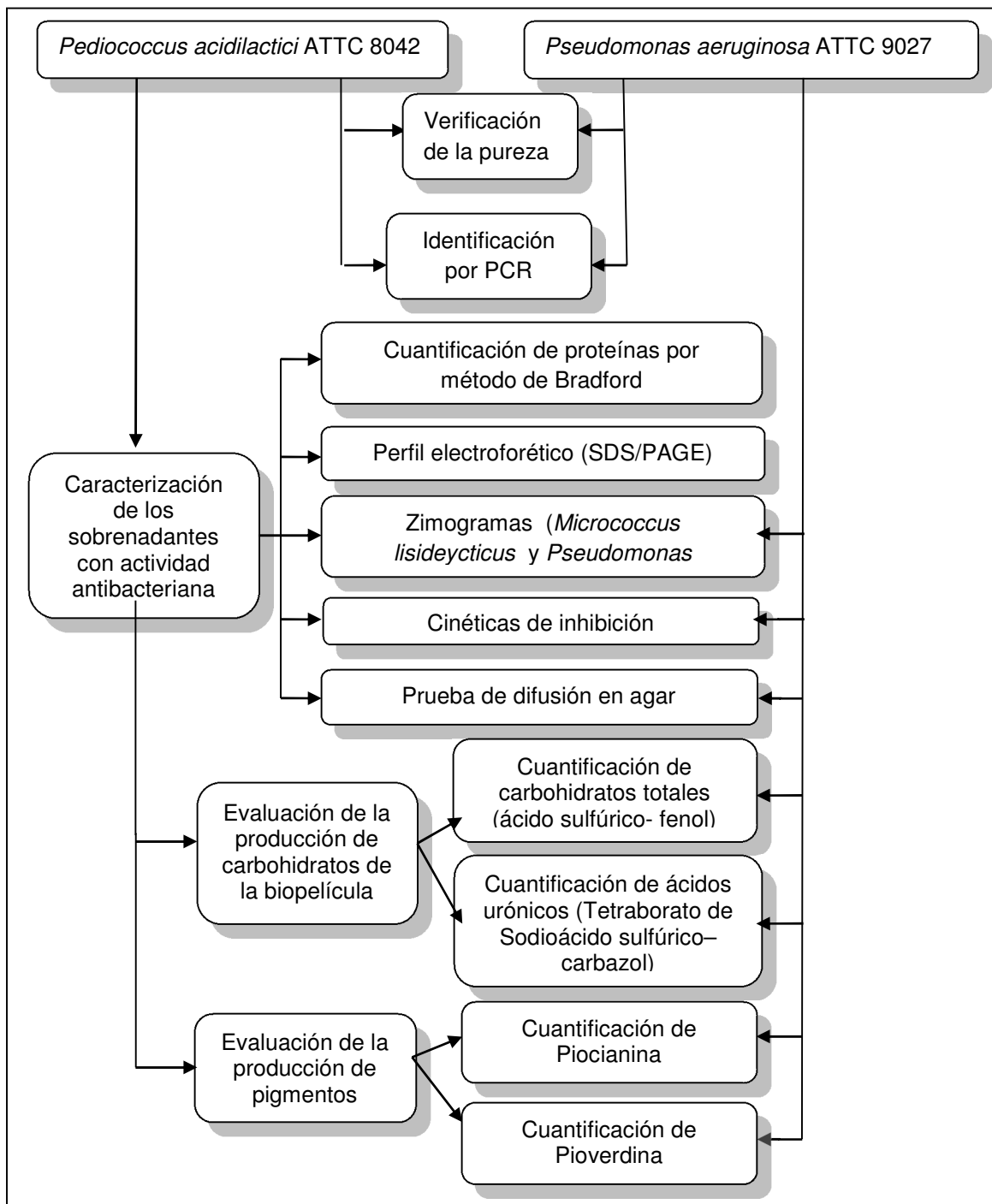


Figura 9. Resumen Metodológico

Fuente: Munguía-Villavicencio, 2012

2.1. Microorganismos

- Bacteria ácido láctica: Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó la cepa liofilizada de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.
- Microorganismo de prueba: Se utilizó la cepa liofilizada de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.
- Cepa liofilizada de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, como sustrato para los zimogramas de actividad *in situ* mediante electroforesis en gel.

Todas las cepas fueron proporcionadas por la Dra. Adriana Llorente Bousquets del laboratorio de Bioconservación (L-7) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

2.2. Medios de Cultivo y soluciones

Para las pruebas que se realizaron se utilizaron medios de cultivo sólidos y líquidos, tanto para *Pediococcus acidilactici* como para *Pseudomonas aeruginosa*, así como soluciones para realizar diluciones; los medios utilizados son los recomendados por la literatura.

2.2.1. Medio MRS modificado para el cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Llorente (1998), probó diversas formulaciones para el cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y encontró que el medio MRS (De Man Rogosa and Sharp) modificado (MRSm) por la adición de 10% (w/v) de sacarosa y 0.1% (w/v) de ácido ascórbico, permitieron el óptimo crecimiento de la cepa (Cuadro 4) (Llorente, *et al.*, 2008).

El método de preparación de los medios MRS fue el usado por Llorente (2008). Los ingredientes se pesaron y se resuspendieron en 950 mL de agua destilada en matraces Erlenmeyer de 2 L. Los 50 mL restantes se utilizaron para la preparación por separado de las soluciones de ácido ascórbico (10 mL) y de sacarosa (40 mL). El medio se esterilizó por separado para evitar las reacciones de Maillard; los ingredientes del matraz Erlenmeyer y la solución de sacarosa, en autoclave (marca Hirayama HV-50, California, USA) a 121° C

durante 15 min. El ácido ascórbico se esterilizó por membrana (0.22 μ m, Millipore). Una vez estériles y a temperatura ambiente, se adicionaron las soluciones de ácido ascórbico y de sacarosa al resto del medio y se mezclaron suavemente hasta su incorporación total; se dejaron en prueba de esterilidad por 24 h a 30 \pm 2° C (Llorente, 2008).

Cuadro 4. Formulación del caldo MRSm y agar MRS

Reactivo	Caldo (g /L)	Agar(g/L)	Proveedor
Bacto-peptona	10.0	10.0	B-D
Extracto de carne	10.0	10.0	B-D
Extracto de levadura	5.0	5.0	B-D
Glucosa	0.0	20.0	Técnica Química
Sacarosa	10.0	0.0	Mallinkrodt
Monoleato de polisorbitán 80 (Tween)	1.0	1.0	J. T. Baker
Citrato de amonio	2.0	2.0	J. T. Baker
Acetato de sodio	5.0	5.0	J. T. Baker
Sulfato de magnesio	0.1	0.1	J. T. Baker
Sulfato de manganeso	0.05	0.05	J. T. Baker
Fosfato dipotásico	2.0	2.0	J. T. Baker
Ácido ascórbico	1.0	0.0	J. T. Baker
Agar Bacteriológico	0.0	15.0	B-D

Fuente: Llorente (2008)

2.2.2. Medios de cultivo para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Los medios de cultivo para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 fueron el caldo y agar Luria Bertani fortificado (LBf), caldo y agar King “A” y caldo y agar King “B” los cuales fueron preparados según la literatura al pesar cada uno de los ingredientes y resuspenderlos en 1000 mL de agua bidestilada (Cuadros 5, 6 y 7). Posteriormente se esterilizaron a 121° C durante 15 min en la misma autoclave, los medios sólidos se sirvieron en cajas de Petri desechables estériles agregando aproximadamente 25 mL por caja y los caldos en los recipientes correspondientes para las pruebas (previamente esterilizados de la misma forma); una vez a temperatura ambiente se dejaron en prueba de esterilidad por 24 h a 30 \pm 2° C.

2.2.2.1. Luria Bertani fortificado (LBf)

El caldo y el agar Luria Bertani son medios de cultivo usados para mantener cepas recombinadas de *Escherichia coli* (Atlas y Snyder, 2006), con el fin de hacer estudios genéticos y moleculares; para los ensayos de la cuantificación de la biopelícula, Knezevic y Petrovic (2008) recomienda suplementar los medios Luria Bertani con Glucosa (2 g/L), dichos medios se prepararon en el laboratorio según el Cuadro 5; fueron esterilizados a 121°C por 15 min como previamente se describió.

Cuadro 5. Formulación para caldo y agar Luria Bertani fortificado

Reactivo	Caldo g/L	Agar g/L	Proveedor
Bacto Peptona No. 3	10.00	10.00	B-D
Extracto de Levadura	5.00	5.00	B-D
Cloruro de Sodio (NaCl)	5.00	5.00	Química Meyer
Agar Bacteriológico	0.00	15.00	B-D
Glucosa	2.0	2.0	Técnica Química

Fuente: Modificado de Atlas y Snyder, 2006

2.2.2.2. King “A” (*Pseudomonas P*)

El medio King “A” fue desarrollado por King, *et al.*, en 1954; este medio es usado para la detección y diferenciación de *Pseudomonas aeruginosa* de otras *Pseudomonas*, basándose en la producción de piocianina y la inhibición de la pioverdina (fluoresceína). Los laboratorios CONDA-Pronadisa (2012) y Sigma-Aldrich (2012) indican en su ficha técnica que este medio permite a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 producir un pigmento verde azulado.

Los ingredientes para este medio se pesaron y resuspendieron en 990 mL de agua bidestilada (Cuadro 6), con la observación de agregar Glicerol (10 mL/L) como fuente de carbono y esterilizarlo todo junto de la forma ya descrita.

Cuadro 6. Formulación para el caldo y agar King “A”

Reactivo	Caldo g/L	Agar g/L	Proveedor
Gelatina de Peptona	20.00	20.00	B-D
Sulfato de Potasio (K ₂ SO ₄)	10.00	10.00	Fermont
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	1.40	1.40	Sigma-Aldrich
Agar Bacteriológico	0.00	10.00	B-D
Glicerol añadido (C ₃ H ₈ O ₃)	10.00	10.00	J.T. Baker

Fuente: Modificado de King E.O., *et al.*, 1954 y de Atlas y Snyder, 2006

2.2.2.3. King “B” (*Pseudomonas* F)

El medio King B fue desarrollado de igual manera por King, *et al.*, en 1954; con el objeto de detectar y diferenciar *Pseudomonas aeruginosa* de otras *Pseudomonas*, basándose en la producción de pioverdina (fluoresceína) y la inhibición de la piocianina. Los mismos laboratorios que indican las cepas que producen piocianina en medio King “A” mencionan que la misma cepa (*P. aeruginosa* ATCC 9027) produce pioverdina en King “B” (Sigma-Aldrich, 2012b y CONDA-Pronadisa, 2012b).

Los ingredientes para este medio se pesaron y resuspendieron en 990 mL de agua bidestilada (Cuadro 6), y al igual que el medio King “A” se agregó Glicerol (10 mL/L) para esterilizarlo todo junto de la misma forma.

Cuadro 7. Formulación para el caldo y agar King “B”

Reactivo	Caldo g/L	Agar g/L	Proveedor
Peptona de Gelatina	10.00	10.00	B-D
Peptona de Caseína	10.00	10.00	B-D
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	1.50	1.50	J.T. Baker
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	1.50	1.50	Química Meyer
Agar Bacteriológico	0.00	10.00	B-D
Glicerol añadido (C ₃ H ₈ O ₃)	10.00	10.00	J.T. Baker

Fuente: Modificado de King E.O., *et al.*, 1954 y de Atlas y Snyder 2006

2.2.3. Agua Peptonada

Para realizar las diluciones de muestras microbiológicas se utilizó agua peptonada (0.1%) , la cual se preparó según lo especifica la Norma Oficial Mexicana 110 (NOM-110-SSA1-1994) que abarca los criterios para realizar preparaciones y diluciones de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Se disolvieron 1.0 g de peptona proteasa (B-D) y 8.5 g de cloruro de sodio (NaCl) (Meyer) en 1000 mL de agua bidestilada. Se esterizaron en la misma autoclave a 121 ° C durante 15 min, para después pasar prueba de esterilidad por 24 h a 30 ±2° C.

2.2.4. Solución Buffer de fosfatos de Dulbecco (Dulbecco's PBS)

La solución buffer de fosfatos de Dulbecco (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Solution) se compone según el Cuadro 8. Los reactivos se pesaron y adicionaron en agua destilada hasta obtener 1000 mL de volumen total, el pH se debe de ajustar a 7.4 adicionando HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N, se esterilizó por filtración de membrana a 0.22 µm (Atlas y Snyder, 2006).

Cuadro 8. Formulación de la Solución Bufferada de Fosfatos de Dulbecco

Reactivo	Cantidad g/L	Proveedor
Cloruro de Sodio (NaCl)	8	Química Meyer
Cloruro de Potasio (KCl)	0.2	J.T. Baker
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)	1.44	Química Meyer
Difosfato de Potasio (KH ₂ PO ₄)	0.2	J.T. Baker

Fuente: Atlas y Snyder, 2006

2.3. Reactivación y verificación de pureza de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

2.3.1. Reactivación de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

La reactivación de las cepas se llevó a cabo de la siguiente manera:

La cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 se obtuvo liofilizada en pellets comerciales y para su reconstitución se colocó un pellet en 500 mL de caldo MRS comercial. Se colocó en una incubadora a 30 ± 2° C durante 12 h. Posteriormente se sembró por estría en caja de

Petri con agar MRS y se incubó en estufa a $30 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 24 h para poder observar la morfología colonial y realizar la tinción de Gram.

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 siguió el siguiente proceso: Se colocó la cepa liofilizada (un pellet) en 500 mL de caldo Luria Bertani fortificado y se incubó a $30 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 12 h, posteriormente se sembró por estría en cajas de Petri con agar Luria Bertani, agar King “A” y King “B”, se incubaron a $30 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 24 h con el fin de poder observar la morfología colonial, la producción de piocianina o pioverdina y realizar la tinción de Gram.

2.3.2. Criopreservación de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Con el objetivo de mantener y preservar el mismo lote y cepas de los microorganismos de prueba, estos se criopreservaron de la siguiente manera:

Para *P. acidilactici*: después de ser reactivada la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en medio MRS comercial, se tomó una alícuota del 1% (v/v) que se inoculó en 500 mL de caldo MRS modificado dejándolo incubar a $30 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 12 h para posteriormente centrifugarse a 6000 rpm por 20 min a 4°C en tubos estériles de 50 mL (40 mL del cultivo por tubo), se desechó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 4 mL del medio de criopreservación esterilizado a 121°C por 15 min (MRS modificado con 20%, v/v, de glicerol) después se dispensaron 1 mL de las células resuspendidas en tubos de criopreservación con capacidad de 2 mL, mismos que se colocaron en un congelador a $-20 \pm 2^\circ \text{C}$ hasta el momento en el que requirieron reactivar.

Para *P. aeruginosa*: después de ser reactivada la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio Luria Bertani fortificado (LBf), se centrifugaron a 6000 rpm por 20 min a 4°C en tubos estériles de 50 mL (40 mL del cultivo por tubo), se desechó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 4 mL del medio de criopreservación esterilizado (LBf adicionado con 20%, v/v, de glicerol) para posteriormente dispensar 1 mL de las células resuspendidas en tubos de criopreservación con capacidad de 2 mL, mismos que se colocaron en un congelador a $-20 \pm 2^\circ \text{C}$. Para criopreservar *P. aeruginosa* ATCC 9027 en medios King “A” y King “B” se tomaron dos tubos criopreservados en LBf para inocular cada uno en 500

mL de caldo King “A” y en King “B”, se incubaron a $30 \pm 2^\circ$ C durante 12 h para centrifugarlos y resuspenderlos de la misma manera que se hizo con los de Lbf, pero con el medio de criopreservación correspondiente (caldo King “A” y caldo King “B” adicionados con 20%, v/v, de glicerol cada uno), después se colocaron en tubos de criopreservación de la misma manera y se mantuvieron en congelación bajo las mismas condiciones hasta el momento en el que requirieron reactivar.

2.3.3. Verificación de la pureza de las cepas microbiológicas

2.3.3.1. Pureza del cultivo en agar, morfología colonial y producción de pigmentos

Para cada uno de los medios de cultivo (Lbf, King “A” y King “B”) se verificó que las colonias que crecieron de la inoculación por estría fueran iguales en cuanto a forma, la elevación, margen, superficie, opacidad y/o cromaticidad (Figura 10). Cabe mencionar que todas las colonias de cultivos que crecieron agar King “A” presentaron pigmentación verde-azulosa (piocianina) y las que crecieron en King “B” una color verde fluorescente (pioverdina).

2.3.3.2. Tinción de Gram

La tinción de Gram permite una diferenciación entre bacterias, la cual se basa en la estructura y en la composición de la pared celular. Las bacterias Gram positivas son capaces de retener el primer colorante (cristal violeta), tiñéndose de azul, en tanto que las Gram negativas no, lo que les permite reaccionar con el segundo colorante de contraste (safranina), adquiriendo un color rojo (Calda-Arias, 2011).

La prueba se realizó tomando una azada del cultivo fresco, que fue colocada en un portaobjetos limpio que tenía una gota de agua esterilizada, se fijó a la flama y se tiño primero con cristal violeta (1 min.), se lavó con agua destilada, se cubrió con lugol (solución yodo-yoduro al 4%) (1 min.), y se decoloró con una solución de alcohol-acetona, por último se tiño con safranina (1 min.) y se lavó con agua destilada. Se dejaron secar los frotis a temperatura ambiente y se observaron al microscopio. Los reactivos utilizados fueron los proveídos por el B-D™ Gram Stain Kit.

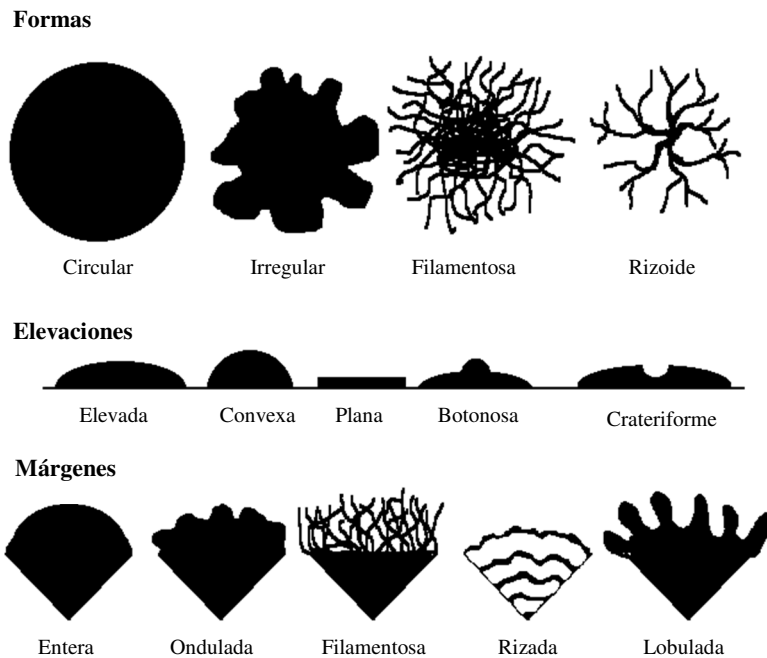


Figura 10. Ejemplos de Formas, elevaciones y márgenes

Fuente: Leung, 2014

2.4. Identificación de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 mediante PCR tiempo final

2.4.1. Identificación de los genes 16S y *ldh* de *Pediococcus acidilactici*

La identificación de *Pediococcus acidilactici* se realizó por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) bajo el método usado por Mora, *et al.*, (1997) modificado por Llorente en 2008, para detectar la fracción 16S y el gen *ldhD* de dicha bacteria.

El cultivo y extracción del DNA cromosómico se efectuó mediante el uso del kit comercial GenElute NA 2100 (Sigma Aldrich) de acuerdo a la metodología para bacterias Gram positivas indicada por el proveedor.

Los primers para las regiones variables del gen 16S rRNA del género *Pediococcus* y el gen *ldhD* para la especie *P. acidilactici* fueron sintetizados en el laboratorio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Secuencia y posición de los *primers* utilizados en la PCR

Primer	Nomenclatura ^a	Longitud	Secuencia (5' → 3')
		(pb)	
Pac	S-S-P.pent-67(<i>Pediococcus pentosaceus</i>)-a-S-22		CGAACTTCCGTTAATTGATTAT
Ppe	S-S-P.acid-69(<i>Pediococcus acidilactici</i>)-a-S-22	872	CGAACTTCCGTTAATTGATCAG
Pu	S-*-Lab-940(<i>Pediococcus acidilactici</i>)-a-A-18		ACCTTGCGGTCGTACTCC
<i>IdhDF</i>	<i>Idh</i> -S-P.acidid-1192(<i>P.acidilactici</i>)-a-S-20		GGACTTGATAACGTACCCGC
<i>IdhDR</i>	<i>Idh</i> -S-P.acidid-1640(<i>P.acidilactici</i>)-b-A-20	449	GTTCCGTCTTGCATTTGACC

^aNomenclatura dada por Alm *et al.*, 1996.

Temperatura óptima de alineamiento: 67 °C

Fuente: Mora *et al.*, 1997

Mora *et al.*, en 1997, describieron una PCR múltiple en el que se pueden diferenciar bacterias pertenecientes al género *Pediococcus*, para lo cual se diseñaron los primers frontales Pac y Ppe para la fracción 16S de *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*, los cuales solo difieren en dos bases. El primer reverso (Pu), diseñado para ambos, coincide completamente con el gen 16S rRNA de las dos especies de *Pediococcus* y es capaz de coincidir con el mismo gen de otras Bacterias Ácido Lácticas. Para identificar la especie de *Pediococcus acidilactici* se diseñaron los primers *IdhDF* y *IdhDR* provenientes del análisis de la secuencia del gen de la D-Lacto Deshidrogenasa.

La reacción de amplificación *in vitro* del DNA se llevó a cabo en un volumen de 25 µL conteniendo: 12.5 µL de PCR MasterMix® (solución premezclada de Taq DNA polimerasa, dNTP, MgCl₂ y soluciones de amortiguamiento), 0.05 µL de cada uno de los primers (Pac, Ppe, Pu, *IdhDF* y *IdhDR*), 1 µL de DNA (60 a 80 ng/µL) y 9 µL de agua ultra pura libre de nucleasas.

Los pasos para la amplificación incluyeron una desnaturalización a 94° C durante 5 min y para incrementar la especificidad de alineamiento la temperatura se mantuvo a 70° C y se redujo 1° C cada dos ciclos hasta alcanzar la óptima de 67° C. Después de 1 minuto en la temperatura de alineamiento, 35 ciclos adicionales se llevaron a cabo. La fase de extensión se realizó a 72° C por 50 segundos y al finalizar los ciclos siguió una etapa a 72° C por 7 min

(Cuadro 10). La PCR anterior se llevó a cabo en un Termocilador (ATC 401 Thermal Cycler de CLP™) gracias a las facilidades prestadas por el Dr. Francisco Montiel Sosa y la M. en C. Ana Sánchez Mendoza en el Laboratorio 8 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES-Cuautitlán.

Cuadro 10. Resumen de tiempos y temperaturas por ciclos para la PCR de *Pediococcus acidilactici*

	1 c	2 ciclos			2 ciclos			2 ciclos			2 ciclos			35 ciclos			1 c
°C	94	94	70	72	94	69	72	94	68	72	94	67	72	94	67	72	72
min	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	50 s	7

Fuente: Modificado de Mora *et al.*, 1997 y de Llorente, 2008

Electroforesis: tras la amplificación, 5 µL del producto de la amplificación se mezclaron con 3 µL de Bromuro de Etidio (BrEt 0.5 µg/mL⁻¹) como revelador y 3 µL de colorante Blue Orange para identificar los productos de la PCR. La mezcla anterior se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% utilizando el amortiguador Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE) a 80 volts hasta que el frente de corrimiento identificado por el colorante Blue-Orange avanzó al final del gel. El gel se observó en un transluminador de luz ultravioleta (MicroDOC System de Cleaver Scientific Ltd.) y se tomó una imagen fotográfica para su análisis.

Paralelamente se realizó un amplificado bajo las mismas condiciones con DNA de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (como control negativo) y sin DNA (como blanco), los cuales fueron sometidos a la misma electroforesis junto con un marcador de peso molecular (100-2000 pb).

2.4.2. Identificación del gen 16S *Pseudomonas aeruginosa*

La identificación de *Pseudomonas aeruginosa* se llevó a cabo mediante el protocolo de Spilker *et al.*, (2004) en el que utilizó un par de primers para identificar el género de *Pseudomonas* y otro para la especificar la especie *aeruginosa* (Cuadro 11).

Cuadro 11. Primers para la identificación de el gen 16S rDNA de *Pseudomonas* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*

Primer	Secuencia (5' → 3')	Objetivo	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño (pb)
PA-GS-F	GACGGGTGAGTAATGCCTA	Especies de	54° C	618
PA-GS-R	CACTGGTGTTTCCTTCCTATA	<i>Pseudomonas</i>		
PA-SS-F	GGGGGATCTTCGGACCTCA	<i>P. aeruginosa</i>	58° C	956
PA-SS-R	TCCTTAGAGTGCCCCACCCG			

Fuente: Spilker *et al.*, 2004

El cultivo y extracción del DNA cromosómico se efectuó mediante el uso del kit comercial GenElute NA 2100 (Sigma Aldrich) de acuerdo a la metodología para bacterias Gram negativas indicada por el proveedor.

La reacción de amplificación *in vitro* del DNA se llevó a cabo en un volumen de 25 µL conteniendo: 12.5 µL de PCR MasterMix® (solución premezclada de Taq DNA polimerasa, dNTP, MgCl₂ y soluciones de amortiguamiento), 0.05 µL de cada uno de los primers (PA-GS-F y PA-GS-R ó PA-SS-F y PA-SS-R), 1 µL de DNA (60 a 80 ng/µL) y 10.5 µL de agua ultra pura libre de nucleasas.

Los pasos para la amplificación incluyeron una desnaturalización inicial a 95° C durante 2 min, para continuar con 25 ciclos consistentes en 20 segundos a 94° C, 20 segundos de la temperatura óptima de alineamiento (Cuadro 12) y 40 segundos a 72° C, y una extensión final de 1 minuto a 72 °C, los datos se resumen en el Cuadro 12.

Electroforesis: se hizo de la misma manera que para *Pediococcus acidilactici* junto con los amplificadores del control negativo (DNA de *Escherichia coli* O157:H7) y el blanco (sin DNA), sometidos en la misma electroforesis junto con el marcador de peso molecular (100-2000 pb) y observados el mismo transiluminador de luz ultravioleta de donde se tomó una imagen fotográfica para su análisis.

Cuadro 12. Resumen de tiempos y temperaturas por ciclos para la PCR de *Pseudomonas* y *Pseudomonas aeruginosa*

	Ciclos	1 ciclo	25 ciclos	1 ciclo
<i>Pseudomonas</i>	° C	95	94	72
	Tiempo	2 min	20 seg	40 seg
<i>P. aeruginosa</i>	° C	95	94	72
	Tiempo	2 min	20 seg	40 seg

Fuente: Spilker *et al.*, 2004

2.5. Cinéticas de crecimiento bacteriano

2.5.1. Cinética de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

La cepa criopreservada de *P. acidilactici* ATCC 8042 se reactivó mediante un preinóculo (pA) en un matraz Erlenmeyer de 50 mL con 40 mL de caldo MRS modificado (MRSm) durante 12 horas a $30 \pm 2^\circ \text{C}$, inoculando 1 mL de las células criopreservadas. Posteriormente se tomó una alícuota de 400 μL del cultivo anterior y se inoculó en otro preinóculo (pB) en un matraz con las mismas características y bajo las mismas condiciones.

Para la determinar la cinética de crecimiento a 24 h se utilizaron matraces Erlenmeyer de 50 mL con 40 mL de MRSm, con tres réplicas cada uno, tomando muestras cada hora (0-24 h). Cada matraz fue inoculado con el 1% (v/v) del segundo preinóculo (pB) y se incubaron bajo las mismas condiciones. Se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf®) en una longitud de onda de $A_{600\text{nm}}$ utilizando como blanco caldo MRSm sin inocular. En paralelo se determinaron las UFC/mL, para lo cual se realizaron una serie de diluciones decimales (10^{-1} a 10^{-9}) en agua peptonada, colocando 20 μL de cada dilución por triplicado en cajas con agar MRS divididas en tres que se incubaron durante 24 horas a $30 \pm 2^\circ \text{C}$. Se tomaron como representativas las cajas que presentaron las diluciones que contenían entre 10 y 30 colonias. Se usó el factor de dilución para determinar el número de células viables en 1 mL: $\text{Número de UFC/mL} = \frac{\text{No. promedio de colonias} \times \text{Inverso de la dilución}}{\text{Volumen de la gota (0.02 mL)}}$. Los resultados de las cuentas obtenidas expresadas como UFC/mL se transformaron al logaritmo base 10.

2.5.2. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio Luria Bertani fortificado, King “A” y King “B”

La cepa criopreservada de *P. aeruginosa* ATCC 9027 se reactivó mediante un preinóculo (pA) en un matraz Erlenmeyer de 50 mL con 40 mL de caldo LBf, KA o KB, durante 12 horas a $30 \pm 2^\circ \text{C}$, inoculando el 1 mL de las células criopreservadas. Posteriormente se tomó una alícuota de 400 μL del cultivo anterior y se inoculó en otro preinóculo (pB) en un matraz con las mismas características y bajo las mismas condiciones.

La cinética siguió el mismo procedimiento que el usado para *P. acidilactici*, se realizaron tres réplicas, tomando muestras cada dos horas (0-24 h) y a las 36, 48 y 60 horas. En cada matraz de 50 mL de capacidad se adicionaron 10 mL de medio líquido inoculado con el 1% (v/v) del segundo preinóculo (pB) y se incubaron bajo las mismas condiciones. Se determinó la densidad óptica y las UFC/mL por el procedimiento antes descrito.

Tanto en la cinética de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* como en la de *Pseudomonas aeruginosa* se calcularon la tasa de crecimiento (k) y el tiempo de generación (t_{gen}) usando las siguientes ecuaciones tomando los datos de la fase de crecimiento exponencial:

Tasa de crecimiento:

$$k = \frac{\log_{10}[X_t] - \log_{10}[X_0]}{0.301 \times t} = \text{gen/h}$$

Donde:

X_t = Máximo de UFC/mL

X_0 = Mínimo de UFC/mL

t = Tiempo transcurrido entre X_t y X_0 (horas)

Tiempo de generación:

$$t_{gen} = \frac{1}{k} = \text{h/gen}$$

Donde: k = Tasa de crecimiento

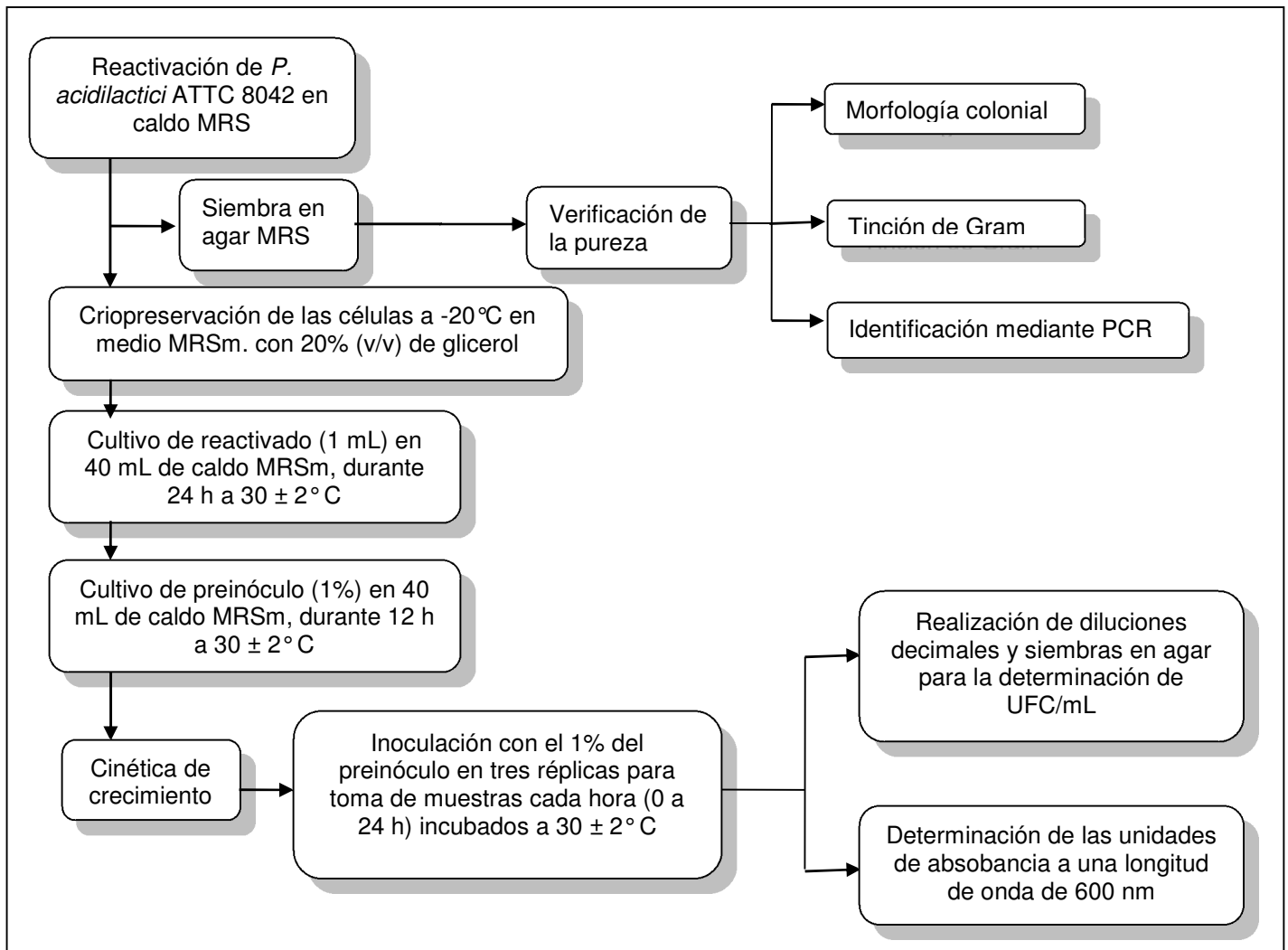


Figura 11. Resumen de la metodología para la reactivación y cinética de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Fuente: Munguía-Villavicencio, 2012

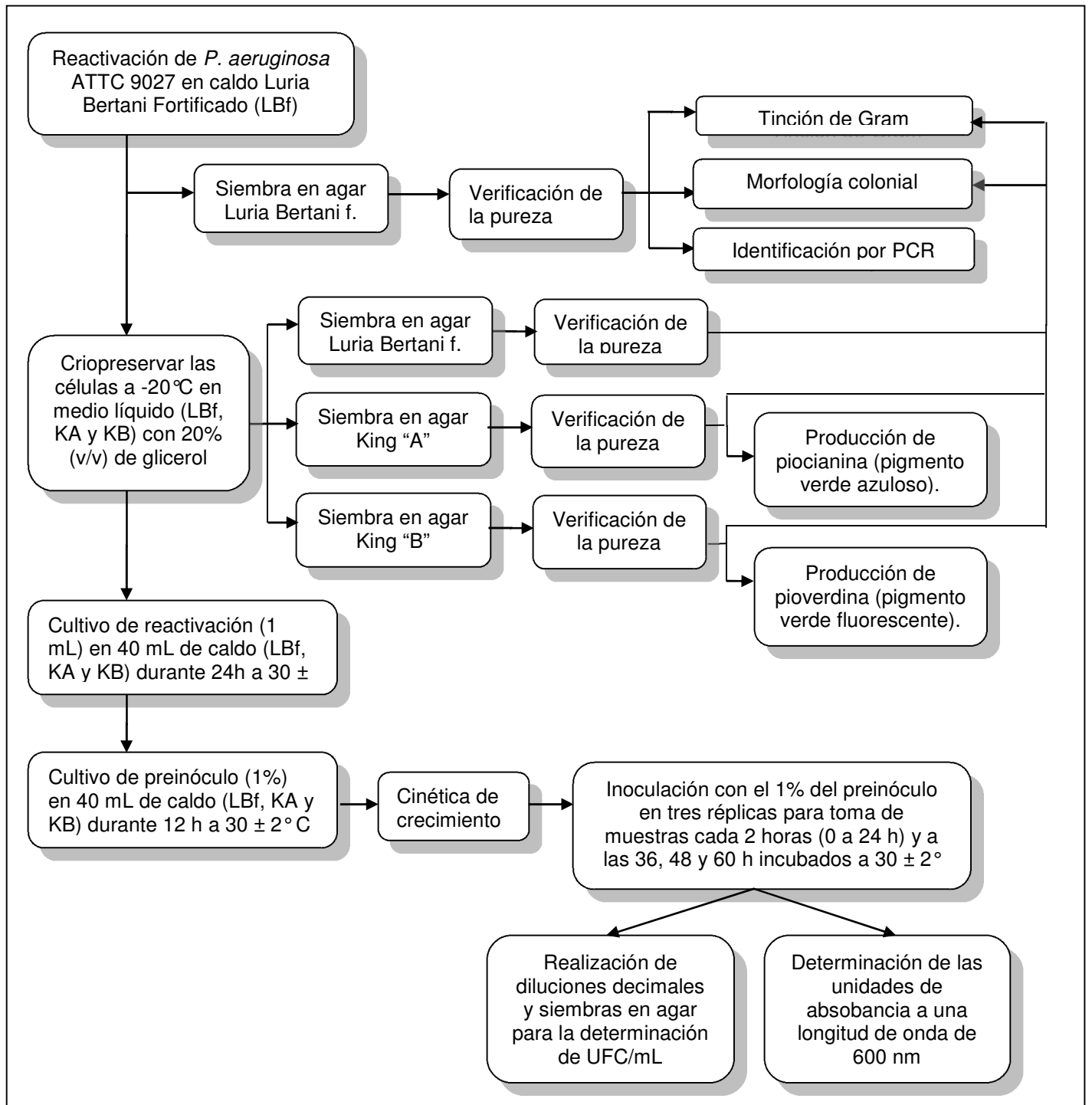


Figura 12. Resumen de la metodología de la reactivación y cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Fuente: Munguía-Villavicencio, 2012

2.6. Caracterización del sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 con actividad antibacteriana

2.6.1. Obtención del sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 liofilizado

La preparación de los sobrenadantes concentrados por liofilización se hizo de acuerdo con Llorente (2008). Se realizaron cultivos de *P. acidilactici* en MRS_m, hasta diferentes fases de crecimiento (4, 6, 8, 12, 16 y 24 h de incubación), se centrifugaron a 6,000 rpm, durante 20 min, a 4° C para separar la biomasa del sobrenadante, posteriormente se neutralizó a pH 7 ± 0.02 con NaOH 0.1N y se esterilizó por medio de un sistema de filtración (Millipore) con membrana (0.22 µm); 30 mL de los sobrenadantes se dispensaron en tubos cónicos con capacidad de 50 mL, se congelaron a -70 ± 2° C durante 72 h y se liofilizaron a -50 ± 2° C y 0.055 mBars durante 24 h, por último se conservaron a -20 ± 2° C, hasta su utilización. Los sobrenadantes se resuspendieron y concentraron (10X) con agua bidestilada estéril (Llorente, 1998; Martínez, 2011).

2.6.2. Determinación de concentración de proteína de los sobrenadantes por el método de Bradford

El fundamento de este método depende de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico (azul brillante de Coomassie G-250) y los residuos básicos y aromáticos de las proteínas, producen un cambio en el color de rojo a azul y un aumento en la absorbancia (465 a 595nm), el cual se mide en espectrofotómetro (Bradford, 1976).

Para determinar la concentración de proteína se realizó el método Micro de Bradford, el cual consiste en hacer diluciones en tubos de microcentrífuga para construir una curva patrón (Anexo 1) con cantidades crecientes de una solución estándar de Albúmina Sérica de Bovino (BSA) junto con cantidades decrecientes de agua destilada (Cuadro 19, Anexo 1) y 200 µL de colorante azul brillante de Coomassie (Reactivo de Bradford), se mezclaron, dejando reposar por 5 min para inmediatamente realizar la lectura a temperatura ambiente en un periodo no mayor a 30 min a una longitud de onda de 595nm, en un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf™) frente a un blanco del Reactivo de Bradford. Para la

cuantificación de la proteína de los sobrenadantes, se hicieron diluciones tales que permitieron estimar la concentración de proteína contenida en la muestra.

2.6.3. Determinación del perfil electroforético por SDS-PAGE de las proteínas de los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici*

El perfil electroforético de las proteínas de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 se llevó a cabo como Llorente en 2008, siguiendo las especificaciones del equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell de BIO-RAD (2013). La electroforesis se realizó bajo condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970), para lo cual las muestras liofilizadas de los sobrenadantes fueron resuspendidas en agua bidestilada estéril (3-5 mg/mL de proteína).

Debido a ensayos preliminares se decidió precipitar las proteínas de las muestras de sobrenadante para que las bandas pudieran ser lo suficientemente claras en los geles con la técnica de Metanol-Cloroformo la cual consistió en tomar 400µL de las muestras de los sobrenadantes resuspendidos (10X) y colocarlas en un tubo de 1.5 mL de microcentrífuga, se le adicionaron 600 µL de Metanol, posteriormente 150 µL de Cloroformo y finalmente 450 µL de agua destilada estéril para agitarse vigorosamente después de cada adición. Se centrifugaron a 14,000 rpm por 2 min a 4° C, se retiró con cuidado la capa acuosa superior (en medio de las dos capas quedaron las proteínas suspendidas), se adicionaron 600 µL de Metanol y se volvieron a centrifugar de la misma manera. Se decantó el sobrenadante y se colocó por 2 min a 70° C en un ThermoMixer® para eliminar cualquier residuo de Metanol.

El *pellet* de proteínas precipitadas (aproximadamente 1.5 µg) se resuspendió en 30 µL del buffer de muestra de Bio-Rad (30µL) (Dodecil Sulfato de Sodio, 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol Tris-HCl y glicerol) y se desnaturalizaron a 95° C por 5 min, para que 20 µL de la muestra desnaturalizada se colocara en geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7, 12% utilizando un marcador de alto peso molecular (10 a 250 kDa Presicion Plus Protein™ Dual Color Standars). El gel se dejó correr por 150 min a 90 volts y 4mA hasta que el frente de corrimiento llegó al final del gel. Al término de la electroforesis, los geles se desmontaron y tñieron en agitación por 30 min con Azul Brillante de Coomassie (Sigma-Aldrich) al 0.25% en 450 mL de metanol y 100 mL de ácido acético aforado a 1000 mL con agua Bidestilada,

mismos que se decoloraron con agitación por 12 h con metanol-ácido acético-agua bidestilada (200 mL, 150 mL, 650 mL).

2.6.4. Determinación de la actividad bacteriolítica por técnicas zimográficas

Para evidenciar que la actividad de péptidoglicano hidrolasa está presente en los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 se realizaron electroforesis en geles desnaturalizantes de Poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7 y al 10% copolimerizados con 0.2% (v/w) de células liofilizadas de *Micococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma-Aldrich) o de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, (Valence y Lortal, 1995; Mora *et al.*, 2003).

Las células de *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvieron al cultivarlas en 500 mL de Luria Bertani fortificado hasta fase media logarítmica, la biomasa celular se obtuvo por medio de centrifugación a 6000 rpm por 20 min a 4° C, misma que se lavó tres veces con 4 mL de PBS estéril y frío (4° C) centrifugándolo de la misma manera entre cada lavado; el *pellet* limpio y libre de sobrenadantes se congeló y liofilizó de la misma manera que los sobrenadantes de *P. acidilactici*.

La muestra del sobrenadante se precipitó por el método Metanol-Cloroformo ya descrito y se desnaturalizó a una temperatura de 95°C por 5 min junto al buffer de muestra de Bio-Rad (Dodecil Sulfato de Sodio, 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol Tris-HCl y glicerol). Tras la electroforesis, por 60 min a 180 volts y 4mA, los geles se lavaron con agua desionizada en agitación suave durante 30 min y, posteriormente se incubaron en una solución amortiguadora de renaturalización (Tris-HCl 25mM pH 8 con Tritón al 1%) durante 12 h a 40° C. Se tiñeron durante 30 min con azul de metileno (Sigma-Aldrich) al 1% v/w en KOH al 0.1% w/v y se destiñeron con agua destilada (Valence y Lortal, 1995).

2.6.5. Difusión en agar

Con el objetivo de evidenciar la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre cultivos se realizaron pruebas de difusión en agar, el cuál ha sido el método más utilizado para la determinación de la actividad antimicrobiana, a través del tiempo ha sido aceptado por la Food and Drug Administration (FDA) y recomendado como estándar por el NCCLS (National Committee on Clinical Laboratory Standards) (NCCLS, 2005).

En cajas de Petri estériles (15 cm) se colocaron 10 penicilindros estériles equidistantes uno de otro (Figura 13), con el propósito de formar los pozos y no de cortarlos. Después se agregó una capa base de agar Müller Hinton (45 mL) (Pidcock, 1990; Llorente, 1998), una vez solidificada la base, se adicionaron 15 mL de una sobrecapa de agar suave (caldo LBF, KA y KB adicionado del 0.6% de agar bacteriológico) inoculado con 1% (v/v) de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 de un preinóculo en fase logarítmica (Pidcock, 1990; De Vuyst, 1995; Wolf y Gibbons, 1996; Llorente, 1998; NCCLS, 2005).

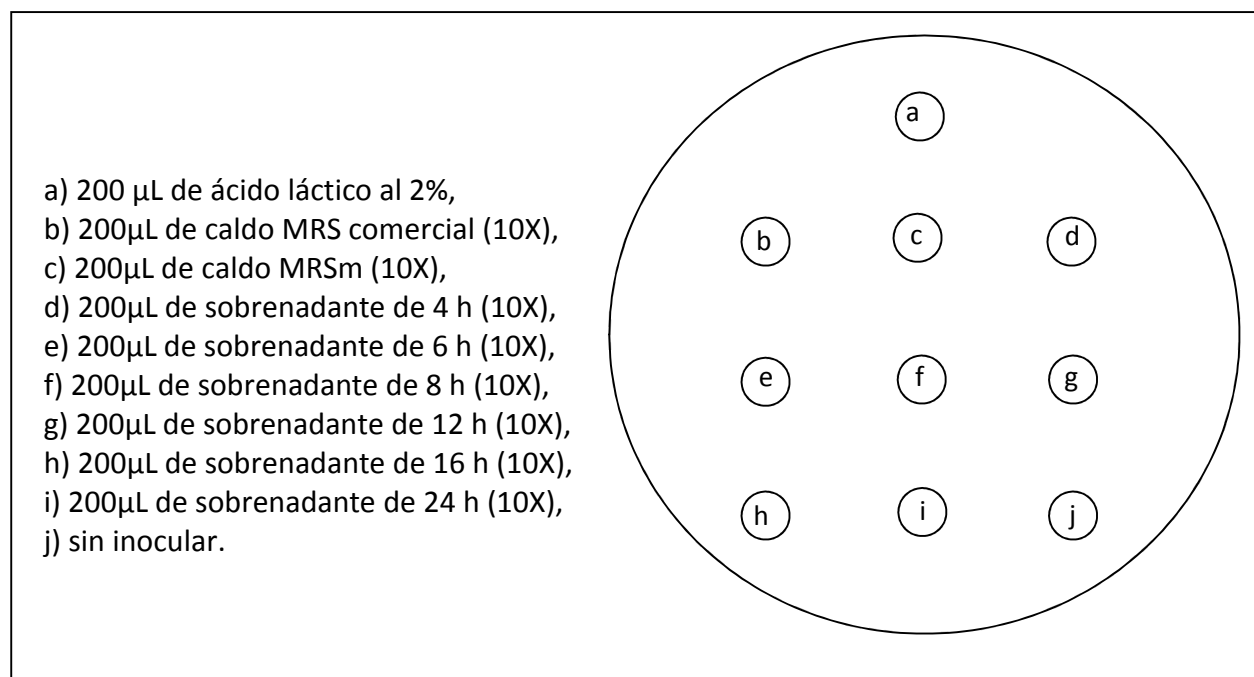


Figura 13. Distribución de los penicilindros y los sobrenadantes en cajas de Petri para la prueba de difusión en agar

Una vez solidificada la capa de agar suave, se retiraron los penicilindros para dejar descubiertos los pozos de la bicapa, en éstos se agregaron 200 µL de los sobrenadantes (10X) de diferentes etapas del crecimiento de *Pediococcus acidilactici* (0.6–1.0 mg de proteína/pozo) (Figura 13). Las cajas se colocaron durante 2 h a una temperatura de 4°C para permitir la difusión de los sobrenadantes y posteriormente se incubaron durante 6-24 horas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Después de la incubación se midieron los halos de inhibición obtenidos. Como control positivo, se utilizaron 200 µL de ácido láctico grado alimenticio al 2% (MEYER), y como testigos negativos el medio MRS comercial y el MRSm, neutralizados, liofilizados y concentrados (10X).

2.6.6. Cinéticas de inhibición

La cuantificación *in vitro* de la actividad antimicrobiana se corroboró mediante cinéticas de inhibición, las cuales consisten en utilizar una serie de medios bacteriológicos líquidos a los que se les añaden cantidades conocidas del antimicrobiano y del microorganismo de prueba, y con base en muestreos periódicos se determina la sobrevivencia o crecimiento en UFC/mL (Lewus y Montville, 1991; Parish y Davidson, 1993).

La prueba se realizó de la siguiente manera: se prepararon, matraces Erlenmeyer y tubos cónicos con capacidad de 50 mL, se les colocaron 4 mL del caldo LBf, KA (en matraces) o KB (en tubos) inoculado con el 1% (v/v) de un cultivo en fase media logarítmica de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y 1 mL de sobrenadantes concentrados (10X) (4, 6, 8, 12, 16 y 24 h); a la par se incubaron testigos negativos con 1 mL de medio MRS comercial (10X) o MRSm (10X) así como un control positivo con ácido láctico al 2%. Se tomaron muestras cada dos horas de las 0 a las 24 h y a las 36, 48, 60 y 72 h con el fin de determinar el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 por medio de las UFC/mL, para lo cual se realizaron diluciones decimales (de 10^{-1} a 10^{-10}) con agua peptonada, se sembraron 20 µL por triplicado de cada dilución en cajas con el agar correspondiente para cada caldo y se incubaron a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h. Los resultados de las cuentas obtenidas fueron expresados como UFC/mL transformándolas al logaritmo base 10. Cada conteo se realizó por triplicado y con los datos obtenidos se construyeron las gráficas correspondientes.

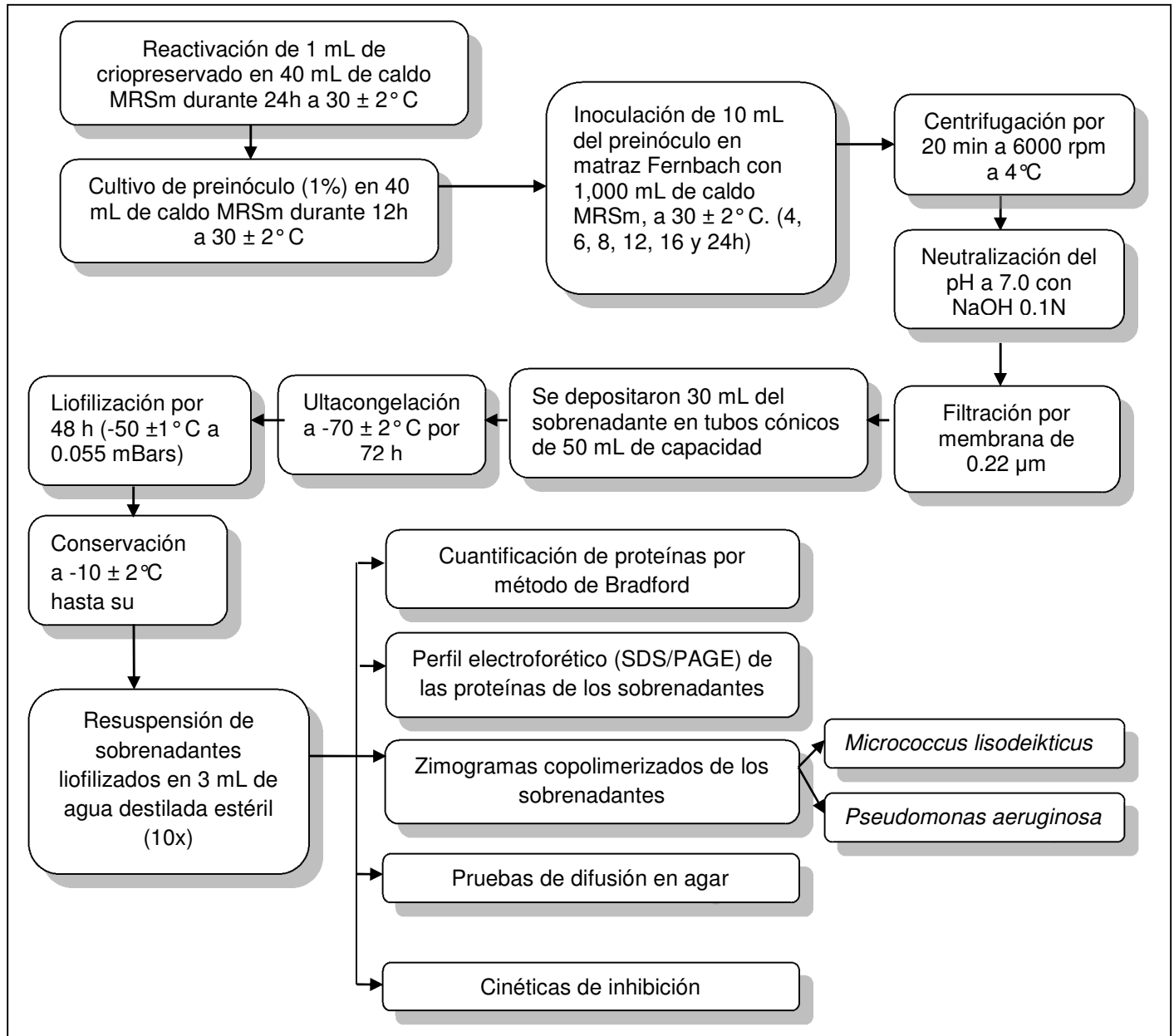


Figura 14. Resumen de la metodología para la caracterización del sobrenadante del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 con actividad antibacteriana

Fuente: Munguía Villavicencio, 2012

2.7. Evaluación del efecto de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre la producción de exopolisacáridos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Para evaluar el efecto que los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 tienen sobre la producción de biopelículas y el contenido de exopolisacáridos se utilizaron dos pruebas para cuantificar el contenido total de carbohidratos y el de ácidos urónicos que se producen en el biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*, para ello se realizaron cultivos de la siguiente manera:

En tubos de cultivo de 30 mL de capacidad se colocaron 50 perlas de vidrio (borosilicato) de 3 mm de diámetro (Rosber®) previamente lavadas y esterilizadas con el objeto de proporcionar una mayor superficie de contacto; una vez colocadas dentro de los tubos, se esterilizaron juntos en autoclave a 121° C por 15 min y se reservaron hasta el momento de ser utilizados.

De un preinóculo proveniente de la reactivación de 1 mL de criopreservado de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 se inoculó caldo LBf. al 1% (v/v), se distribuyeron 800 µL en cada uno de los tubos y se agregaron 200 µL de cada uno de los sobrenadantes a evaluar (10X) así como los controles y testigos (control negativo: caldo LBf estéril, control positivo: ácido láctico al 2% y testigos negativos: MRS comercial (10X) y MRSm 10X). La cuantificación de EPS de las biopelículas se realizó a las 0, 12, 24, 36 y 48 h, periodos de tiempo en los que los tubos se colocaron de manera horizontal y se dejaron incubando a 30 ± 2°C.

Después de la incubación se adicionaron muy lentamente 25 mL de PBS estéril y frío (4° C) con el objetivo de remover el líquido sobrenadante de cada tubo, proceso que se repitió tres veces. Entre cada lavado, los tubos se decantaron evitando que las perlas de vidrio salieran de este. Finalmente con mucho cuidado se inclinaron sobre papel filtro para secar completamente el líquido restante. Después del lavado se adicionaron 1000 µL de agua bidestilada estéril (con el objeto de igualar el volumen de la muestra original), y se procedió a tratarlos para la cuantificación de carbohidratos totales y ácidos urónicos.

2.7.1. Cuantificación de carbohidratos totales

El contenido total de EPS se puede cuantificar por métodos colorimétricos como el de Fenol-Ácido Sulfúrico, descrito por Dubois *et al.*, (1956) utilizando a la glucosa como estándar (equivalentes de glucosa) tiene como principio que los carbohidratos, en presencia de ácidos fuertes y calor, desarrollan una serie de reacciones que llevan a la formación de derivados de furanos, los cuales, al combinarse con compuestos fenólicos generan complejos de color obscuro (Brummer y Cui, 2005).

El método que se utilizó fue una adaptación en volúmenes a los usados por Masuko *et al.*, (2005), por cada mL de muestra se procedió de la siguiente manera: a los tubos de cultivo con las perlas de vidrio ya cultivadas, lavadas con PBS y adicionadas con 1000 μ L de agua bidestilada estéril, se adicionaron con cuidado 3 mL de Ácido Sulfúrico para agitarse por 30 min, posteriormente se adicionaron 600 μ L de Fenol al 5% en agua para después ser incubados en baño maría a 90° C por 5 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se leyeron en un espectrofotómetro (Spectronic 20D) a 490 nm. Como blanco se utilizó 1 mL de agua bidestilada esterilizada tratada como ya se mencionó, cuando fue necesario se realizaron diluciones tales que permitieran cuantificar la cantidad de equivalentes de glucosa. Para la cuantificación de equivalentes de glucosa se realizó una curva patrón con diluciones de glucosa en agua bidestilada esteril, (5-200 μ g/mL) siguiendo el método anterior (Anexo 8).

2.7.2. Cuantificación de ácidos Urónicos

Debido a que la proporción de alginato en la matriz extracelular de las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* es mayor que el resto de los carbohidratos (Lembre *et al.*, 2012), es importante dilucidar si los efectos observados se reflejan directamente en la cantidad de alginato presente en la biopelícula y ya que los ácidos urónicos generan compuestos cromógenos cuando son calentados a 100° C en presencia de ácido sulfúrico concentrado con tetraborato de sodio y carbazol (Taylor y Buchanan-Smith, 1992; Mojica *et al.*, 2007) se utilizó el siguiente método para su cuantificación (de α -L-glucuronato) por espectrofotometría.:

Para la cuantificación de ácidos urónicos se adaptó el método propuesto por Casseratti *et al.*, (2003). a los mismos volúmenes de muestra usados en la cuantificación de carbohidratos totales con el fin de poder equiparar la cantidad de carbohidratos totales con la de ácidos urónicos en las biopelículas de *P. aeruginosa*. A los tubos de cultivo con las perlas de vidrio ya cultivadas, lavadas con PBS y adicionadas de 1000 μL de agua bidestilada estéril, se adicionaron con cuidado 4 mL de Tetraborato de Sodio 25 mM en Ácido Sulfúrico para después calentarlos por 10 min a 100°C en baño María y dejarlos enfriar a temperatura ambiente por 15 min. A temperatura ambiente se adicionó 1 mL de carbazol al 0.125% en etanol absoluto para volverlos a calentar y enfriar bajo las mismas condiciones. La lectura se hizo en un espectrofotómetro (Spectronic 20D) a 550 nm. Como blanco se utilizó 1 mL de agua bidestilada esterilizada tratada como ya se mencionó y, cuando fue necesario se realizaron diluciones tales que permitieran cuantificar la cantidad ácidos urónicos. Para poder cuantificar la cantidad de ácidos urónicos se realizó una curva patrón con diluciones (15-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de Ácido D-glucurónico (Sigma-Aldrich) siguiendo el método anterior (Anexo 9).

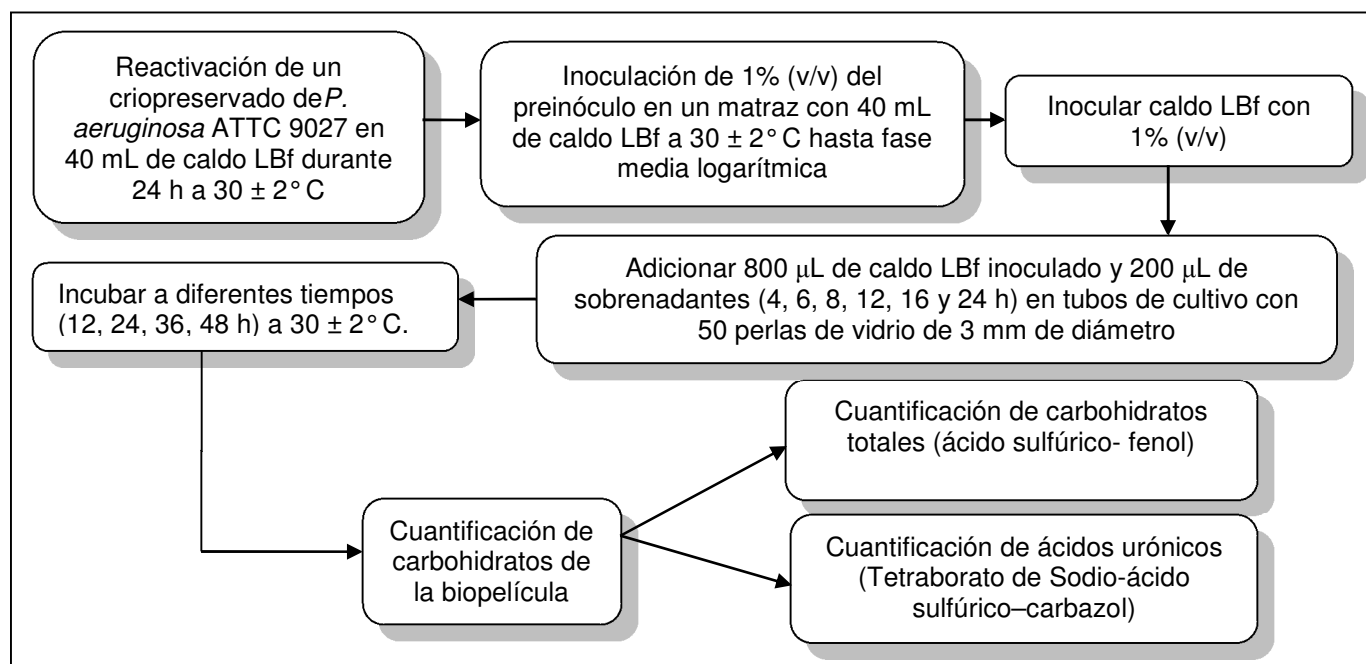


Figura 15. Resumen de la metodología para la evaluación del efecto de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre la producción de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Fuente: Munguía Villavicencio, 2012

2.8. Evaluación del efecto de los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre la producción de piocianina de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

El método que propone Kurachi (1958) y que aplican Essar *et al.*, (1990), Kong *et al.*, (2005) y Babic *et al.*, (2010) para cuantificar la cantidad de piocianina generada por *Pseudomonas aeruginosa* consiste en generar un reacción acida que deriva en un cromógeno rosado que se puede medir por espectrofotometría a 520 nm. Las concentraciones se expresan como microgramos productores de piocianina por mililitro del sobrenadante del cultivo al multiplicar la densidad optica a A₅₂₀ nm por el factor 17.072, o también se puede construir una curva patron con la piocianina purificada (Sigma-Aldrich Co. LLC., a 2012).

El método de Ralli (2005) se adapto de la siguiente manera:

Se reactivó un criopreservado de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en 40 mL medio King “A” en un matraz Erlenmeyer con capacidad 50 mL por 24 h a 30 ± 2° C. De éste se inocularon 40 mL de medio King “A” al 1% (v/v) y se incubaron por 12 h a la misma temperatura; del cultivo anterior se inoculó medio King “A” al 1% (v/v) y se repartieron 12 mL en matraces Erlenmeyer de capacidad de 50 mL a los que se adicionaron 3 mL de los sobrenadantes así como los controles y testigos (control negativo: caldo King “A” estéril, control positivo: ácido láctico al 2% y testigos negativos: MRS comercial (10X) y MRSm 10X), se dejaron incubar por 12, 24, 48 y 72 h a 30 ± 2° C antes de extraer y cuantificar la piocianina.

Para la extracción y cuantificación de piocianina se centrifugó el cultivo a 6000 rpm por 20 min a 4° C, se separó el sobrenadante del paquete celular por decantación y a los sobrenadantes le agregaron 9 mL de cloroformo para después agitarlos vigorosamente y centrifugarlos por 10 min bajo las condiciones anteriores. La capa del fondo (piocianina en cloroformo) se trasvasó a otro tubo para agreagrlle inmediatamente 3 mL de HCl al 0.2N y centrifugarlo de la manera anterior. La porción cromógena que queda en la parte superior se trasvasó a los tubos de lectura del espectrofotómetro (Spectronic 20D) para realizar su lectura a 520nm., como blanco se utilizó HCl al 0.2N. La cantidad de microorganismos productores

de piocianina por mililitro de cultivo se calculó al multiplicar la absorbancia a 520 nm por el factor de Kurachi (1958): 17.072.

2.9. Evaluación del efecto de los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre la producción de pioverdina de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Para la determinación de la producción de pioverdina se adaptó el método propuesto por Ralli (2005) donde los niveles de pioverdina se expresan en una proporción $DO A_{405} / DO A_{600nm}$. Para ello se reactivó un criopreservado *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en 40 mL medio King “B” en un matraz Erlenmeyer con capacidad 50 mL por 24 h a $30 \pm 2^\circ$ C. De éste se inocularon 40 mL de medio King “B” al 1% (v/v) que se incubaron por 12 h a la misma temperatura; del cultivo anterior se inoculó medio King “B” al 1% (v/v) del cuál se repartieron 4 mL en tubos cónicos de 50 mL de capacidad, a los que se adicionaron 1 mL de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 así como los controles y testigos (control negativo: caldo King “B” estéril, control positivo: ácido láctico al 2% y testigos negativos: MRS comercial (10X) y MRSm 10X), se dejaron incubar por 12, 24, 48 y 72 h a $30 \pm 2^\circ$ C antes de cuantificar la pioverdina (Stintzi *et al.*, 1998; McMorran *et al.*, 2001; Jacques *et al.*, 2003).

Para su cuantificación se tomó una alícuota para medir la $DO A_{600nm}$ y el resto se centrifugó a 6000 rpm por 20 min a 4° C, el sobrenadante se esterilizó por membrana de $0.22 \mu m$ (Millipore®) y se trasvasaron a los tubos de lectura del espectrofotómetro (Spectronic 20D) para realizar su lectura a 405nm, como blanco se utilizó el medio King “B” sin inocular y en el caso de los cultivos con sobrenadantes, el mismo medio (4 mL) adicionados de 1 mL de medio MRSm concentrado (10X).

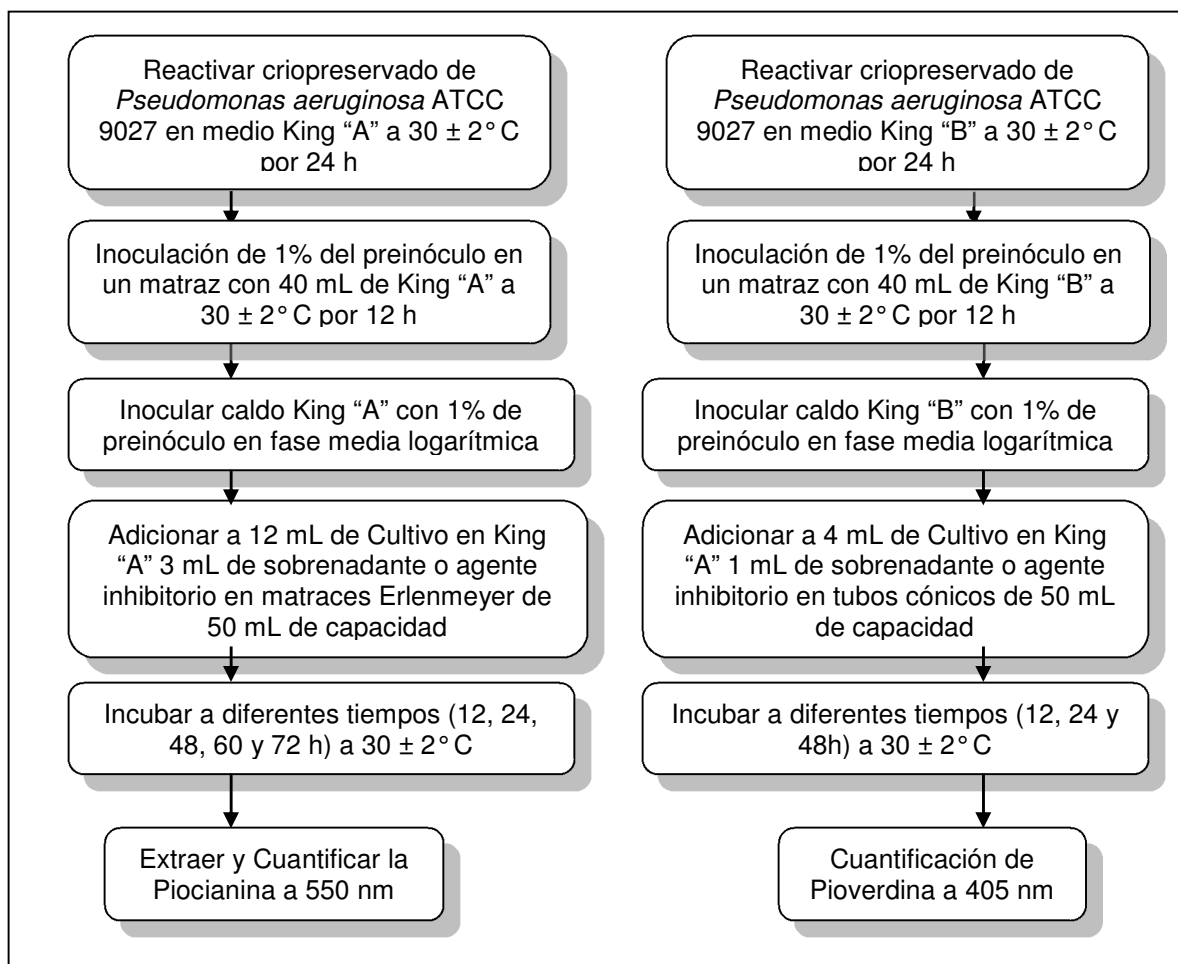


Figura 16. Resumen de la metodología para la demostración del efecto del sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre la producción de piocianina y pioverdina de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Fuente: Modificado de Ralli, 2005

3. Resultados y Discusión

3.1. Reactivación y verificación de la pureza de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Las cepas liofilizadas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 se reactivaron según la metodología y se verificó la pureza de las colonias en los medios correspondientes.

En la figura 17 (a) se muestran las colonias de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en agar MRS, con forma circular, márgenes lisos, apariencia cremosa de color blanquecina y un diámetro aproximado de 2 a 3 mm. En la tinción de Gram correspondiente se pueden observar tétradas o pares de cocos Gram positivos (Figura 17, b).

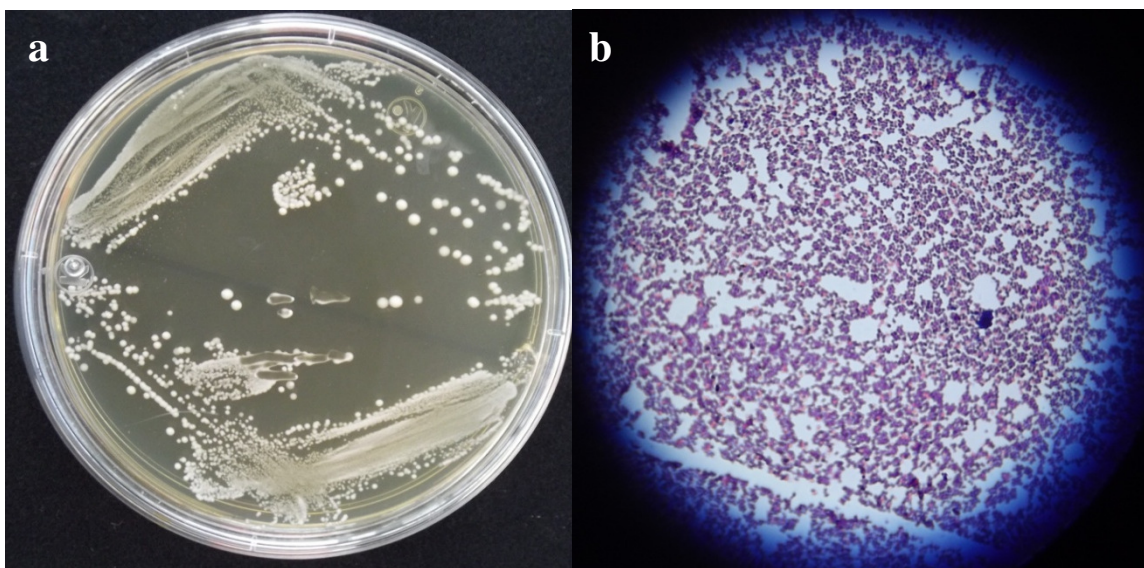


Figura 17. a) Colonias de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en agar MRS, b) Tinción de Gram de las colonias de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

La pureza de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 se verificó en cajas de agar Luria Bertani fortificado (Figura 18 a), King “A” (Figura 18 b) y King “B” (Figura 18 c), donde se pudieron observar colonias redondas, de < 1 mm de diámetro con bordes irregulares, translúcidas y con producción de un pigmento azul-verdoso en el agar King “A”, y uno verde

fluorescente en agar King “B” (King *et al.*, 1954). Así mismo se realizaron tinciones de Gram de las colonias mostrando bacilos Gram negativos (Figura 18 d).

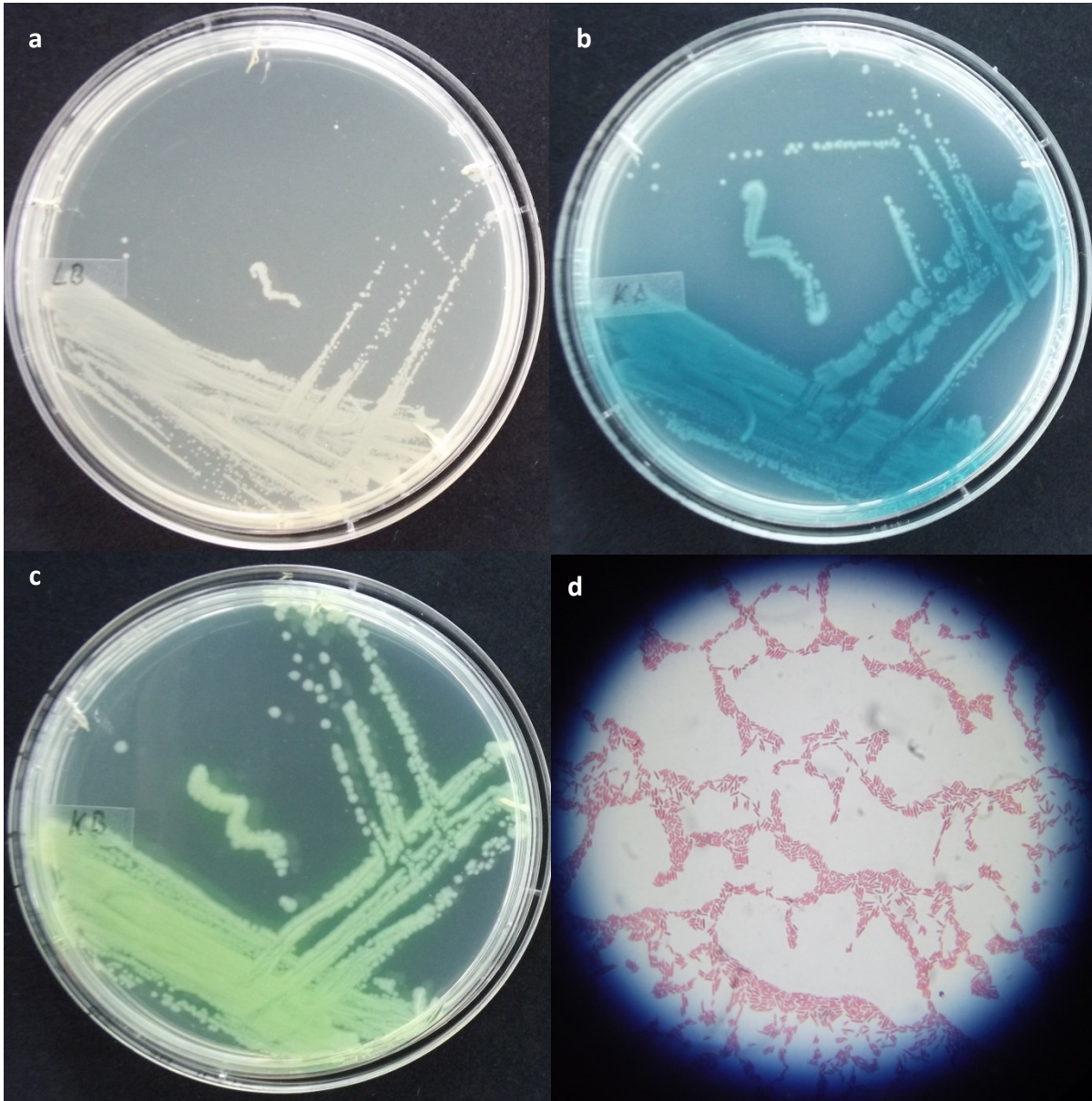


Figura 18. Identificación morfológica de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. a) Colonias de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en agar LBf., b) Colonias de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en agar King “A”, c) Colonias de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en agar King “B”, d) Tinción de Gram de las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Dados los resultados anteriores se trataba de cultivos puros de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 que cumplían con las características citadas en la literatura.

3.2. Identificación de las cepas problema mediante la amplificación por PCR del gen 16S y *ldhD* de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y la región variable 16S de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

El problema de identificar a las bacterias por métodos bioquímicos fue solucionado por las herramientas moleculares mediante el análisis de las fracciones 16S del rDNA (Roselló-Mora y Amann, 2001), por lo tanto se decidió utilizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para realizar la identificación de las cepas de estudio y tener la plena certeza de que se cuenta con las herramientas para comparar los resultados con otros trabajos relacionados.

Como la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 guarda similitud del 91 al 98% con otras cepas del mismo género y especie, así como del 96 al 97% con cepas de *Pediococcus pentosaceus* y del 93 al 94% con cepas de *Pediococcus damnosus* (Llorente, 2008 y Mora *et al.*, 1997), se decidió realizar una PCR múltiple por el método que propone Mora *et al.*, (1997), lo que permitió identificar el género y la especie de *Pediococcus acidilactici* a través de la amplificación de una región variable de rDNA (*16S*) y del gen de la D-lactato deshidrogenasa (*ldh*). En la figura 19 (A) se pueden observar los productos de la PCR que permitieron identificar al género *Pediococcus* con un fragmento de 872 pb (*16S*) y a la especie *P. acidilactici* con un fragmento de 449 pb (*ldh*).

Para el caso de la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* se utilizó el método propuesto por Spilker *et al.*, (2004) en el que se realizaron dos PCR para amplificar regiones conservadas y variables de rDNA. La identificación del género *Pseudomonas* se hizo mediante la amplificación de una región conservada de rDNA (*16S*) de 618 pb y la identificación de la especie *P. aeruginosa* con un amplificado de una región variable de rDNA (*16S*) con un producto de 956 pb (Figura 19, B).

Ambos métodos de identificación molecular se llevaron a cabo con los controles negativos y blancos correspondientes.

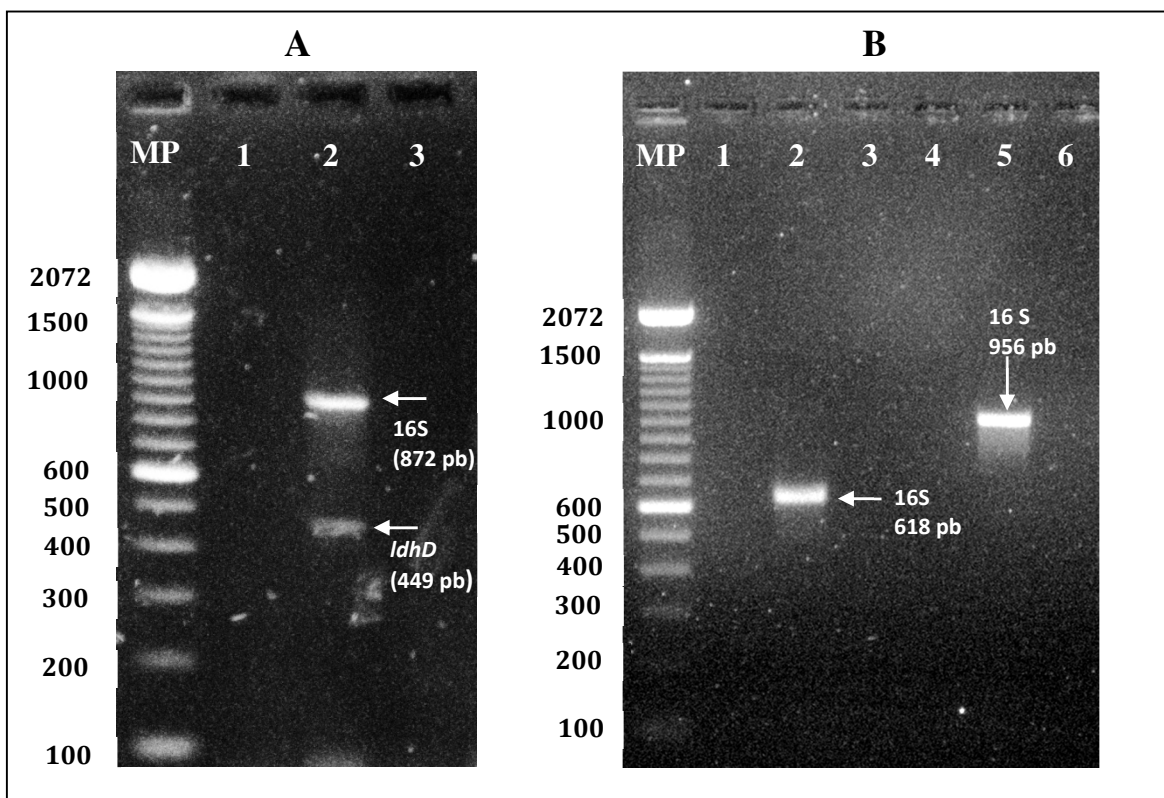


Figura 19. Electroforesis de la PCR para la identificación de las cepas de interés.

A. *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. MP) Marcador de tamaño molecular (100 pb Invitrogen), 1) Blanco sin DNA, 2) DNA de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, 3) DNA de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014.
B. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. MP) Marcador de tamaño molecular (100 pb Invitrogen), 1) Blanco sin DNA para género, 2) DNA de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 para género, 3) DNA de *Escherichia coli* O157:H7 para género, 4) Blanco sin DNA para especie, 5) DNA de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 para especie, 6) DNA de *Escherichia coli* O157:H7 para especie.

3.3. Cinética de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Debido a que Llorente (2008) y Martínez-Trejo (2011) reportan los efectos antagónicos en los sobrenadantes de la fase logarítmica del crecimiento de *Pediococcus acidilactici* (8h) y a que Velazco-Pérez (2010) reporta actividad antibacteriana a las 8 y 16 h (fase estacionaria) de fermentación, se decidió obtener sobrenadantes de diferentes etapas de las fases de crecimiento para establecer las diferencias entre ellas y evaluar su efecto en *Pseudomonas aeruginosa*. Para ello se construyó una cinética de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en medio líquido MRS modificado (Llorente, 1998).

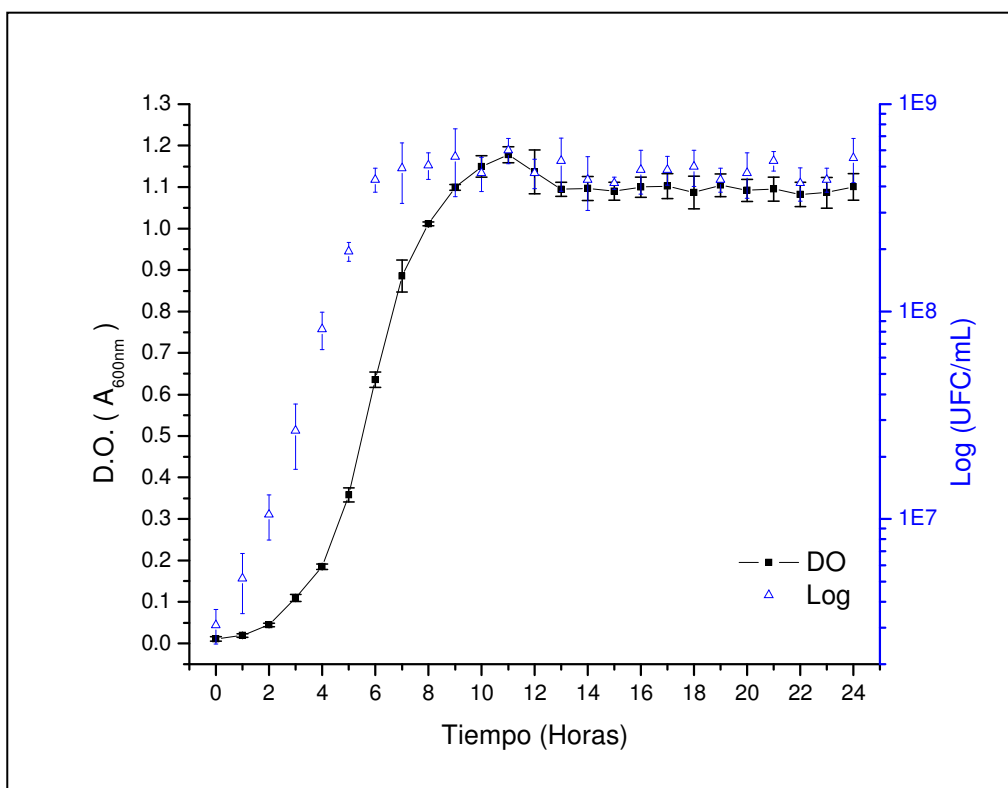


Figura 20. Cinética de Crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en medio MRSm.

En la figura 20 se muestra la cinética de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 donde se evaluó el comportamiento de la Densidad Óptica (D.O.) A_{600nm} y las Unidades Formadoras de Colonia por mL (UFC/mL) pudiéndose establecer que la fase de latencia va de las 0 a las 2 h, la fase logarítmica de las 2 a las 10 h (con una tasa de crecimiento de $k = 1.073$ gen/h y un tiempo de generación de $t_{gen} = 55.8$ min/gen) y la fase estacionaria de las 10 h en adelante, resultados que fueron similares a los obtenidos por Llorente (1998).

Aunque el incremento de la densidad óptica tipo sigmoidal es el característico de esta bacteria, las fases de crecimiento se presentaron con mayor prontitud (2 h antes) debido a que la cepa obtenida de un proveedor comercial (MICROBIOLOGICS St. Cluod MIN, USA.) se preparó en los inóculos y pases previos a la cinética lo que generaron un efecto “fed-batch” o crecimiento semi-continuo al cambiar a las células a un medio con más nutrientes disponibles. Realizar lecturas cada hora contribuyó a identificar con mayor

claridad el inicio y término de las fases de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en medio MRSm.

3.4. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Para poder realizar los análisis posteriores de la cuantificación de exopolisacáridos se siguieron las recomendaciones de Knezevic y Petrovic (2008) por lo que la cepa liofilizada de *Pseudomonas aeruginosa* se reactivó en el medio descrito por estos autores (Luria Bertani fortificado con glucosa, 2 g/L) formulado con ingredientes de BD™ y tras la comprobación de pureza e identidad, se realizaron las cinéticas de crecimiento en el mismo medio (Figura 21) en donde se identificó que la fase media logarítmica se alcanzó a las 6 horas con una D.O. de 0.400 A_{600nm} .

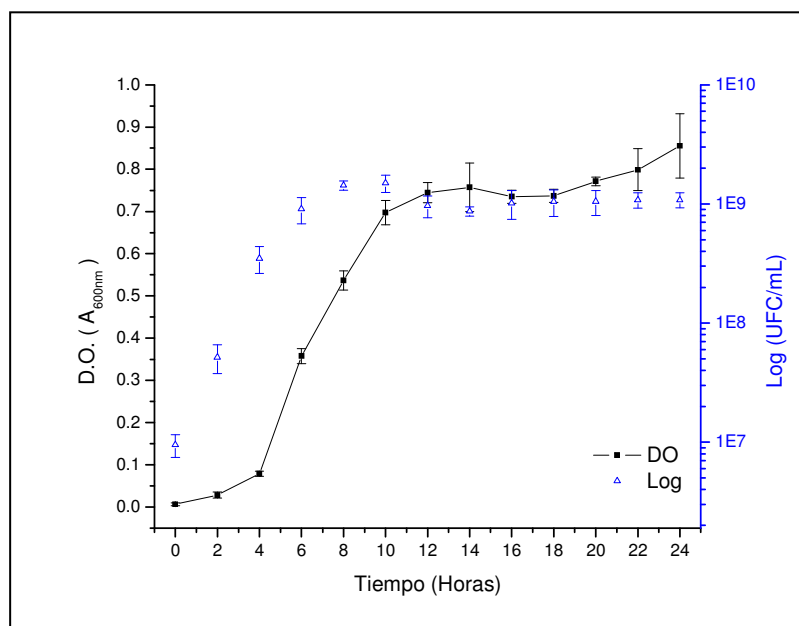


Figura 21. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio Luria Bertani Fortificado

King *et al.*, (1954) desarrollaron los medios King “A” y King “B”, cada uno de ellos contienen cantidades diferentes de fuentes de aminoácidos, de carbono y microminerales específicos que le permiten a *Pseudomonas aeruginosa* producir pirocianina o pioverdina respectivamente, por lo tanto fue necesario realizar las cinéticas correspondientes para conocer el comportamiento normal de su crecimiento en cada uno de los medios líquidos, las cuales se presentan en las Figuras 22 y 23.

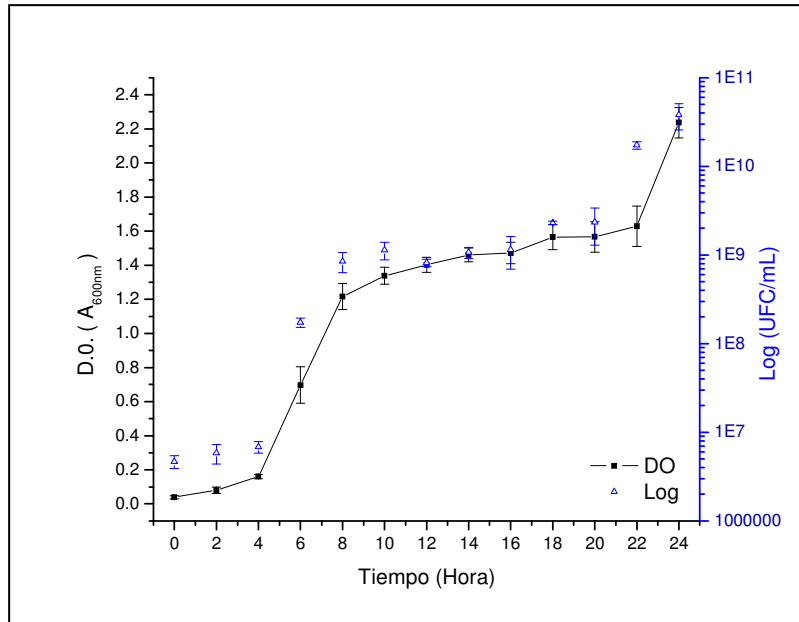


Figura 22. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio King "A"

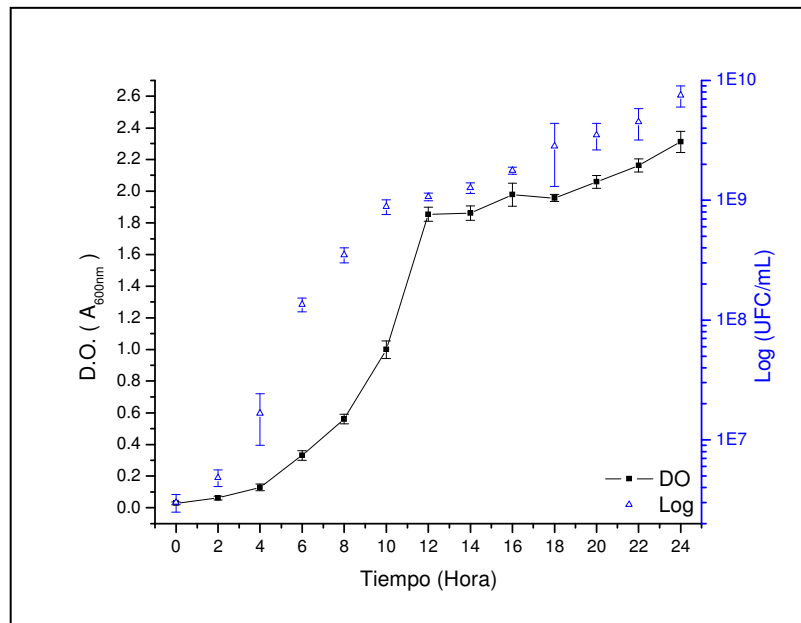


Figura 23. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio King "B"

Al analizar las cinéticas de crecimiento se pudo determinar que las diferencias en la composición de los medio de cultivo ocasiona que en cada uno de ellos el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* sea diferente, por ejemplo en las D.O. máximas y en los tiempos

de presentación y duración de las fases de crecimiento que se resumen en el Cuadro 13 (fase de latencia, exponencial y estacionaria).

Cuadro 13. Duración de las fases de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

MEDIO DE CULTIVO	Fase de latencia (Lag)	Fase exponencial (Log)	Fase estacionaria	Tasa de crecimiento (gen/h)	Tiempo de Generación (min/gen)	D.O. (A600nm) a las 24 h
Luria Bertani Fortificado	0-4 h	4-10 h	10-24 h	0.22	13.50	0.855 ± 0.075
King "A"	0-4 h	4-8 h	8-24 h	0.31	18.45	2.236 ± 0.089
King "B"	0-4 h	4-12 h	12-24 h	0.10	9.94	2.312 ± 0.066

3.5. Caracterización de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Dado el crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 se decidió obtener sobrenadantes de las diferentes etapas de su crecimiento por la metodología de Llorente (2008). Se obtuvieron sobrenadantes de la etapa logarítmica temprana (4 h), de la fase media logarítmica (6 h), de la fase logarítmica tardía (8h), del inicio de la fase estacionaria (12 h) y de la meseta de la fase estacionaria (16 y 24 h) y se procedió a caracterizarlos en términos de cuantificación de proteínas, perfiles electroforéticos, zimogramas de actividad *in situ* utilizando como microorganismos susceptibles las cepas liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 9648 (Sigma-Aldrich Chem, U.S.A.) y de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 así como cinéticas de inhibición y pruebas de difusión en agar.

3.5.1. Cuantificación de proteínas por método de Bradford

La cuantificación de las proteínas de los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 se llevó a cabo por el método de Micro-Bradford (Bradford, 1976). Después de construir una curva patrón utilizando diluciones conocidas de Albúmina Sérica Bovina (BSA) (BioRad™), se graficaron los resultados (Anexo 1) de la que se pudo establecer una correlación entre los resultados de $r^2 = 0.9979$ y la ecuación como $y = 0.0350x$.

La concentración de proteínas de las muestras de los sobrenadantes en las diferentes fases de crecimiento se presenta en el Cuadro 14 y en la Figura 24.

Cuadro 14. Concentración de proteína de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en diferentes etapas de su crecimiento

Hora de cultivo	Concentración de proteína (mg/mL)
4	3.37 ± 0.35 ^b
6	3.63 ± 0.53 ^{a b}
8	3.24 ± 0.58 ^b
12	4.88 ± 0.34
16	3.13 ± 0.54 ^b
24	4.05 ± 0.50 ^a
MRSm	3.02 ± 0.30 ^b

Resultados expresados por los promedios ± la desviación estándar. La cuantificación se replicó 9 veces (n=9) y los promedios con superíndices diferentes son estadísticamente diferentes (p<0.05).

Los resultados se analizaron mediante un ANOVA (Análisis de varianza) con un valor de confianza del 95% ($\alpha=0.05$); se determinó que existía una diferencia estadísticamente significativa ($P = 1.47E^{-11}$) entre la concentración de proteína de los sobrenadantes de *P. acidilactici*, así que se realizó una prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para comparar e identificar las diferencias estadísticas entre ellos.

Utilizando como control negativo el medio MRSm sin inocular, se determinó que los sobrenadantes de las 4, 6, 8 y 16 h no resultaron estadísticamente diferentes entre ellos ni con el medio. El sobrenadante de las 24 h de cultivo resultó estadísticamente diferente a los sobrenadantes anteriores excepto al de las 6 h.

El único sobrenadante que resultó estadísticamente diferente a todos los demás y al medio MRSm fue el de las 12 h, esto, asociado a que a las 12 h de cultivo se alcanza un pico máximo en el crecimiento (1.200 D.O. A_{600nm}) como se observa en la Figura 24 (proteínas y crecimiento).

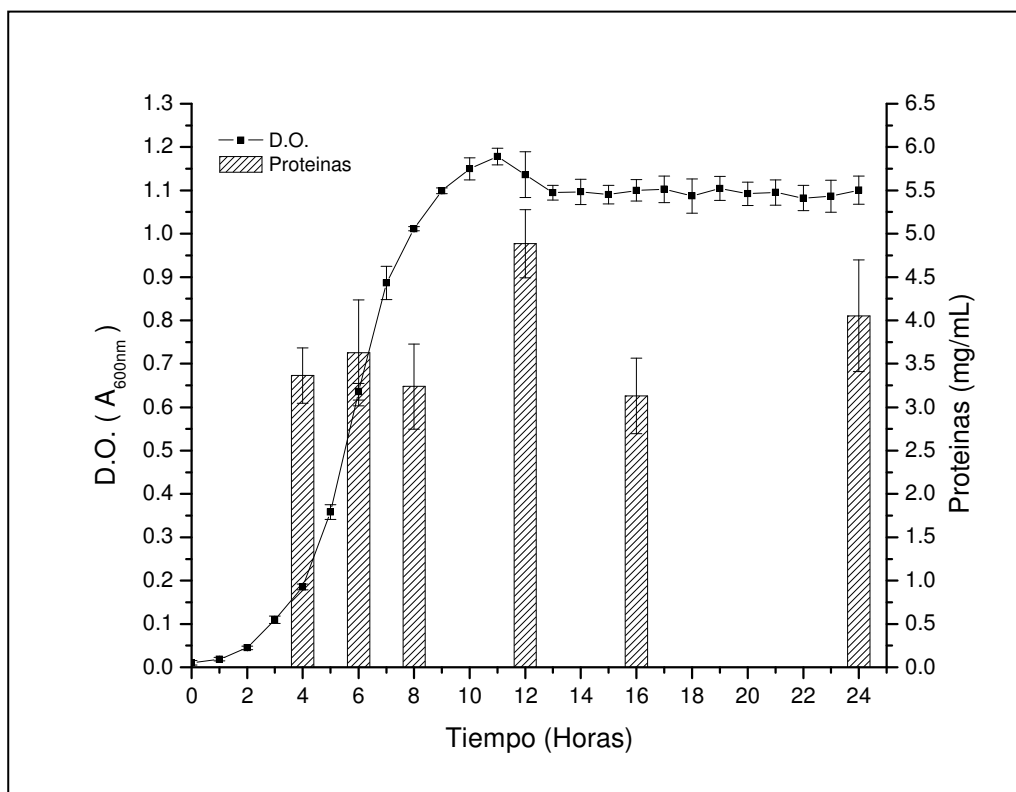


Figura 24. Concentración de proteínas de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 durante diferentes etapas del crecimiento celular en medio MRSm

3.5.2. Perfil electroforético (SDS/PAGE) de los sobrenadantes

Al encontrar diferencias estadísticas entre las concentraciones de proteínas de los sobrenadantes de diferentes etapas del crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, se decidió caracterizar sus perfiles electroforéticos para evidenciar si la diferencia mostrada se debía a la producción de diferentes proteínas o a que en todas las etapas éstas eran las mismas pero en concentraciones distintas.

Durante los ensayos preliminares no se obtuvieron buenos resultados con la técnica de Ácido Tricloro Acético (Llorente, 2008) y tomando en consideración la posible presencia de otros constituyentes en los sobrenadantes, se ensayaron varios tipos de precipitación que permitieran eliminar los carbohidratos y las sales contenidas en ellos provenientes de los compuestos del medio MRSm; la metodología sugerida por Wessel y Flüggé (1984) (precipitación con Metanol-Cloroformo) fue la que resolvió esta situación. La adaptación

metodológica mejoró los rendimientos de los precipitados, al utilizar sólo 400 uL a diferencia de 1000 uL que utilizaba anteriormente y permitió observar con una mayor definición los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de cultivo.

Los geles se escanearon en un Densitómetro (Gel Doc™ XR de BioRad™) y se analizaron mediante el software Image Lab 3.0™ BioRad™ (Figuras 25 y 26) y de este modo se pudo confirmar la presencia de diferentes bandas de proteínas en las fases logarítmicas y estacionarias.

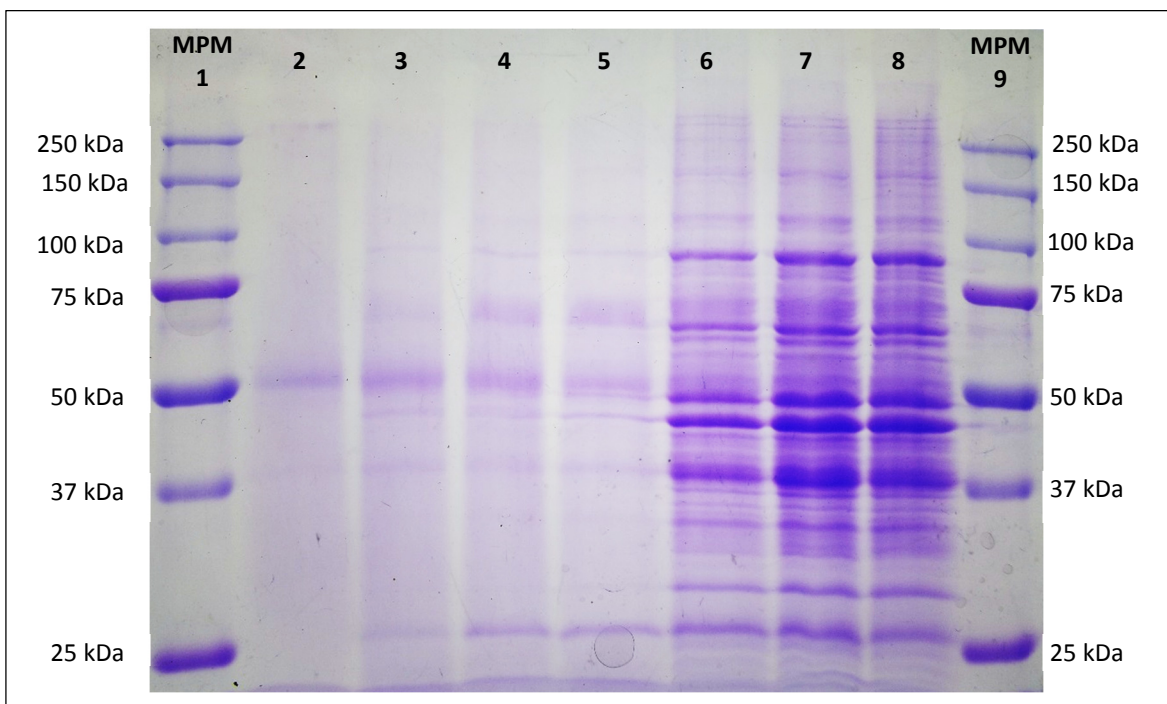


Figura 25. Perfil electroforético de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en gel de Bis/Acrilamida 12% T, 3.3% C, 1mm, tinción Azul de Coomassie.

1. MPM (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio Rad™). 2. Medio MRSm (10X). 3. Sobrenadante de las 4 h de cultivo (10X). 4. Sobrenadante de las 6 h de cultivo (10X). 5. Sobrenadante de las 8 h de cultivo (10X). 6. Sobrenadante de las 12 h de cultivo (10X). 7. Sobrenadante de las 16 h de cultivo (10X). 8. Sobrenadante de las 24 h de cultivo (10X). 9. MPM (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio Rad™).

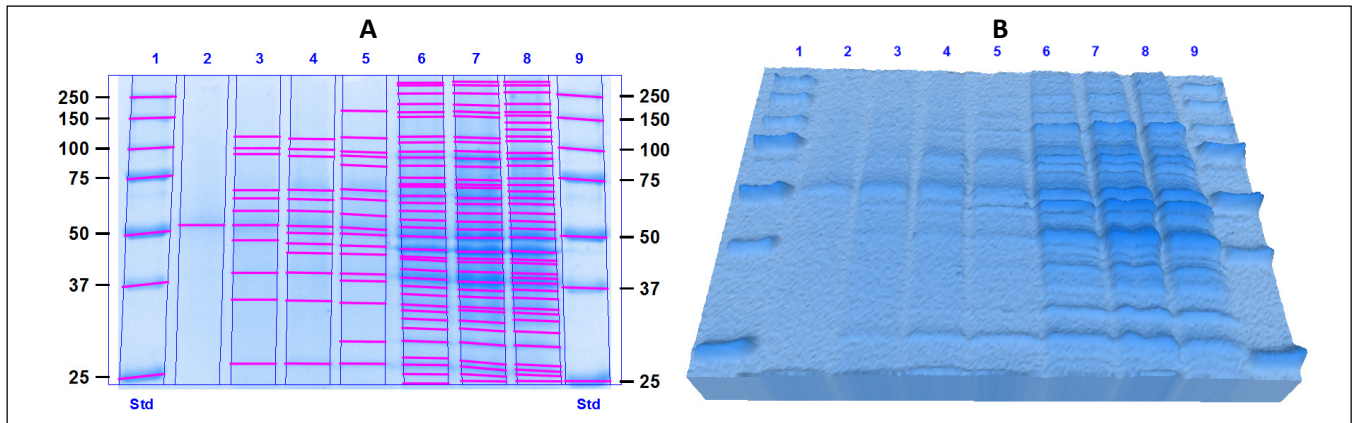


Figura 26. Análisis de las imágenes de los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 con Image Lab 3.0™.

A) Detección de bandas, 50% sensibilidad. B) Imagen 3D de la imagen A.

1. MPM (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio Rad™). 2. Medio MRSm (10X). 3. Sobrenadante de las 4 h de cultivo (10X). 4. Sobrenadante de las 6 h de cultivo (10X). 5. Sobrenadante de las 8 h de cultivo (10X). 6. Sobrenadante de las 12 h de cultivo (10X). 7. Sobrenadante de las 16 h de cultivo (10X). 8. Sobrenadante de las 24 h de cultivo (10X). 9. MPM (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio Rad™)

En el carril 2 de las figuras 25 y 26 se muestra el perfil proteico del medio MRSm (10X) en el que se observa una única banda, misma que está presente en los demás carriles (3-8) con un peso molecular de 63.3 ± 0.6 kDa. Se puede suponer que esta banda proteica se encuentra en todos los sobrenadantes debido al contenido propio del medio MRSm ya que éste se formuló con Bacto Peptona No.3, Extracto de Carne y Extracto de Levadura de BD™, donde el fabricante reporta que <10% de las proteínas totales de estos extractos tienen un peso mayor a los 10kDa (Becton and Dickinson Company, 2006).

Después de analizar los perfiles proteicos y descartar la banda propia del medio MRSm, como se observa en el Cuadro 15, se determinó que los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 presentaban diferentes tipos de perfiles electroforéticos dependiendo de la fase de crecimiento.

Observándose que la cantidad de las bandas proteicas se incrementa conforme aumenta en el tiempo de cultivo; así en el sobrenadante de las 4 h (etapa logarítmica temprana) se observan 10 bandas, en la fase media logarítmica (6 h) hay 12 bandas y logarítmica tardía (8h) 16; sin

embargo durante la fase estacionaria (12, 16 y 24 h) el número se incrementó drásticamente pudiéndose observar de 35 a 37 bandas.

Cuadro 15. Pesos Moleculares de las bandas encontradas en los perfiles electroforéticos de las proteínas de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Peso Molecular (kDa)	Sobrenadantes del cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042						
	MRSm	4 h	6 h	8 h	12 h	16 h	24 h
228.2 ± 0.7					+	+	+
193.4 ± 0.9					+	+	+
188.5 ± 0.9				+	+	+	+
178.1 ± 1.0					+	+	+
163.0 ± 2.9					+	+	+
154.6 ± 0.8				+	+	+	+
149.0 ± 0.9					+	+	+
143.5 ± 0.2							+
134.8 ± 0.2							+
126.7 ± 1.0		+	+	+	+	+	+
122.5 ± 0.7					+	+	+
114.9 ± 0.7		+	+	+	+	+	+
109.0 ± 1.2		+	+	+	+	+	+
101.4 ± 0.9				+	+	+	+
93.2 ± 0.8					+	+	+
88.1 ± 0.3					+	+	+
85.0 ± 0.8		+	+	+	+	+	+
80.3 ± 0.6					+	+	+
77.2 ± 0.9		+	+	+	+	+	+
71.3 ± 0.6		+	+	+	+	+	+
67.1 ± 0.2					+	+	+
63.3 ± 0.6	+	+	+	+	+	+	+
59.8 ± 0.4			+	+	+	+	+
54.4 ± 1.4		+	+	+	+	+	+
51.2 ± 1.1		+	+	+	+	+	+
48.6 ± 0.1					+	+	+
44.8 ± 0.6		+	+	+	+	+	+
42.3 ± 0.5					+	+	+
39.7 ± 0.5					+	+	+
37.4 ± 0.4					+	+	+
34.9 ± 0.5			+	+	+	+	+
32.5 ± 0.5					+	+	+
31.2 ± 0.2					+	+	+
26.2 ± 0.3				+	+	+	+
22.3 ± 0.2		+	+	+	+	+	+
20.8 ± 0.2					+	+	+
18.7 ± 0.2					+	+	+
17.9 ± 0.2					+	+	+

+ Presencia en los perfiles electroforéticos. MRSm= Medio MRS modificado sin inocular (10X). h= horas
Pesos moleculares expresados por los promedios (kDa) ± la desviación estándar. 3 réplicas (n=3).

El incremento del número de bandas obedece al cambio de etapa en la que el cultivo de *Pediococcus acidilactici* se encuentra, observando que las proteínas de los sobrenadantes de la fase logarítmica (4, 6 y 8h) se conservan y están presentes en la fase estacionaria (12, 16 y 24 h).

3.5.3. Zimogramas copolimerizados con *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698

Dado que Llorente *et al.*, (2008) reportaron la presencia de actividad Peptidoglucano Hidrolasa extracelular de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, se realizaron zimogramas copolimerizados en geles de Bis/Acrilamida (9 y 10%) con células de *Micrococcus Lysodeikticus* ATCC 4698 (0.2% v/v) (Valence y Lortal, 1995; Lortal *et al.*, 1997); para ello las proteínas de los sobrenadantes se precipitaron con la misma técnica utilizada en la obtención de los perfiles electroforéticos (Wessel y Flügge, 1984).

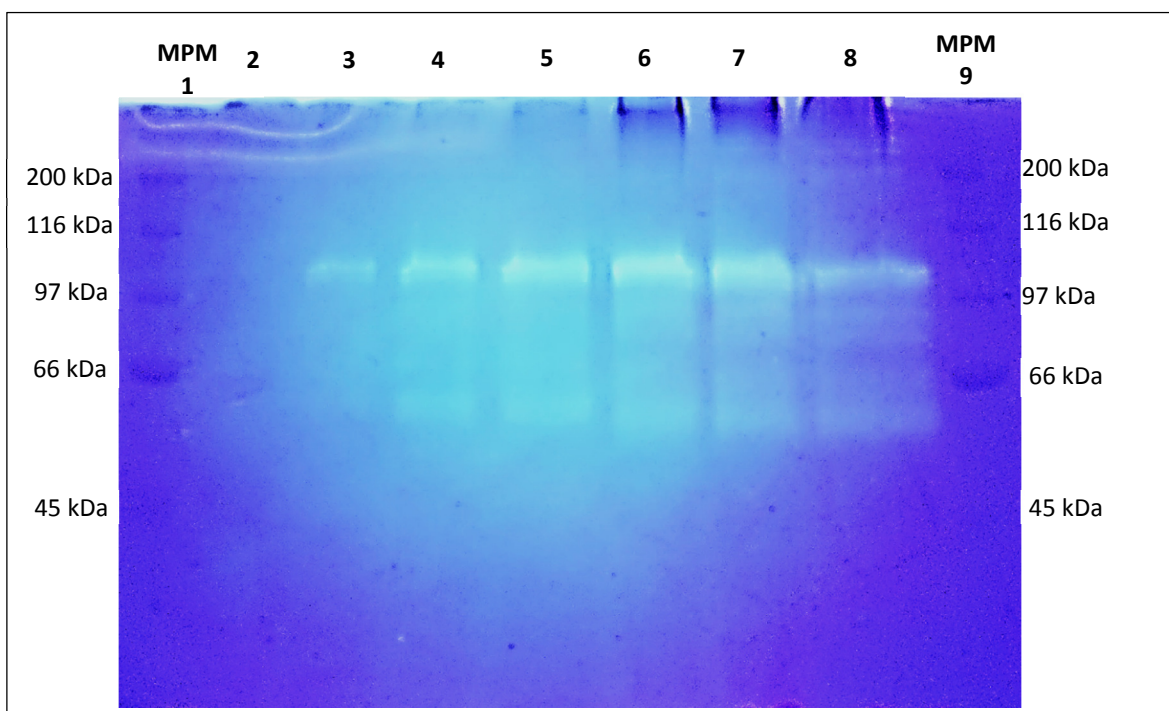


Figura 27. Zimograma de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en gel de Bis/Acrilamida 10% T, 3.3% C, 1mm, copolimerizado con células liofilizadas de *Micrococcus Lysodeikticus* (0.02% w/v), teñido con Azul de Metileno

1. MPM (Prestained Broad Range SDS/PAGE Standards, Bio Rad TM). 2. Medio MRSm (10X). 3. Sobrenadante de las 4 h de cultivo (10X). 4. Sobrenadante de las 6 h de cultivo (10X). 5. Sobrenadante de las 8 h de cultivo (10X). 6. Sobrenadante de las 12 h de cultivo (10X). 7. Sobrenadante de las 16 h de cultivo (10X). 8. Sobrenadante de las 24 h de cultivo (10X). 9. MPM (Prestained Broad Range SDS/PAGE Standards, Bio Rad TM).

Las figuras 27 y 28 muestran que los sobrenadantes de *P. acidilactici* generaron lisis en células de *Micrococcus lisodeiktyccus* evidenciando la presencia de actividad Peptidoglicano Hidrolasa en estos; las bandas de lisis se observan a 115.6 ± 0.5 , 110.3 ± 0.7 y 61.1 ± 0.7 kDa, así como un bandeo secundario poco definido (entre los 110 y 61 kDa). En todos los sobrenadantes se observaron estas zonas de lisis a excepción del medio MRSm (10X) y el de las 4 h en donde no se observa la zona de 61.1 ± 0.7 kDa (carriles 2 y 3 de las figuras 27 y 28).

Al emparejar los zimogramas con los perfiles electroforéticos se pudo definir que las zonas de lisis corresponden a las bandas protéicas de 114.9 ± 0.7 , 109.0 ± 1.2 y 59.8 ± 0.4 kDa, este mismo análisis justificó la ausencia de la zona de lisis antes descrita en el carril del sobrenadante de las 4 h de cultivo, ya que en su perfil electroforético no se encontró la banda de 59.8 ± 0.4 kDa (carril 3 de las figuras 27 y 28). Así mismo el bandeo secundario se pudiera explicar por la presencia de alguna otras bandas de los mismos perfiles electroforéticos.

Aunque Lortal *et al.*, (1997) y Mora *et al.*, (2003) demostraron patrones de actividad PGH en las proteínas de las membranas celulares de *Lactobacillus lactis*, *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*, estos no lo hicieron de la cepa 8042 y menos de sus proteínas extracelulares. Sin embargo la PGH de 116 kDa de este trabajo es similar a la que Mora *et al.*, (2003) describen de las cepas de *P. acidilactici* DSM 20284, ATCC 25740 y PAC1.0 donde también se observa un bandeo secundario inespecífico.

Por otra parte, la PGH extracelular de 110kDa tiene un peso idéntico al reportado por Llorente *et al.*, (2008) donde se analizaron las proteínas extracelulares de la cepa 8042. Aunque se trabajó con la misma cepa que Llorente *et al.*, (2008) no se habían evidenciado con anterioridad una zona de lisis a 61 kDa ni el bandeo secundario para esta cepa.

Posiblemente la precipitación de las proteínas extracelulares con Metanol-Cloroformo (Wessel y Flügge, 1984) permitió evidenciar éstas nuevas zonas de actividad lítica, esta diferencia obedece a que Llorente *et al.*, (2008) utilizaron como método de precipitación el Ácido Tricloro Acético y a pesar de que éste ha sido comparable con la precipitación con

metanol-cloroformo (Jiang, *et al.*, 2004) el método usado está indicado para precipitar proteínas de medios líquidos en presencia de lípidos y detergentes, lo que podría explicar porque se observaron mejores resultados con ésta forma de precipitación.

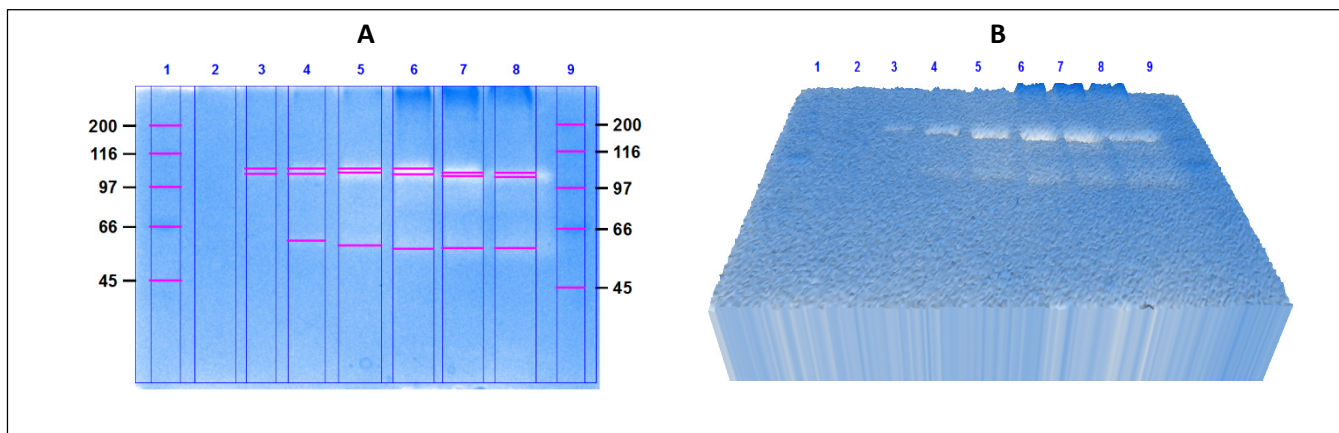


Figura 28. Análisis de las imágenes de los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 con Image Lab 3.0™.

A) Detección de bandas, 50% sensibilidad. B) Imagen 3D de la imagen A.

1. MPM (Prestained Broad Range SDS/PAGE Standards, Bio Rad™). 2. Medio MRSm (10X). 3. Sobrenadante de las 4 h de cultivo (10X). 4. Sobrenadante de las 6 h de cultivo (10X). 5. Sobrenadante de las 8 h de cultivo (10X). 6. Sobrenadante de las 12 h de cultivo (10X). 7. Sobrenadante de las 16 h de cultivo (10X). 8. Sobrenadante de las 24 h de cultivo (10X). 9. MPM (Prestained Broad Range SDS/PAGE Standards, Bio Rad™).

Como ya se ha mencionado, la actividad antagónica de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 contra algunas bacterias Gram positivas (Llorente *et al.*, 2008) es atribuida a la presencia de una Peptidoglicano Hidrolasa debido a su efecto lítico en la pared celular de estas bacterias (demostrada en este trabajo), sin embargo su efecto en bacterias Gram Negativas no ha sido aclarado en el sentido que algunas cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* var. Typhimurium y *Pseudomonas aeruginosa* han sido inhibidas en pruebas de difusión en agar (Hernández, 2012) pero en cultivos líquidos no, esto posiblemente se deba a la presencia de exopolisacáridos que recubren las célula y la impermeabilizan impidiendo su mecanismo de acción, por ello se lavaron las células de *Pseudomonas aeruginosa*.

3.5.4. Zimogramas copolimerizados con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Usando el principio de Leclerc y Asselin (1989) para la detección de hidrolasas de paredes celulares en geles de poliacrilamida, se planteó la realización de zimogramas copolimerizados con células de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 liofilizadas y libres de exopolisacáridos (por lavados en PBS), que se liofilizaron y se utilizaron como las de *Micrococcus lysodeikticus* obteniendo las siguientes imágenes de los zimogramas de actividad *in situ* de los sobrenadantes de cultivo de la cepa 8042 (Figuras 29 y 30).

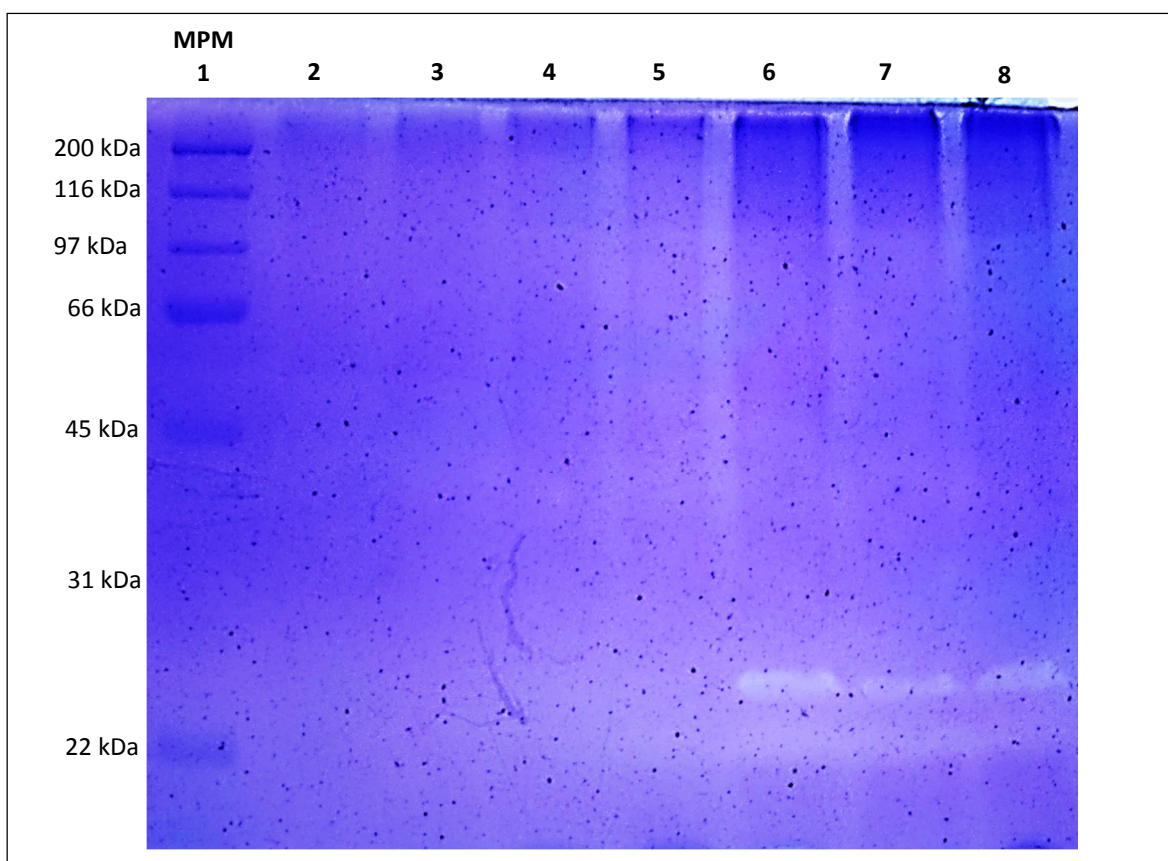


Figura 29. Zimograma de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en gel de Bis/Acrilamida 10% T, 3.3% C, 1mm, copolimerizado con células liofilizadas de *Pseudomonas aeruginosa* (0.02% w/v), teñido con Azul de Metileno

1. MPM (Prestained Broad Range SDS/PAGE Standards, Bio Rad™). 2. Medio MRSm (10X). 3. Sobrenadante de las 4 h de cultivo (10X). 4. Sobrenadante de las 6 h de cultivo (10X). 5. Sobrenadante de las 8 h de cultivo (10X). 6. Sobrenadante de las 12 h de cultivo (10X). 7. Sobrenadante de las 16 h de cultivo (10X). 8. Sobrenadante de las 24 h de cultivo (10X). 9. MPM (Prestained Broad Range SDS/PAGE Standards, Bio Rad™).

Sólo los sobrenadantes de la fase estacionaria tuvieron efectos líticos sobre las células de *Pseudomonas aeruginosa* a 20.9 ± 0.3 y 17.4 ± 0.3 kDa.

Esto evidenció que los sobrenadantes de *P. acidilactici*, además de poseer Peptidoglicano Hidrolasas, poseían proteínas con efecto lítico en células Gram negativas, de las cuales se desconoce su naturaleza. No existe ningún reporte sobre la presencia de este tipo de enzimas en bacterias Ácido Lácticas y menos en *Pediococcus acidilactici*.

Sin embargo bajo el concepto y mecanismo de acción que Cotter *et al.*, (2013) dan de las bacteriocinas y el antecedente de que Mora *et al.*, (2003) refieren a la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como no pediocinogénica y Llorente (2008) demostró la ausencia del gen *pedB*, se descarta que estas proteínas sean de una naturaleza similar.

Se requieren más estudios para poder determinar la naturaleza y características de estas proteínas líticas de células Gram Negativas.

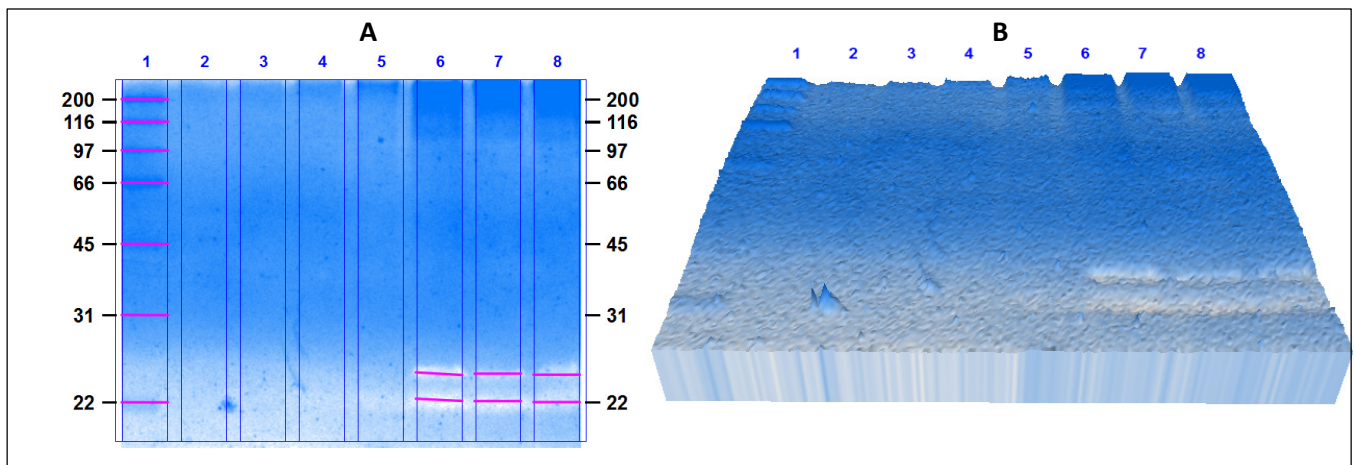


Figura 30. Análisis de las imágenes de los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 con Image Lab 3.0™.

A) Detección de bandas, 50% sensibilidad. B) Imagen 3D de la imagen A.

1. MPM (Prestained Broad Range SDS/PAGE Standards, Bio Rad™). 2. Medio MRSm (10X). 3. Sobrenadante de las 4 h de cultivo (10X). 4. Sobrenadante de las 6 h de cultivo (10X). 5. Sobrenadante de las 8 h de cultivo (10X). 6. Sobrenadante de las 12 h de cultivo (10X). 7. Sobrenadante de las 16 h de cultivo (10X). 8. Sobrenadante de las 24 h de cultivo (10X). 9. MPM (Prestained Broad Range SDS/PAGE Standards, Bio Rad

3.5.5. Difusión en agar

Tras evidenciar que los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 poseían Peptidoglicano Hidrolasas y otro tipo de proteínas capaces de lisar las células de *Pseudomonas aeruginosa*, se procedió a caracterizar su efecto durante el crecimiento de éstas en medios sólidos utilizando la prueba de difusión en agar, misma que se ha utilizado como referente por más de 70 años para medir la capacidad inhibitoria de un agente antimicrobiano (NCCLS, 2005).

El NCCLS recomienda utilizar el agar Müller Hinton para medir la susceptibilidad a antimicrobianos, sin embargo Martínez (2011) realizó pruebas de difusión en agar (agar antibióticos No.11 con una sobrecapa de agar Nutritivo 0.6%) evidenciando la actividad inhibitoria de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, por lo que se contrastaron ambos métodos obteniendo los siguientes resultados (Figuras 31A y 31B).

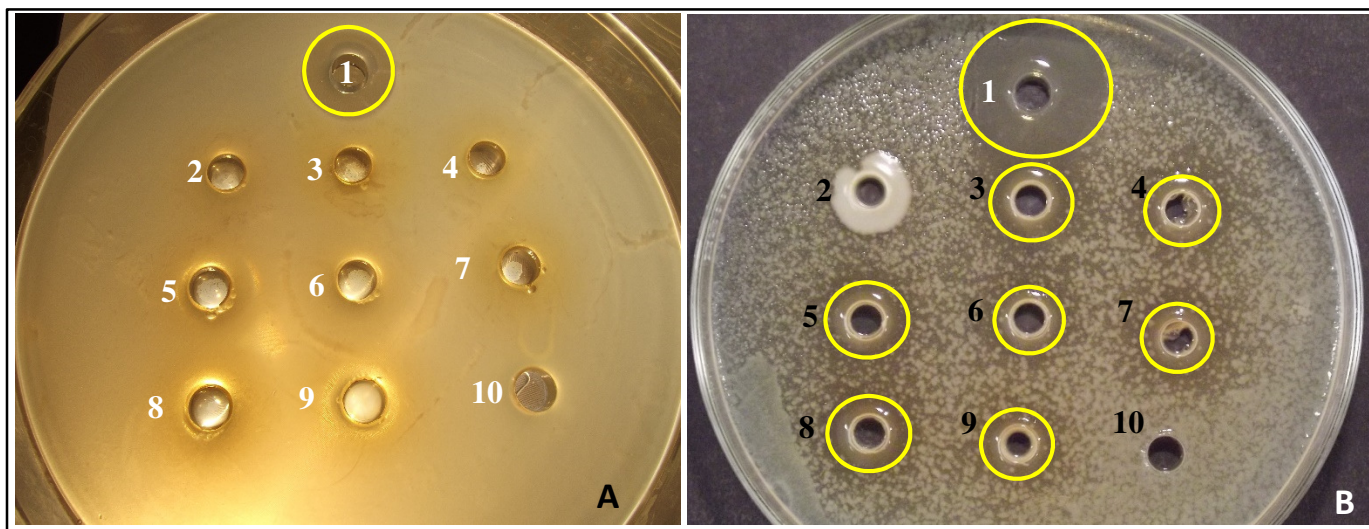


Figura 31. Pruebas de Difusión en Agar de los Sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. A) Agar Müller Hinton, B) Agar Antibióticos No. 11 con sobrecapa de Agar Suave Nutritivo (0.6%).

1) Ácido Láctico 2%. 2) Medio MRS (10X). 3) Medio MRSm (10X). 4) Sobrenadante de las 4 h de cultivo (10X). 5) Sobrenadante de las 6 h de cultivo (10X). 6) Sobrenadante de las 8 h de cultivo (10X). 7) Sobrenadante de las 12 h de cultivo (10X). 8) Sobrenadante de las 16 h de cultivo (10X). 9) Sobrenadante de las 24 h de cultivo (10X). 10) Sin Inocular.

Como se observa en la Figura 31 B, en el agar Antibióticos No.11 con la sobrecapa de agar Nutritivo suave (Martínez, 2011) todos los sobrenadantes tuvieron un efecto inhibitorio medido en 14.68 ± 0.54 mm sin tener una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre ellos ($p < 0.05$). Además, el Medio MRSm (10X) generó un efecto similar de inhibición (Figura 31, B, 3), pero el medio MRS (10X) (Figura 31, B, 2) ocasionó que sobre la zona de inhibición se formara un película blanquecina. Debido a que no se conocía el origen de esa capa, se tomó una muestra y se tiñó con la técnica de Gram resultando un frotis de bacilos Gram negativos sin ningún contaminante, por lo que se supuso se trataba de la formación de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*.

En cambio, en el agar Müller Hinton ninguno de los sobrenadantes generó halos de inhibición a excepción del control positivo del Ácido Láctico (2%).

Este efecto podría atribuirse a la diferencia que existe en la formulación y disponibilidad de nutrientes que hay entre los dos medios, el medio Nutritivo carece de una fuente de carbohidratos para el crecimiento de las bacterias, en cambio el medio Müller Hinton contiene almidón y dado que la disponibilidad de carbohidratos en el medio favorece la formación de exopolisacáridos (Knezevic y Petrovic, 2008) que protegen a las células de agentes nocivos, es posible pensar que en el medio Müller Hinton se formaran exopolisacáridos que evitaron el efecto inhibitorio de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, en cambio en el medio nutritivo, donde la disponibilidad de carbohidratos es menor y la producción de exopolisacáridos también lo es y por lo tanto las proteínas líticas tuvieron el efecto inhibitorio deseado.

Una duda surgió al observar que en el método de Martínez (2011) los controles negativos, el medio MRS (10X) y el MRSm (10X), generaron efectos que no se habían reportado con anterioridad (Generación de exopolisacáridos y zona de inhibición) y debido a que existen reportes del efecto inhibitorio de algunas de las sustancias que componen a estos medios sobre *Pseudomonas aeruginosa* (Acetato de Sodio, Tween 80 y el Ascorbato de Sodio) (Toutain-Kidd *et al.*, 2009; Hisham A. *et al.*, 2012), ¿No sería posible que alguno de los ingredientes de estos medios pudiera tener un efecto en el crecimiento de *Pseudomonas*

aeruginosa?. Por lo que se separaron los ingredientes y se prepararon soluciones concentradas (10X) ajustando su pH a 7.0 ± 0.02 , esterilizándolas por filtración en membranas $0.22\mu\text{m}$ para caracterizar su efecto en pruebas de difusión en agar (Figura 32).

Esta prueba se realizó en el medio Müller Hinton y se adaptó para utilizarse con los medio de cultivo seleccionados para la evaluación de las biopelículas (LB fortificado), Piocianina (King “A”) y Pioverdina (King “B”) en donde a una capa de agar Müller Hinton se colocó una sobrecapa de agar suave (0.6% de cada medio inoculado al 1% de un cultivo en fase logarítmica).

Como se puede observar en la Figura 32, en cada uno de los medios, los ingredientes generaron efectos diferentes como lo muestra el Cuadro 16.

En todos los medios de cultivo el control positivo del Ácido láctico generó inhibiciones desde 15.2 hasta 19.0 mm, en las pruebas con sobrecapa de Lbf y King “B” ninguno de los ingredientes generaron un efecto inhibitorio; en cambio, en el agar King “A” y Müller Hinton todos los ingredientes del medio generaron un halo de inhibición, pero para el agar Müller Hinton solo el Citrato de Amonio no lo hizo.

Ante los resultados anteriores resulta aventurado aseverar que el efecto de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, así como los testigos negativos (medios MRS y MRSm) están determinados por el medio en el que crece *Pseudomonas aeruginosa* y por lo tanto de los nutrientes de que dispone. Es importante recordar que los resultados de la pruebas de difusión tienen la limitante propia de la difusión del agente inhibidor por ello es necesario comparar estos resultados con pruebas de inhibición en cultivos líquidos (NCCLS, 2005).

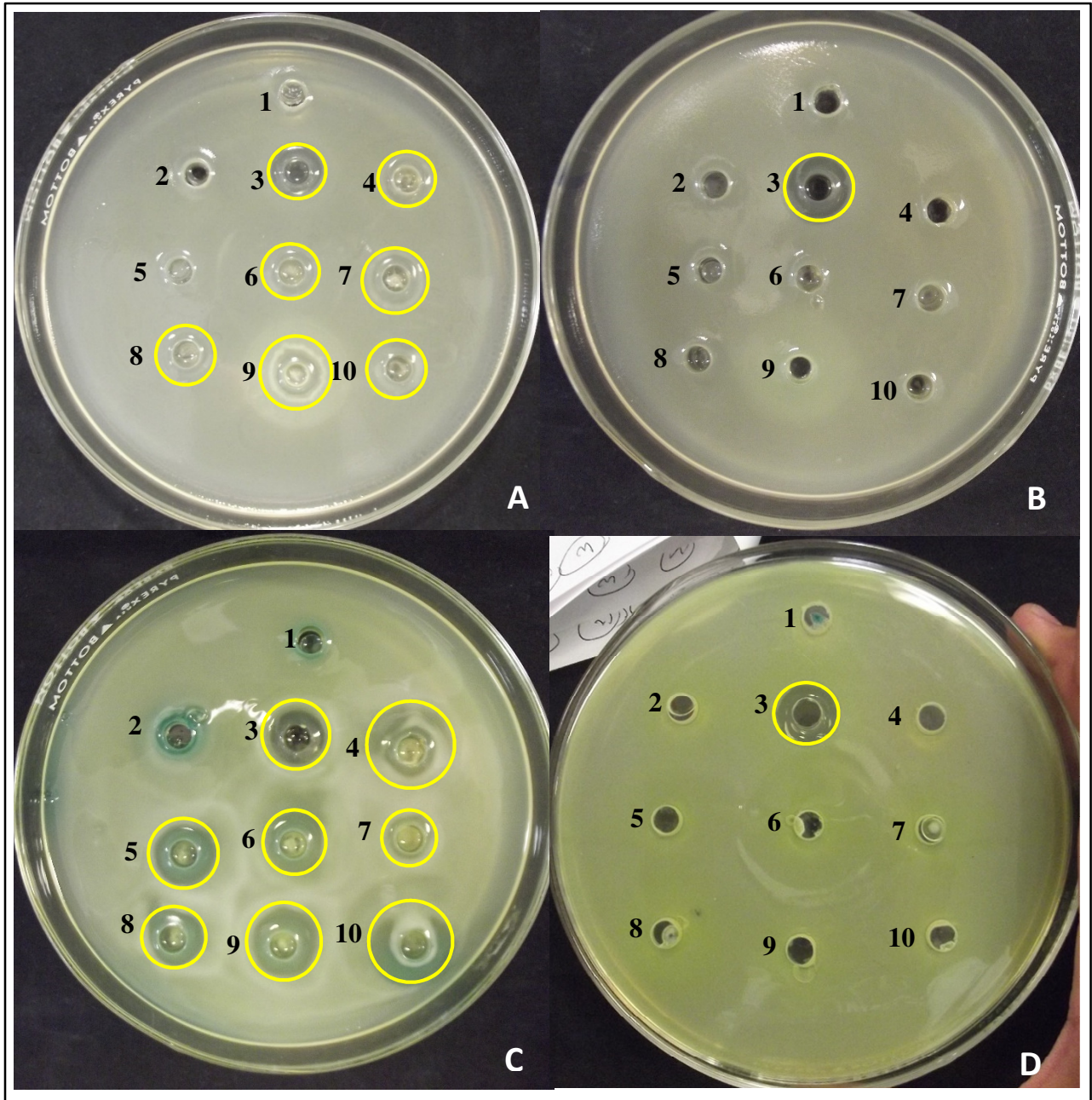


Figura 32. Pruebas de Difusión en Agar de los componentes del medio MRSm en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. A) Agar Müller Hinton, B) Agar Müller Hinton con sobrecapa de Agar Suave Luria Bertani Fortificado (0.6%). C) Agar Müller Hinton con sobrecapa de Agar Suave King “A” (0.6%). D) Agar Müller Hinton con sobrecapa de Agar Suave King “B” (0.6%).

1) Sin Inocular. 2) Agua destilada Estéril. 3) Ácido Láctico 2%. 4) Ácido Ascórbico, pH 7.0. 5) Citrato de amonio pH 7.0. 6) Acetato de Sodio pH 7.0. 7) Fosfato Dipotásico pH 7.0. 8) Sacarosa pH 7.0. 9) Sulfato de Magnesio pH 7.0. 10) Tween 80 pH 7.0.

Cuadro 16. Dimensiones de los halos de Inhibición de los ingredientes del medio MRS y MRSm en los diferentes medios de cultivo.

Ingrediente	Agar Müller Hinton	Agar M.H y sobrecapa de LBf	Agar M.H y sobrecapa de King "A"	Agar M.H y sobrecapa de King "B"
Sin Inocular	-	-	-	-
Agua Destilada	-	-	-	-
Ácido Láctico	15.2 ± 0.4 ^a	17.3 ± 0.4	19.0 ± 0.5 ^a	18.2 ± 0.5
Ácido Ascórbico	13.3 ± 0.5 ^b	-	13.7 ± 0.4 ^b	-
Citrato de Amonio	-	-	17.0 ± 0.8 ^{cd}	-
Acetato de Sodio	11.3 ± 0.2 ^c	-	16.4 ± 0.1 ^{cd}	-
Fosfato Dipotásico	13.4 ± 0.8 ^{ab}	-	11.6 ± 1.0	-
Sacarosa	11.9 ± 0.4 ^c	-	15.5 ± 0.9 ^{cde}	-
Sulfato de Magnesio	13.2 ± 0.5 ^b	-	17.4 ± 0.3 ^{abcd}	-
Tween 80	14.8 ± 0.6 ^a	-	16.6 ± 0.3 ^{cdef}	-

M.H. = Müller Hinton. - = Sin evidencia de Inhibición. Inhibición medida por los promedios (mm) ± la desviación estándar. 3 réplicas (n=3). En cada medio de cultivo los promedios con superíndices diferentes son estadísticamente diferentes (p<0.05).

3.5.6. Cinéticas de inhibición

Debido a la discrepancia de los resultados de las pruebas de difusión en agar, se realizaron cinéticas de inhibición en cada medio de cultivo (LBf, KA y KB) con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sometidos a un análisis de UFC/mL obteniendo los siguientes resultados (Figuras 33, 34 y 35).

Las figuras 33, 34 y 35 se encuentran agrupadas las cinéticas de crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 9027 pertenecientes a los tratamientos con los sobrenadantes de *P. acidilactici* ATCC 8042 en su fase logarítmica (4, 6 y 8 h) (A), así como las de su fase estacionaria (12, 16 y 24 h) (B) y los testigos negativos de los medios MRS y MRSm (C) en los medios LBf, KA y KB respectivamente.

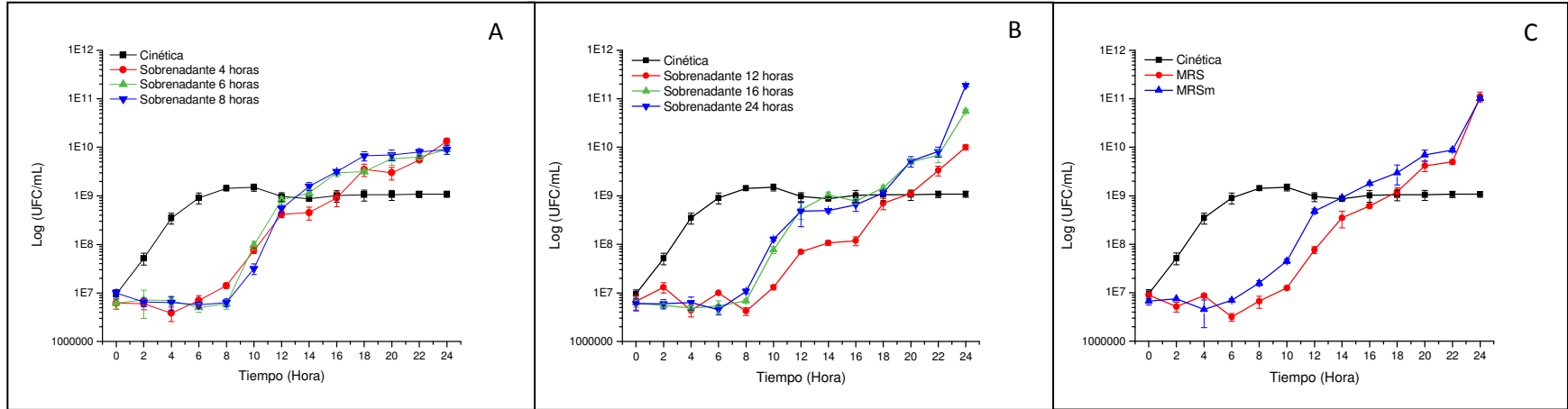


Figura 33. Cinéticas de Inhibición en caldo Luria Bertani fortificado de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratados con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. A) Inhibición con los sobrenadantes de fase logarítmica (10X) (4, 6 y 8 h); B) Inhibición de los sobrenadantes de fase estacionaria (10X) (12, 16 y 24 h); C) Testigos negativos (Medios sin inocular MRS y MRSm 10X).

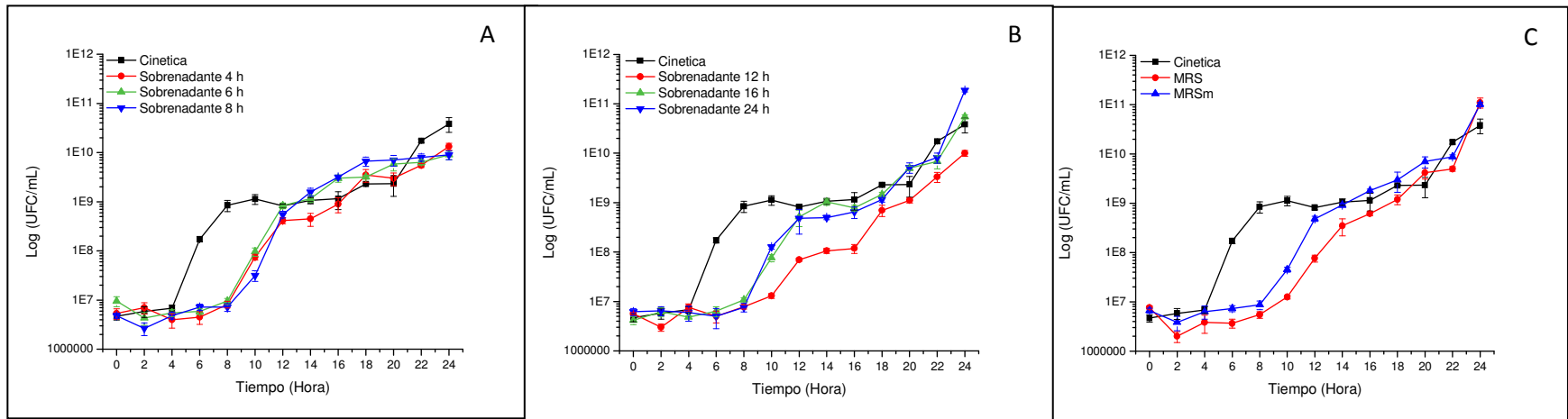


Figura 34. Cinéticas de Inhibición en caldo King "A" de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratados con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. A) Inhibición con los sobrenadantes de fase logarítmica (10X) (4, 6 y 8 h); B) Inhibición de los sobrenadantes de fase estacionaria (10X) (12, 16 y 24 h); C) Testigos negativos (Medios sin inocular MRS y MRSm 10X).

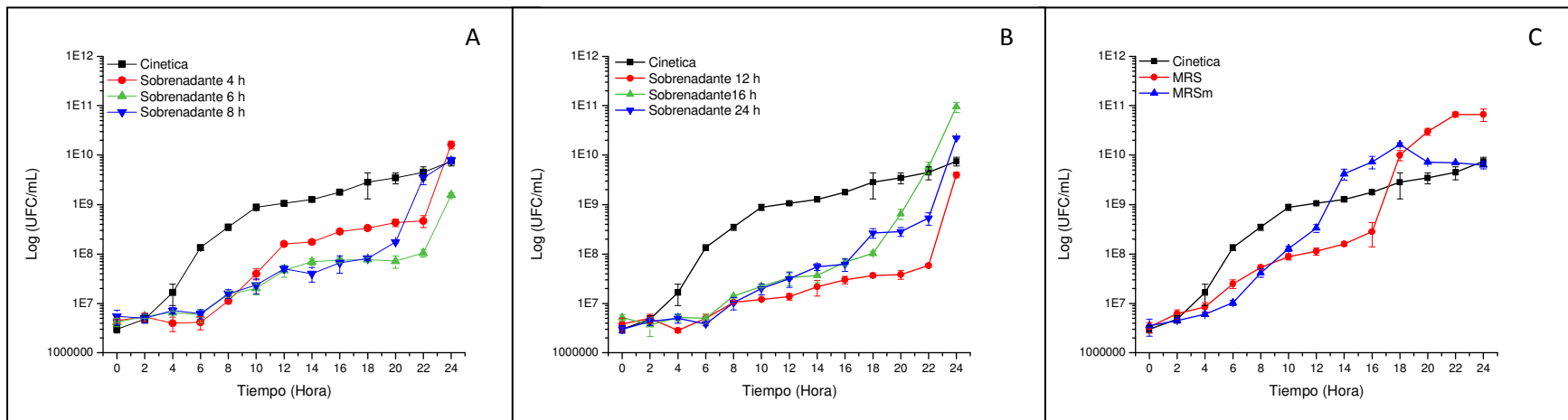


Figura 35. Cinéticas de Inhibición en caldo King “B” de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratados con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. A) Inhibición con los sobrenadantes de fase logarítmica (10X) (4, 6 y 8 h); B) Inhibición de los sobrenadantes de fase estacionaria (10X) (12, 16 y 24 h); C) Testigos negativos (Medios sin inocular MRS y MRSm 10X).

En todos los casos, es evidente que existió un efecto similar al que reporta Martínez (2011), al utilizar sobrenadantes de la fase media logarítmica de *P. acidilactici*, provocando en los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* el incremento de la fase *Lag*, la modificación de la velocidad de crecimiento y UFC a las 24 h de cultivo.

A pesar de que no se trataba de cinéticas de muerte celular, en algunos de ellos incluso se observa una reducción de las UFC/mL al inicio del tratamiento (las primeras 4 horas) lo que puede presumir el efecto lítico de las proteínas de los sobrenadantes.

Para poder establecer si el efecto antagonista de los sobrenadantes de fase logarítmica diferían de los sobrenadantes de fase estacionaria (dada las diferencias en los perfiles electroforéticos y zimográficos) se realizó un análisis de Varianza de las regresiones no lineales con el siguiente modelo de Weibull (Anexo 3, 4 y 5):

$$Y = Asym - Drop(-e^{lrc} * x^{Pwr})$$

Donde:

Asym es un parámetro numérico que representa la asíntota horizontal sobre el lado derecho.

Drop representa el cambio de valor de *Asym* hasta la intercepción de Y.

lrc es el parámetro que representa el logaritmo natural de la constante de proporcionalidad.

Pwr representa la potencia a la cual x es elevado.

Tras el análisis de varianza de las regresiones no lineales se evidenció que todos los tratamientos generaron curvas de crecimiento distintas entre ellas a excepción de las mostradas en el Cuadro 17.

Ante estos resultados no se pudo establecer con claridad una relación o diferencia entre los tipos los sobrenadantes de fase logarítmica (con Peptidoglicano Hidrolasas) (4, 6 y 8 h) y los de fase estacionaria (con Peptidoglicano hidrolasas y con proteínas capaces de lisar células de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) (12, 16 y 24 h).

De los tratamientos que estadísticamente no fueron diferentes entre ellos, se esperaba que en los tres medios (LBf, KA y KB) este efecto fuera similar, lo cual no sucedió (Cuadro 17).

Cuadro 17. Tratamientos de las cinéticas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en las que no se encontró evidencia estadística para aseverar que eran diferentes.

Cinéticas en LBF	Cinéticas en KA	Cinéticas en KB
MRS (10X) y MRSm (10X)	MRS (10X) y MRSm (10X)	8 h (10X) y 24 h (10X)
MRS (10X) y 16 h (10X)	MRSm (10X) y 4 h (10X)	16 h (10X) y 24 h (10X)
MRSm(10X) y 4 h(10X)	MRSm (10X) y 16 h (10X)	
4 h(10X) y 16 h (10X)	4 h (10X) y 16 h (10X)	
6 h (10X) y 8 h (10X)	4 h (10X) y 24 h (10X)	
	6 h (10X) y 8 h (10X)	
	16 h (10X) y 24 h (10X)	

LBF = Luria Bertani fortificado, KA = medio King "A", KB = medio King "B", MRS = medio Man Rogosa and Sharp, MRSm = medio MRS modificado, h = hora, 10X = concentrado 10 veces.

Se debe resaltar el hecho de que, a diferencia de Martínez (2011), los testigos negativos de los medios MRS y MRSm generaron un efecto parecido al descrito con anterioridad (aumento de la fase *Lag*, modificación en la velocidad de crecimiento y UFC a las 24h de cultivo) (Figuras 33 C, 34 C y 35 C).

Ya que las pruebas de difusión demostraron que algunos de los componentes del medio MRS y MRSm pueden generar un efecto inhibitorio (Toutain-Kidd *et al.*, 2009; Hisham A. *et al.*, 2012) se utilizaron las mismas soluciones concentradas (10X) de los ingredientes de estos de la misma manera que en las pruebas de difusión para caracterizar su efecto en cinéticas de crecimiento (Figuras 36, 37 y 38).

Así mismo se realizó un análisis de Varianza de las regresiones no lineales con el siguiente modelo *logístico* (Anexo 6, 7 y 8):

$$Y = A + \frac{(B - A)}{1 + e\left(\frac{xmid - X}{scal}\right)}$$

Donde:

A: es un parámetro numérico que representa la asíntota horizontal sobre el lado izquierdo.

B: es un parámetro numérico que representa la asíntota horizontal sobre el lado derecho.

xmid: es un parámetro numérico que representa el valor de X en el punto de inflexión de la curva.

scal: es un parámetro numérico que representa la escala en el eje X.

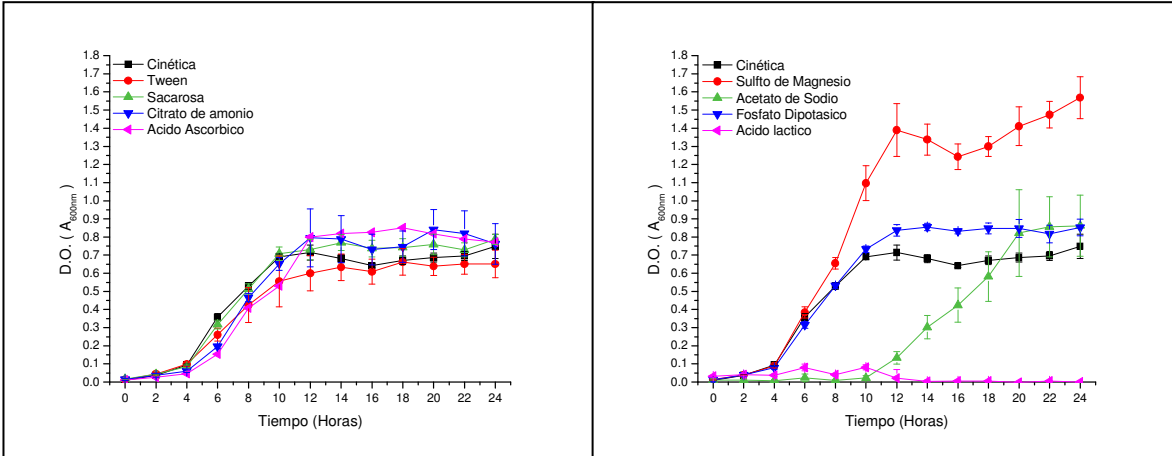


Figura 36. Cinéticas de Inhibición en caldo Luria Bertani fortificado de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratados con los ingredientes de los medios MRS y MRSm.

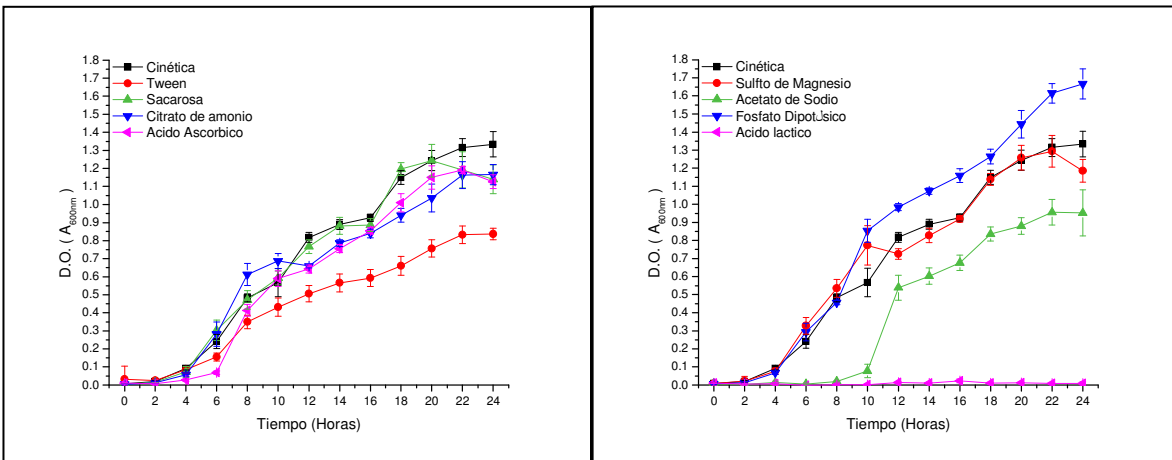


Figura 37. Cinéticas de Inhibición en caldo King "A" de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratados con los ingredientes de los medios MRS y MRSm.

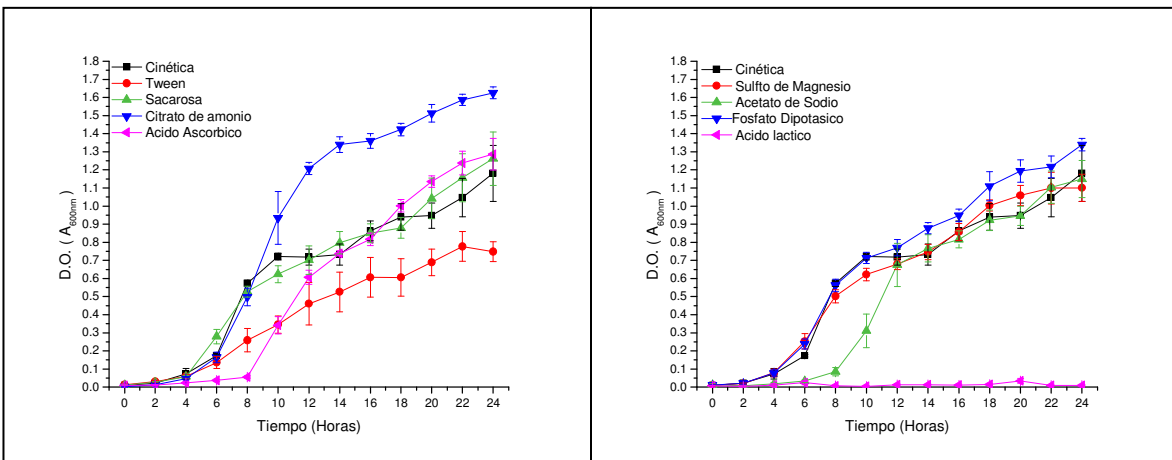


Figura 38. Cinéticas de Inhibición en caldo King "B" de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratados con los ingredientes de los medios MRS y MRSm.

De todos los tratamientos y tras el análisis de varianza de las regresiones no lineales se evidenció que algunos de ellos generaron curvas de crecimiento estadísticamente similares, los cuales se muestran en la siguiente Cuadro (Cuadro 18).

Cuadro 18. Tratamientos de las cinéticas de *Pseudomonas aeruginosa* en las que no se encontró evidencia estadística para aseverar que eran diferentes.

Cinéticas en LBf	Cinéticas en KA	Cinéticas en KB
Citrato de amonio y Ácido Ascórbico	S/T y Sacarosa	S/T y Sacarosa
	S/T y Sulfato de Magnesio	S/T y Sulfato de Magnesio
	Sacarosa y Citrato de Amonio	S/T y Fosfato Dipotásico
	Sacarosa y Sulfato de Magnesio	Sacarosa y Sulfato de Magnesio
	Citrato de Amonio y Ácido Ascórbico	Sacarosa y Fosfato Dipotásico
	Citrato de Amonio y Sulfato de Magnesio	Ácido Ascórbico y Acetato de Sodio
	Ácido Ascórbico y Sulfato de Magnesio	

LBf = Luria Bertani fortificado, KA = medio King "A", KB = medio King "B", S/T = Sin Tratamiento.

Como se observa en las Figuras 36, 37 y 38, en los tres medios de cultivo (LBf, KA y KB) la adición de Ácido Láctico generó una inhibición completa del crecimiento celular esto por la permeabilización de la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* lo que genera la desintegración de la misma por el ácido láctico (Alakomi H.-L. *et al.*, 2000).

El Acetato de Sodio incrementó el tiempo de la fase *Lag* para iniciar la fase logarítmica (log) hasta las 12 h (en el medio LBf), 10 h (en medio KA) u 8 h (en el medio KB), cuando normalmente ésta inicia a las 4 h en todos ellos. A pesar de que en las cinéticas de crecimiento en LBf el Acetato de Sodio triplicó el tiempo de la fase *Lag* y en el medio KB lo duplicó, en las pruebas de difusión correspondientes, ninguno de los ingredientes generaron halos de inhibición (Figura 32, Cuadro 16), esto se explica porque, a pesar de que el Acetato de Sodio genera un efecto retardador, los cultivos de este tratamiento alcanzaron a las 24 h un crecimiento similar al normal (D.O. A_{600nm}). Un efecto parecido es reportado por Ibrahim-Sallam (2007) cuando sumergió rebandas de salmón en una solución al 2.5% (w/v) de Acetato de Sodio lo que generó la reducción de las UFC/g de *Pseudomonas aeruginosa* pero no impidió su crecimiento a lo largo del tiempo.

Así mismo, la cinética de cultivo adicionada de Ácido Ascórbico en el medio KB generó un crecimiento estadísticamente similar al que produjo el Acetato de Sodio en este medio (Figura 38 y Cuadro 18), por lo tanto generó un retraso en el inicio de la fase *log*, pero un crecimiento similar al normal a las 24 h de cultivo (D.O. A_{600nm}). Rawal (1978) demostró el incremento de la susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a algunos antibióticos después de ser tratadas con soluciones (neutralizadas) de Ácido Áscorbico, concluyendo que éste alteraba la superficie celular a través de la competencia con las uniones de magnesio de la pared o membrana celular o ribosomal. La recuperación de *P. aeruginosa* a las 24 h de cultivo se justifica porque en estas cinéticas no se adicionó ningún antibiótico; bajo este argumento, el efecto de las PGH y las proteínas líticas de los sobrenadantes de *P. acidilactici* debió haber sido evidente en las cinéticas correspondientes, lo cual no ocurrió.

Toutain-Kidd *et al.*, (2009) demostraron que la adición de Polisorbato 80 (Tween 80) a cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* provocaba una reducción en la formación de biopelículas; en este trabajo, el Tween 80 provocó que la D.O en fase estacionaria de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* en todos los medios se redujera; en el medio LBf la reducción fue de 0.100 D.O. A_{600nm} y en los medios KA y KB de 0.500 D.O. A_{600nm} .

La adición de Sulfato de Magnesio (presente en el medio MRS y MRSm) permitió un mayor crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en el medio LBf aumentándolo en 0.900 D.O. A_{600nm} más que el normal (al final de la fase logarítmica), dado que este medio no contiene Magnesio ($MgSO_4$) en su formulación, las bacterias se vieron favorecidas al adicionarlo, ya que como lo mencionan Burton *et al.*, (1948) y Garrod y Waterworth (1969) este ingrediente favorece su crecimiento y es necesario para la producción de pirocianina, lo mismo que le permite incrementar su resistencia a algunas sustancias en pruebas de difusión y por tanto reducir el efecto de los sobrenadantes. Lo mismo ocurrió con el Fosfato Dipotásico provocando un mayor crecimiento pero en todos los medios (LBf, KA y KB) (un aumento entre 0.200 a 0.400 D.O. A_{600nm}) dado que este también favorece el crecimiento de *P. aeruginosa* y sobretodo la producción de exopolisacáridos (Kokare *et al.*, 2009).

Algo parecido ocurrió con el Citrato de Amonio pero solo en el medio KB (en los demás no tuvo efecto), donde aumento su crecimiento en 0.500 D.O. A_{600nm} ; Musk *et al.*, (2005) explica este fenómeno al utilizar el citrato de amonio y sus sales férricas para evaluar su efecto en la producción de biopelículas destacando que el citrato de amonio no generaba ningún efecto inhibitorio tanto en su crecimiento como en los exopolisacáridos producidos.

Por último, al adicionar Sacarosa no hubo ningún cambio respecto a las cinéticas de crecimiento normales en todos los medios de cultivo.

Los resultados anteriores explicarían algunos de los fenómenos observados en las pruebas de difusión y cinéticas de inhibición, una de esas explicaciones la da el Ácido Láctico ya que al igual que en las cinéticas de crecimiento, en las pruebas de Difusión de los tres medios se generaron halos de inhibición.

Recordando que los halos de inhibición producidos por los ingredientes del MRS y MRSm se presentaron únicamente en los medios Müller Hinton y LBf, de forma parcial los resultados de las cinéticas del acetato de sodio, ácido ascórbico y el Tween 80 podrían explicar la presencia de éstos, por ejemplo, para el caso de éste último (Tween 80), aunque existió una reducción en la D.O. en el medio LBf, este efecto no sería suficiente para generar los halos de inhibición. En cambio, la disminución de 0.500 en la D.O. A_{600nm} en el medio KA podría explicar la presencia de estos halos en las pruebas de difusión correspondientes. Sin embargo, y a pesar de que su efecto fue idéntico en el medio líquido de KB en las pruebas de difusión en éste medio no se generaron halos con este ingrediente, sin embargo las cinéticas de los demás ingredientes (sacarosa, citrato de amonio, fosfato dipotásico y sulfato de magnesio) explicarían lo contrario (favorecen el crecimiento o no lo modifican) y por lo tanto dejan sin explicación la generación de halos, lo que hace pensar que en efecto, el medio en el que son puestas a prueba las sustancias inhibitorias pueden generar falsos negativos (NCCLS, 2005).

Un fenómeno que hay que aclarar es el de que en el medio Müller Hinton el medio MRS y MRSm no generaron halos de inhibición, pero sus ingredientes por separado si lo hicieron.

Como ya se describió, hubo ingredientes que inhibían las cinéticas de crecimiento, otros que las retrasaban y unos que las aumentaban, la combinación de estos efectos, aunados al hecho de que en las cinéticas de los testigos negativos (MRS y MRSm) se alcanzaron UFC/mL idénticas o superiores a las normales, evitaron la generación de halos en las pruebas de difusión.

Conjuntando lo demostrado en el análisis del efecto de los sobrenadantes y de los ingredientes del MRS y MRSm tanto en las pruebas de difusión como en las cinéticas de crecimiento es posible que el efecto retardador de los mismos sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 se deba a los componentes del medio MRS y MRSm y no a las proteínas analizadas en las electroforesis y zimogramas aunque estas tengan efectos líticos en sustratos “*in situ*”, ya que como se evidenció, estos compuestos pueden interferir en la lectura real del efecto de éstas; sin embargo no se descarta que las proteínas de los sobrenadantes puedan tener un efecto en la producción de biopelículas y pigmentos que a continuación se analizan.

3.6. Efecto en la producción de Exopolisacáridos

Para evaluar los efectos de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre la producción de exopolisacáridos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 se evaluó la producción total de carbohidratos (método de Ácido Sulfúrico-Fenol) y Ácidos Urónicos (Ácido Sulfúrico-Tetraborato de Sodio-Carbazol) por métodos espectrofotométricos, realizando la cuantificación a través de curvas patrón (Anexos 3 y 4). Como se mencionó en la metodología, el método por el cual se hizo crecer a *Pseudomonas aeruginosa* en tubos de cultivo con perlas de vidrio fue una adaptación al método de Masuko *et al.*, (2005) que permitió cuantificar la producción de exopolisacáridos (Figura 39) y como se observa en la Figura 40 se caracterizó de la producción normal (0, 24, 36 y 48 h) de estos compuestos.

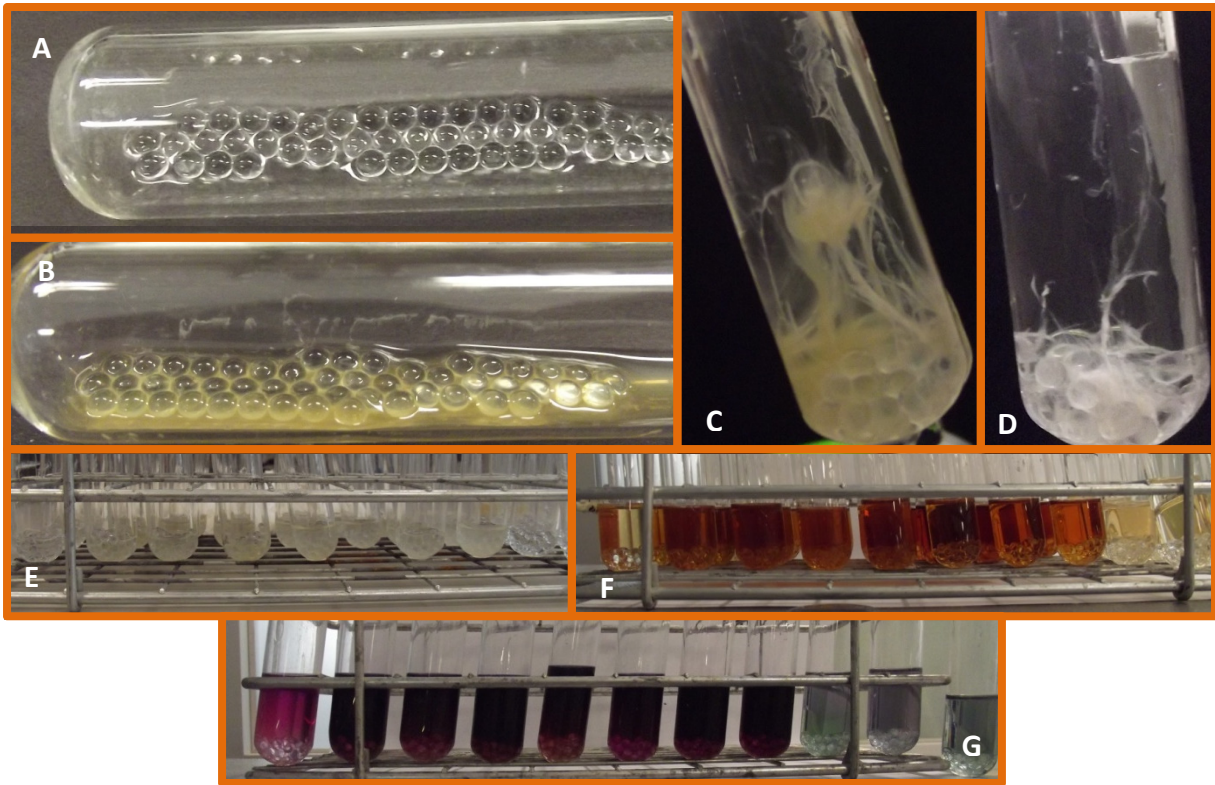


Figura 39. Adaptación al método de Masuko *et al.*, (2005) para la cuantificación de Carbohidratos Totales y Ácidos Urónicos. A) Tubo de cultivo con 50 perlas de Borosilicato sin inocular; B) Tubo de cultivo despues del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en medio Luria Bertani fortificado; C) Primer lavado de la Biopelícula con PBS frío; D) Biopelícula lista para cuantificar; E) Tubos de cultivo previos al la cuantificación de CT y AU; F) Tubos tratados con Ácido Sulfúrico; G) Tubos trtados con Ácido Sulfúrico-Tetraborato de Sodio-Carbazol.

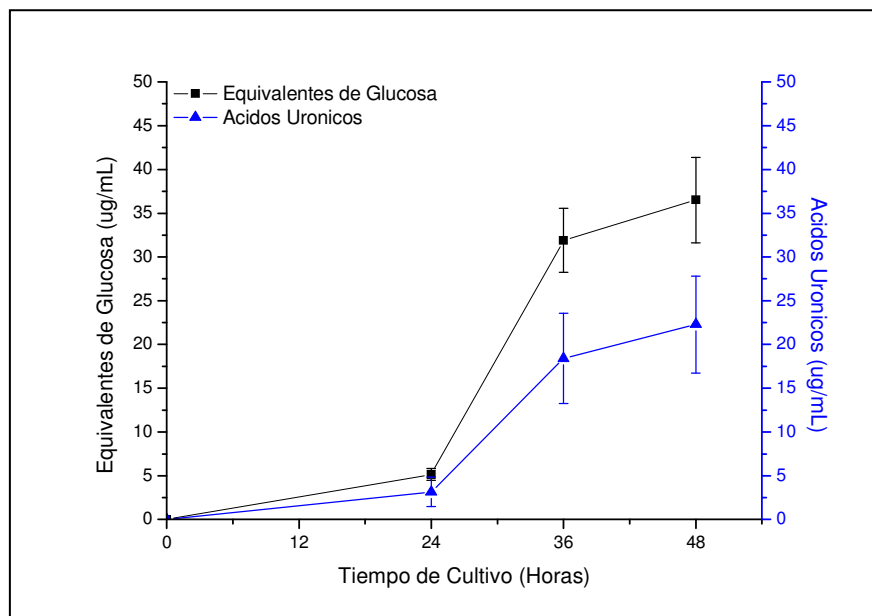


Figura 40. Producción de Ácidos Urónicos (µg/mL) y Carbohidratos Totales (µg/mL) de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio LBF.

Como se observa, la producción de exopolisacáridos (Carbohidratos totales y Ácidos Urónicos) se incrementa gradualmente a lo largo de 48 h de cultivo, después de ese tiempo los niveles de ambos compuestos se estabilizan y se mantienen homogéneos. Posterior a las 24 h de cultivo se observa que los Carbohidratos Totales se encuentran en mayor concentración que los Ácidos Urónicos, indicando que la naturaleza de los exopolisacáridos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* contienen otros carbohidratos tal y como lo menciona Lembre *et al.*, (2012) en donde no solo los ácidos urónicos forman parte de la biopelícula sino que también podría estar presentes la propia glucosa hasta en un 56% y otros carbohidratos en menor proporción como lo son la Ramanosa, Galactosa, Xilosa, Ketodeoxioctulosanato, N-acetyl galactosamina, N-acetyl fructosamina, N-acetyl glucosamina, N-acetyl quinovosamina u otros.

3.6.1. Efecto en la producción de carbohidratos totales

En la Figura 40 se muestran los efectos de la adición de sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en la producción de carbohidratos totales (CT), estos efectos se agruparon en los que son producidos por los sobrenadantes de fase logarítmica (A), fase estacionaria (B) y los testigos negativos MRS y MRSm (C).

El primer efecto que resalta es que todos los tratamientos elevaron considerablemente la producción de carbohidratos totales en todos los tiempos de cultivo, de tener una producción normal de $36.51 \pm 4.86 \mu\text{g/mL}$ a las 48 de cultivo, esta se elevó hasta $3,934.61 \pm 251.62 \mu\text{g/mL}$ 107 veces más).

Dentro del aumento extraordinario en la producción de CT también se pueden observar dos fenómenos muy peculiares, el que generaron los sobrenadantes de fase estacionaria y los testigos negativos (medio MRS y MRSm).

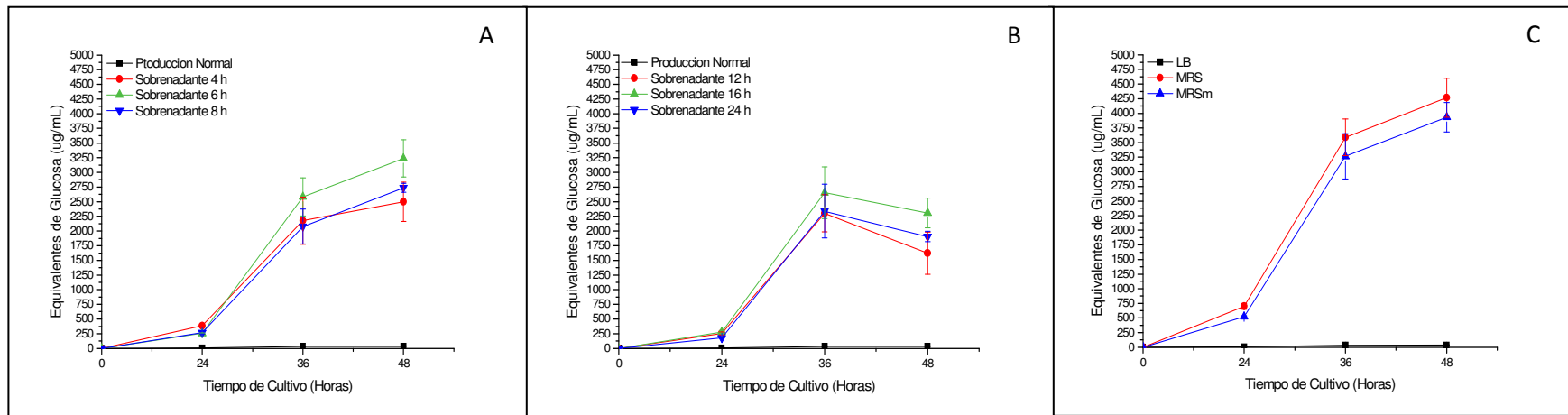


Figura 41. Producción de Carbohidratos Totales de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio LBf tratados con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. A) Producción con los sobrenadantes de fase logarítmica (10X) (4, 6 y 8 h); B) Producción con los sobrenadantes de fase estacionaria (10X) (12, 16 y 24 h); C) Producción con los testigos negativos (Medios sin inocular MRS y MRSm 10X).

Sólo los sobrenadantes del cultivo de fase estacionaria de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (12, 16 y 24 h) provocaron que a las 48 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 la cantidad de CT se redujera considerablemente en relación con la lectura previa, de haber producido en promedio $2,431.26 \pm 405.10$ $\mu\text{g/mL}$ a las 36 h de cultivo, se cuantificaron $1,946.38 \pm 233.79$ $\mu\text{g/mL}$ a las 48 h.

Al igual que en las cinéticas de inhibición, los testigos negativos (MRS y MRSm) generaron un efecto similar al de los sobrenadantes de *P. acidilactici*. Sin embargo este aumento en la producción de CT fue mayor que cualquiera de los otros tratamientos, la máxima producción que los sobrenadantes produjeron en los cultivos de *P. aeruginosa* a las 48 h de cultivo fue de $3,236.58 \pm 317.74$ $\mu\text{g/mL}$ comparado con los $4,267.87 \pm 332.89$ $\mu\text{g/mL}$ del MRS y MRSm.

Después de realizar el análisis estadístico por medio de pruebas de Análisis de Varianza (ANOVA) y Pruebas de Tukey (Anexo 10, Cuadros 26, 27 y 28) se demostró que no existió una relación entre los tratamientos de los sobrenadantes de fase logarítmica o fase estacionaria ni entre los tiempos de cultivo de *P. aeruginosa* (24, 36 y 48 h), sin embargo entre los testigos negativos del MRS y MRSm no hubo diferencia estadística.

3.6.2. Efecto en la producción de ácidos urónicos

En la figura 42 se muestran los efectos de la adición de sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en la producción de Ácidos Urónicos (AU), de igual forma que los CT estos efectos se agruparon en los que son producidos por los sobrenadantes de fase logarítmica (A), fase estacionaria (B) y los testigos negativos MRS y MRSm (C).

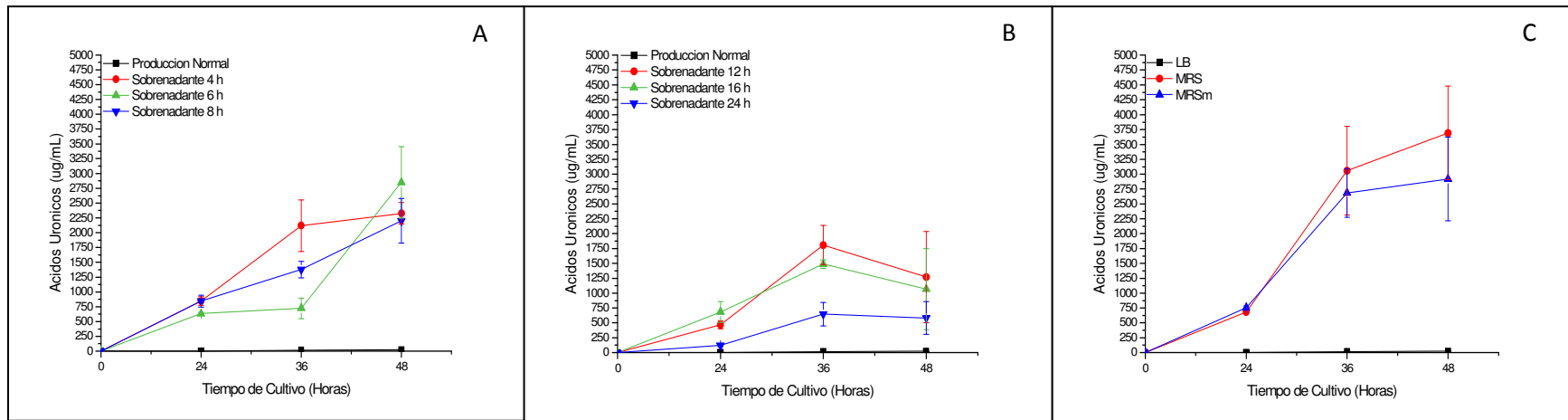


Figura 42. Producción de Ácidos Urónicos de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio LBf tratados con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. A) Producción con los sobrenadantes de fase logarítmica (10X) (4, 6 y 8 h); B) Producción con los sobrenadantes de fase estacionaria (10X) (12, 16 y 24 h); C) Producción con los testigos negativos (Medios sin inocular MRS y MRSm 10X).

En ella se observa que existió un efecto similar que el de los CT, incluso con los mismos efectos antes reportados, un aumento marcado de todos los tratamientos, una diferencia entre los cultivos con los sobrenadantes de la fase logarítmica y los de fase estacionaria y, el aumento marcado que provocaron los testigos negativos (MRS y MRSm).

El hecho de que los mismos fenómenos de los CT se presentaran en los AU se explica por la composición de los exopolisacáridos de *Pseudomonas aeruginosa* (Lembre *et al.*, 2012) como se demostró en la caracterización previamente hecha (Figura 40) se puede presumir que el efecto en la sobreproducción, disminución en los tratamientos de fase estacionaria no solo son en la totalidad de los carbohidratos producidos, sino que están directamente relacionados con la cantidad de Ácidos Urónicos contenidos en ellos.

Ante ello el primer pendiente a resolver era porque los sobrenadantes generaron una sobreproducción generalizada y dado que los testigos negativos de MRS y MRSm generaron un efecto similar se decidió utilizar las mismas soluciones concentradas (10X) de los ingredientes de estos medios de la misma manera que en las pruebas de difusión y cinéticas de inhibición para caracterizar su efecto en la producción de CT y AU.

Los resultados de estas cuantificaciones se observan en la Figura 43, en la que es evidente que todos los ingredientes del MRS y MRSm generaron un incremento en la producción de los exopolisacáridos y por lo tanto de los CT y AU, en todos los resultados la cantidad de ácidos urónicos fue menor a la cantidad de carbohidratos totales correspondiendo a los reportados previamente en este trabajo (Figura 40) y Lembre *et al.*, (2012).

Aunque la sacarosa fue la que generó un incremento mayor en la producción de CT y AU no se puede concluir que esta sea la responsable de la sobreproducción de exopolisacáridos en todos los tratamientos, esto a pesar de que la disponibilidad de carbohidratos favorece la producción de éstos, de hecho el propio medio Luria Bertani fortificado utilizado para su evaluación debe su fortificación a la adición de glucosa (Knezevic y Petrovic, 2008; De Klevit, 2009).

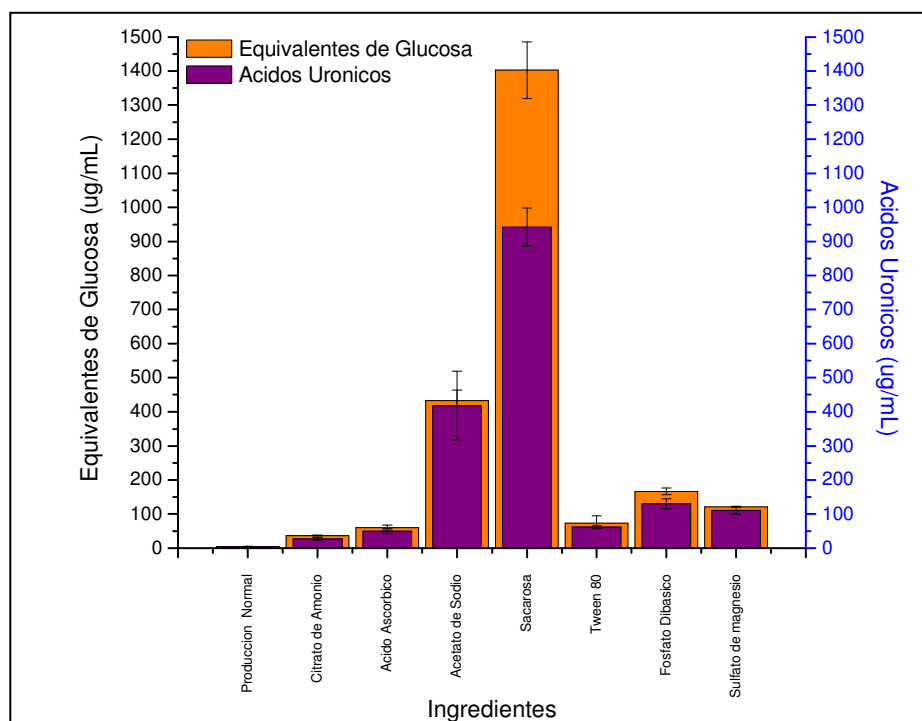


Figura 43. Producción de Ácidos Urónicos ($\mu\text{g/mL}$) y Carbohidratos Totales ($\mu\text{g/mL}$) de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tras 24 h de cultivo en medio LBF tratados con los ingredientes del medio MRS y MRSm.

La sacarosa (disacárido compuesto de alfa-glucopiranososa y beta-fructofuranosa) puede ser utilizada por *Pseudomonas aeruginosa* como fuente de carbono dentro de su metabolismo y como parte del inicio en la producción de exopolisacáridos al requerir Fructosa-6-fosfato (Lavery *et al.*, 2014), estudios recientes han descubierto que la matriz de exopolisacáridos de *Pseudomonas aeruginosa* no solo está compuesta de Alginato sino también del Pls y Pel polisacáridos (manosa, ramnosa y glucosa); cepas mucoides sobre productoras de exopolisacáridos están relacionadas con los operones *alg*, *psl* y *pel* (Overhage *et al.*, 2005; Ryder *et al.*, 2007; De Klevit, 2009; Franklin *et al.*, 2011; Colvin *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2012) (Figura 43).

Directamente no se puede relacionar la adición de algunos de los compuestos con el aumento en la producción de CT y AU, sin embargo no hay que olvidar que el Citrato de Amonio puede ser utilizado como fuente de carbono alternativa (Musk *et al.*, 2005).

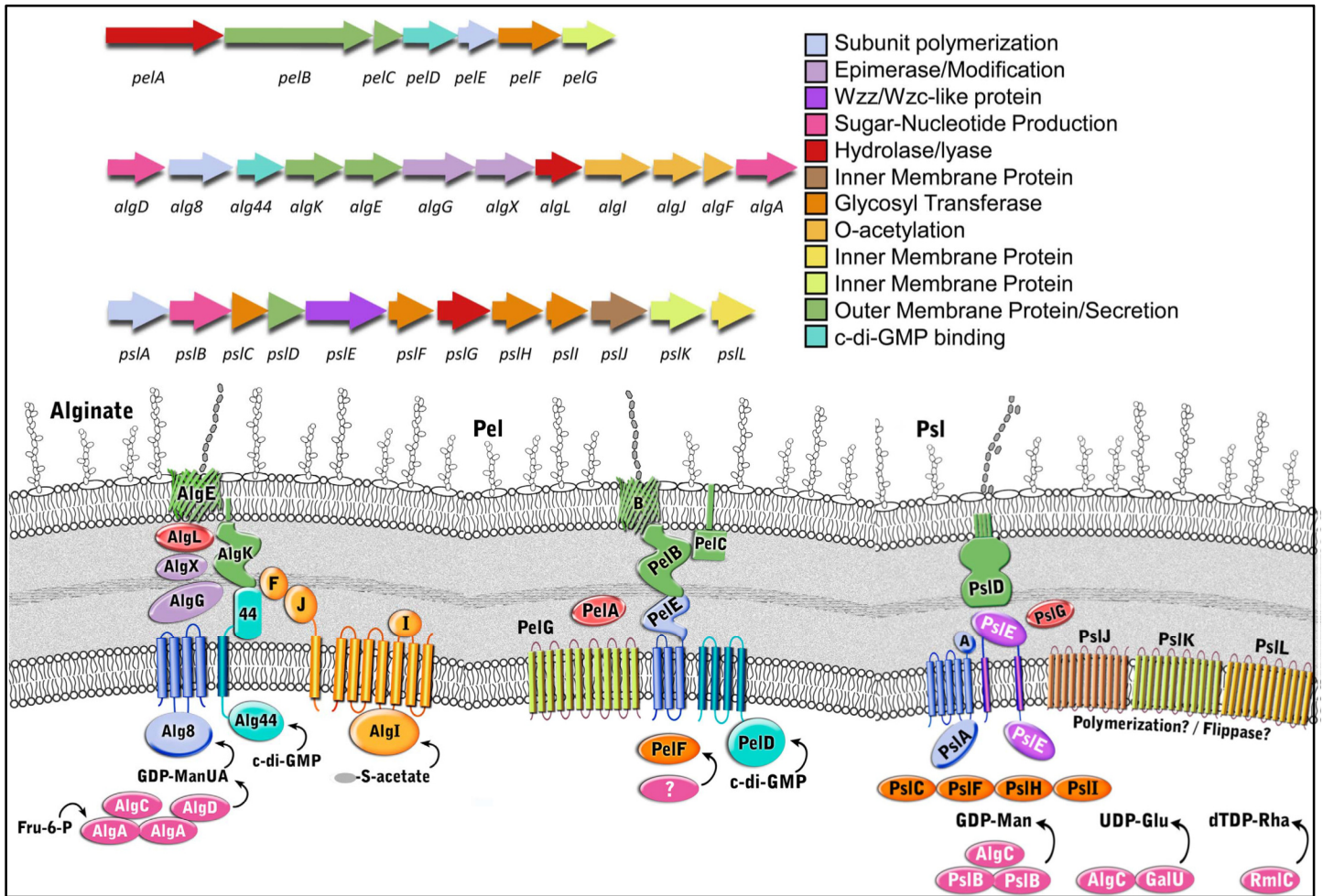


Figura 44. Operones *pel*, *alg* y *psl* y la estructura propuesta del complejo de biosíntesis del Alginato, Pel y Psl polisacáridos

Fuente: Franklin *et al.*, 2011

Por otro lado el Sulfato de Magnesio y el Fosfato Dipotásico que promueven en crecimiento de *P. aeruginosa*. favorecen la producción de piocianina y pioverdina respectivamente (Kokare *et al.*, 2009) tambien lo hacen con los exopolisacáridos al promover la activación de los sistemas *Quorum sensing* LasIR, RhlIR y PQS (Ryder *et al.*, 2007; De Klevit, 2009; Laverty *et al.*, 2014).

Sin embargo el Acetato de Sodio, el Ácido Ascórbico y el Tween 80 generaron un efecto inhibitor en el crecimiento de *P. aeruginosa* y han sido reportados como inhibidores de la producción de biopelículas (Toutain-Kidd *et al.*, 2009) la producción del exopolícarido PIs

puede promover una resistencia al Tween 80 (Zegans *et al.*, 2012) y por lo tanto aunque haya sido agregado al cultivo de *P. aeruginosa*, la producción de exopolisacáridos no se vio afectada y al contrario se vio promovida a través de un intento de resistencia (propiedad natural de las biopelículas) a estos ingredientes.

La combinación de la disponibilidad de carbohidratos, la promoción de los sistemas *Quorum sensing* y la resistencia natural a algunos de ellos hacen que la adición de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* y de MRS y MRSm pudieran provocar el aumento en los CT y AU producidos por *P. aeruginosa*.

Por último no hay que olvidar que la producción de CT y AU de los tratamientos con los sobrenadantes de la fase estacionaria de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 provocaron una disminución en su producción después de las 36 h donde la única posible explicación es la presencia de las proteínas líticas de las células de *P. aeruginosa* ATCC 9027 reportadas en este trabajo.

3.7. Efecto en la producción de Pigmentos

Para la evaluación en la producción de los pigmentos que puede producir *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 se emplearon métodos espectrofotométricos y medios de cultivo que promueven su producción (medios King “A” y “B”). En la figura 45 se muestra la producción de Píocianina y Píoverdina durante 72 h de cultivo, esta producción normal muestra que desde las primeras 12 h y hasta las 60 horas la producción de ambos pigmentos se mantiene estable pero a las 72 h esta producción se eleva considerablemente.

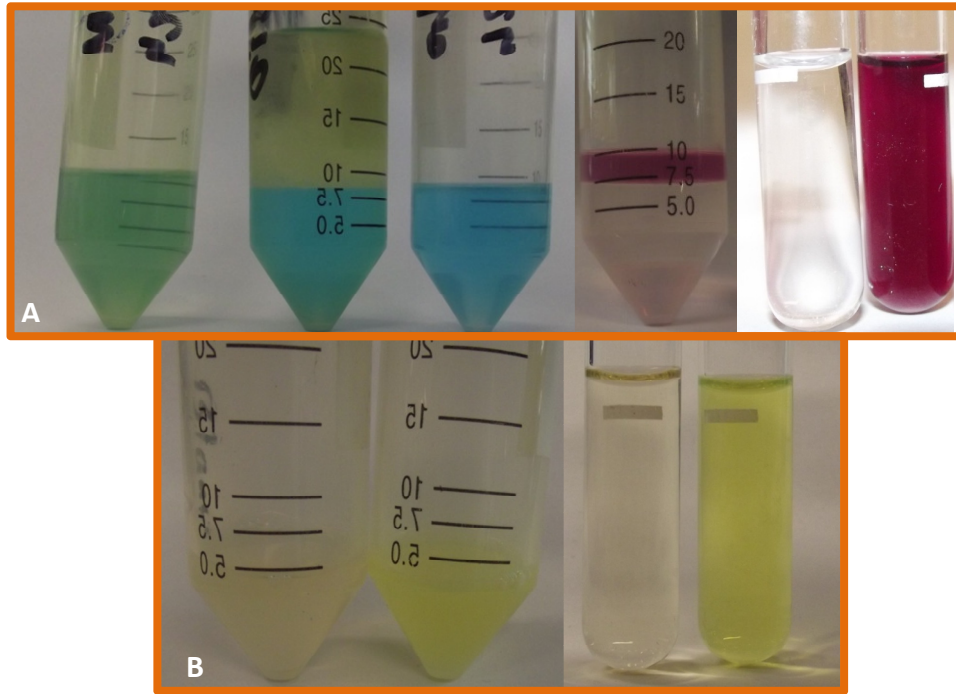


Figura 45. Cuantificación de pigmentos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. A) Cultivo de *P. aeruginosa* en medio King “A”, extracción de piocianina (azul) con cloroformo y Ácido Clorhídrico (Rojizo). B) Cultivo de *P. aeruginosa* en medio King “B” y obtención de la pioverdina por filtración (amarillo fluorescente).

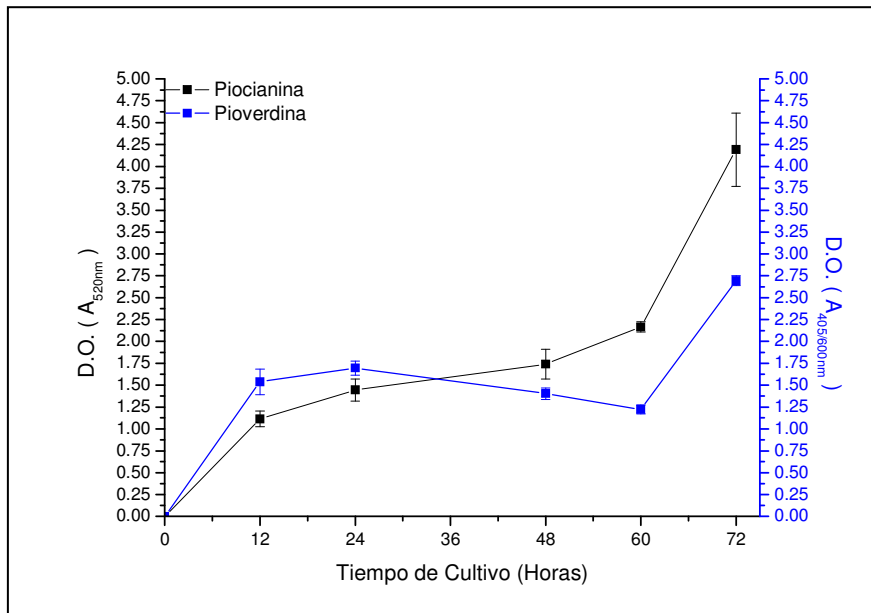


Figura 46. Producción de Piocianina y Pioverdina en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medios King “A” y King “B”.

3.7.1. Efecto en la producción de piocianina

En la Figura 47 se observan los efectos que los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 generaron en la producción de piocianina, estos efectos se agruparon al igual que en los otros casos en los que son producidos por los sobrenadantes de fase logarítmica (A), fase estacionaria (B) y los testigos negativos MRS y MRSm (C). En todos los casos la producción de piocianina se ve reducida drásticamente observando una leve recuperación después de las 48 h de cultivo. Como ejemplo a las 72 h de cultivo normal se obtuvo una lectura de 2.273 D.O. (A_{520nm}) al contrario de los sobrenadantes que tan solo fue de 0.244 D.O. (A_{520nm}) indicando una reducción promedio de hasta el 88.57% de la producción normal.

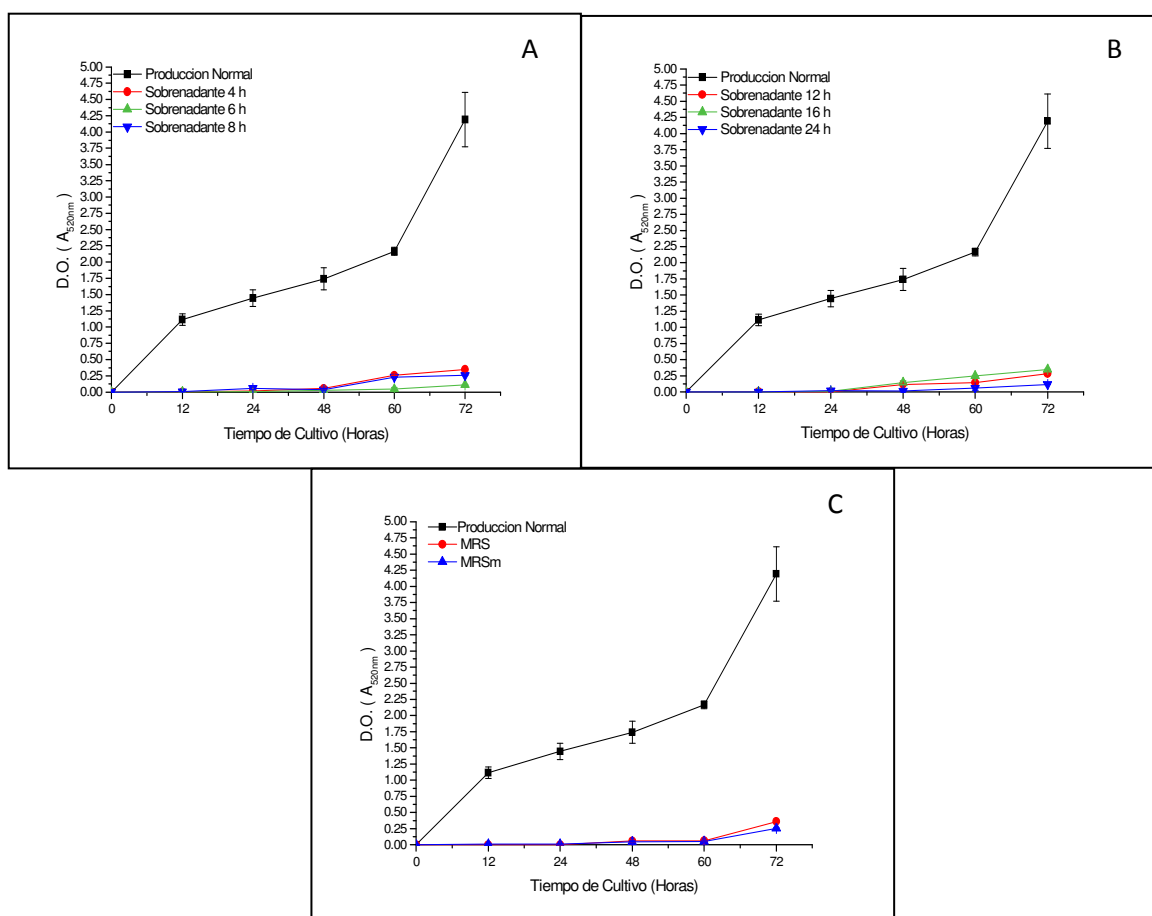


Figura 47. Producción de Piocianina de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9025 en medio King “A” tratados con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. A) Producción con los sobrenadantes de fase logarítmica (10X) (4, 6 y 8 h); B) Producción con los sobrenadantes de fase estacionaria (10X) (12, 16 y 24 h); C) Producción con los testigos negativos (Medios sin inocular MRS y MRSm 10X).

Dado que los testigos negativos MRS y MRSm generaron efectos similares a los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* se utilizaron las mismas soluciones concentradas (10X) de los ingredientes de estos medios de la misma manera que en las pruebas de difusión, cinéticas de inhibición y cuantificación de exopolisacáridos para caracterizar su efecto en la producción de piocianina. En la Figura 48 se muestran sus efectos.

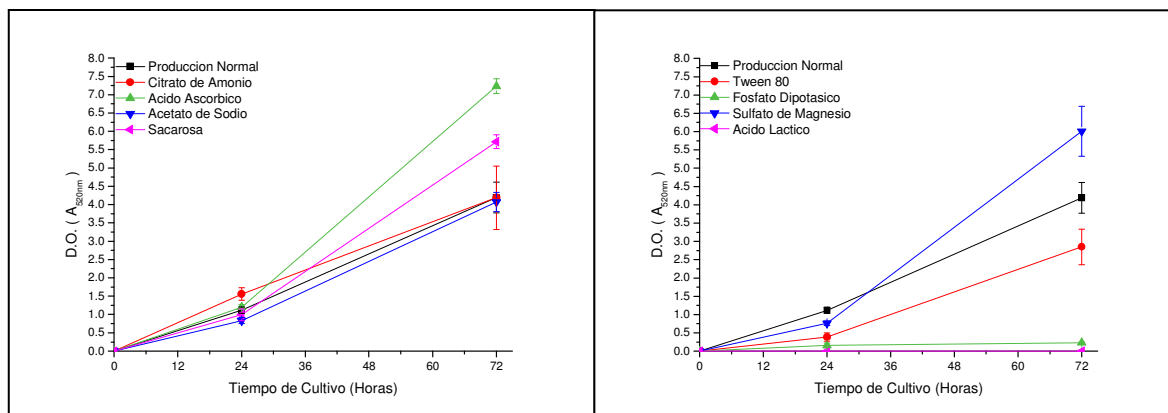


Figura 48. Producción de Piocianina de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9025 en medio King “A” tratados con los ingredientes de los medios MRS y MRSm.

Sorprendentemente el Ácido Ascórbico, la Sacarosa y el Sulfato de Magnesio provocaron un aumento en la producción de piocianina a las 72 h de cultivo. El Tween 80 desde las 24 h provocó una reducción en su producción pero el Fosfato Dipotásico la inhibió por completo.

La síntesis de la Piocianina se inicia con la utilización del Ácido Shikímico (proveniente del uso de fosfoenol-piruvato) para transformarlo en Ácido Chorismico y producir feniácinas (Mavrodri *et al.*, 2006 y Petrova *et al.*, 2012) esto puede explicar el aumento con la adición de Sacarosa (fuente de carbono); la disminución provocada por el Tween 80 podría explicarse por su efecto en la inhibición del crecimiento celular (cinéticas de crecimiento).

King *et al.*, (1954) demostraron que la adición de magnesio (cloruro) y la adición de Fosfato Dipotásico promovían la producción de Piocianina o Pioverdina respectivamente y que de forma inversa las inhibían, por lo que la adición del sulfato de magnesio pudo favorecer el aumento en la producción de Piocianina. Sin embargo y en este mismo sentido, el efecto producido por todos los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y los medios MRS y MRSm probablemente se deban a la presencia del Fosfato Dipotásico (inhibidor de

la producción de piocianina) y por lo tanto el efecto que pudieran producir las proteínas de los sobrenadantes no se pudo demostrar por la inhibición que este ingrediente generó en todos los análisis.

No hay que olvidar que la piocianina es considerada un señalador terminal del sistema *Quorum sensing* y que controlan la expresión de un *set* de genes denominados “estimulación PYO” como parte de la compleja red de señalización encargada de efecto redox que *Pseudomonas aeruginosa* pueda ejercer sobre otras células (Nadal-Jiménez *et al.*, 2012).

3.7.2. Efecto en la producción de pioverdina

En el caso de la evaluación de los efectos de los sobrenadantes de *P. acidilactici* ATCC 8042 sobre la producción de pioverdina de *Pseudomonas aeruginosa* se observan en la figura 49. Organizadas en los efectos producidos por los sobrenadantes de fase logarítmica (A), fase estacionaria (B) y testigos negativos (C).

Es importante resaltar que no se pudo evaluar la producción después de las 48 h debido a que en los cultivos se generó una especie de moco o sustancia gelatinosa que imposibilitaba la extracción de piocianina con cloroformo, este moco no se presenta de forma normal, lo que podría indicar que los sobrenadantes aparte de afectar la producción de pioverdina provocan la generación de exopolisacáridos en un medio en que normalmente no se producen. Lo que también aclararía porque los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* incrementaron drásticamente su producción (evaluación de exopolisacáridos).

Los datos mostrados son una relación entre la D.O. A_{405nm} de la pioverdina producida y la D.O. A_{600nm} del crecimiento celular, en la Figura 49 se puede observar un incremento en esta relación a las 12 h en todos los tratamientos de los sobrenadantes lo cual indica que en ese periodo de cultivo se produjo mucho más pioverdina por unidad celular (en promedio 32 veces más que lo normal), de las 24 h a las 48 h la proporción entre las densidades ópticas regresó a niveles casi idénticos a los normales.

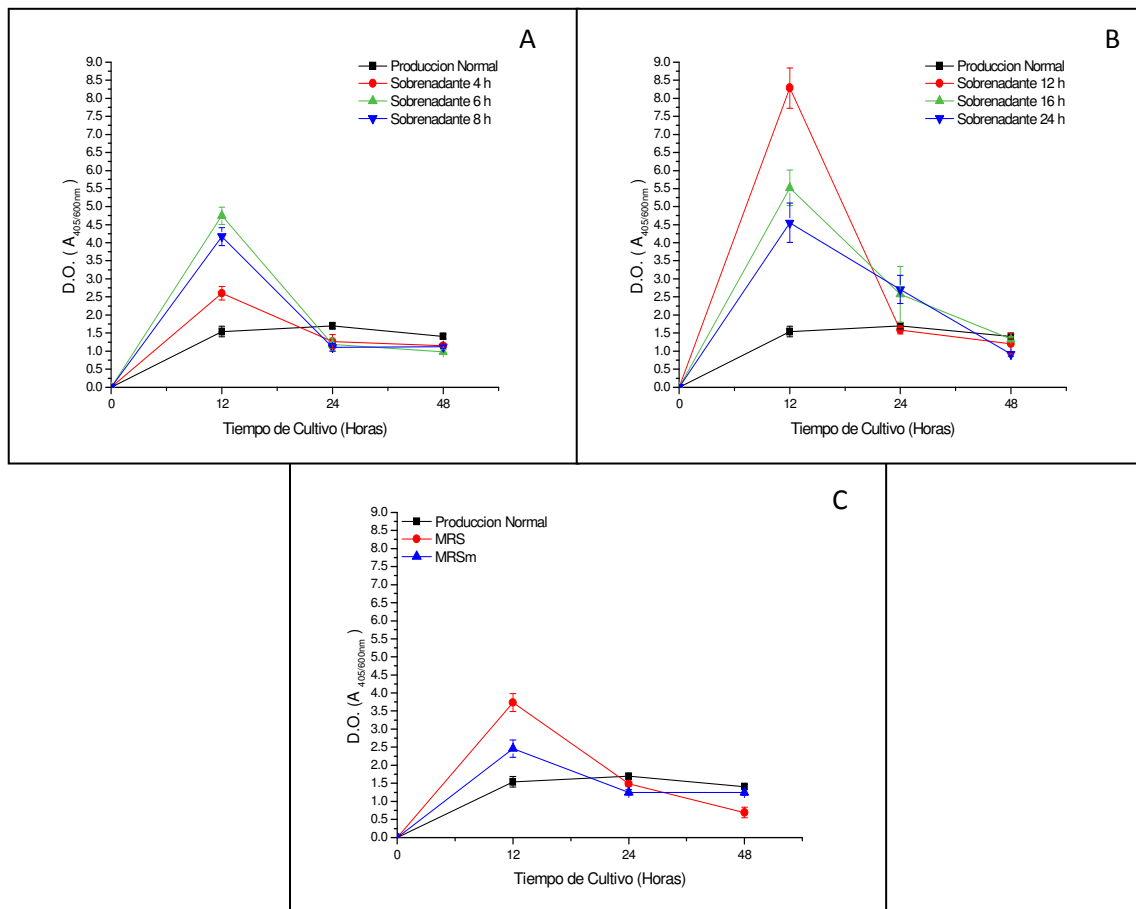


Figura 49. Producción de Pioverdina de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9025 en medio King “A” tratados con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. A) Producción con los sobrenadantes de fase logarítmica (10X) (4, 6 y 8 h); B) Producción con los sobrenadantes de fase estacionaria (10X) (12, 16 y 24 h); C) Producción con los testigos negativos (Medios sin inocular MRS y MRSm 10X).

En este caso si existió una diferencia estadística ($P > 0.05$) entre los tratamientos de los sobrenadantes de fase logarítmica, estacionaria y los testigos negativos, aunque estos últimos generaron también un aumento en la proporción a las 12 h, por esto, también se evaluó el efecto de los ingredientes de los medios MRS y MRSm en la producción de pioverdina observando los siguientes resultados (Figura 50).

Después del análisis estadístico se estableció que ninguno de los ingredientes favoreció de manera significativa el aumento en la producción de pioverdina a las 12 h de cultivo, al contrario, la Sacarosa y el Tween 80 provocaron una disminución generalizada desde las 12 h hasta las 24 h. Se puede suponer que la combinación de los ingredientes del MRS y/o MRSm de alguna manera generaron un incremento en esta relación a las 12 h de cultivo

pudiendo hablarse de un estrés medioambiental ante el cuál las *Pseudomonas aeruginosa* utilizan a la pioverdina para propiciarse un mayor crecimiento y de una forma más rápida bajo el concepto de quelador de hierro en medios donde se tiene pocas concentraciones (Cox y Adams, 1985).

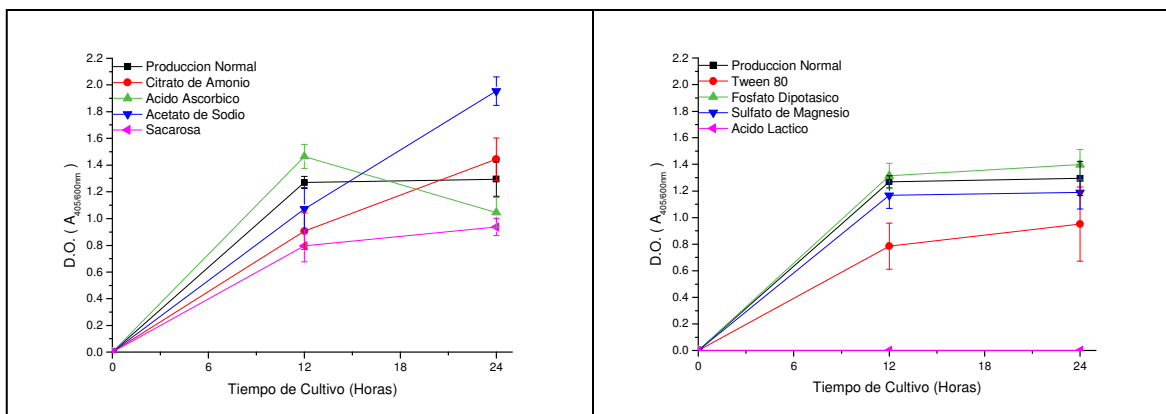


Figura 50. Producción de Pioverdina de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9025 en medio King “A” tratados con los ingredientes de los medios MRS y MRSm.

Sin embargo el simple efecto de los ingredientes (Testigos negativos, C, Figura 49) no sería suficiente para generar lo observado con los sobrenadantes (A y B, Figura 49) y por lo tanto es posible que las proteínas presentes en ellos sí lo hayan hecho. Observando que los sobrenadantes de fase estacionaria (con proteínas líticas de células de *P. aeruginosa*) provocaron un incremento mayor en comparación con los de fase logarítmica se presume que *P. aeruginosa* requirió incrementar la producción de pioverdina como mecanismo de defensa tal y como ocurriera en una infección oportunista en donde la producción de este factor de virulencia le permite realizar un infección inicial y favorecer su multiplicación para poder establecer el *quorum sensing* necesario para promover otros factores de virulencia como las biopelículas (observado con la producción del moco después de las 24 h) (Nguyen *et al.*, 2014).

4. Conclusiones.

En el presente trabajo se caracterizaron los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en medio MRSm, en sus diferentes etapas de crecimiento, en términos de concentración de proteínas, perfil electroforético y zimogramas de actividad para identificar la respuesta de la adición de estos en algunos factores de virulencia, producción de exopolisacáridos, piocianina y pioverdina por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 obteniéndose las siguientes conclusiones:

1. Al cultivar *P. acidilactici* ATCC 8042 en medio MRSm se obtuvieron los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de las fases logarítmicas y estacionarias (temprana, media y tardía) con concentraciones de proteínas, masas moleculares relativas y número de bandas distintas en cada fase.
2. *P. acidilactici* ATCC 8042 produce en todos los sobrenadantes evaluados actividad de Péptidoglicano Hidrolasas (PGH) a 115.6 ± 0.5 , 110.3 ± 0.7 y 61.1 ± 0.7 kDa, así como un bandeo secundario poco definido (entre los 110 y 61 kDa) sobre *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698. La banda lítica de 61.1 ± 0.7 kDa no había sido reportada.
3. **Sólo en los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de fase estacionaria** se pudieron observar dos proteínas de 20.9 ± 0.3 y 17.4 ± 0.3 kDa con **efecto lítico** sobre células de *Pseudomonas aeruginosa* que no habían sido reportadas.
4. Todos los sobrenadantes del cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 aumentaron la fase lag de **4 a 8 h**, aunque a las 24 h de cultivo se obtuvieron crecimientos en UFC/mL sin diferencia estadística ($p < 0.05$).
5. El efecto de los sobrenadantes del cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 sobre la producción de carbohidratos totales (CT) y ácidos urónicos (AU) fue la de elevar su producción en todos los tiempos de cultivo de *P. aeruginosa* ATCC 9027, en el control, de 36.51 ± 4.86 $\mu\text{g/mL}$ de equivalentes de glucosa, y 22.28 ± 5.5 $\mu\text{g/mL}$ de ácidos urónicos a las 48 h de cultivo, estos se elevaron hasta $3,934.61 \pm 251.62$ $\mu\text{g/mL}$ y $3,656.43 \pm 187.6$ $\mu\text{g/mL}$ (107 y 164 veces más) respectivamente, sin embargo sólo los sobrenadantes de fase estacionaria provocaron que a las 48 h de cultivo la cantidad de CT y AU se redujera considerablemente en relación con la lectura de las 36 h, esto asociado a la presencia de las proteínas líticas de *P. aeruginosa* observadas en los zimogramas.

6. Todos los sobrenadantes del cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 tuvieron un efecto reductor en la producción de pirocianina de hasta el **88.57%** de la producción en el control.
7. En cuanto al efecto en la producción de pioverdina, se observó que todos los sobrenadantes del cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 provocaron a las 12 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 un incremento en la producción de pioverdina de hasta 32 veces en términos de absorbancia $A_{405/600\text{nm}}$. Aunque los sobrenadantes de fase estacionaria provocaron una mayor producción que los demás ($P > 0.05$)

5. Literatura Citada

1. Kleurstofen, A., T. (1942). Pyoverdinen de groene fluorescende van *Pseudomonas fluorescens*. En B. A. 16, *Thesis* (pág. 16578). University of Amsterdam.
2. Alakomi, H.-L., Skyttä, E., Saarela, M., Matilla-Sandholm, T., Latva-Kala, K., y Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2001-2005.
3. Albrecht-Gary, A.-M., Blanc, S., Rochel, N., Ocacktan, A. Z., y Abdallah, M. A. (1994). Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorganic Chemistry*, 33, 6391-6402.
4. Alm, E., Oerther, D., Larsen, N., Sthal, D., y Raskin, L. (1996). The oligonucleotide probe database. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 3557-3559.
5. Arnaut-Rollier, I., De Zutter, L., y Van Hoof, J. (1999). Identities of the *Pseudomonas* spp. in flora from chilled chicken. *International Journal of Food Microbiology*, 48, 87-96.
6. Atlas, R. M., y Snyder, J. W. (2006). *Handbook of media for clinical microbiology* (2nd ed.). (T. a. Group, Ed.) USA: CRC Press.
7. Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. S. Salminen, y A. Von Wrigth (Edits.), *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (pp. 1-72). New York: Marcel Dekker.
8. Babic, F., Venturi, V., y Maravic-Vlahovicek, G. (2010). Tobramycin at subinhibitory concentration inhibits the RhIR *quorum sensing* system in *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolate. *BMC Infectious Diseases*, 148(10), 12.
9. Beckton and Dickinson Company. (Octubre de 2006). BD Bionutrients TM Technical Manual. Advanced Bioprocessing. 3rd edition. USA.
10. Bhunia, A. K., Jhonson, M. C., y Ray, B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65(4), 261-268.
11. Bibek, R., y Daeschel, M. (1992). *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. *International Standards Boock*. UK: CRC Press.
12. BIO-RAD. (2013). *Mini Protean-Tetra Cell*. Recuperado el 2 de Mayo de 2013, de <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296.PDF>

13. Borch, E., Kant-Muermans, M.-L., y Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 103-120.
14. Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* (72), 248-254.
15. Brook, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. (2003). *Biología de los Microorganismos*. USA: Pearson Prentice Hall.
16. Brummer, Y., y W. Cui, S. (2005). Understanding carbohydrate analysis. *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications*. USA: Taylor y Francis Group. LLC.
17. Burton, M. O., Campbell, J. J., y Eagles, B. A. (1948). The mineral requirements for pyocyanin production. *Canadian Journal of Research*, , 1(26c), 15-22.
18. Calda-Arias, L. (2011). *Guía para la Tinción de Gram*. (Universidad del Valle del Cauca, Facultad de Ciencias en la Salud, Medicina y Enfermería IV Semestre) Recuperado el 6 de Diciembre de 2012, de http://www.facultadsalud.unicauca.edu.co/Documentos2010/DptoMedInt/Tencion_de_gram.pdf
19. Camiade, E., Peltier, J., Bourgeois, I., Couture-Tosi, E., Courtin, P., Antunes, A., Pons, J.-L. (2010). Characterization of Acp, a peptidoglycan hydrolase of *Clostridium perfringens* with N-Acetylglucosaminidase activity that is implicated in cell separation and stress-induced autolysis. *Journal of Bacteriology*, 192(9), 2373-2384.
20. Carr, F., Chill, D., y Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281-370.
21. Cesaratti, M., Luppi, E., Maccari, F., y Volpi, N. (2003). A 96 well assay for uronic acid carbzole reaction. *Carbohydrate Polymers*, 54, 56-61.
22. Chavant, P., Gaillard Martinie, B., Talon, R., Hébraud, M., y Bernerdi, T. (2007). A new device for rapid avaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 605-612.
23. Chen, H., y Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 82-100.
24. Chen-Wei, W., Li-Jung, Y., y Shann-Tzong, J. (2004). Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural anf Food Chemistry*, 52, 1146-1151.

25. Chi-Zang, Y., Yam, K. L., y Chikindas, M. L. (2004). Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 15-22.
26. Chemielewsky, R. A., y Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 22-32.
27. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Jounger, J. J., Baddour, L. M., Barret, F. F., Melton, D. M., y Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue cultures plates: quantitative model for the adherence of staphylococci to medical device. *Journal of Clinical Microbiology*, 22, 996-1006.
28. Cibik, R., y Chapot-Chartier, M. P. (2004). Characterization of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 459-463.
29. CIE Commission Internationale de L'Eclairage. (2004). *Technical Report. Colorimetry. 3rd Edition*. (C. C. L'Eclairage, Productor) Recuperado el 4 de Diciembre de 2012, de http://cie.mogi.bme.hu/cie_arch/kee/div1/tc148.pdf
30. CIE. L'Eclairage, Commission Internationale de. (2007). *Colorimetry. Understanding the CIE system*. (J. Schanda, Ed.) USA: John Wiley y Sons, Inc.
31. Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F., y Hernández, P. E. (2011). Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. (T. P. Inc., Ed.) *Food Science and Technology International*, 7(4), 281-305.
32. Colvin, K. M., Irie, Y., Tart, C., Urbano, R., Whitney, J. C., Ryder, C., Parsek, M. R. (2012). The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environmental Microbiology*, 14(8), 1-26.
33. CONDA-Ponadisa. (s.f.). *King A medium (Pseudomonas P agar) USP*. Recuperado el 9 de Diciembre de 2012, de <http://www.condalab.com/pdf/1531.pdf>
34. CONDA-Pronadisa. (2012). *King B medium (Pseudomonas F agar) USP*. Recuperado el 10 de Diciembre de 2012, de <http://www.condalab.com/pdf/1532.pdf>
35. Cornellis, P. (2008). *Pseudomonas. Genomic and molecular biology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press. pp. 175-198.
36. Corporate, bioMérieux. (6 de Diciembre de 2012). *bioMérieux Clinical Diagnostics website*. Recuperado el 6 de Diciembre de 2012, de http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?open=CNL_CLN_PRDydoc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_11yparams.sform=9ylang=en

37. Cotter, P. D., Ross, R. P., y Hill, C. (2013). Bacteriocins: a viable alternative? *Nature Reviews. Microbiology.*, 11, 95-105.
38. Cotter, P., Hill, C., y Ross, P. (2005). Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777-788.
39. Cox, C. D., y Adams, P. (1985). Siderophore Activity of Pyoverdinin for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection And Immunity*, 48(1), 130-138.
40. Cunningham, A. B., Lennox, J. E., y Ross, R. J. (2010). *Chapter 1. Introductions to biofilms*. Recuperado el 5 de Diciembre de 2012, de Section 6 What are their characteristics? : <http://www.hypertextbookshop.com/biofilmbook/v004/r003/contents/chapters/chapter001/section006/green/page003.html>
41. Davies, D. G., Chakrabarty, A. M., y Geesey, G. G. (1993). Exopolisaccharide Production in Biofilms: Substratum Activation of Alginate Gene Expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(4), 1181-1186.
42. De Kievit, T. R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., y Iglewski, B. H. (2001). *Quorum-Sensing* genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Their role and expression patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1865-1873.
43. De Kievit, T. R. (2009). *Quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 11(2), 279-288.
44. De Vuyst, L. (1995). Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. *Journal of Applied Bacteriology*, 28, 28-35.
45. Dietrich, L. E., Price-Whelan, A., Petersen, A., y Newman, D. K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 61(5), 1308-1321.
46. Dizche, Z., Whistler, R. L., y Wolfrom, L. M. (1962). Color reactions of hexoses. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. pp. 45-96.
47. Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., y E. Nychas, G.-J. (2012). Spoilage microbiota associated to storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 130-141.
48. Doyle, M. (2007). Microbial food spoilage: Losses and control strategies. A brief review of the literature. *Fri Briefings*, pp. 1-16.

49. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., y Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3).
50. E. Nychas, G.-J., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., y Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78, 77-89.
51. Ercolioni, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., y Villani, F. (2006). Change in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 4663-4671.
52. Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., y Crawford, I. P. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 884-900.
53. FAO. (2007). *Manual de buenas prácticas para la industria de la carne*. Roma: FAO.
54. Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T., y Howell, P. L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1-16.
55. García Cano, I., Velasco Perez, L., Rodriguez Sanoja, R., Sánchez, S., Mendoza Hernández, G., Llorente Bousquets, A., y Farréz, A. (2011). Detection, cellular localization and antibacterial activity two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 607-615.
56. Garrod, L. P., y Waterworth, P. M. (1969). Effect of medium composition on the apparent sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to gentamicin. *Journal of Clinical Pathology*, 5(22), 534-538.
57. Golovlev, E. L. (2002). The mechanism of formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a type of structured population. *Microbiology*, 71 (3), 249-254.
58. Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J., Christensen, A., y Givskov, M. (2002). Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 79-97.
59. Granados Pérez, E. A. (2009). Caracterización de la actividad proteolítica extracelular de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. En *Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas*. Mexico, D.F.: Facultad de Ciencias, UNAM.
60. Hernández Castillo, O. A. (2012). Efecto antagónico de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre una cepa de *Escherichia coli* O157:H7. En *Tesis de Maestría*. Cuautitlán Izcalli: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

61. Hernández Olvera, J. (2005). Espectro antimicrobiano de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 . En *Tesis de Licenciatura*. México, D.F.: Facultad de Ciencias, UNAM.
62. Hisham A., A., Fathy M., S., y Eman M., E.-M. (2012). Combating *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by potential biofilm inhibitors. *Asian J. Res. Pharm. Sci.*, 2(2), 66-72.
63. Holzapfel, W. H., Franz, C. M., Ludwig, W., Back, W., y Dicks, L. M. (2006). The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. *Prokaryotes*, 4, 229-266.
64. Hoover. (1993). Bacteriocins with potencial use in foods. En P. Davidson, y L. B.A. (Edits.), *Antimicrobials in foods* (1st ed.). New York, USA: Marcel Dekker Inc.
65. Huard, C., Miranda, G., Redko, Y., Wessner, F., Foster, S. J., y Chapot-Chartier, M.-P. (2004). Analysis of the Peptidoglycan Hydrolase complement of *Lactococcus lactis*: identification of a third N-Acetylglucosaminidase, AcmC. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3493-3499.
66. Hugenholtz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 165-178.
67. Ibrahim Sallam, K. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, 5(18), 566-575.
68. Jacques, P., Ongena, M., Bernard, F., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., y Thonart, P. (2003). Fluorescent *Pseudomonas* mainly produce the dihydroform of pyoverdine at specific growth rate. *Letters in Applied Microbiology*(36), 259-262.
69. Jamuna Bai, A., y Ravishankar Rai, V. (2011). Bacterial *Quorum Sensing* and food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 184-194.
70. Jiang, L., He, L., y Fountoulakis, M. (2004). Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography*, 1023, 317-320.
71. Kasher, N., Behzadian-Nejad, Q., Najari-Peerayeh, S., Mousavi-Hosseini, K., Moazzeni, M., y Esmaeeli, S. G. (Julio de 2006). Synthesis and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-tetanus toxoid conjugate. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 1441-1446.
72. Kennamer, G., Bricks, B., Georgia, A., y Jim, F. (2012). *Comprensión y control del color: Manteniendo la imagen de sus productos*. (K. Minolta, Productor) Recuperado el 4 de Diciembre de 2012, de http://sensing.konicaminolta.com.mx/wp-content/uploads/2011/05/clemsonbrick_Brochure02.pdf

73. King E.O., W. M. (1954). Two simple media for demonstration of pyocyanin and flourescein. *Laboratory and Clinical Medicine*, 44, 301-307.
74. Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), 39-85.
75. Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., y Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 103-125.
76. Knezevic, P., y Petrovic, O. (2008). A Colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of Microbiological Methods*, 74, 114-118.
77. Kokare, C. R., Chakraborty, S., Khopade, A. N., y Mahadik, K. R. (2009). Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 159-168.
78. Kong, K.-F., Jayawardena, S. R., Indulkar, S. D., Puerto, A. d., Koh, C.-l., Höibi, N., y Mathee, K. (Noviembre de 2005). *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB B-Lactamases, proteases, *Quorum Sensing*, and other virulence factors. *Antimicrobial Agents and Chemeotherapy*, 49(11), 4567-4575.
79. Kurachi, M. (1958). Studies on the biosynthesis of pyocianine. (II). *Bulletin of the Institute of Chemistry and Res.*, 36, 174-187.
80. Laux, D. C., Corson, J. M., Givscov, M., Hentzer, M., Müller, A., Goldberg, J. B., y Cohen, P. S. (2002). Lysophatidic acid inhibition of the accumulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 alginate, pyoverdine, elastase and LasA. *Microbiology*, 178, 1709-1723.
81. Laverty, G., Gorman, S. P., y Gilmore, B. F. (2014). Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. *Pathogens*, (3), 596-632.
82. Lecler, D., y Asselin, A. (1989). Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamid gel electrophoresis. *Canadian Journal Of Microbiology*, 35, 749-753.
83. Lembre, P., Lorentz, C., y Di Martino, P. (2012). Exopolisaccharides of the biofilm matrix:A complex biophysical world. En *The Complex World of Polysaccharydes* (pp. 371-392). Intech.
84. Leung, B. (2014). *Interpreting Plates*. Recuperado el 2014 de Enero de 1, de Science Buddies: http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project_ideas/MicroBio_Interpreting_Plates.shtml

85. Lewus, C. B., y Montville. (1991). Detection of bacteriocins produced by acid lactic bacteria. *Journal of Microbiologic Method*, 13, 145-150.
86. Llorente Bousquets, A. (1998). Evaluación de la producción de bacteriocinas de *Pediococcus acidilactici* bajo diferentes condiciones de cultivo. En *Tesis de Maestría en Microbiología*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
87. Llorente Bousquets, A. (2008). Caracterización de la actividad antibacteriana de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. En *Tesis de Doctorado*. Mexico D.F.: Facultad de Ciencias, UNAM.
88. Llorente Bousquets, A., Pérez Munguía, S., y Farrés, A. (2008). Novel extracellular proteolytic activity in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Canadian Journal of Microbiology*, 54, 694-699.
89. Lortal, S., y Chapot-Chartier, M. P. (2005). Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*, 15, 857-871.
90. Lortal, S., Valence, F., Bizet, C., y Maubois, J. L. (1997). Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification: application to 10 Lactobacillus species. *Research in Microbiology*, 148, 461-474.
91. Lujan, A. M., Moyano, A. J., Segura, I., Argaraña, C. E., y Smania, A. M. (2007). Quorum-sensing-deficient (lasR) mutants emerge at high frequency from *Pseudomonas aeruginosa* mutS strain. *Microbiology*, 153, 225-237.
92. Ma, L., Wang, J., Wang, S., Anderson, E. M., Lam, J. S., Parsek, M. R., y Wozniak, D. J. (2012). Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated. *Environmental Microbiology*, 14(8), 1995-2005.
93. Magnusson, J. (2003). Antifungal activity of lactic acid bacteria. En *Ph.D. dissertation*. (pp. 3-10). Swedish University of Agricultural Sciences.
94. Martínez Trejo, M. C. (2011). Evaluación *in vitro* de la Actividad Antibacteriana del Sobrendante de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. En *Tesis de Maestría*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
95. Masson. (1995). *Microbiología y parasitología médica*. España: Salvat.
96. Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. I., y Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*(339), 69-72.

97. Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G., y Tomashow, L. S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboximide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6454-6465.
98. Mavrodi, D. V., Peever, T. L., Mavrodi, O. V., Parejko, J. A., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., Tomashow, L. S. (2010). Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3), 866-879.
99. Mavrodri, D. V., Blankenfeldt, W., y Thomashow, L. S. (2006). Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol*, 44, 417-445.
100. May, T. B., y Chakrabarty, A. M. (1994). Isolation and assay of *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *Methods in Enzymology*, 235, 295-304.
101. McMorran, B. J., Kumara, S. H., Sullivan, K., y Lamont, I. L. (2001). Involment of transformylase enzyme in siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 147, 1517-1524.
102. Mojica, K., Elsey, D., y Cooney, M. J. (2007). Quantitative analysis of biofilm EPS uronic content. *Journal of Microbiological Methods*, 71, 61-65.
103. Mora, D., Gracia Fortina, M., Parino, C., y Luigi Manachini, P. (1997). Identification of *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* based on 16S rRNA and IdhD gene-targeted multiplex PCR analysis. *FEMS Microbiology Letters*(151), 231-236.
104. Mora, D., Musacchio, F., Fortina, M. G., Senini, L., y Manachini, P. L. (2003). Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 561-570.
105. Munguia Villavicencio, P. M. (2012). Evaluación de la actividad antagónica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en la expresión de los factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. En *Tesis de Mestría en Ciencias*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, UNAM.
106. Musk, D. J., Banko, D. A., y Hergenrother, P. J. (2005). Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry y Biology*, 12, 789-796.
107. Nadal-Jiménez, P., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., y Quax, W. J. (2012). The multiple signaling system regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), 46-65.

108. NCCLS. (2005). *Manual of antimicrobial susceptibility testing*. USA: American Society of Microbiology.
109. Nguyen, A. T., O'Neill, M. J., Watts, A. M., Robson, C. L., Lamont, I. L., Wilks, A., y Oglesby-Sherrouse, A. G. (2014). Adaptation of iron homeostasis pathways by a *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine mutant in the cystic fibrosis lung. *Journal of Bacteriology*, 196(12), 2265-2276.
110. NOM-009-ZOO-1994. (31 de Julio de 2007). *Proceso Sanitario de la Carne*. Diario Oficial de la Federación.
111. NOM-110-SSA1-1994. (16 de Agosto de 1995). *Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico*. Diario Oficial de la Federación.
112. O'Toole, G. A., y Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449-461.
113. Overhage, J., Schemionek, M., Webb, J. S., y Rhem, B. H. (2005). Expression of the psl Operon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilms: PslA performs an essential function in biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 71, 4407-4413.
114. Parish, M., y Davidson, P. (1993). Method for evaluation. En P. Davidson, *Antimicrobials in Foods* (1st ed.). New York: Marcel Dekker.
115. Peeters, E., Nelis, H. J., y Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grow in microtiter plates. *Jornal of Microbiological Methods*, 72, 157-165.
116. Petrova, O. E., Schurr, J. R., Schurr, M. J., y Sauer, K. (2012). Microcolony formation by the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* requires pyruvate and pyruvate fermentation. *Molecular Microbiology*, 86(4), 819-835.
117. Pichardo Reyes, E. A., Bale, M. J., Cannon, W. H., y Matsen, J. M. (1981). identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocyanin production on Tech agar. *Journal of Clinical Microbiology*, 13(3), 466-458.
118. Piddock, L. J. (1990). Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*(68), 307-318.
119. Pitts, B., Hamilton, M. A., Zelter, N., y Stewart, P. S. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiology Methods*(54), 269-276.

120. Plata Stapper, A., Narashimhan, G., Ohman, D. E., Barakat, J., Hentzer, M., Molin, S., y Mathee, K. (2004). Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 679-690.
121. Rachid, D., y Ahmed, B. (Julio de 2005). Effect of iron and growth inhibitors of siderophore production by *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology*, 4(7), 697-702.
122. Ralli, P. (2005). Impaired virulence factor production in a dihydroorotate dehydrogenase mutant (pyrD) of *Pseudomonas aeruginosa*. En *Dissertation Prepared for the Degree of Doctor of Philosophy*. University of North Texas.
123. Ramírez, G. R., Luna, M. B., Camacho, C. A., Tsuzuky, R. G., Viena, G., Velázquez, M., y Mejía, A. (2006). *Manual de prácticas de microbiología general*. Mexico D.F.: Facultad de Química UNAM.
124. Rawal, B. (1978). Bactericidal action of ascorbic acid on *Pseudomonas aeruginosa*: alteration of cell surface as a possible mechanism. *Chemotherapy*, 24(3), 166-171.
125. Rivera Quiróz, J. (2004). Evaluación del efecto de bioconservación en salami al adicionar *Pediococcus acidilactici* como cultivo iniciador. En *Tesis de Maestría en Microbiología*. Cuautitlán Izcalli, Edo. México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
126. Ryder, C., Byrd, M., y Wozniak, D. J. (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion in Microbiology* (10), 644-648.
127. Salminen, S., Von Wrigth, A., y Ouwehand, A. (2004). *Lactic acid bacteria. Microbiological and Functional Aspects* (3rd ed.). USA: Marcel Dekker Inc.
128. Sigma-Aldrich. (2012). *17208 Pseudomonas Isolation Agar*. Recuperado el 10 de Diciembre de 2012, de <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Fluka/Datasheet/17208dat.pdf>
129. Sigma-Aldrich. (2012). *P1852 Pseudomonas agar (for fluorescein)*. Recuperado el 10 de Diciembre de 2012, de <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/4/p1852dat.pdf>
130. Sigma-Aldrich Co. LLC. (2012). Pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. Recuperado el 4 de Diciembre de 2012, de Product Information: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/9/p0046dat.Par.0001.File.tmp/p0046dat.pdf>

131. Sigma-Aldrich Co. LLC. (2012). Pyoverdines from *Pseudomona fluorescens*. Recuperado el 4 de Diciembre de 2012, de Product Information: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/5/p8124dat.Par.0001.File.tmp/p8124dat.pdf>
132. Soberon, G. (2001). *Microbios en linea*. (E. Martínez Romero, J. C. Martínez Romero, Editores, C. d. UNAM, Productor, y CPD-DGSCA) Recuperado el 4 de Diciembre de 2012, de Capítulo 3. *Pseudomonas aeruginosa*: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3/>
133. Spilker, T., Conenye, T., Vandamme, P., y LiPuma, J. J. (Mayo de 2008). PCR-Base assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2074-2079.
134. SRL-Forum. (2012). *SRL-Forum*. Recuperado el 4 de Diciembre de 2012, de <http://villavu.com/forum/showthread.php?t=74908>
135. Stepanovic, S., Vokovic, D., Savic, B., y Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* (40), 175-179.
136. Stintzi, A., Evans, K., Meyer, J. M., y Poole, K. (1998). *Quorum-sensing* and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: lasR/lasI mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*(166), 341-345.
137. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., y Costerton, W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews of Microbiology*, 56, 187-209.
138. Szweda, P., Schielmann, M., Kotlowski, R., Gorczyca, G., Zalewska, M., y Milewski, S. (2012). Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 96, 1157-1174.
139. Taylor, K. A., y Buchanan-Smith, J. G. (1992). A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and specific assay for galacturonic acid. *Analytical Biochemistry*(201), 190-196.
140. Toutain, C. M., Caiazza, N. C., y O'Toole, G. A. (2004). Molecular basis of biofilm development by *Pseudomonas*. En M. Gannoum, y G. A. O'Toole (Edits.), *Microbial Biofilms* (pp. 43-63). Washington, USA: ASM Press.
141. Toutain-Kidd, C. M., Kadivar, S. C., Bramante, C. T., Bobin, S. A., y Zegans, M. E. (2009). Polysorbate 80 inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its

- cleavage by the secreted lipase LipA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(1), 136-145.
142. University of Sheffiel. (2013). *Department of molecular biology and biotechnology*. Recuperado el 15 de Diciembre de 2013, de Molecular Microbiology: <http://www.shef.ac.uk/mbb/staff/smesnaga>
143. Valence, F., y Lortal, S. (Septiembre de 1995). Zymogram and preliminary characterization of *Lactobacillus helveticus* autolysins. *Applied Environmental Microbiology*, 61(9), 3391-3399.
144. Velazco Pérez, L. Y. (2010). Caracterización y espectro antimicrobiano de la Peptidoglicano Hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. En *Tesis de Licenciatura*. México, D.F.: Facultad de Química, UNAM.
145. Visca, P., Impri, F., y Lamont, I. L. (2006). Review: Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology*, 15(1), 22-30.
146. Waters, C. M., y Bassler, B. L. (2005). *Quorum Sensing: Cell-to-Cell communication in bacteria*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 319-346.
147. Wessel, D., y Flügge, U. I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, 138, 141-1443.
148. Wilson, R., Sikes, D. A., Watson, D., Rutman, A., Taylor, G. W., y Cole, P. J. (1988). Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infection and Immunity*, 56(9), 2515-2517.
149. Wolf, C., y Gibbons, W. (1996). Improved method for quantification of the bacteriocin nisin . *Journal of applied bacteriology*, 80, 453-457.
150. Yaakoubi, K., Benkerroum, N., Wiorowski, F., Sanson, F., Haydersah, J., y Chevallier, I. (2009). Development of a multiwell antagonistic activity assay for the detection of bacteriocin production by lactic acid bacteria. *Journal of Rapid Methods y Automation in Microbiology*(17), 32-45.
151. Zegans, M. E., Wozniak, D., Griffin, E., Toutain-Kidd, C. M., Hammond, J. H., Garfoot, A., y Lam, J. S. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl promotes resistance to the biofilm inhibitor polysorbate 80. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(8), 4112-4122.
152. Zhou, G. H., Xu, X. L., y Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat-A review. *Meat Science*, 86, 119-128.

6. Anexos

ANEXO 1

Cuadro 19. Método Micro Bradford

Fuente:

Tubo No	Azul de Coomassie μL	Agua destilada μL	Solución BSA μL	μg/ml de Proteína	Volumen total
Blanco	200	800	0	0	1000
1	200	650	150	1.875	1000
2	200	600	200	2.5	1000
3	200	500	300	3.75	1000
4	200	400	400	5	1000
5	200	300	500	6.25	1000
6	200	200	600	7.5	1000
7	200	100	700	8.75	1000
8	200	0	800	10	1000

Munguía Villavicencio, 2012

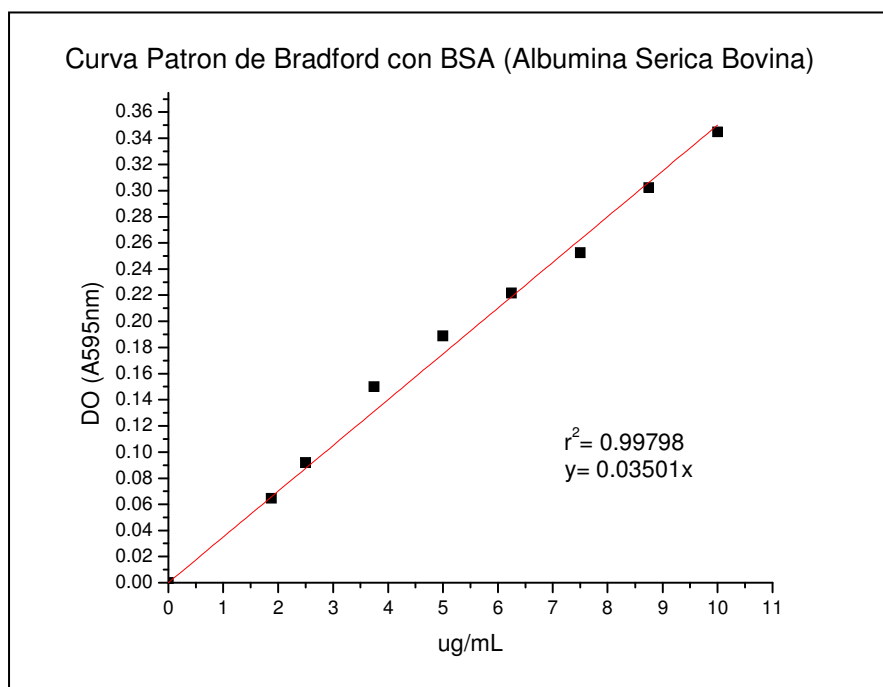


Figura 51. Curva Patrón de Albumina Sérica Bovina por método de Micro-Bradford

ANEXO 2

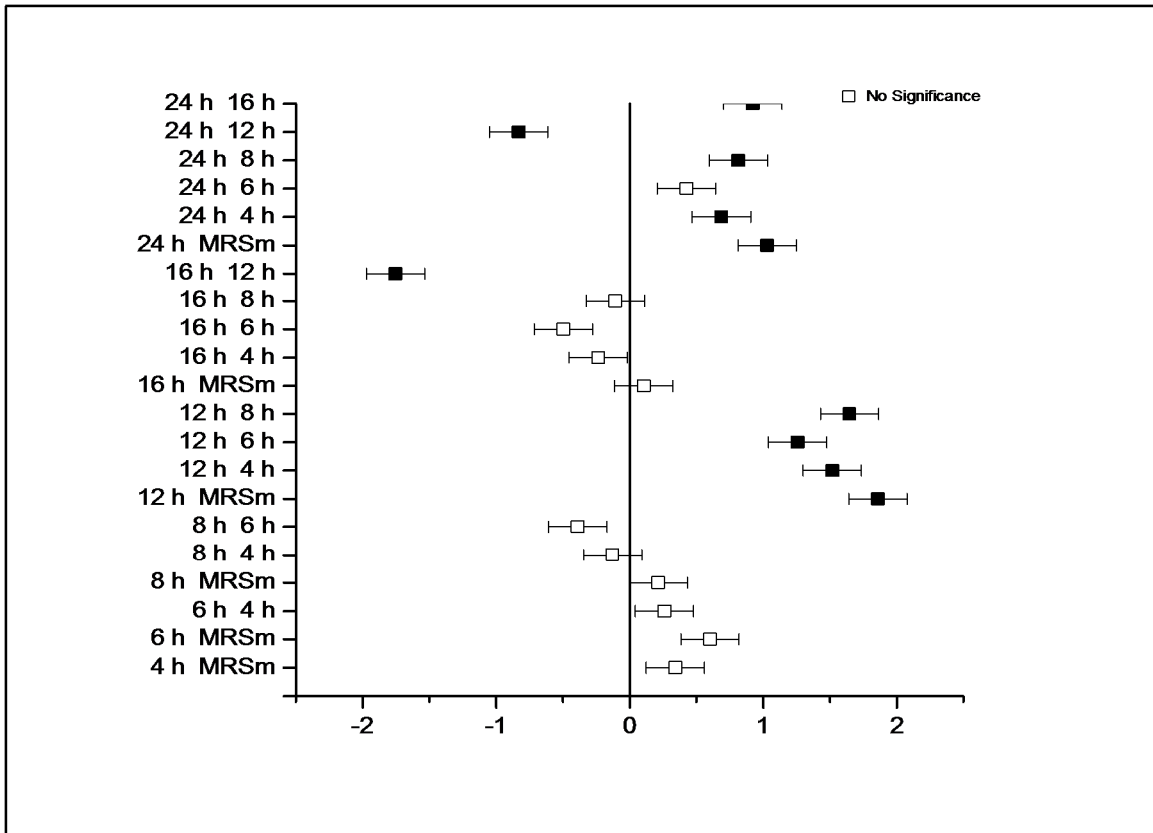


Figura 52. Prueba de Tukey para la concentración de proteínas de los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

ANEXO 3

Cuadro 20. Análisis de Varianza de los modelos de Weibull para las cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en medio LBF.

$H_0 = \mu_1 = \mu_2$

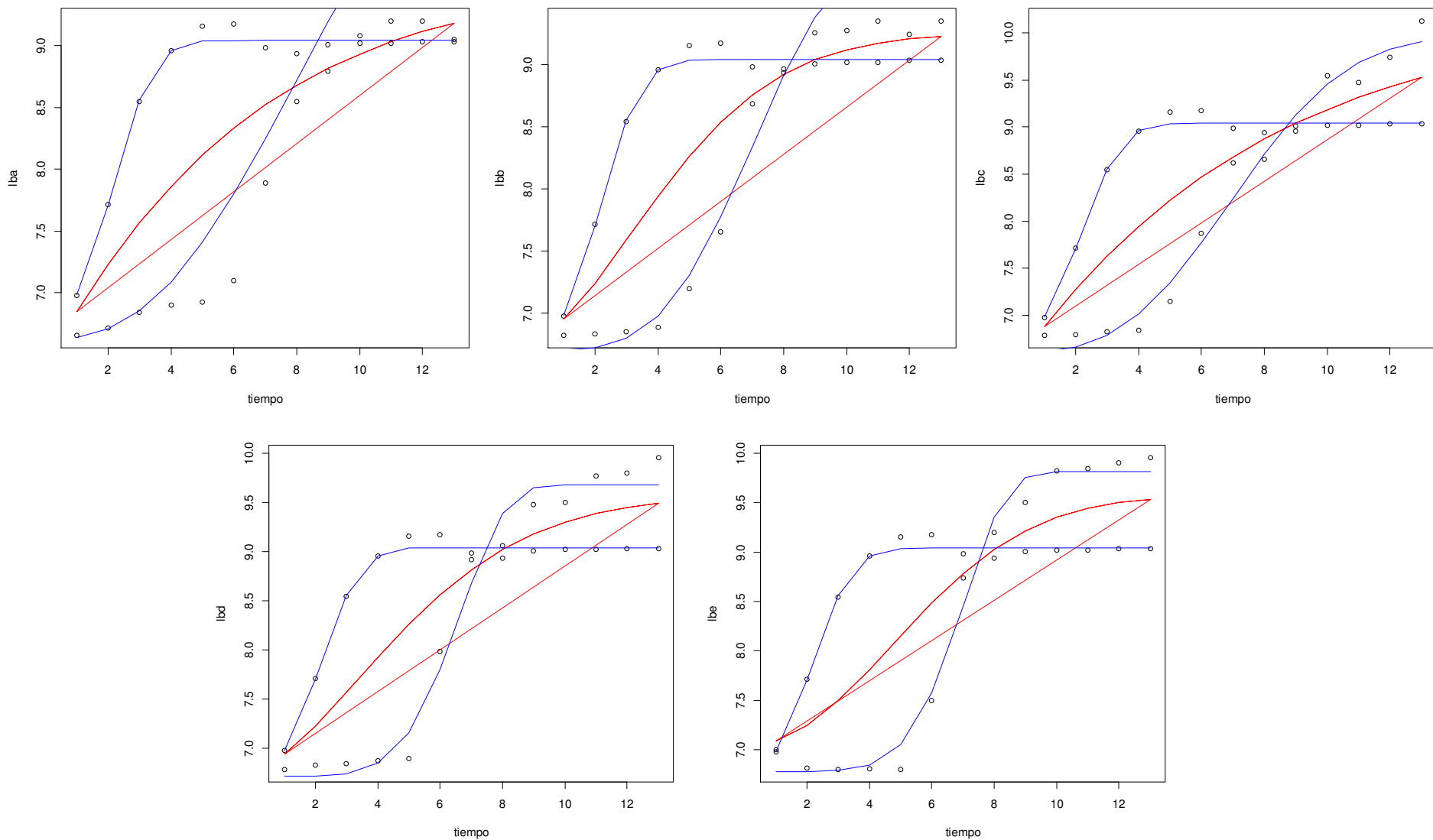
$p < 0.05$ = Existe evidencia estadística para rechazar la H_0

$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$

$P > 0.05$ = No existe evidencia estadística para rechazar H_0

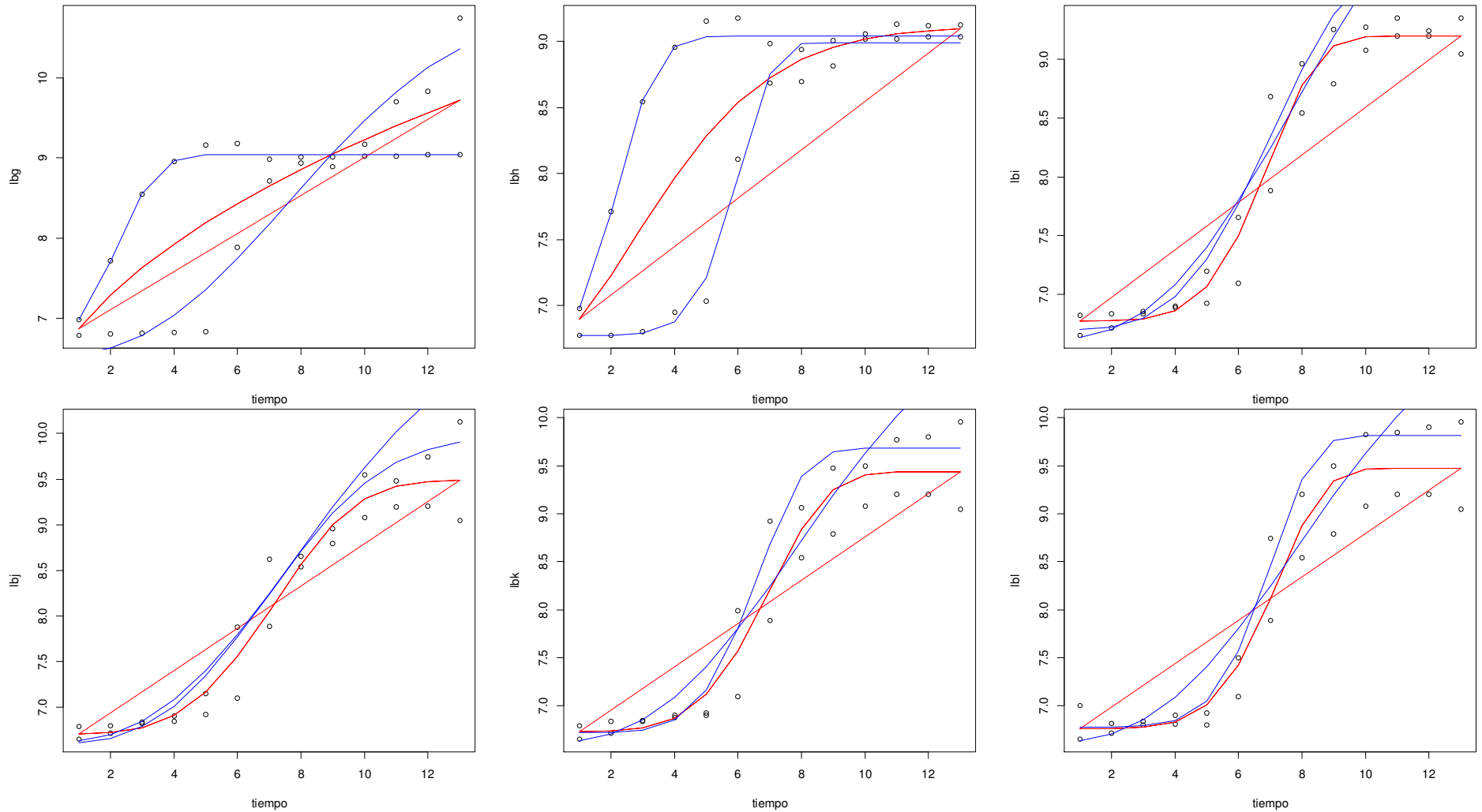
Grafico	Tratamientos en comparación	Valor P	H_0 o H_1
lba	Sin Tratamiento v.s. MRS (10X)	0.000001656	H_1
lbb	Sin Tratamiento v.s. MRSm (10X)	0.008898	H_1
lbc	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X)	0.000000000003377	H_1
lbd	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X)	0.0000000000001478	H_1
lbe	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X)	0.00000022	H_1
lbf	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.000000000006177	H_1
lbg	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.0000000000001412	H_1
lbh	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.00004592	H_1
lbi	MRS (10X) v.s. MRSm (10X)	0.06534	H_0
lbj	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X)	0.003640	H_1
lbk	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X)	0.00000000000022	H_1
lbl	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X)	0.07124	H_0
lbm	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.0000000000001412	H_1
lbn	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.0524	H_0
lbñ	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.000003441656	H_1
lbo	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X)	0.053377	H_0
lbp	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X)	0.008898	H_1

Grafico	Tratamientos en comparación	Valor P	H₀ o H₁
lbq	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X)	0.008767	H ₁
lbr	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.00000008876	H ₁
lbs	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.01478	H ₁
lbt	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.0000000001478	H ₁
lbu	Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X)	0.00000022	H ₁
lbv	Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X)	0.00000978966177	H ₁
lbw	Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.0009875512	H ₁
lbx	Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.07898	H ₀
lby	Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.00000000113	H ₁
lbz	Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X)	0.0656	H ₀
lbaa	Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.000000113	H ₁
lbbb	Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.0000000007749	H ₁
lbcc	Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.000000002057	H ₁
lbdd	Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.000000000224	H ₁
lbee	Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.00000001008	H ₁
lbff	Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.000000008934	H ₁
lbgg	Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.0000000001478	H ₁
lbhh	Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.00000022	H ₁
lbii	Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.000000006177	H ₁



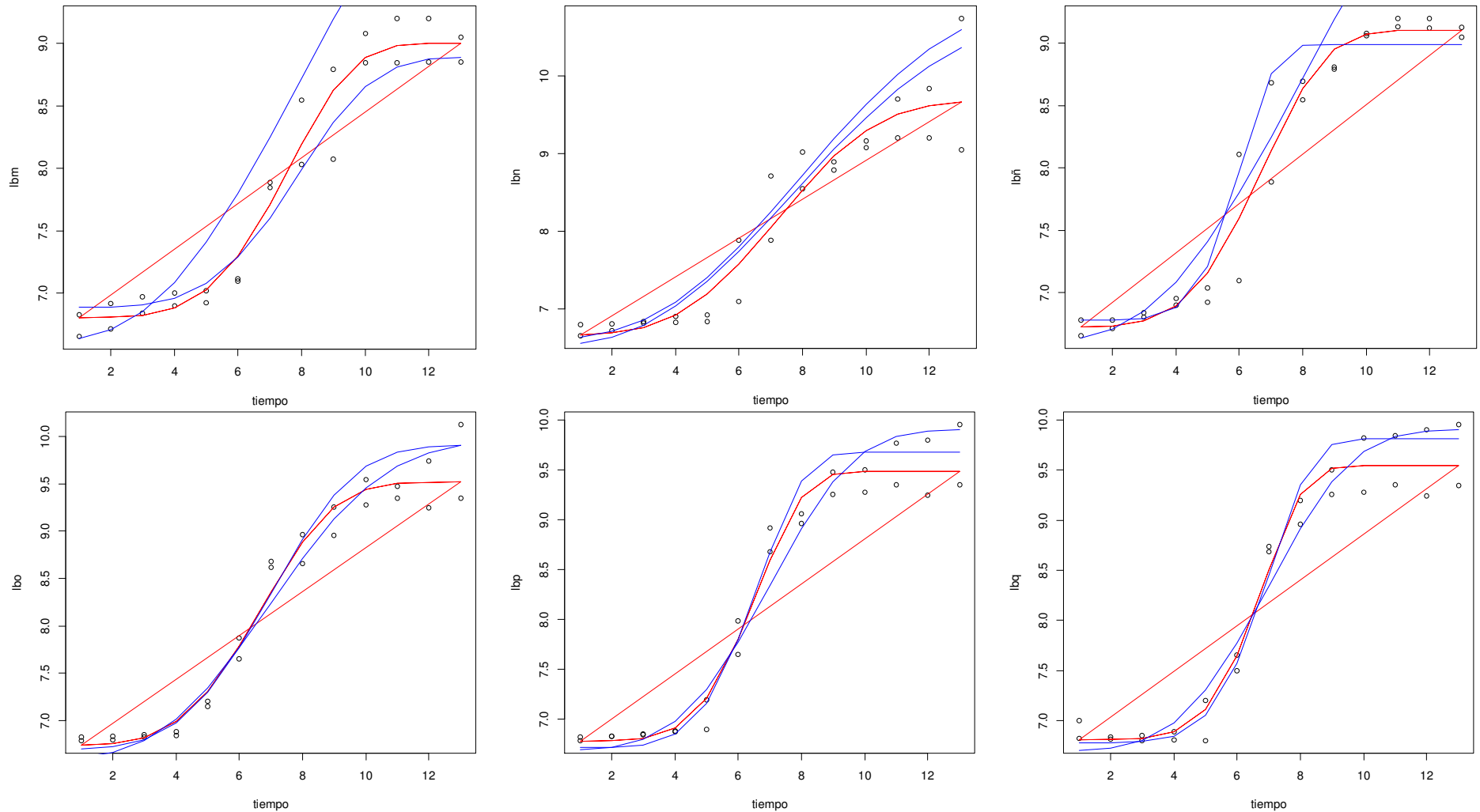
lba) Cinética sin tratamiento y la cinética con MRS (10X). **lbb)** Cinética sin tratamiento y la cinética con MRSm (10X). **lbc)** Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 4 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbd)** Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 6 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbe)** Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 8 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio LBf. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. LBf = Medio Luria Bertani fortificado. MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces



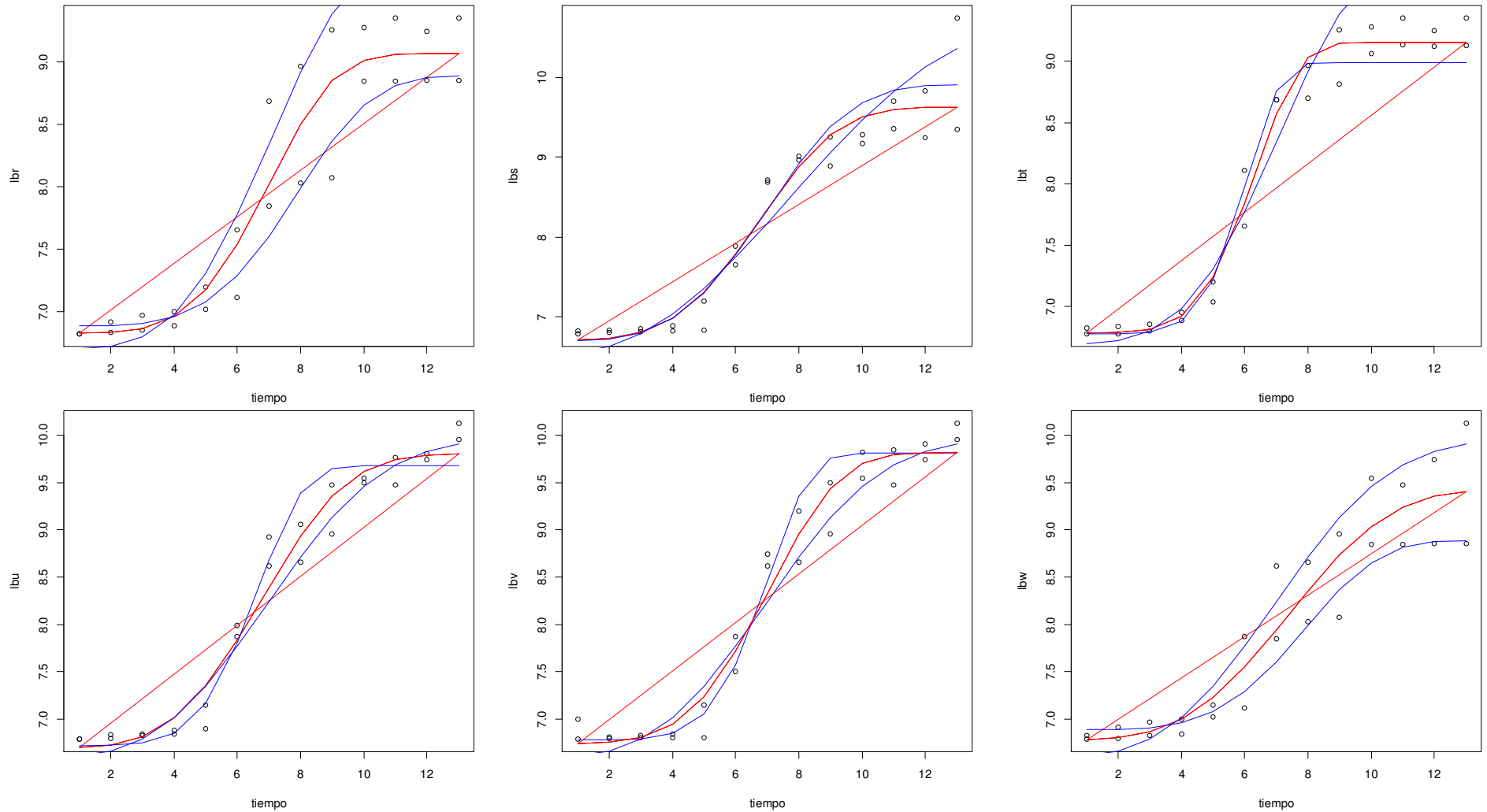
lbg) Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbh)** Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbi)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con MRSm (10X). **lbj)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 4 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbk)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 6 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbi)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 8 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio LBf. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. LBf = Medio Luria Bertani fortificado. MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces



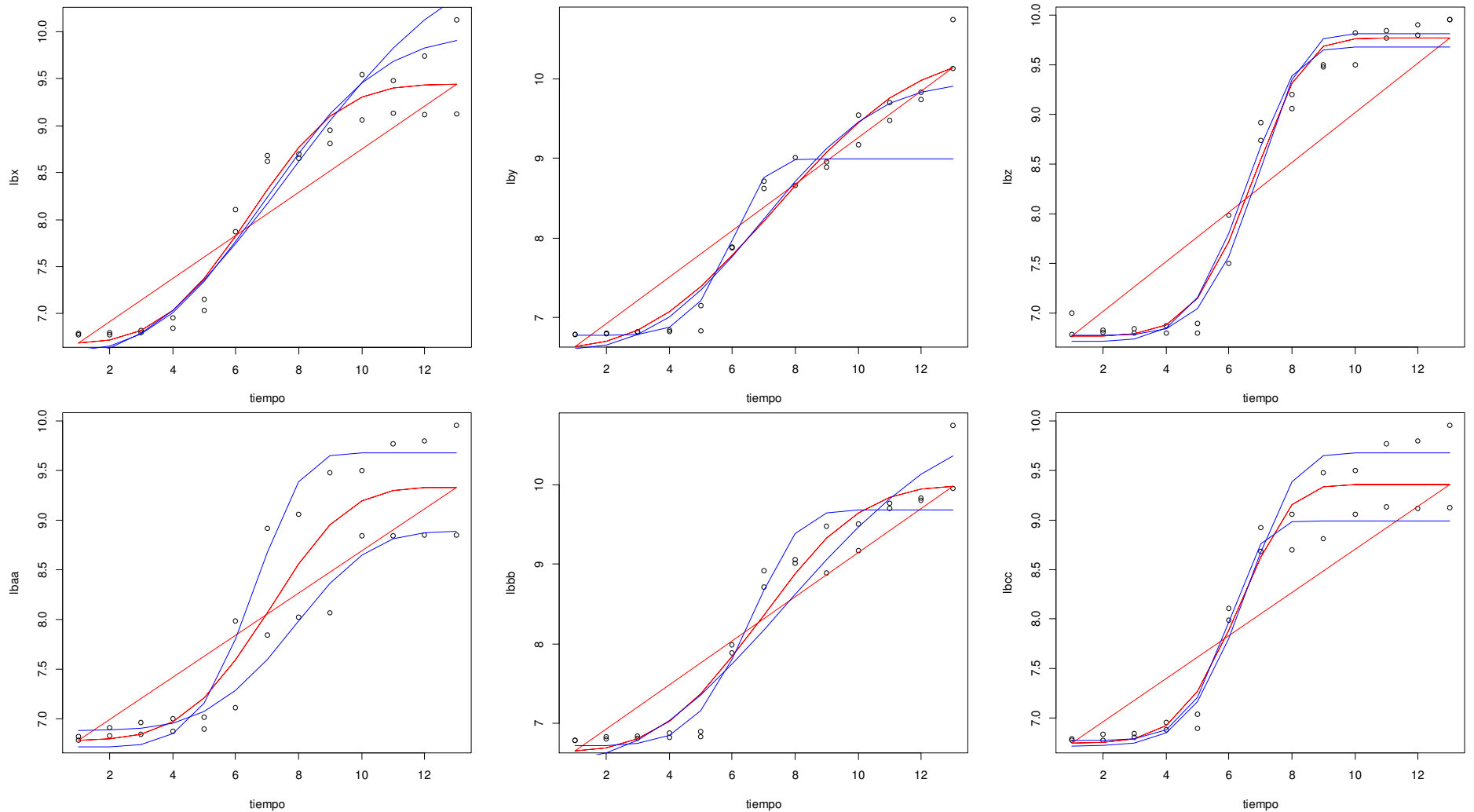
lbn) Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbñ)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbñ)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbo)** Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 4 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbp)** Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 6 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbq)** Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 8 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio LBF. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. LBF = Medio Luria Bertani fortificado. MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces



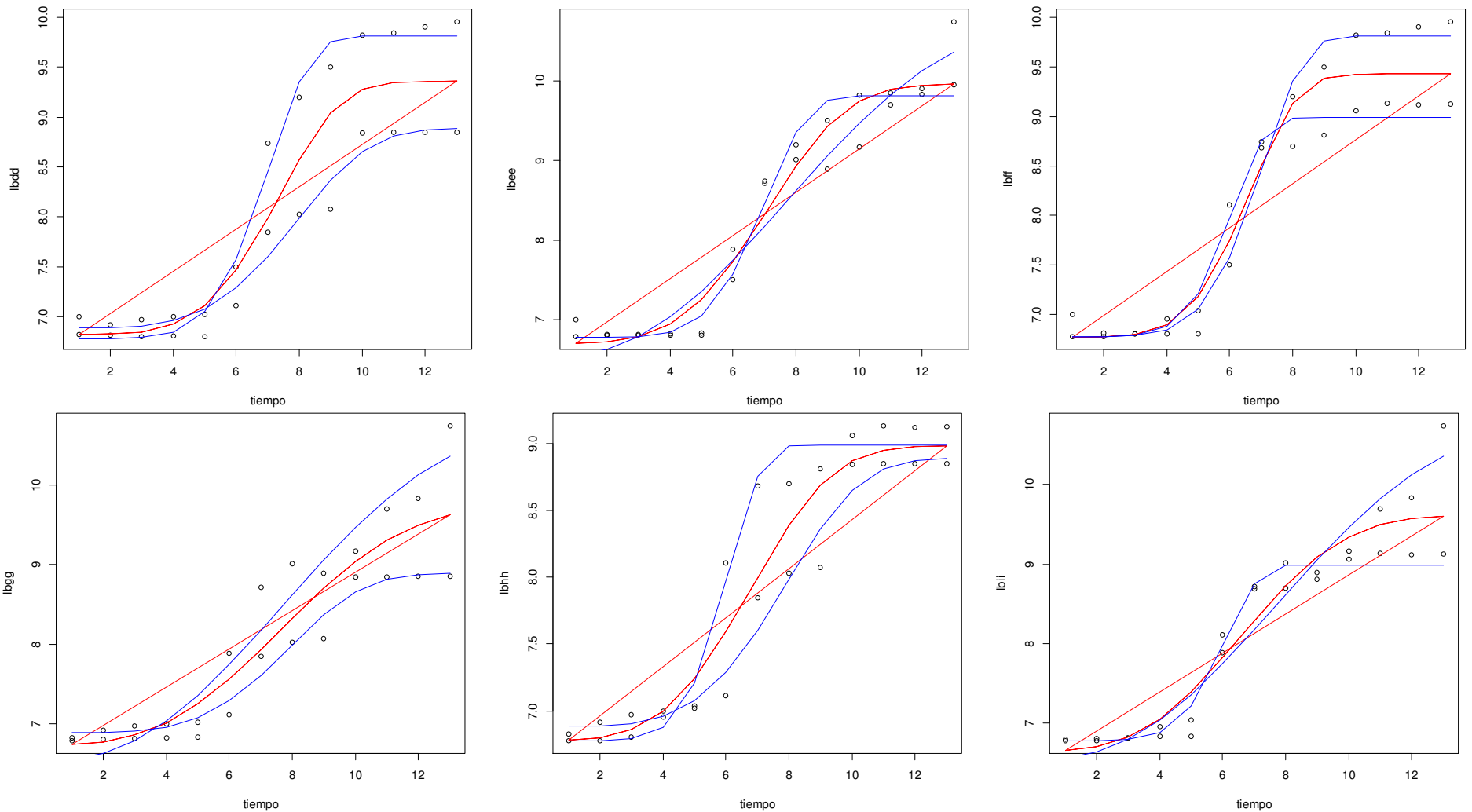
lbr) Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbs)** Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbt)** Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbu)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 4 y 6 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbv)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 4 y 8 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbw)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 4 y 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio LBf. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. LBf = Medio Luria Bertani fortificado. MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces



lby) Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 4 y 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lby)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 4 y 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbz)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 6 y 8 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbaa)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 6 y 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbbb)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 6 y 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbcc)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 6 y 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio LBf. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. LBf = Medio Luria Bertani fortificado. MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces



lbdd) Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 8 y 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbee)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 8 y 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbff)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 8 y 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbgg)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 12 y 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbhh)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 12 y 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **lbii)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 16 y 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio LBF. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. LBF = Medio Luria Bertani fortificado. MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces

ANEXO 4

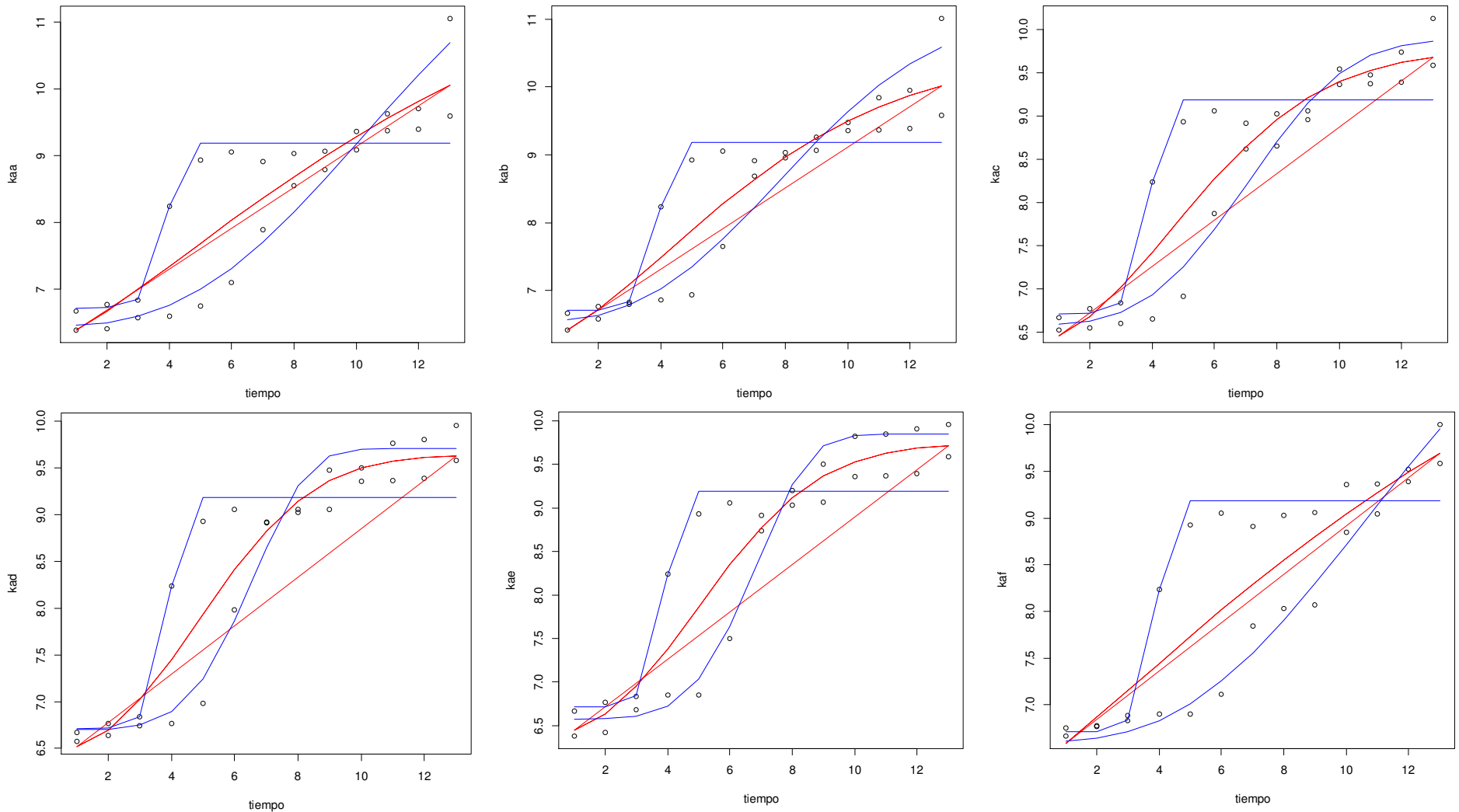
Cuadro 21. Análisis de Varianza de los modelos de Weibull para las cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en medio King “A”.

$H_0 = \mu_1 = \mu_2$
 $H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$

$p < 0.05$ = Existe evidencia estadística para rechazar la H_0
 $P > 0.05$ = No existe evidencia estadística para rechazar H_0

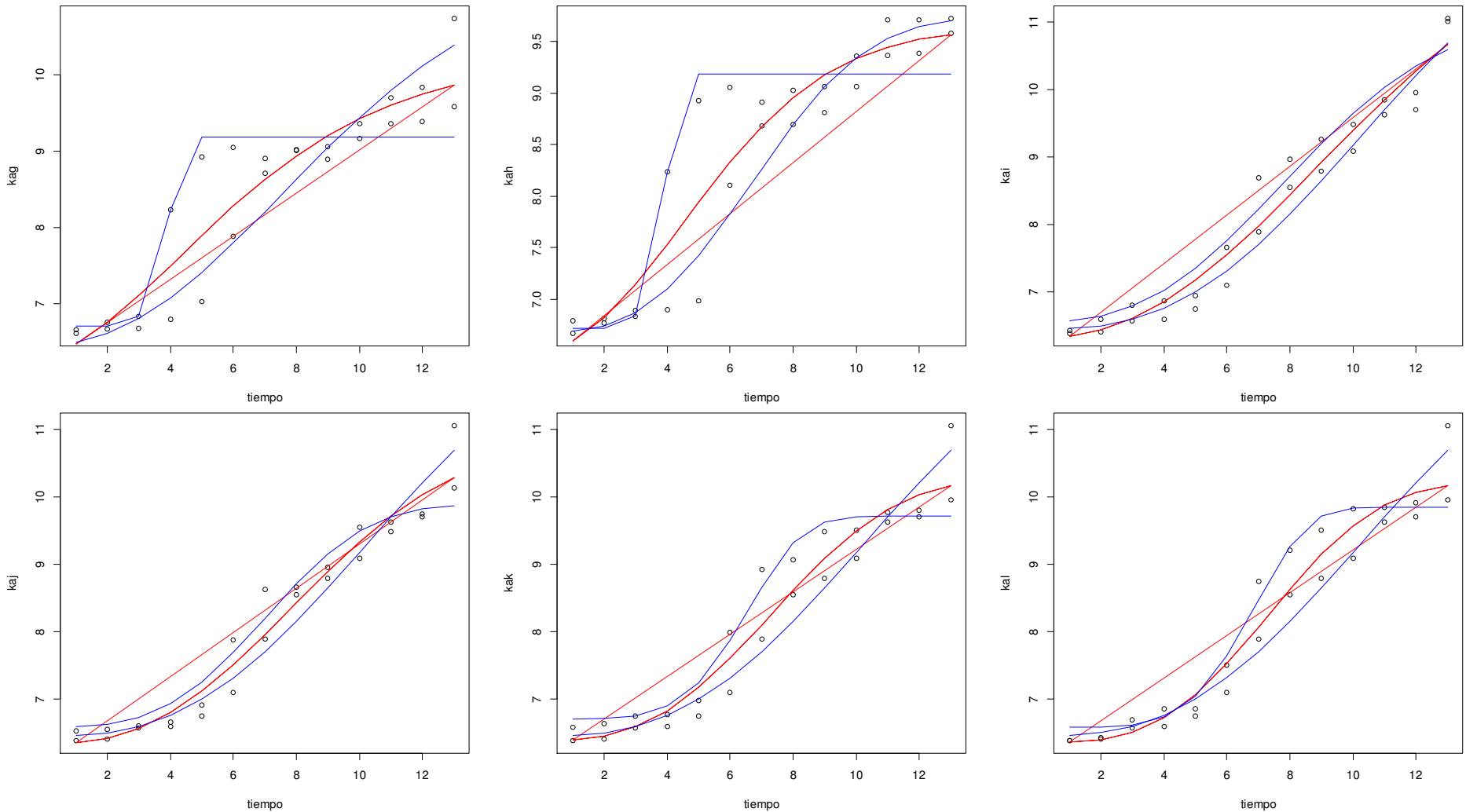
Grafico	Tratamientos en comparación	Valor P	H_0 o H_1
kaa	Sin Tratamiento v.s. MRS (10X)	0.0000000001478	H_1
kab	Sin Tratamiento v.s. MRSm (10X)	0.00000022	H_1
kac	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X)	0.0000978966177	H_1
kad	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X)	0.0009875512	H_1
kae	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X)	0.0000000001478	H_1
kaf	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.00000022	H_1
kag	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.0000978966177	H_1
kah	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.0009875512	H_1
kai	MRS (10X) v.s. MRSm (10X)	0.054887	H_0
kaj	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X)	0.000000113	H_1
kak	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X)	0.0000000007749	H_1
kal	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X)	0.000000002057	H_1
kam	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.007876	H_1
kan	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.0098878	H_1
kañ	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.000099763	H_1
kao	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X)	0.076988	H_0
kap	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X)	0.000008366	H_1

Grafico	Tratamientos en comparación	Valor P	H₀ o H₁
kaq	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X)	0.000000113	H ₁
kar	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.0000007749	H ₁
kas	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.087769	H ₀
kat	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.0088998	H ₁
kau	Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X)	0.0022358	H ₁
kav	Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X)	0.00554456	H ₁
kaw	Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.000056356	H ₁
kax	Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.0656678	H ₀
kay	Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.07776678	H ₀
kaz	Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X)	0.086676	H ₀
kaaa	Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.000046884	H ₁
kabb	Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.000040455	H ₁
kacc	Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.000877678	H ₁
kadd	Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.000046884	H ₁
kaee	Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.000040455	H ₁
kaff	Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.000877678	H ₁
kagg	Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.000075655	H ₁
kahh	Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.00009884	H ₁
kaii	Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.055498	H ₀



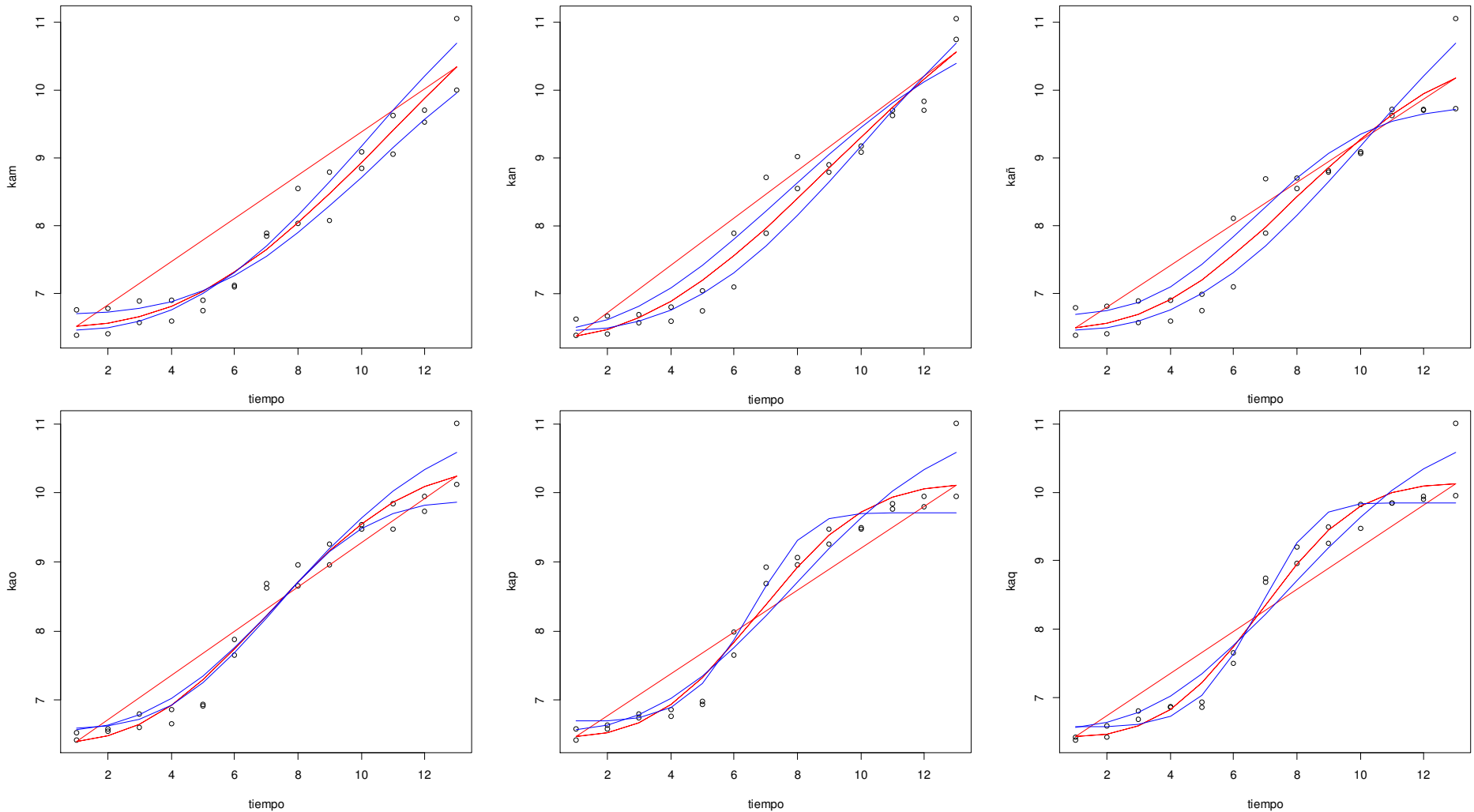
kaa) Cinética sin tratamiento y la cinética con MRS (10X). **kab)** Cinética sin tratamiento y la cinética con MRSm (10X). **kac)** Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 4 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kad)** Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 6 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kae)** Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 8 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kaf)** Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KA. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KA = Medio King "A". MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces



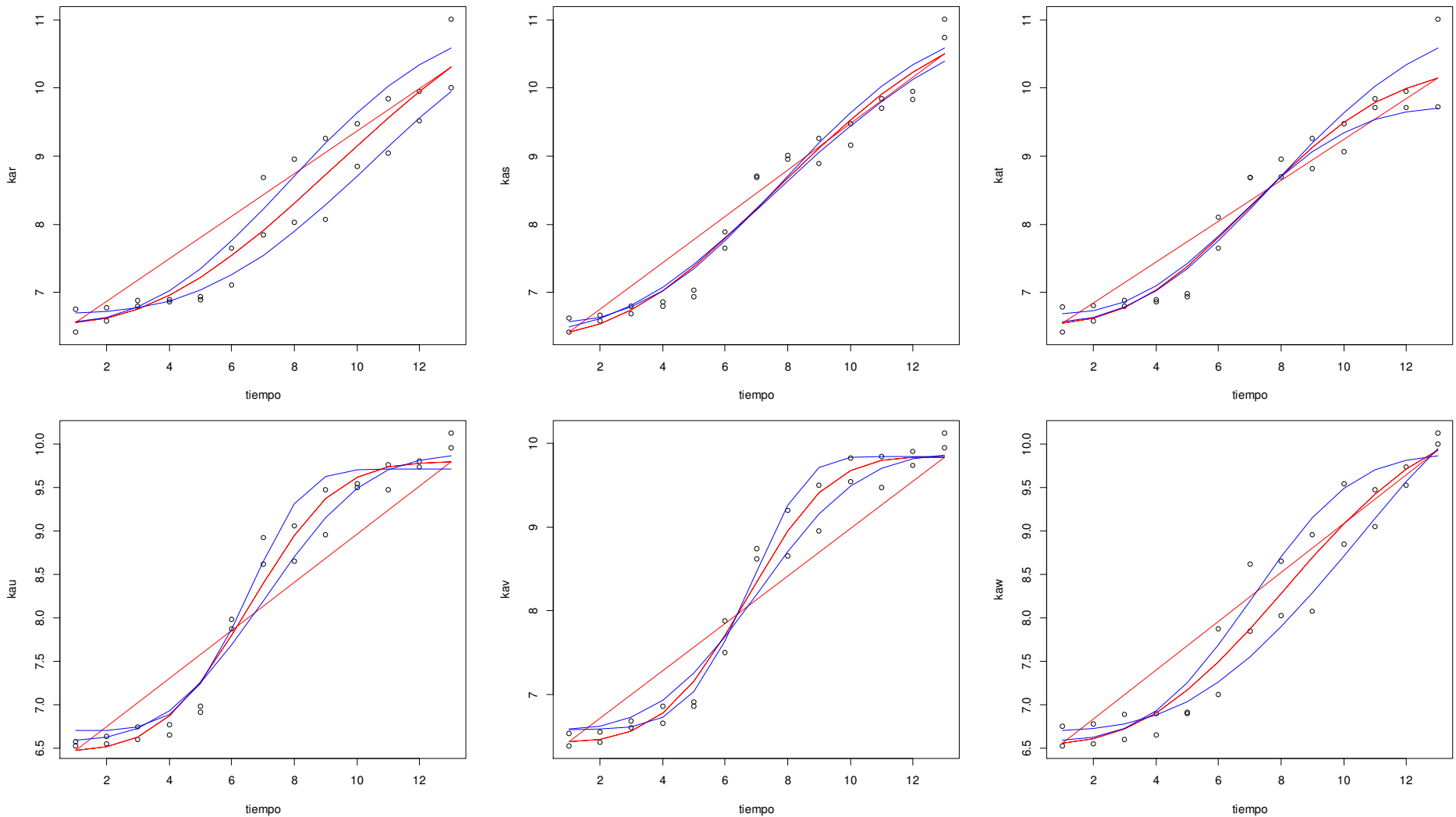
kag) Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kah)** Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kai)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con MRSm (10x). **kaj)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 4 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kak)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 6 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kal)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 8 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KA. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KA = Medio King "A". MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces



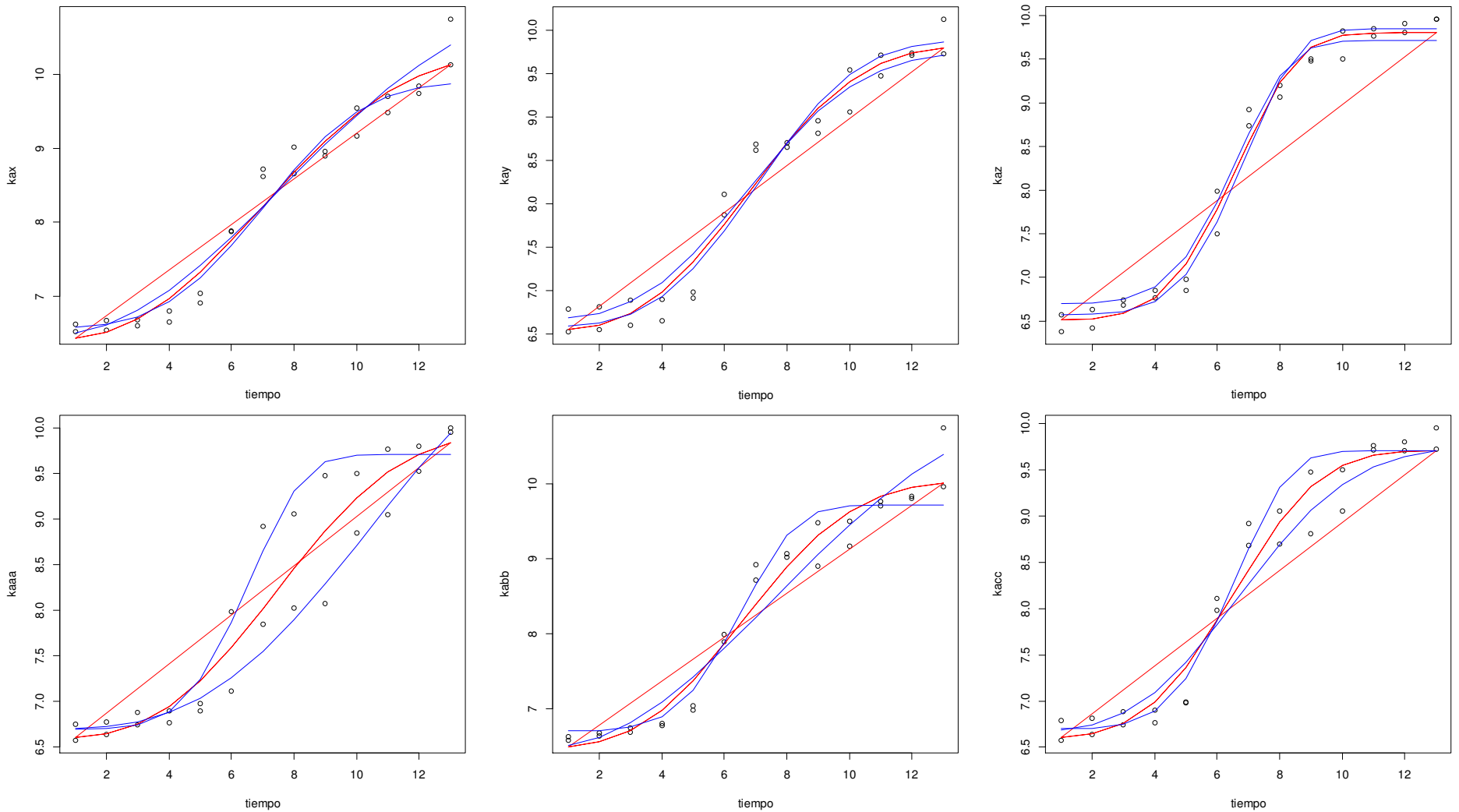
kam) Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kan)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kañ)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kao)** Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 4 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kap)** Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 6 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kaq)** Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 8 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KA. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KA = Medio King "A". MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces



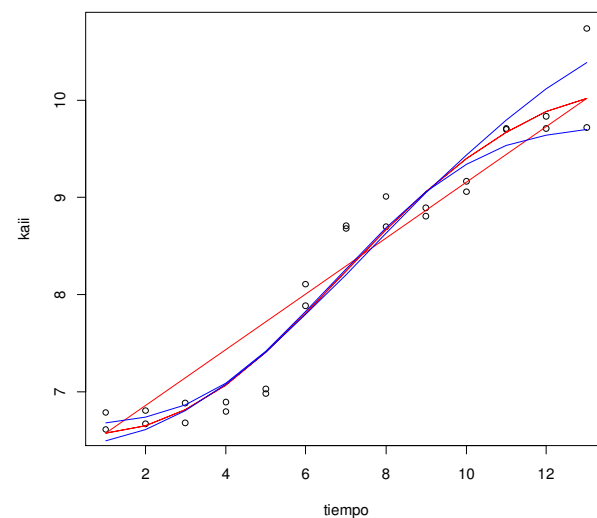
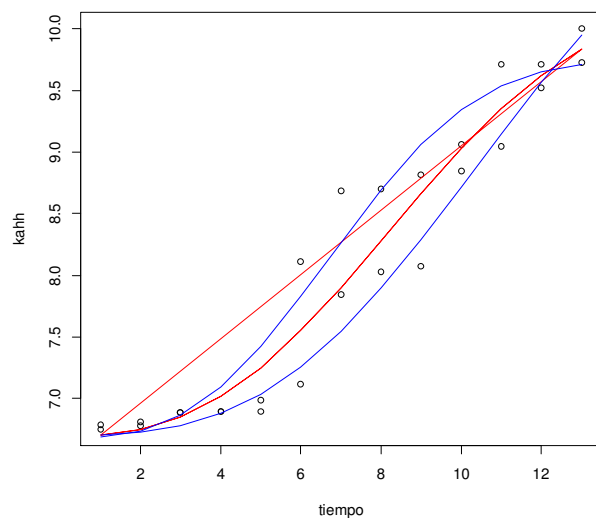
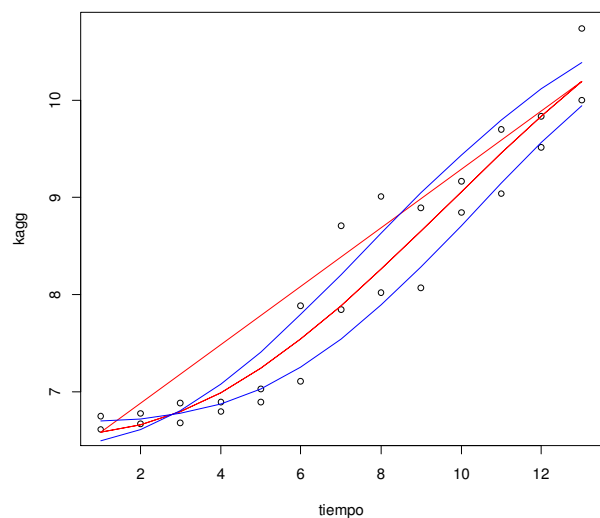
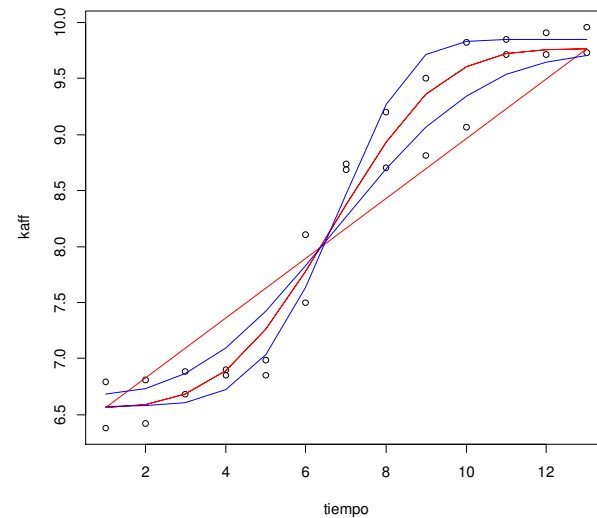
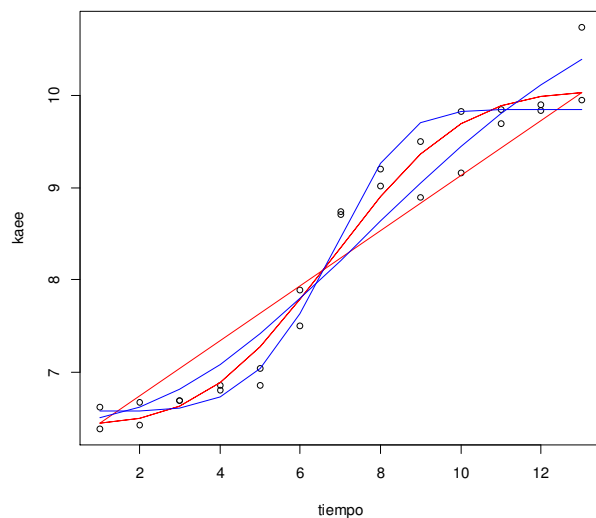
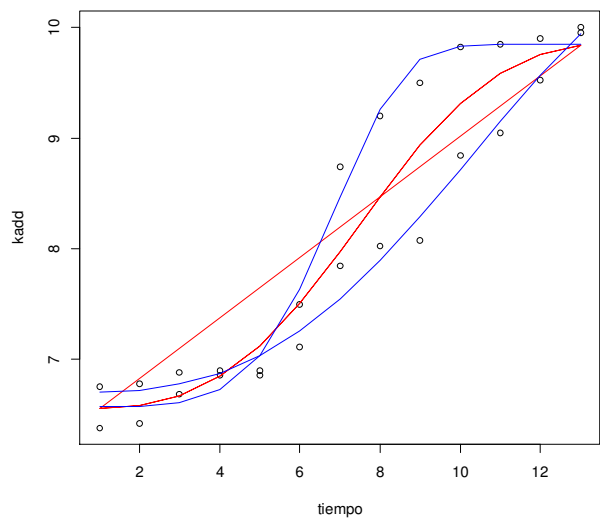
kar) Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kas)** Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kat)** Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kau)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 4 y 6 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kav)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 4 y 8 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kaw)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 4 y 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KA. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KA = Medio King "A". MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces



kax) Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 4 y 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kay)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 4 y 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kaz)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 6 y 8 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kaaa)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 6 y 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kabb)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 6 y 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kacc)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 6 y 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KA. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KA = Medio King "A". MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces



kadd) Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 8 y 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kaee)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 8 y 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kaff)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 8 y 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kagg)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 12 y 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kahh)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 12 y 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kaii)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 16 y 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KA. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KA = Medio King "A". MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces

ANEXO 5

Cuadro 22. Análisis de Varianza de los modelos de Weibull para las cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en medio King “B”.

$H_0 = \mu_1 = \mu_2$

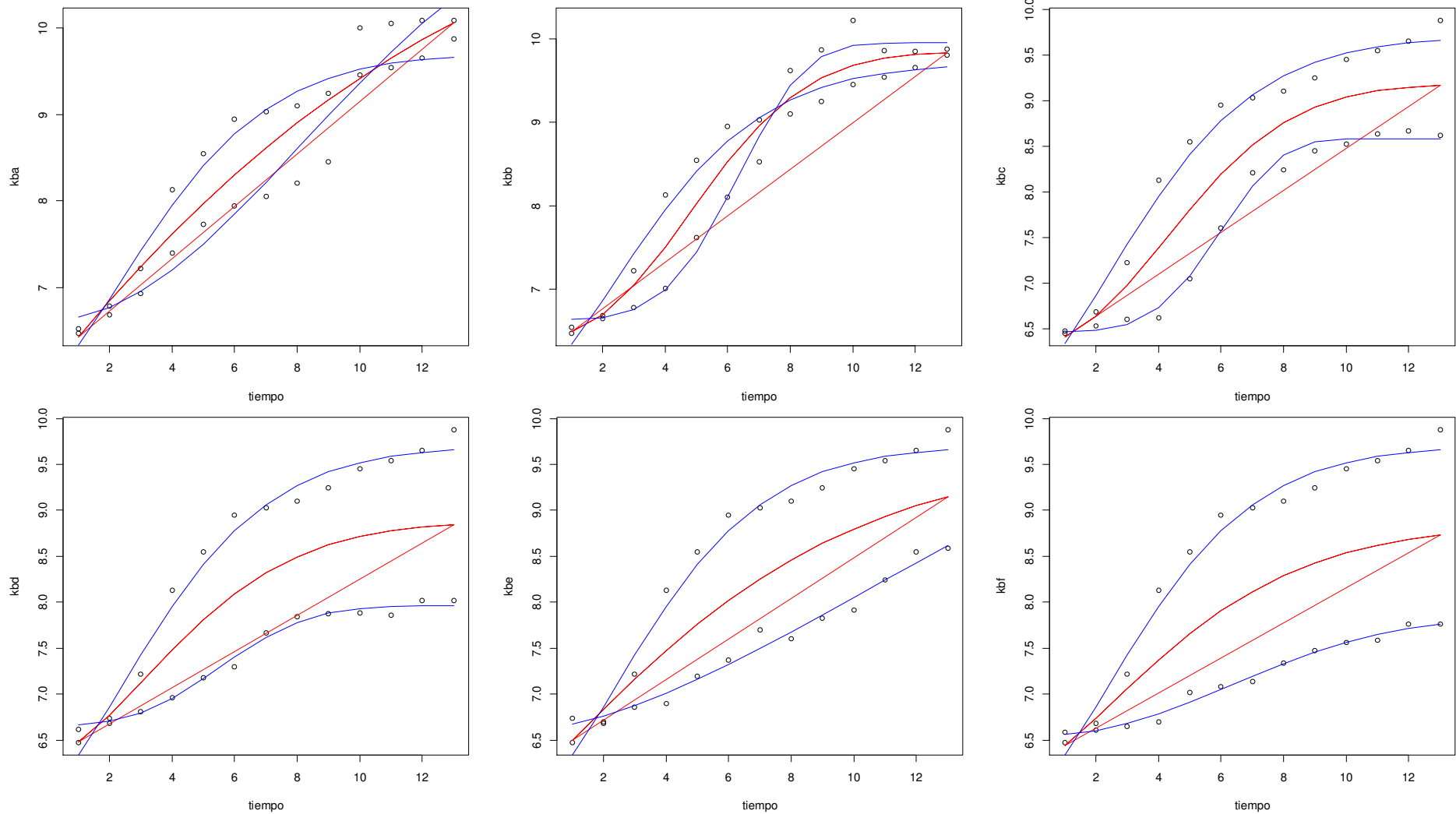
$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$

$p < 0.05$ = Existe evidencia estadística para rechazar la H_0

$P > 0.05$ = No existe evidencia estadística para rechazar H_0

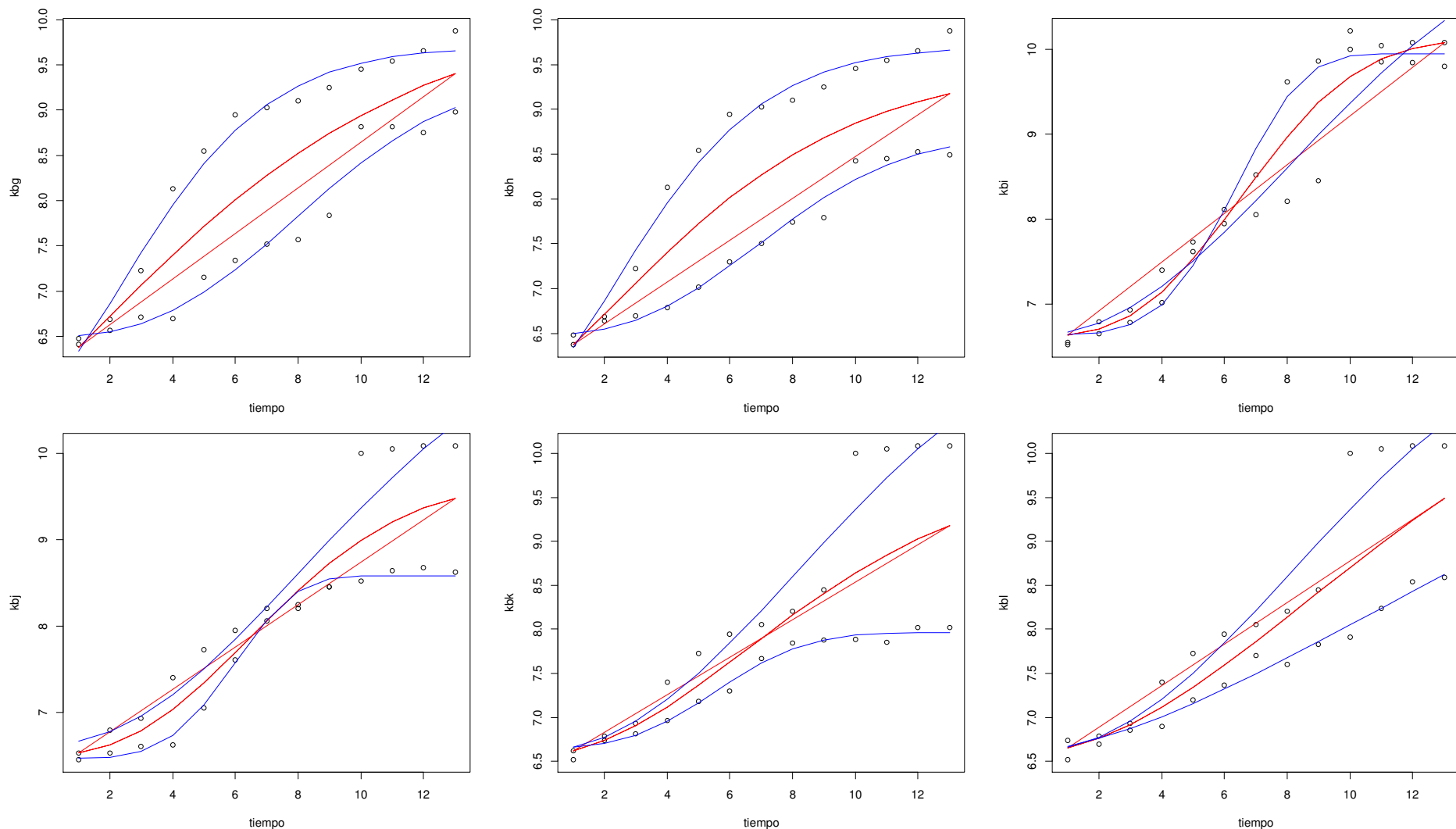
Grafico	Tratamientos en comparación	Valor P	H_0 o H_1
kba	Sin Tratamiento v.s. MRS (10X)	0.000000001478	H_1
kbb	Sin Tratamiento v.s. MRSm (10X)	0.00000022	H_1
kbc	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X)	0.0000978966177	H_1
kbd	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X)	0.0009875512	H_1
kbe	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X)	0.000000001478	H_1
kbf	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.00000022	H_1
kbg	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.0000978966177	H_1
kbh	Sin Tratamiento v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.00009875512	H_1
kbi	MRS (10X) v.s. MRSm (10X)	0.0054887	H_1
kbj	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X)	0.000000113	H_1
kbk	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X)	0.000000007749	H_1
kbl	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X)	0.00000002057	H_1
kbm	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.00007876	H_1
kbn	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.0000098878	H_1
kbñ	MRS (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.000099763	H_1
kbo	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X)	0.00009875512	H_1
kbp	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X)	0.0054887	H_1

Grafico	Tratamientos en comparación	Valor P	H₀ o H₁
kbq	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X)	0.00009875512	H ₁
kbr	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.000054887	H ₁
kbs	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.000000113	H ₁
kbt	MRSm (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.000000007749	H ₁
kbu	Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X)	0.000000002057	H ₁
kbv	Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X)	0.00007876	H ₁
kbw	Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.00009875512	H ₁
kbx	Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.000054887	H ₁
kby	Sobrenadante de 4 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.000000113	H ₁
kbz	Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X)	0.000000007749	H ₁
kbaa	Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.000000002057	H ₁
kbbb	Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.00007876	H ₁
kbcc	Sobrenadante de 6 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.00009875512	H ₁
kbdd	Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X)	0.000054887	H ₁
kbee	Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.0113	H ₁
kbff	Sobrenadante de 8 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.06778	H ₀
kbgg	Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X)	0.000054887	H ₁
kbhh	Sobrenadante de 12 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.000000113	H ₁
kbii	Sobrenadante de 16 h de cultivo (10X) v.s. Sobrenadante de 24 h de cultivo (10X)	0.077678	H ₀



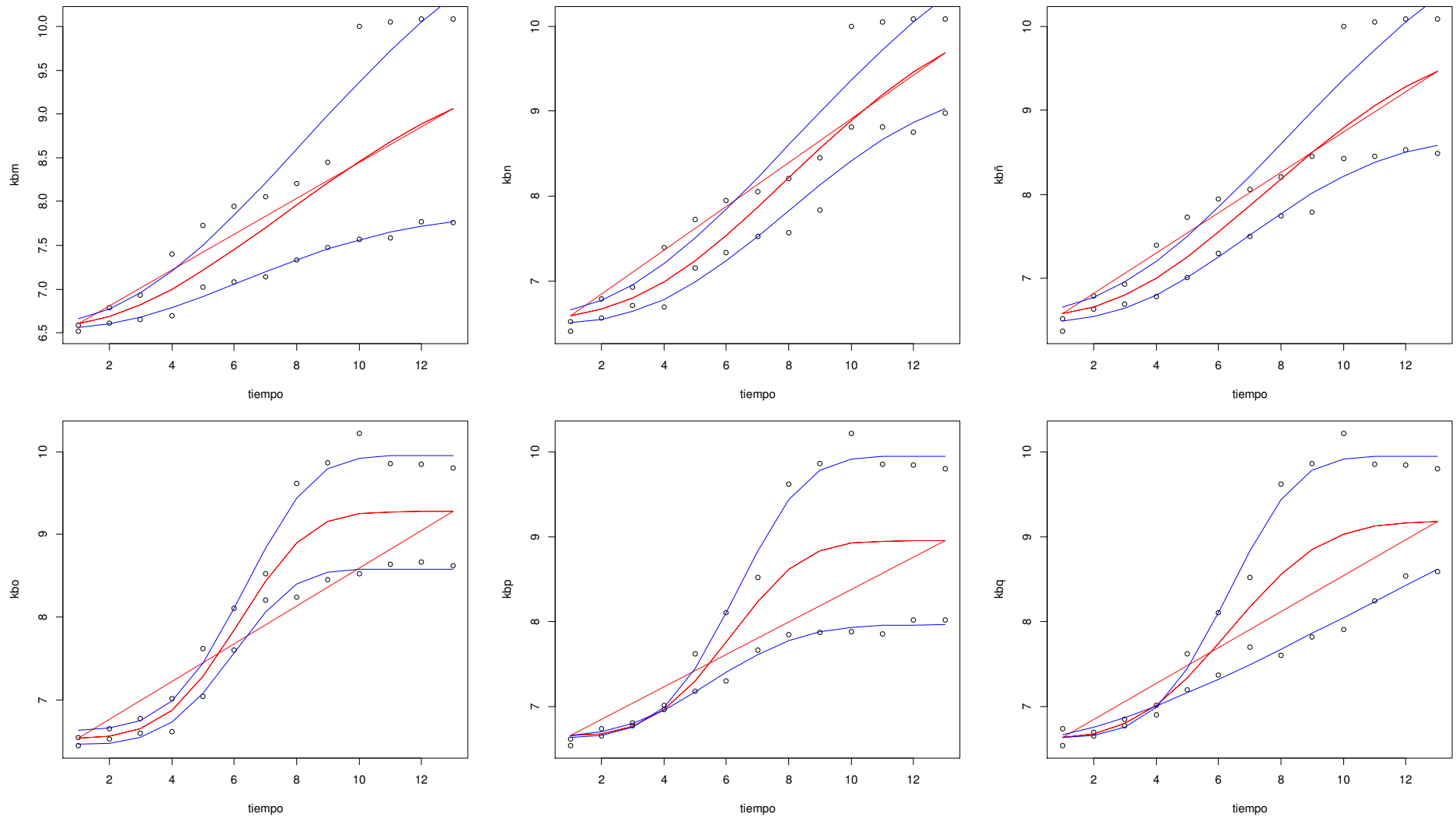
kba) Cinética sin tratamiento y la cinética con MRS (10X). **kbb)** Cinética sin tratamiento y la cinética con MRSm (10X). **kbc)** Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 4 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbd)** Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 6 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbe)** Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 8 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbf)** Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KB. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KB = Medio King "B". MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces



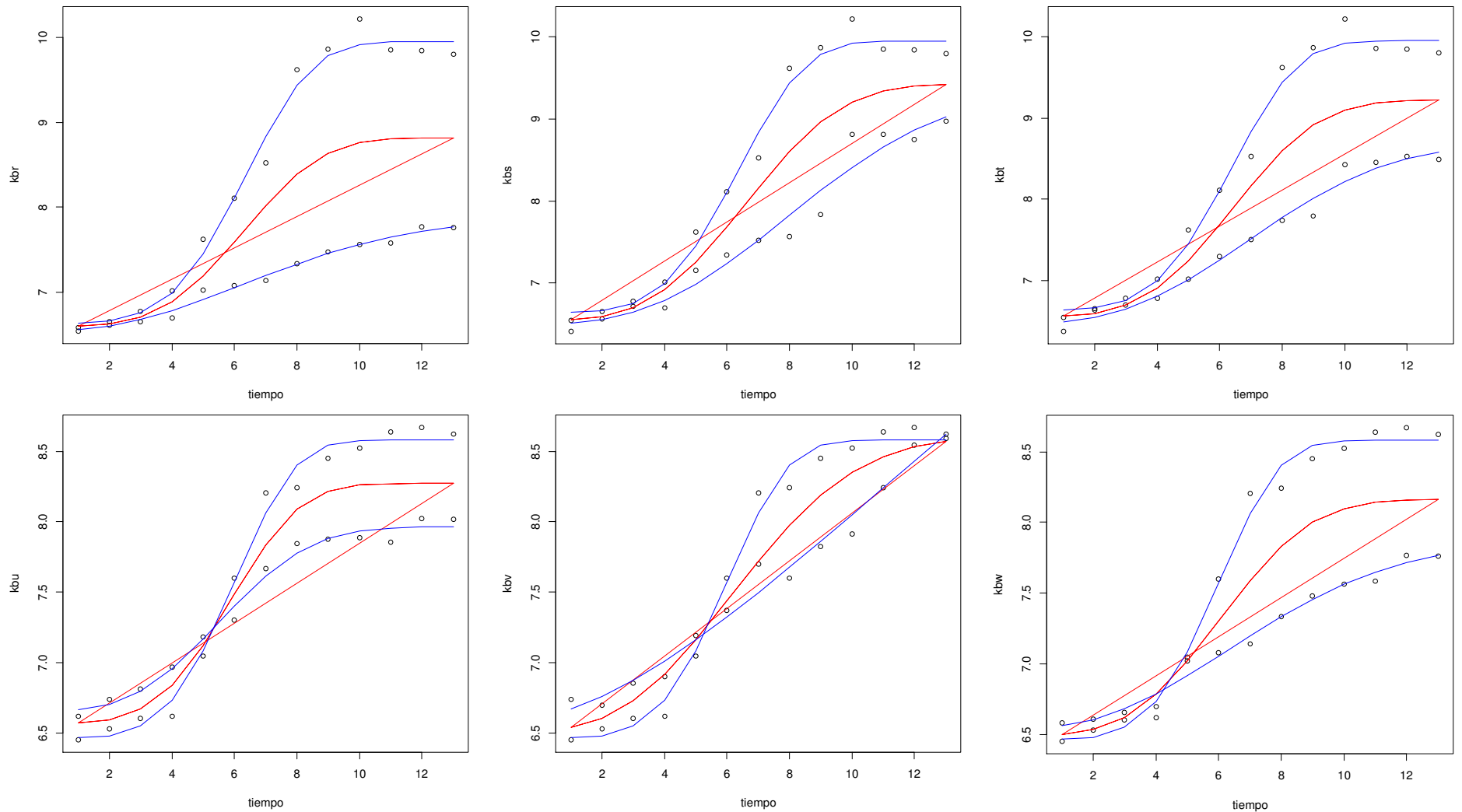
kgb) Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbh)** Cinética sin tratamiento y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbi)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con MRSm (10x). **kbj)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 4 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbk)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 6 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbl)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 8 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KB. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KB = Medio King "B". MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces



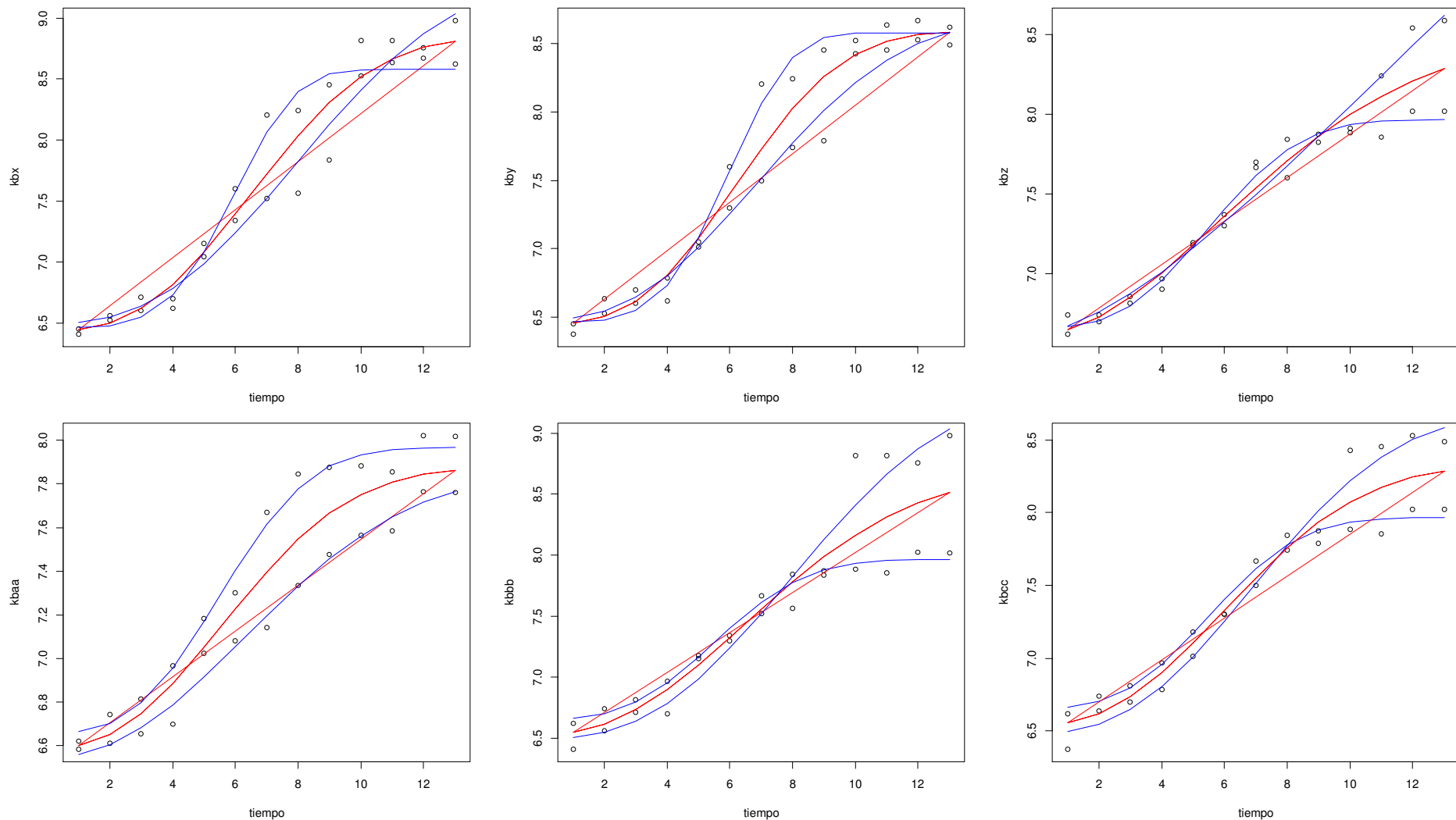
kbn) Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbn)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbñ)** Cinética con MRS (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbo)** Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 4 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbp)** Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 6 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbq)** Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 8 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KB. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KB = Medio King "B". MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces



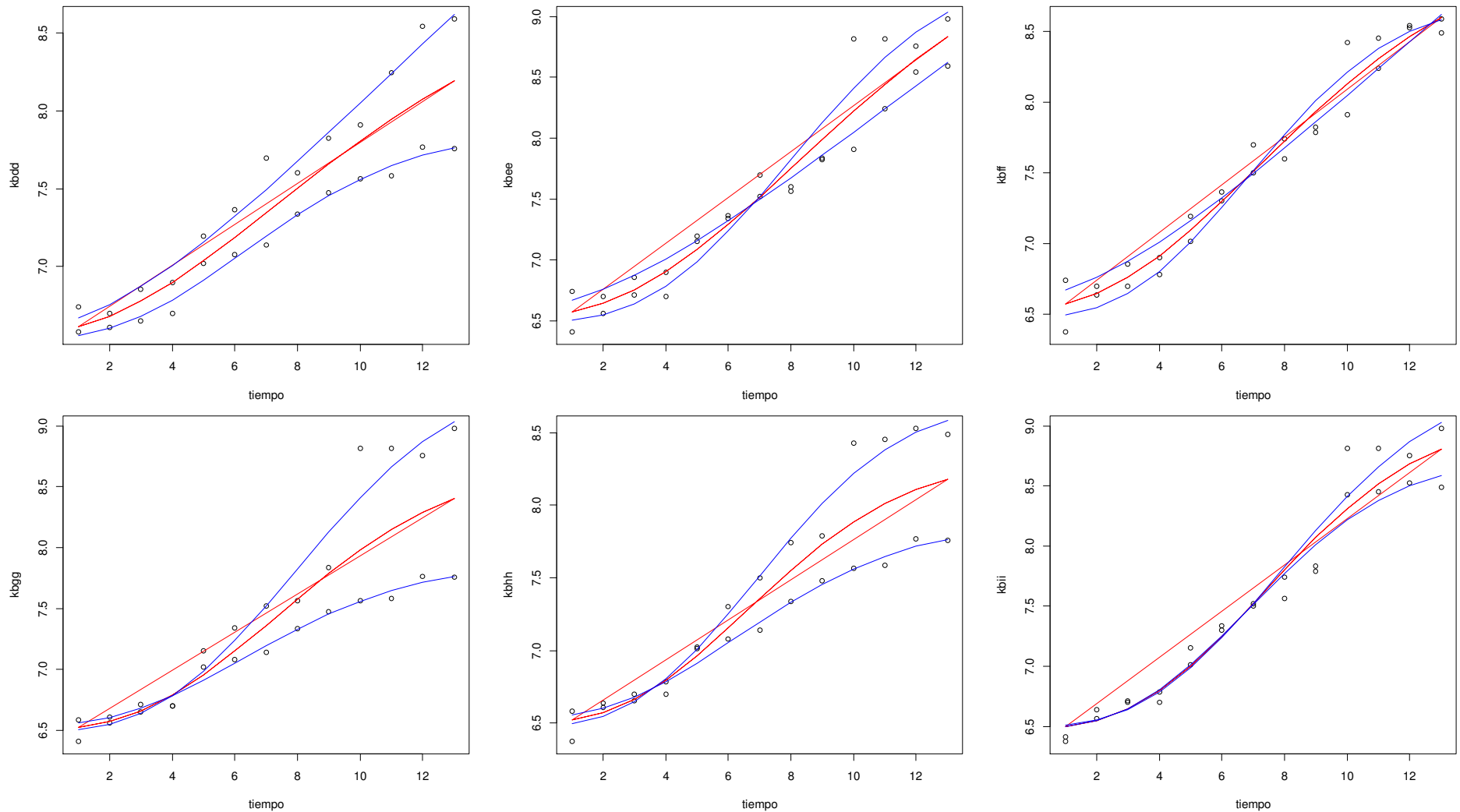
kbr) Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbs)** Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbt)** Cinética con MRSm (10X) y la cinética con el sobrenadante del cultivo por 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbu)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 4 y 6 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbv)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 4 y 8 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbw)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 4 y 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KB. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KB = Medio King "B". MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces



kax) Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 4 y 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kay)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 4 y 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kaz)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 6 y 8 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kaa)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 6 y 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kabb)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 6 y 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kacc)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 6 y 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KA. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KA = Medio King "A". MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces



kbdd) Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 8 y 12 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbee)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 8 y 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbff)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 8 y 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kggg)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 12 y 16 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbhh)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 12 y 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X). **kbii)** Cinéticas con el sobrenadante del cultivo por 16 y 24 horas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (10X).

Regresión no lineal con el modelo de Weibull. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KB. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KB = Medio King "B". MRS= Medio Man, Rogosa y Sharpe. MRSm= Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado. 10X= Concentrado 10 veces

ANEXO 5

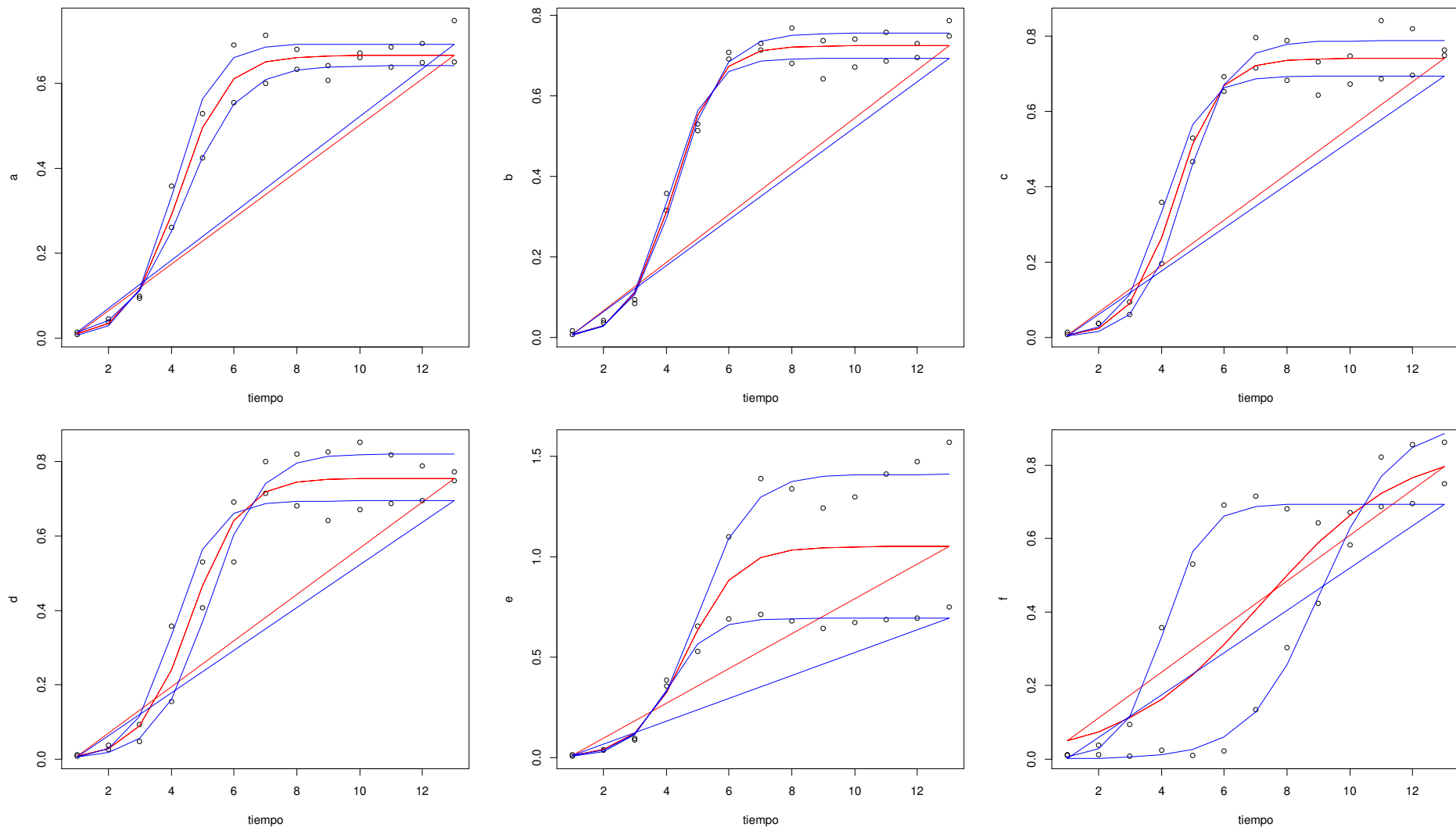
Cuadro 23. Análisis de Varianza de los modelos Logísticos para las cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm en medio LBF.

$H_0 = \mu_1 = \mu_2$
 $H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$

$p < 0.05$ = Existe evidencia estadística para rechazar la H_0
 $P > 0.05$ = No existe evidencia estadística para rechazar H_0

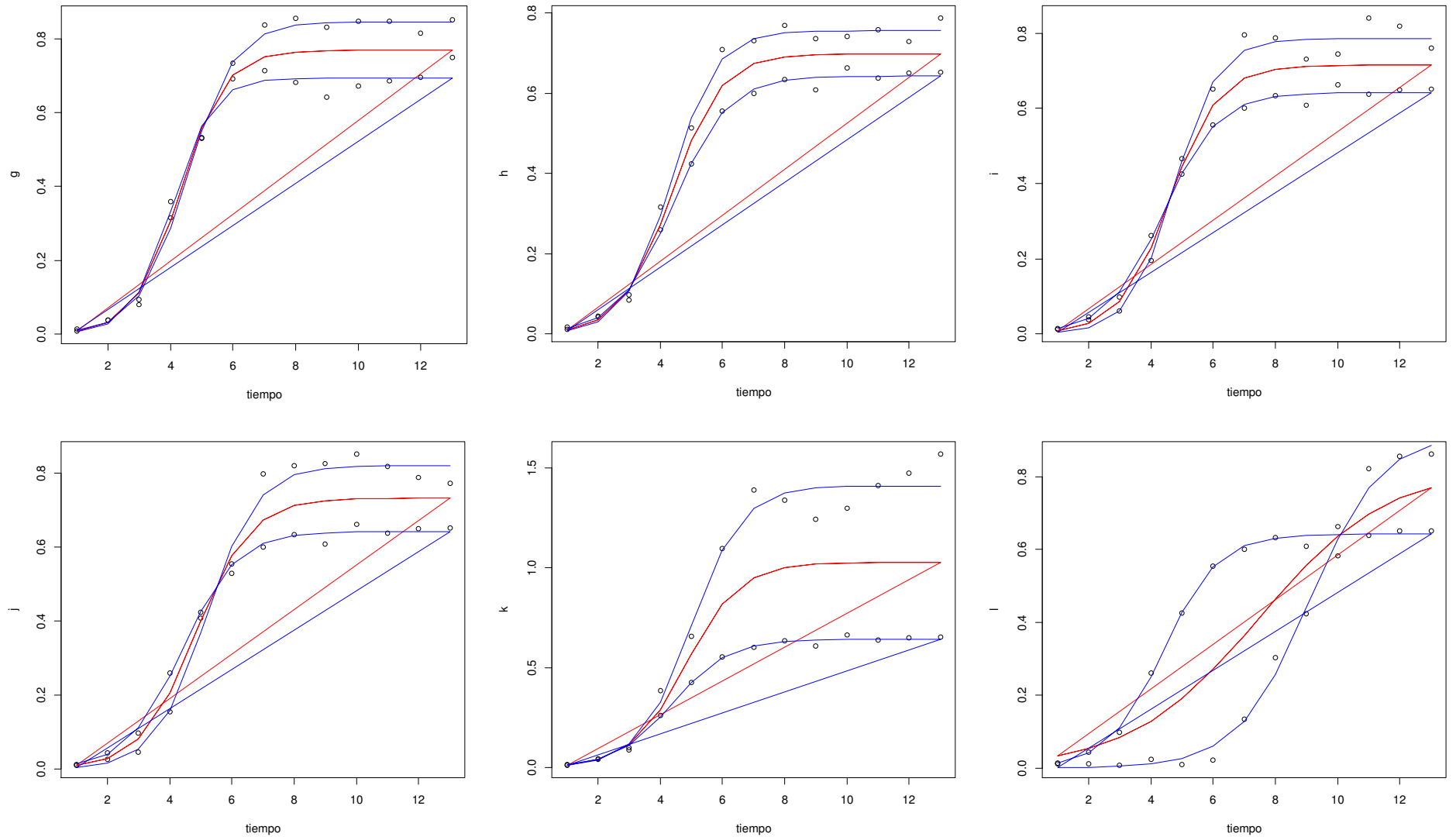
Grafico	Tratamientos en comparación	Valor P	H_0 ó H_1
a	Sin Tratamiento v.s. Tween 80	0.000001096	H_1
b	Sin Tratamiento v.s. Sacarosa	0.004128	H_1
c	Sin Tratamiento v.s Citrato de Amonio	0.0000613	H_1
d	Sin Tratamiento v.s Ácido Ascórbico	0.00000182	H_1
e	Sin Tratamiento v.s Sulfato de Magnesio	0.000000113	H_1
f	Sin Tratamiento v.s Acetato de Sodio	0.00000000000000007749	H_1
g	Sin Tratamiento v.s Fosfato Dipotásico	0.000000002057	H_1
h	Tween 80 v.s. Sacarosa	0.000000000224	H_1
i	Tween 80 v.s. Citrato de Amonio	0.00000001008	H_1
j	Tween 80 v.s. Ácido Ascórbico	0.000000008934	H_1
k	Tween 80 v.s. Sulfato de Magnesio	0.00000000000000210	H_1
l	Tween 80 v.s. Acetato de Sodio	0.00000000000000022	H_1
m	Tween 80 v.s. Fosfato Dipotásico	0.0000002057	H_1
n	Sacarosa v.s. Citrato de Amonio	0.0127	H_1
ñ	Sacarosa v.s. Ácido Ascórbico	0.00006794	H_1
o	Sacarosa v.s. Sulfato de Magnesio	0.000000000000891	H_1
p	Sacarosa v.s. Acetato de Sodio	0.00000000000000022	H_1

Grafico	Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ o H ₁
q	Sacarosa v.s. Fosfato Dipotásico	0.000001656	H ₁
r	Citrato de Amonio v.s. Ácido Ascórbico	0.08898	H ₀
s	Citrato de Amonio v.s Sulfato de Magnesio	0.0000000000003377	H ₁
t	Citrato de Amonio v.s Acetato de Sodio	0.00000000000001478	H ₁
u	Citrato de Amonio v.s. Fosfato Dipotásico	0.003640	H ₁
v	Ácido Ascórbico v.s. Sulfato de Magnesio	0.000000000006177	H ₁
w	Ácido Ascórbico v.s Acetato de sodio	0.0000000000001412	H ₁
x	Ácido Ascórbico v.s Fosfato Dipotásico	0.00004592	H ₁
y	Sulfato de Magnesio v.s. Acetato de sodio	0.000000000000006534	H ₁
z	Sulfato de Magnesio v.s Fosfato Dipotásico	0.0000000000124	H ₁
zz	Acetato de Sodio v.s. Fosfato Dipotásico	0.00000000000022	H ₁



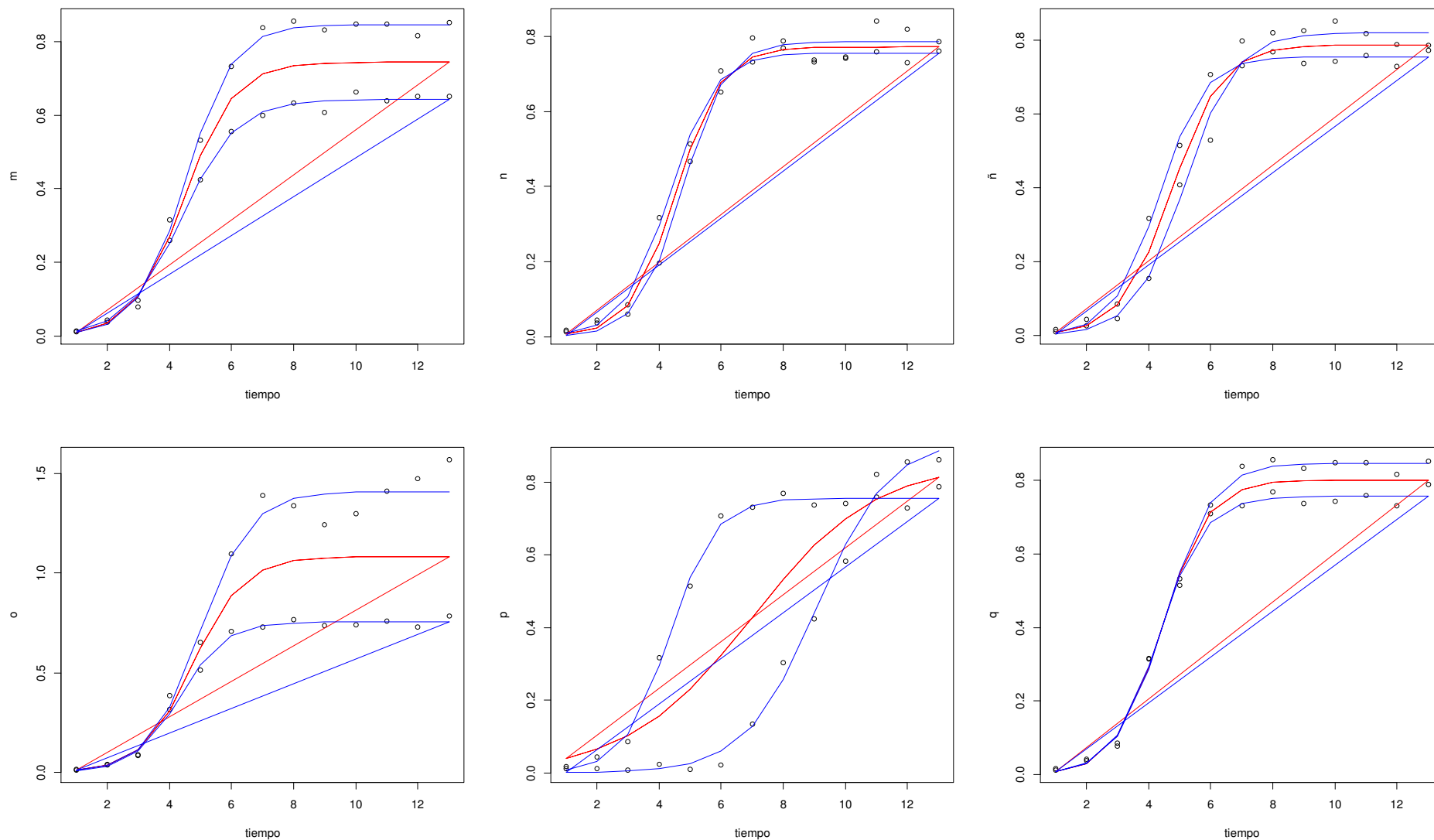
a) Cinética sin tratamiento y la cinética con Tween 80. **b)** Cinética sin tratamiento y la cinética con Sacarosa. **c)** Cinética sin tratamiento y la cinética con Citrato de Amonio. **d)** Cinética sin tratamiento y la cinética con Ácido Ascórbico. **e)** Cinética sin tratamiento y la cinética con Sulfato de Magnesio. **f)** Cinética sin tratamiento y la cinética con Acetato de Sodio.

Regresión no lineal con el modelo Logístico. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio LBf. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. LB = Medio Luria Bertani fortificado. 10X= Concentrado 10 veces



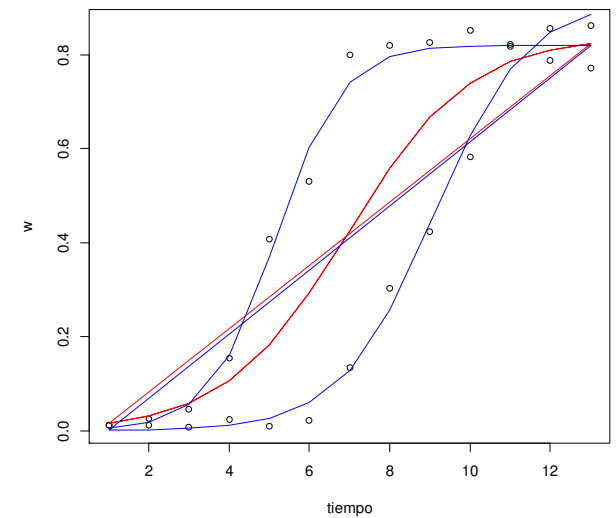
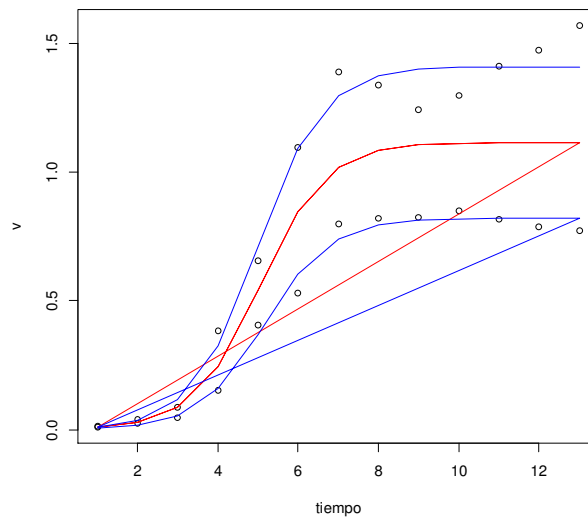
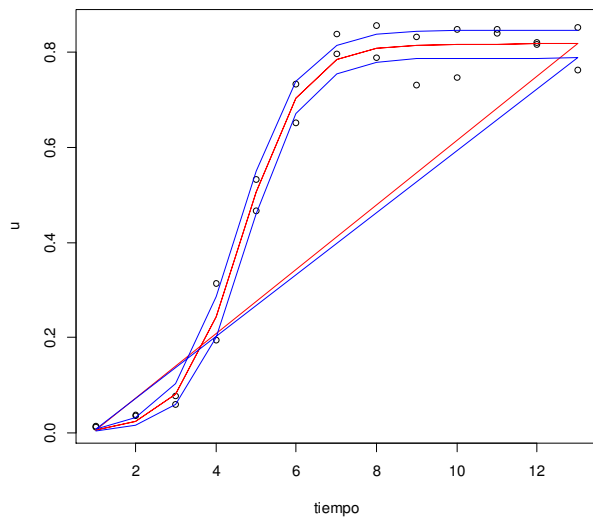
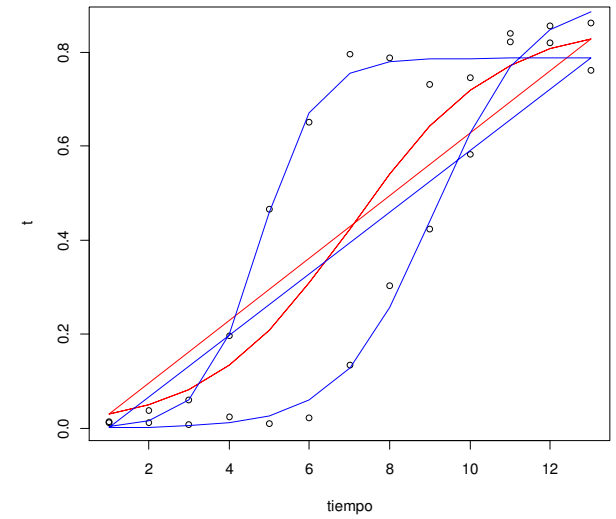
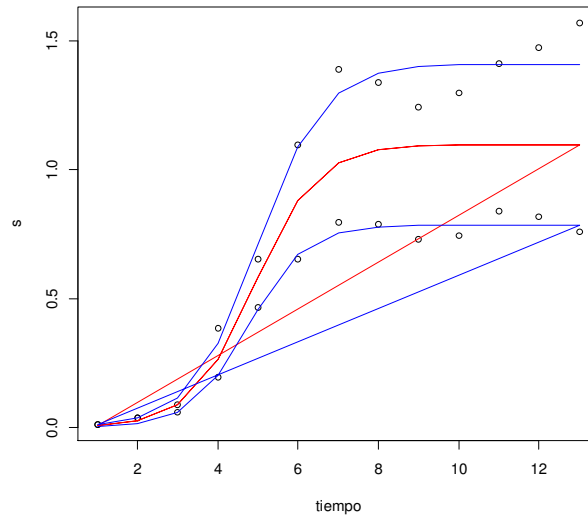
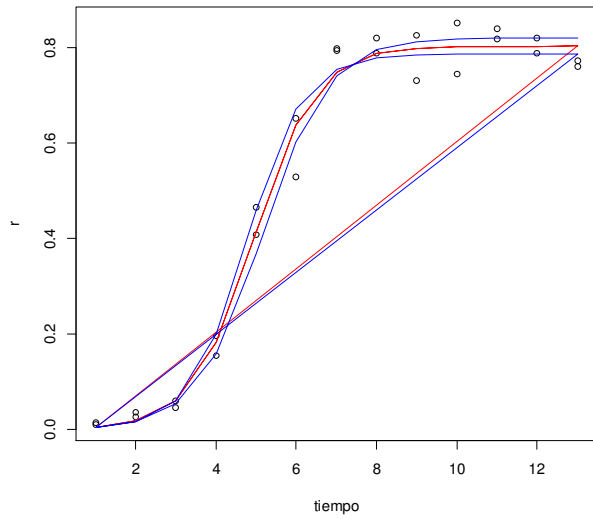
g) Cinética sin tratamiento y la cinética con Fosfato Dipotásico. **h)** Cinética con Tween 80 y la cinética con Sacarosa. **i)** Cinética con Tween 80 y la cinética con Citrato de Amonio. **j)** Cinética con Tween 80 y la cinética con Ácido Ascórbico. **k)** Cinética con Tween 80 y la cinética con Sulfato de Magnesio. **l)** Cinética con Tween 80 y la cinética con Acetato de Sodio.

Regresión no lineal con el modelo Logístico. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio LBf. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. LB = Medio Luria Bertani fortificado. 10X= Concentrado 10 veces



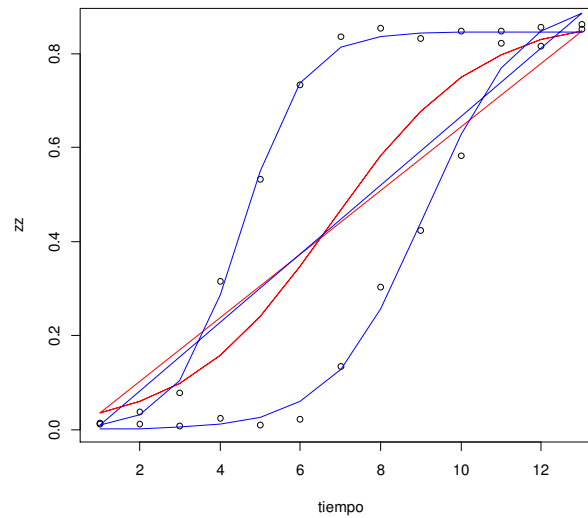
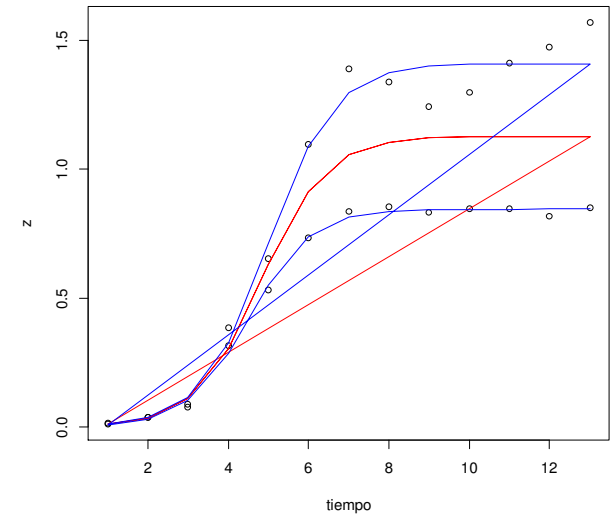
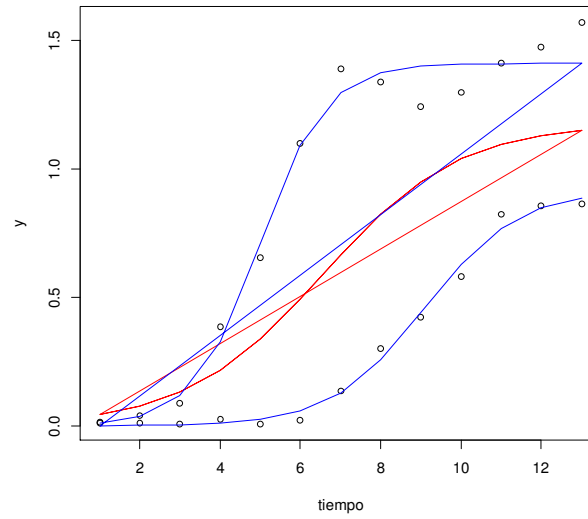
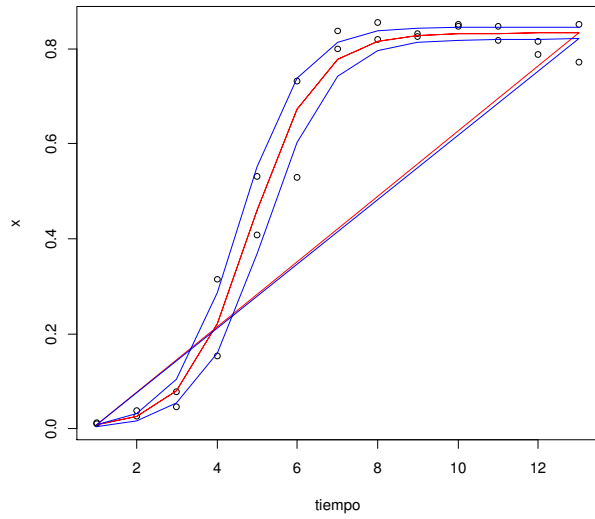
m) Cinética con Tween 80 y la cinética con Fosfato Dipotásico. **n)** Cinética con Sacarosa y la cinética con Citrato de Amonio. **ñ)** Cinética con Sacarosa y la cinética con Ácidos Ascórbico. **o)** Cinética con Sacarosa y la cinética con Sulfato de Magnesio. **p)** Cinética con Sacarosa y la cinética con Acetato de Sodio. **q)** Cinética con Sacarosa y la cinética con Fosfato Dipotásico.

Regresión no lineal con el modelo Logístico. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio LBf. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. LB = Medio Luria Bertani fortificado. 10X= Concentrado 10 veces



r) Cinética con Citrato de Amonio y la cinética con Ácido Ascórbico. **s)** Cinética con Citrato de Amonio y la cinética con Sulfato de Magnesio. **t)** Cinética con Citrato de Amonio y la cinética con Acetato de Sodio. **u)** Cinética con Citrato de Amonio y la cinética con Fosfato Dipotásico. **v)** Cinética con Ácido Ascórbico y la cinética con Sulfato de Magnesio. **w)** Cinética con Ácido Ascórbico y la cinética con Acetato de Sodio.

Regresión no lineal con el modelo Logístico. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio LBf. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. LB = Medio Luria Bertani fortificado. 10X= Concentrado 10 veces



x) Cinética con Ácido Ascórbico y la cinética con Fosfato Dipotásico. **y)** Cinética con Sulfato de Magnesio y la cinética con Acetato de Sodio. **z)** Cinética con Sulfato de Magnesio y la cinética con Fosfato Dipotásico. **zz)** Cinética con Acetato de Sodio y la cinética con Fosfato Dipotásico.

Regresión no lineal con el modelo Logístico. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio LBf. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. LB = Medio Luria Bertani fortificado. 10X= Concentrado 10 veces

ANEXO 6

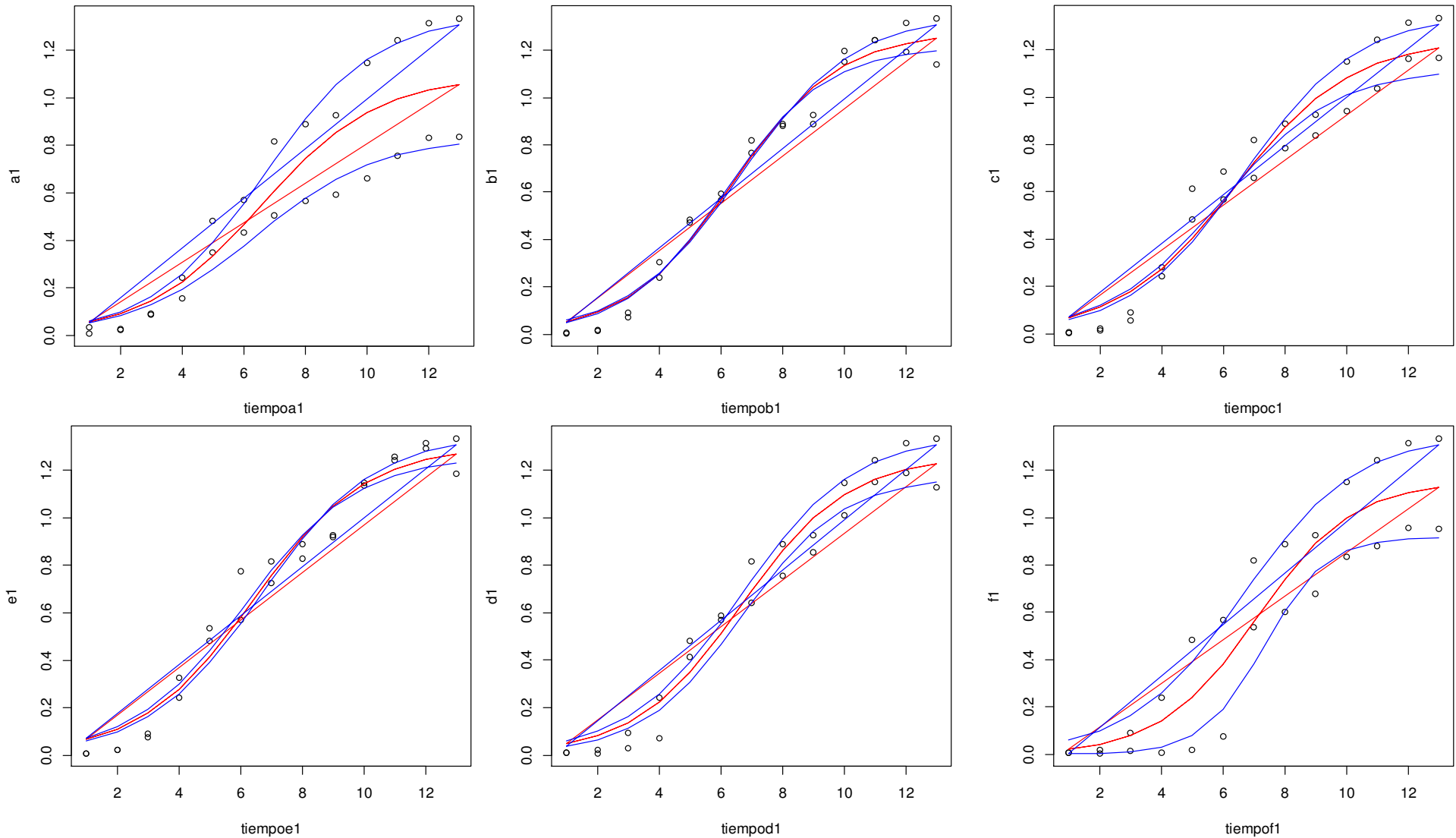
Cuadro 24. Análisis de Varianza de los modelos Logísticos para las cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm en medio King “A”.

$H_0 = \mu_1 = \mu_2$
 $H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$

$p < 0.05$ = Existe evidencia estadística para rechazar la H_0
 $P > 0.05$ = No existe evidencia estadística para rechazar H_0

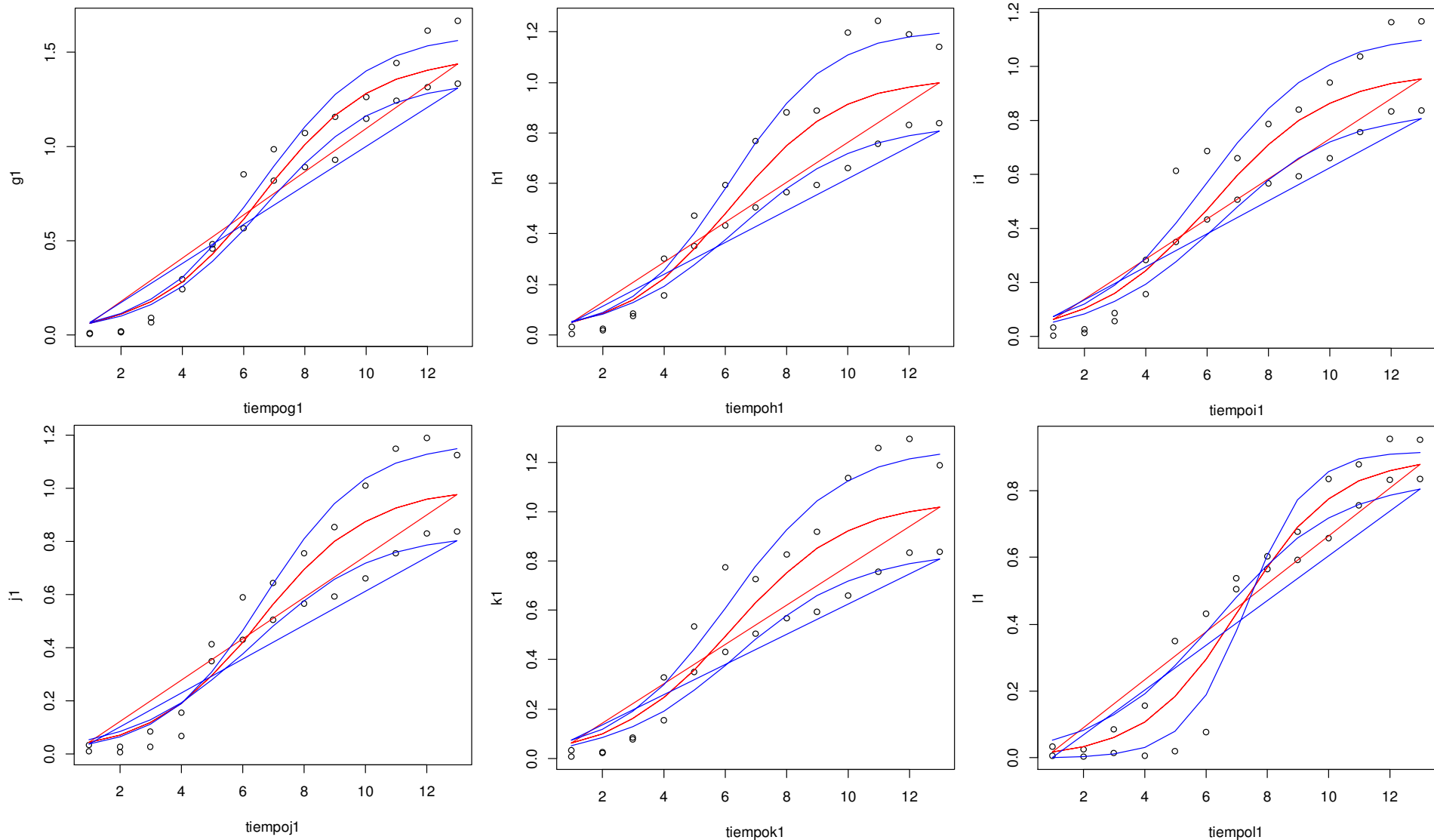
Grafico	Tratamientos en comparación	Valor P	H_0 o H_1
a1	Sin Tratamiento v.s. Tween 80	0.0000000005017	H_1
b1	Sin Tratamiento v.s. Sacarosa	0.4341	H_0
c1	Sin Tratamiento v.s. Citrato de Amonio	0.04459	H_1
d1	Sin Tratamiento v.s. Ácido Ascórbico	0.02495	H_1
e1	Sin Tratamiento v.s. Sulfato de Magnesio	0.6763	H_0
f1	Sin Tratamiento v.s. Acetato de Sodio	0.00000002322	H_1
g1	Sin Tratamiento v.s. Fosfato Dipotásico	0.001427	H_1
h1	Tween 80 v.s. Sacarosa	0.00000002113	H_1
i1	Tween 80 v.s. Citrato de Amonio	0.00003437	H_1
j1	Tween 80 v.s. Ácido Ascórbico	0.00001884	H_1
k1	Tween 80 v.s. Sulfato de Magnesio	0.0000001828	H_1
l1	Tween 80 v.s. Acetato de Sodio	0.0002745	H_1
m1	Tween 80 v.s. Fosfato Dipotásico	0.0000000009134	H_1
n1	Sacarosa v.s. Citrato de Amonio	0.3425	H_0
ñ1	Sacarosa v.s. Ácido Ascórbico	0.1759	H_1
o1	Sacarosa v.s. Sulfato de Magnesio	0.8566	H_0
p1	Sacarosa v.s. Acetato de Sodio	0.0000003068	H_1

Grafico	Tratamientos en comparación	Valor P	H₀ o H₁
q1	Sacarosa v.s. Fosfato Dipotásico	0.0002838	H ₁
r1	Citrato de Amonio v.s. Ácido Ascórbico	0.3573	H ₀
s1	Citrato de Amonio v.s Sulfato de Magnesio	0.2958	H ₀
t1	Citrato de Amonio v.s Acetato de Sodio	0.00003438	H ₁
u1	Citrato de Amonio v.s. Fosfato Dipotásico	0.00004153	H ₁
v1	Ácido Ascórbico v.s. Sulfato de Magnesio	0.08699	H ₀
w1	Ácido Ascórbico v.s Acetato de sodio	0.00004787	H ₁
x1	Ácido Ascórbico v.s Fosfato Dipotásico	0.00001066	H ₁
y1	Sulfato de Magnesio v.s. Acetato de sodio	0.0000008475	H ₁
z1	Sulfato de Magnesio v.s Fosfato Dipotásico	0.001962	H ₁
zz1	Acetato de Sodio v.s. Fosfato Dipotásico	0.000000001163	H ₁



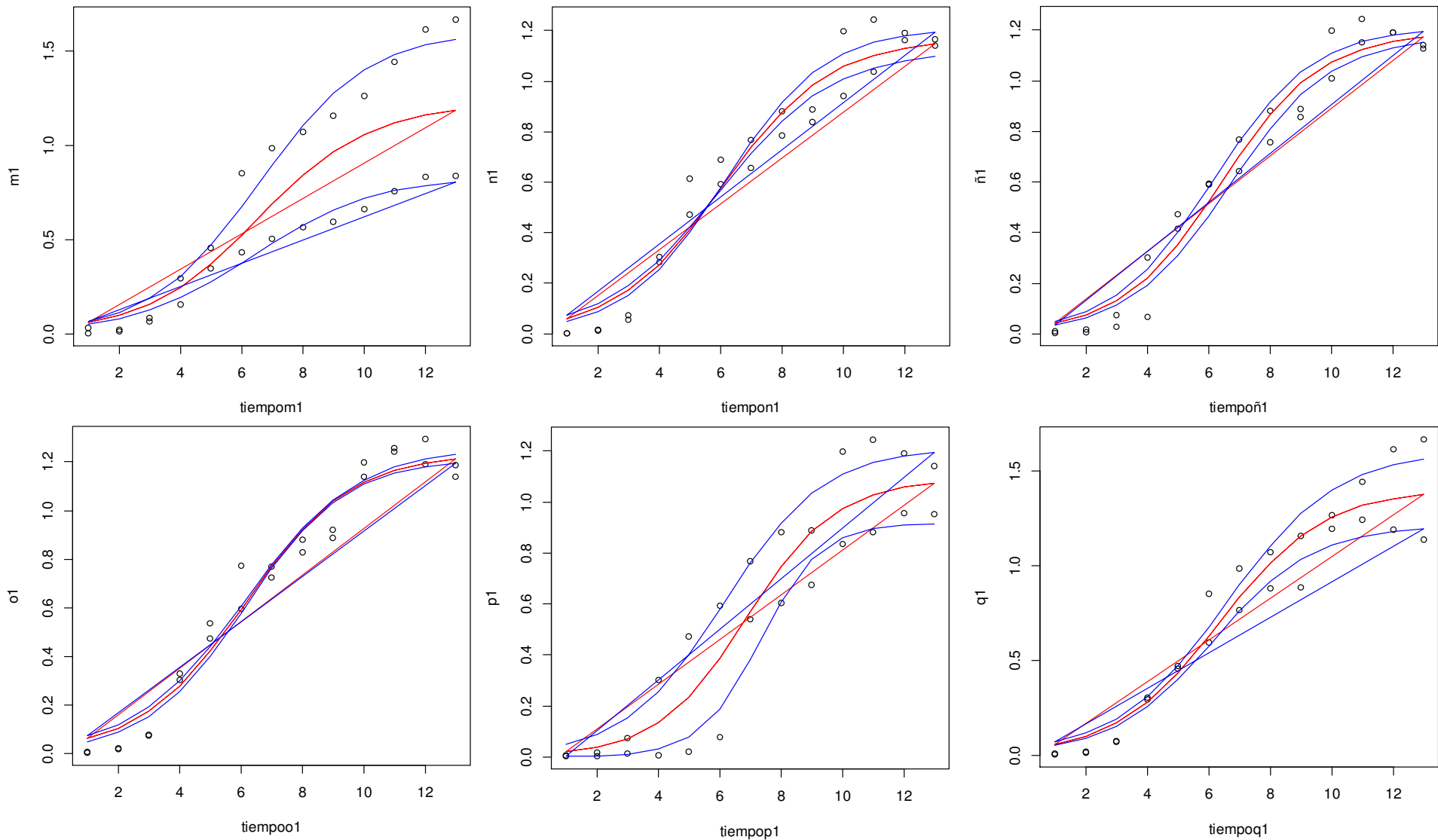
a1) Cinética sin tratamiento y la cinética con Tween 80. **b1)** Cinética sin tratamiento y la cinética con Sacarosa. **c1)** Cinética sin tratamiento y la cinética con Citrato de Amonio. **d1)** Cinética sin tratamiento y la cinética con Ácido Ascórbico. **e1)** Cinética sin tratamiento y la cinética con Sulfato de Magnesio. **f1)** Cinética sin tratamiento y la cinética con Acetato de Sodio.

Regresión no lineal con el modelo Logístico. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KA. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KA = Medio King "A". 10X= Concentrado 10 veces



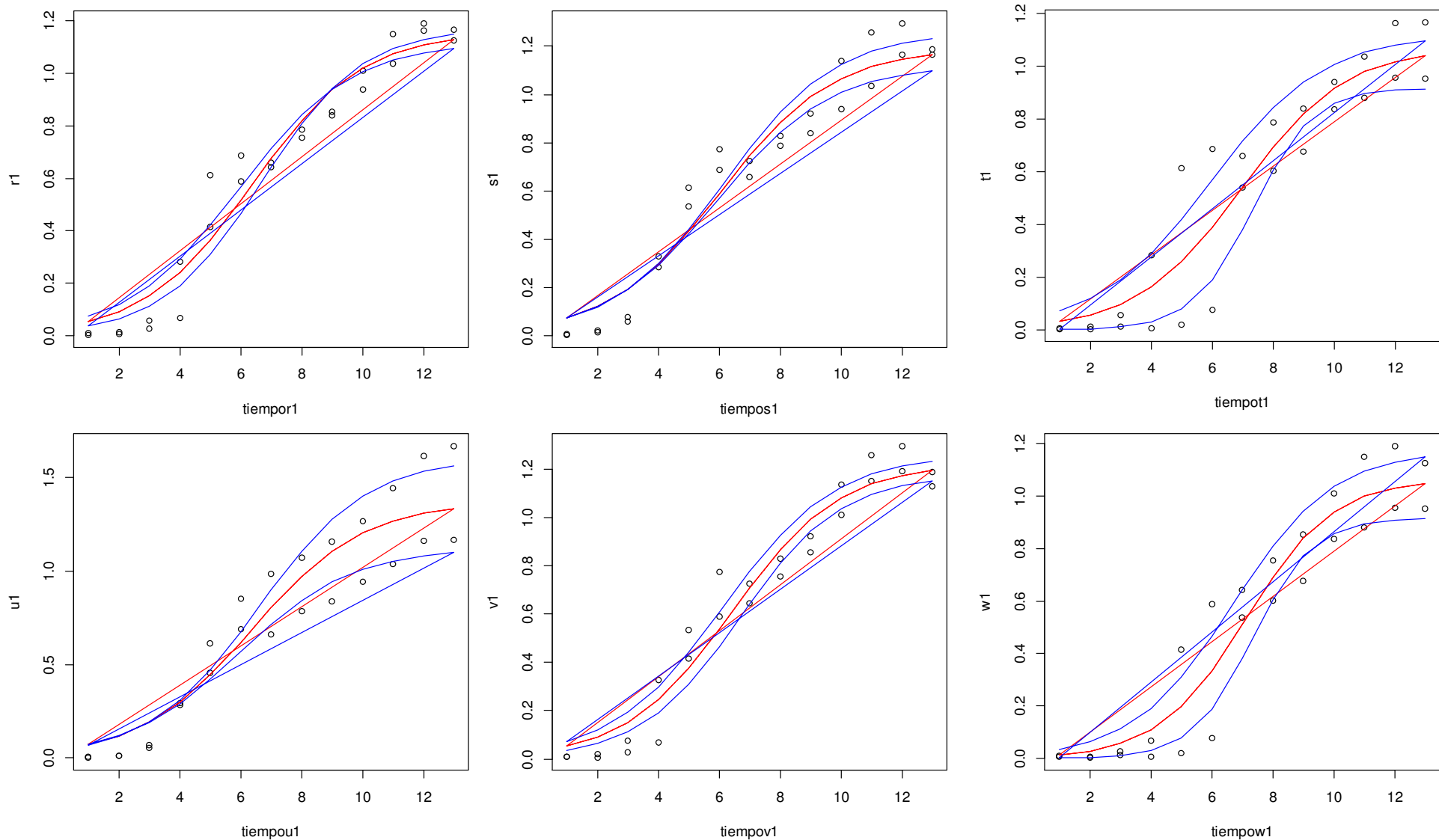
g1) Cinética sin tratamiento y la cinética con Fosfato Dipotásico. **h1)** Cinética con Tween 80 y la cinética con Sacarosa. **i1)** Cinética con Tween 80 y la cinética con Citrato de Amonio. **j1)** Cinética con Tween 80 y la cinética con Ácido Ascórbico. **k1)** Cinética con Tween 80 y la cinética con Sulfato de Magnesio. **l1)** Cinética con Tween 80 y la cinética con Acetato de Sodio.

Regresión no lineal con el modelo Logístico. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KA. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KA = Medio King "A". 10X= Concentrado 10 veces



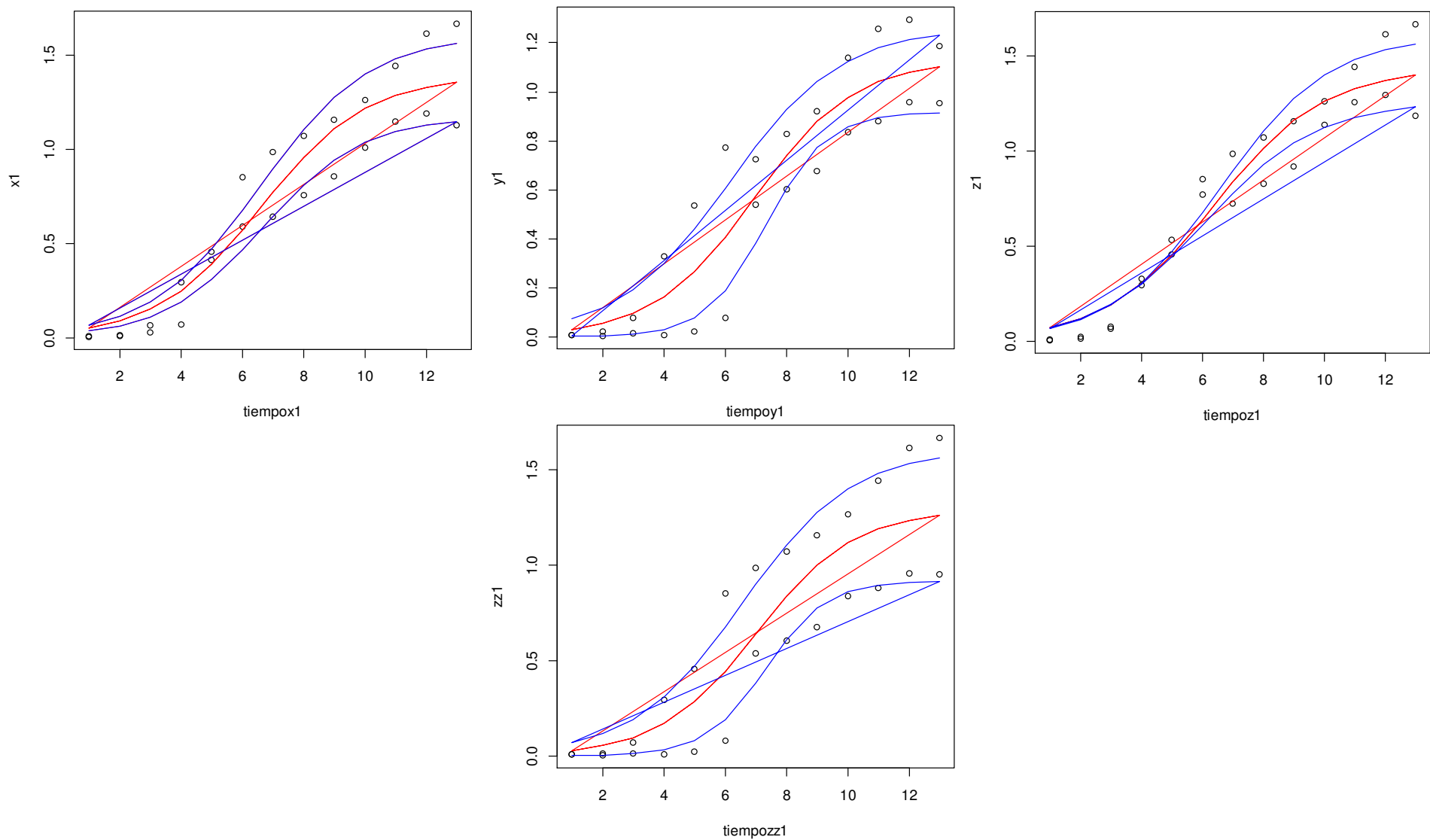
m1) Cinética con Tween 80 y la cinética con Fosfato Dipotásico. **n1)** Cinética con Sacarosa y la cinética con Citrato de Amonio. **ñ1)** Cinética con Sacarosa y la cinética con Ácidos Ascórbico. **o1)** Cinética con Sacarosa y la cinética con Sulfato de Magnesio. **p1)** Cinética con Sacarosa y la cinética con Acetato de Sodio. **q1)** Cinética con Sacarosa y la cinética con Fosfato Dipotásico.

Regresión no lineal con el modelo Logístico. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KA. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KA = Medio King "A". 10X= Concentrado 10 veces



r1) Cinética con Citrato de Amonio y la cinética con Ácido Ascórbico. **s1)** Cinética con Citrato de Amonio y la cinética con Sulfato de Magnesio. **t1)** Cinética con Citrato de Amonio y la cinética con Acetato de Sodio. **u1)** Cinética con Citrato de Amonio y la cinética con Fosfato Dipotásico. **v1)** Cinética con Ácido Ascórbico y la cinética con Sulfato de Magnesio. **w1)** Cinética con Ácido Ascórbico y la cinética con Acetato de Sodio.

Regresión no lineal con el modelo Logístico. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KA. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KA = Medio King "A". 10X= Concentrado 10 veces



x1) Cinética con Ácido Ascórbico y la cinética con Fosfato Dipotásico. **y1)** Cinética con Sulfato de Magnesio y la cinética con Acetato de Sodio. **z1)** Cinética con Sulfato de Magnesio y la cinética con Fosfato Dipotásico. **zz1)** Cinética con Acetato de Sodio y la cinética con Fosfato Dipotásico.

Regresión no lineal con el modelo Logístico. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KA. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KA = Medio King "A". 10X= Concentrado 10 veces

ANEXO 7

Cuadro 25. Análisis de Varianza de los modelos Logísticos para las cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm en medio King “B”.

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

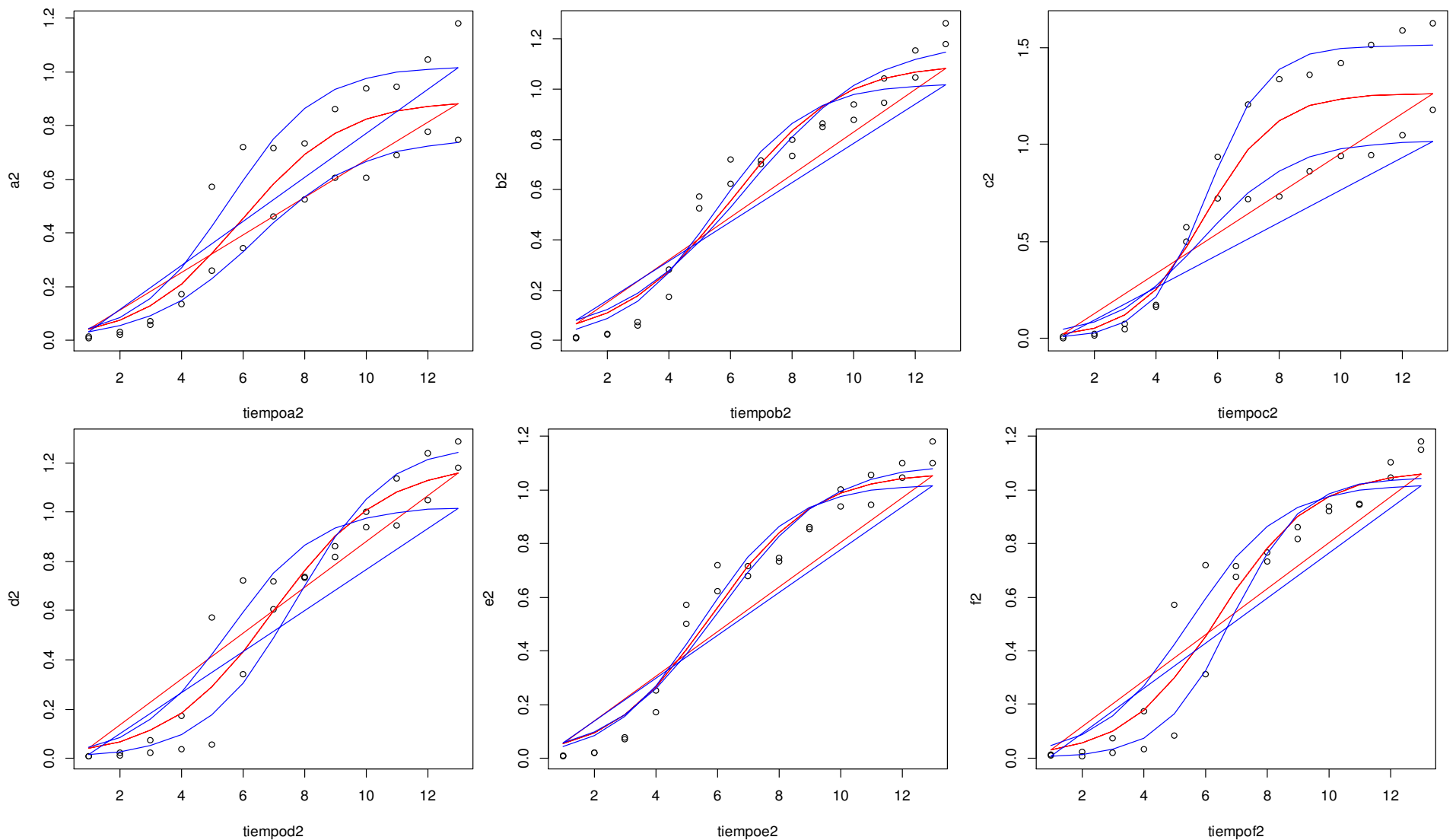
$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

$p < 0.05$ = Existe evidencia estadística para rechazar la H_0

$P > 0.05$ = No existe evidencia estadística para rechazar H_0

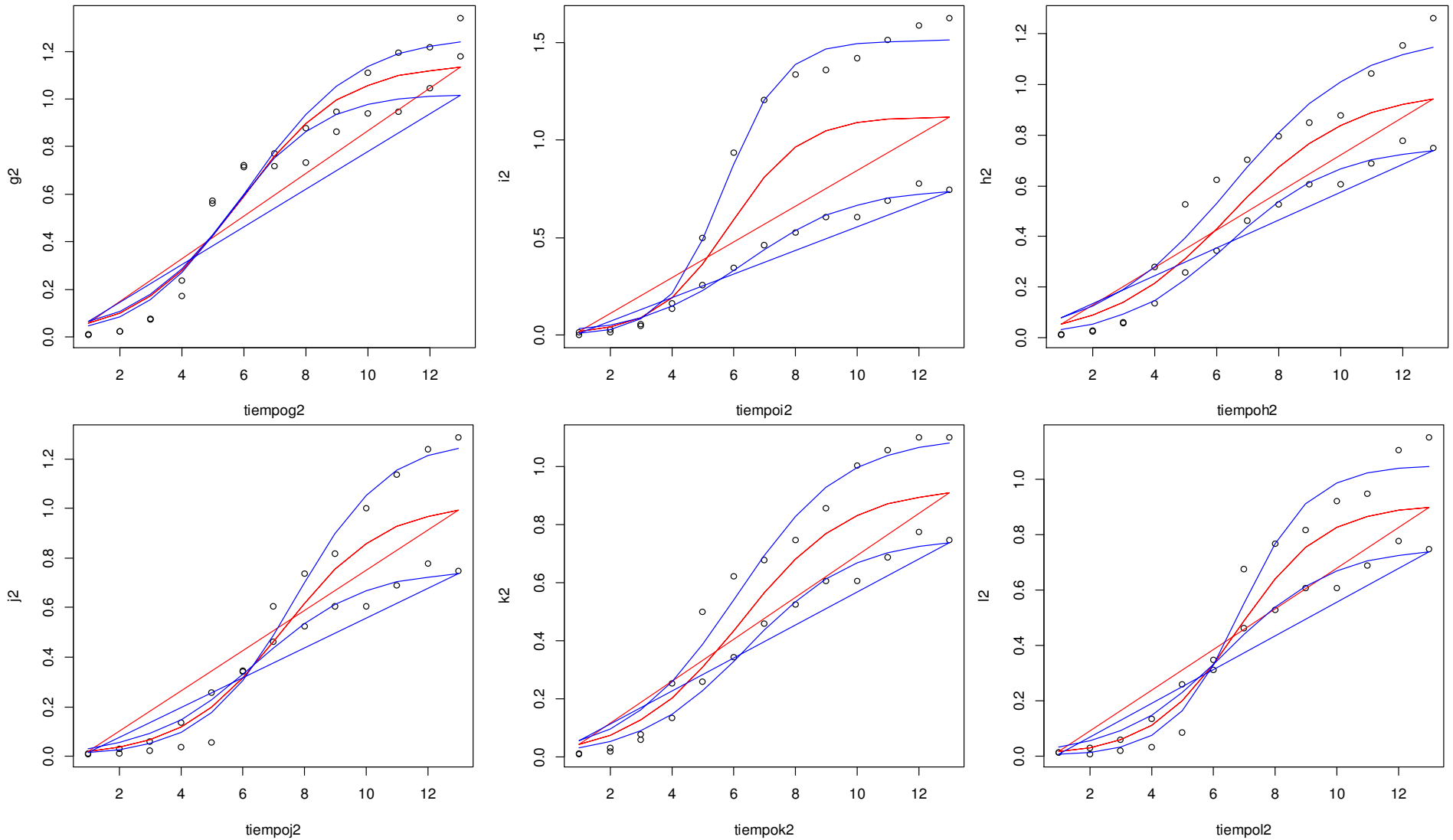
Grafico	Tratamientos en comparación	Valor P	H_0 o H_1
a2	Sin Tratamiento v.s. Tween 80	0.000002686	H_1
b2	Sin Tratamiento v.s. Sacarosa	0.6674	H_0
c2	Sin Tratamiento v.s. Citrato de Amonio	0.0000001513	H_1
d2	Sin Tratamiento v.s. Ácido Ascórbico	0.001367	H_1
e2	Sin Tratamiento v.s. Sulfato de Magnesio	0.8675	H_0
f2	Sin Tratamiento v.s. Acetato de Sodio	0.008382	H_1
g2	Sin Tratamiento v.s. Fosfato Dipotásico	0.06159	H_0
h2	Tween 80 v.s. Sacarosa	0.0000002229	H_1
i2	Tween 80 v.s. Citrato de Amonio	0.0000002229	H_1
j2	Tween 80 v.s. Ácido Ascórbico	0.000000008244	H_1
k2	Tween 80 v.s. Sulfato de Magnesio	0.000000004778	H_1
l2	Tween 80 v.s. Acetato de Sodio	0.0000002682	H_1
m2	Tween 80 v.s. Fosfato Dipotásico	0.000000004194	H_1
n2	Sacarosa v.s. Citrato de Amonio	0.0000001084	H_1
ñ2	Sacarosa v.s. Ácido Ascórbico	0.004458	H_1
o2	Sacarosa v.s. Sulfato de Magnesio	0.8752	H_0
p2	Sacarosa v.s. Acetato de Sodio	0.007734	H_1

Grafico	Tratamientos en comparación	Valor P	H₀ o H₁
q2	Sacarosa v.s. Fosfato Dipotásico	0.1746	H ₀
r2	Citrato de Amonio v.s. Ácido Ascórbico	0.00000000377	H ₁
s2	Citrato de Amonio v.s Sulfato de Magnesio	0.00000000003773	H ₁
t2	Citrato de Amonio v.s Acetato de Sodio	0.00000000002732	H ₁
u2	Citrato de Amonio v.s. Fosfato Dipotásico	0.000000247	H ₁
v2	Ácido Ascórbico v.s. Sulfato de Magnesio	0.000398	H ₁
w2	Ácido Ascórbico v.s Acetato de sodio	0.0747	H ₀
x2	Ácido Ascórbico v.s Fosfato Dipotásico	0.0002492	H ₁
y2	Sulfato de Magnesio v.s. Acetato de sodio	0.002952	H ₁
z2	Sulfato de Magnesio v.s Fosfato Dipotásico	0.03558	H ₁
zz2	Acetato de Sodio v.s. Fosfato Dipotásico	0.0001271	H ₁



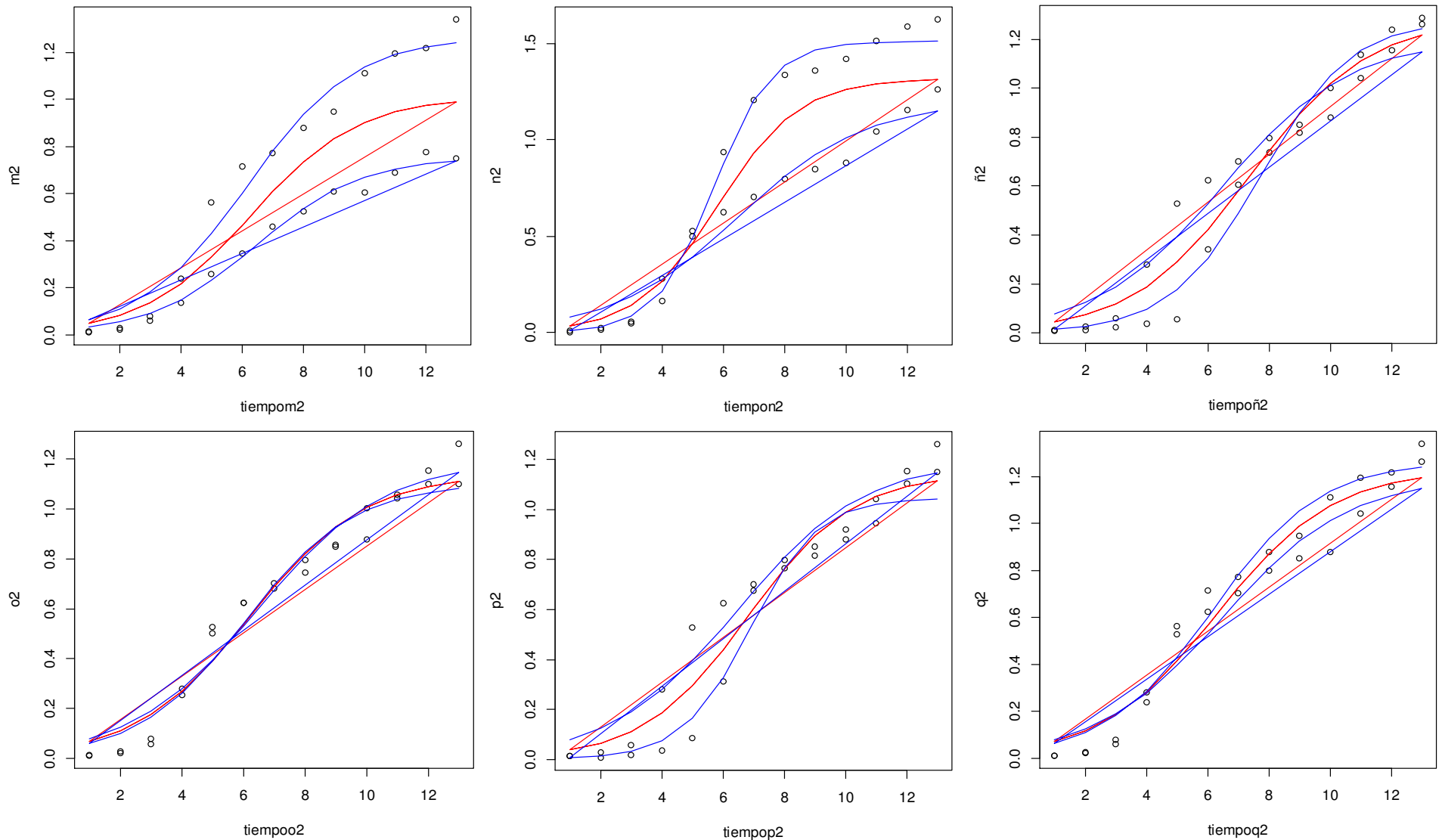
a2) Cinética sin tratamiento y la cinética con Tween 80. **b2)** Cinética sin tratamiento y la cinética con Sacarosa. **c2)** Cinética sin tratamiento y la cinética con Citrato de Amonio. **d2)** Cinética sin tratamiento y la cinética con Ácido Ascórbico. **e2)** Cinética sin tratamiento y la cinética con Sulfato de Magnesio. **f2)** Cinética sin tratamiento y la cinética con Acetato de Sodio.

Regresión no lineal con el modelo Logístico. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KB. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KB = Medio King "B". 10X= Concentrado 10 veces



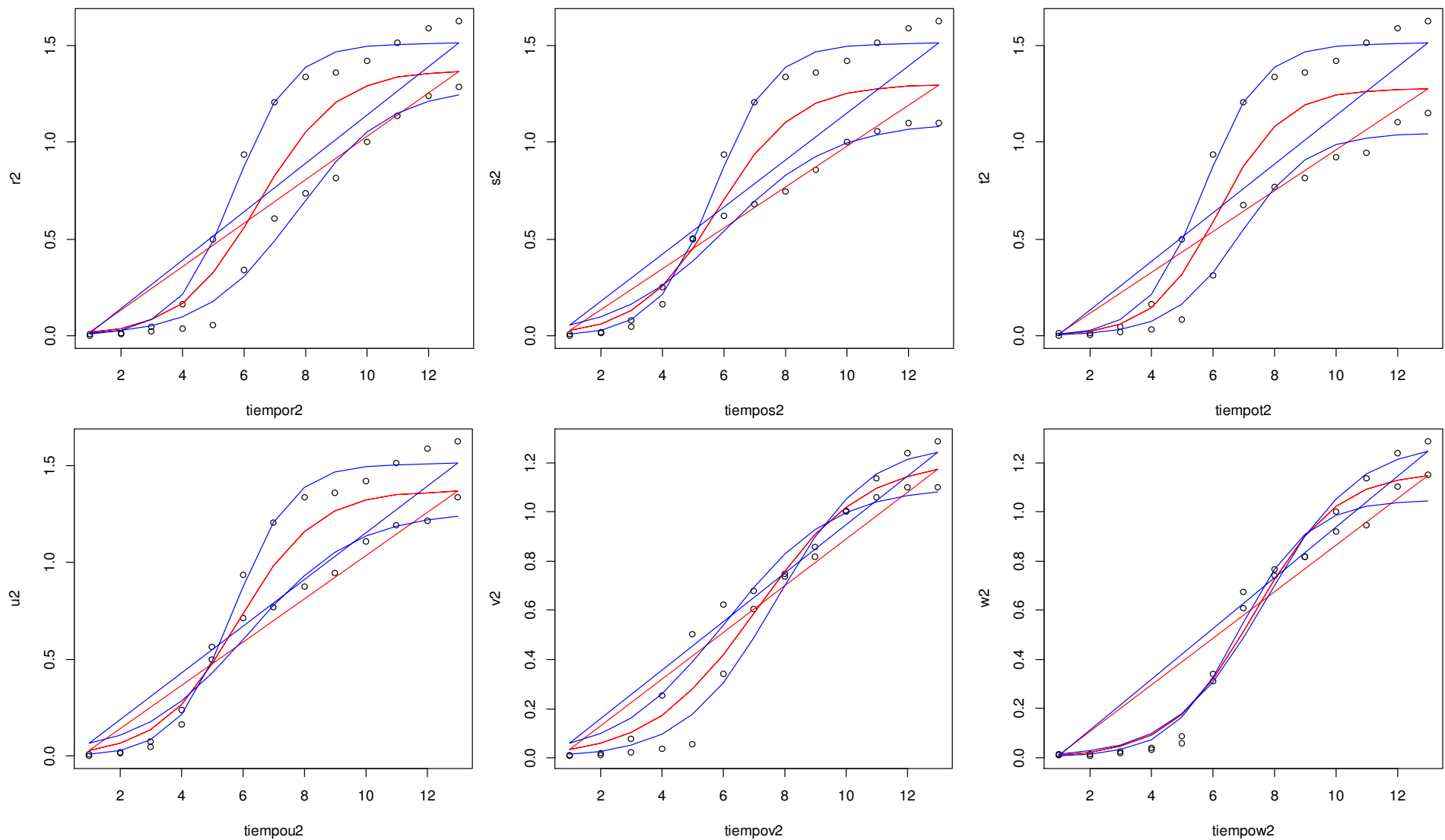
g2) Cinética sin tratamiento y la cinética con Fosfato Dipotásico. **h2)** Cinética con Tween 80 y la cinética con Sacarosa. **i2)** Cinética con Tween 80 y la cinética con Citrato de Amonio. **j2)** Cinética con Tween 80 y la cinética con Ácido Ascórbico. **k2)** Cinética con Tween 80 y la cinética con Sulfato de Magnesio. **l2)** Cinética con Tween 80 y la cinética con Acetato de Sodio.

Regresión no lineal con el modelo Logístico. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KB. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KB = Medio King "B". 10X= Concentrado 10 veces



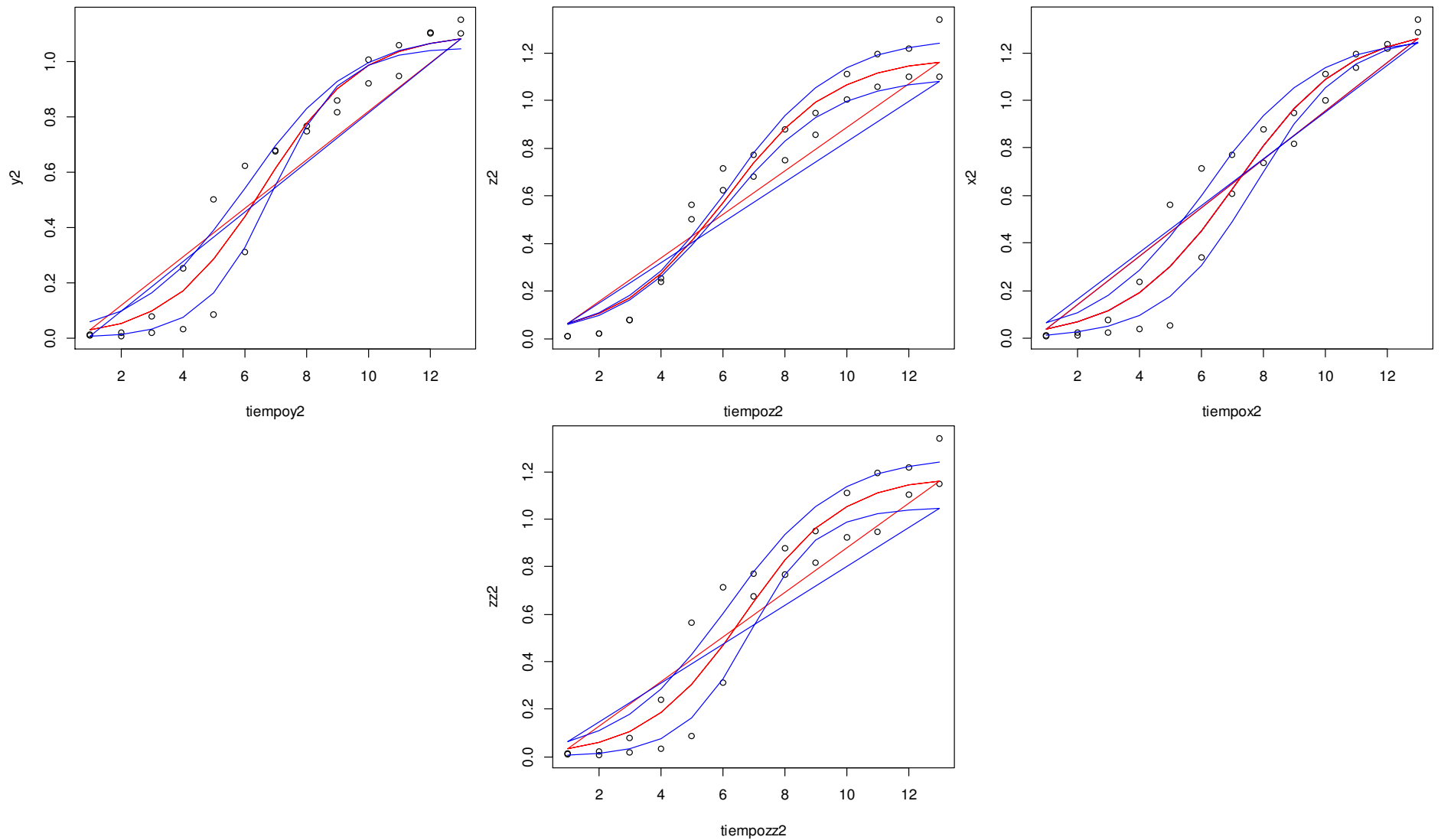
m2) Cinética con Tween 80 y la cinética con Fosfato Dipotásico. **n2)** Cinética con Sacarosa y la cinética con Citrato de Amonio. **ñ2)** Cinética con Sacarosa y la cinética con Ácidos Ascórbico. **o2)** Cinética con Sacarosa y la cinética con Sulfato de Magnesio. **p2)** Cinética con Sacarosa y la cinética con Acetato de Sodio. **q2)** Cinética con Sacarosa y la cinética con Fosfato Dipotásico.

Regresión no lineal con el modelo Logístico. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KB. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KB = Medio King "B". 10X= Concentrado 10 veces



r2) Cinética con Citrato de Amonio y la cinética con Ácido Ascórbico. **s2)** Cinética con Citrato de Amonio y la cinética con Sulfato de Magnesio. **t2)** Cinética con Citrato de Amonio y la cinética con Acetato de Sodio. **u2)** Cinética con Citrato de Amonio y la cinética con Fosfato Dipotásico. **v2)** Cinética con Ácido Ascórbico y la cinética con Sulfato de Magnesio. **w2)** Cinética con Ácido Ascórbico y la cinética con Acetato de Sodio.

Regresión no lineal con el modelo Logístico. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KB. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KB = Medio King "B". 10X= Concentrado 10 veces



x2) Cinética con Ácido Ascórbico y la cinética con Fosfato Dipotásico. **y2)** Cinética con Sulfato de Magnesio y la cinética con Acetato de Sodio. **z2)** Cinética con Sulfato de Magnesio y la cinética con Fosfato Dipotásico. **zz2)** Cinética con Acetato de Sodio y la cinética con Fosfato Dipotásico.

Regresión no lineal con el modelo Logístico. Cinéticas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medio KB. La curva roja de cada gráfica indica la regresión no lineal estimada entre las dos cinéticas analizadas. Las curvas azules indican la regresión no lineal de cada uno de los tratamientos. KB = Medio King "B". 10X= Concentrado 10 veces

ANEXO 8

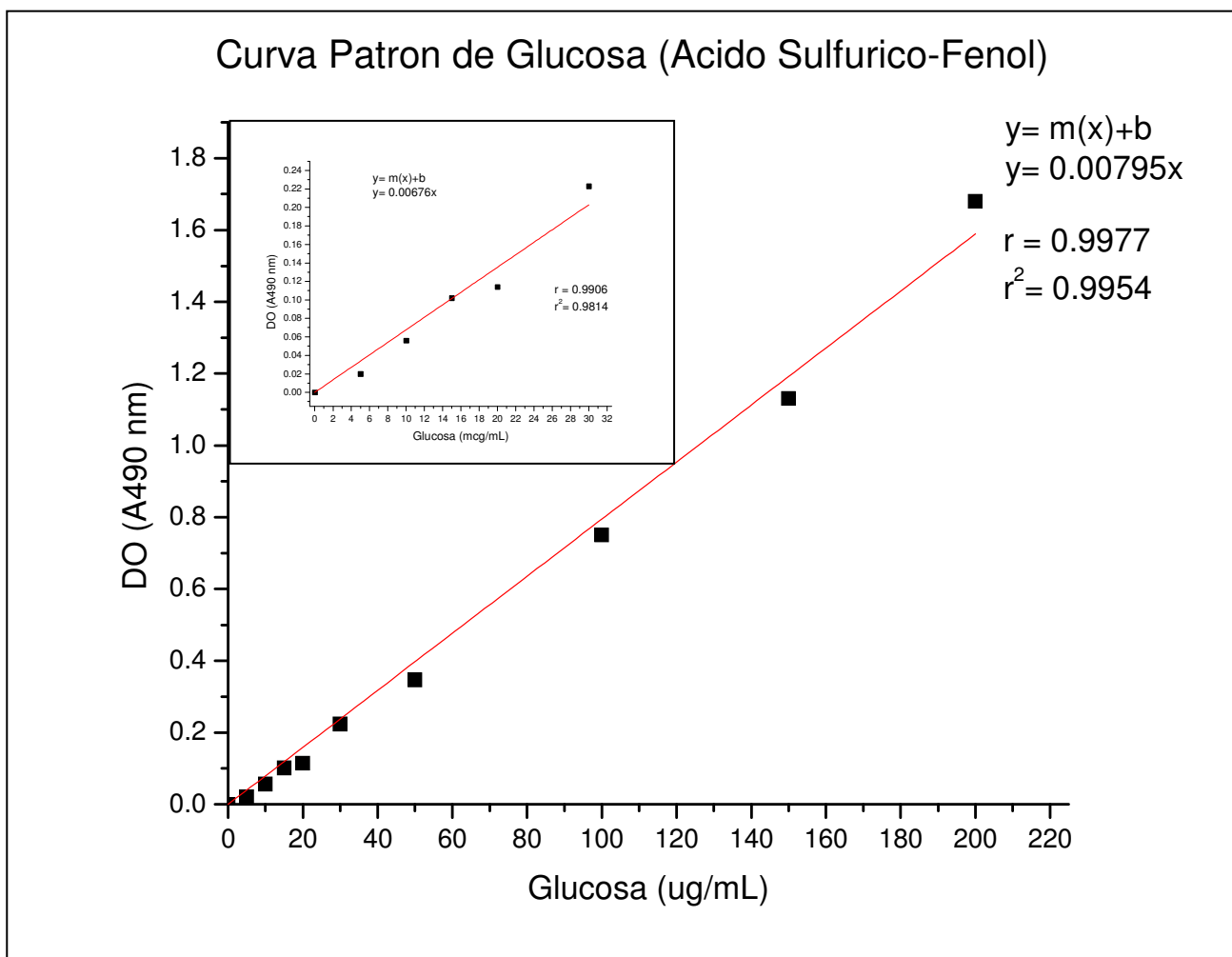


Figura 53. Curvas Patrón de Glucosa por método de Ácido Sulfúrico-Fenol.

ANEXO 9

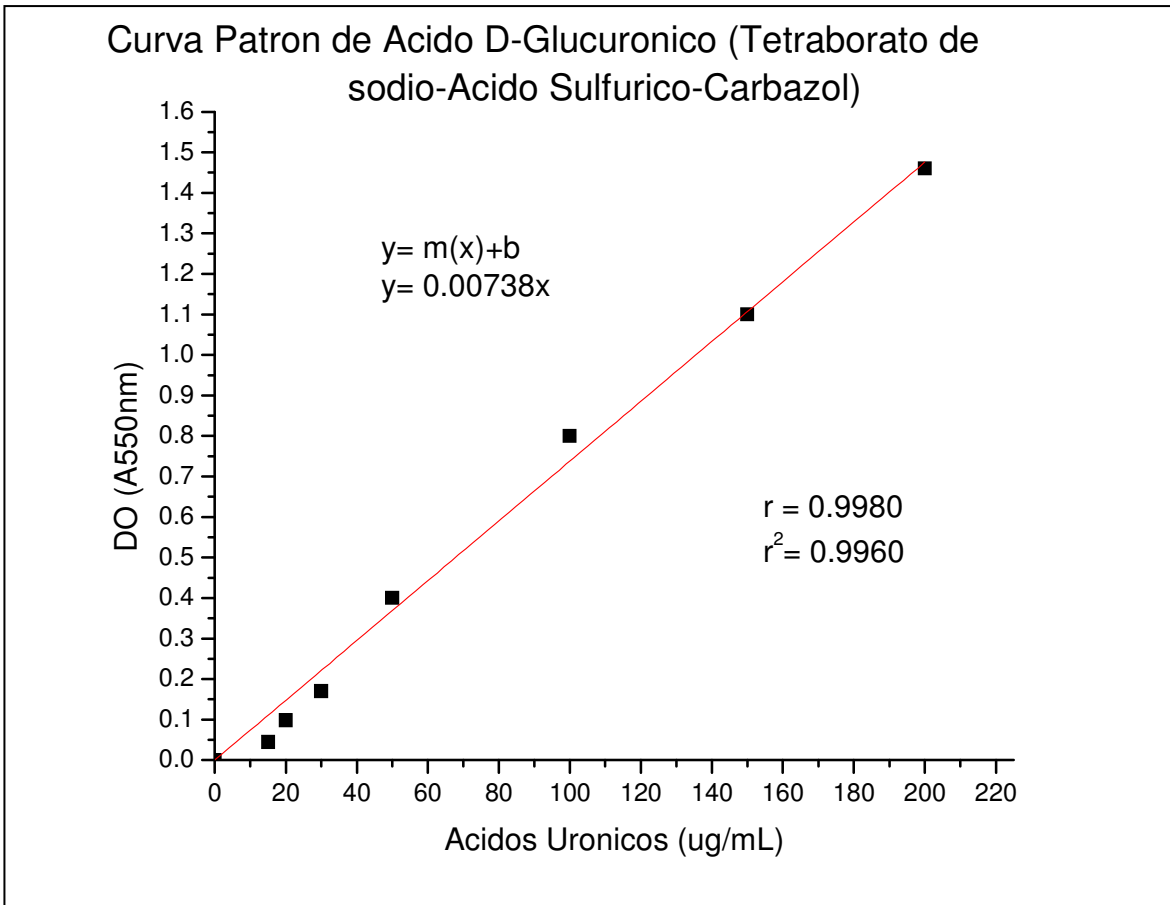


Figura 54. Curvas Patrón de Ácidos Urónicos Tetraborato de Sodio-Ácido Sulfúrico-Carbazol.

ANEXO 10

Cuadro 26. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ ó H ₁
MRSm vs. MRS	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRSm	0.0000013	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9652134	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0192960	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000040	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 12 h	1.0000000	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9999961	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0004277	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0003401	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 16 h	0.9824303	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 16 h	0.9958896	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0134200	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0071424	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 4 h	0.0000065	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 4 h	0.0000147	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 6 h	0.9999999	H ₀

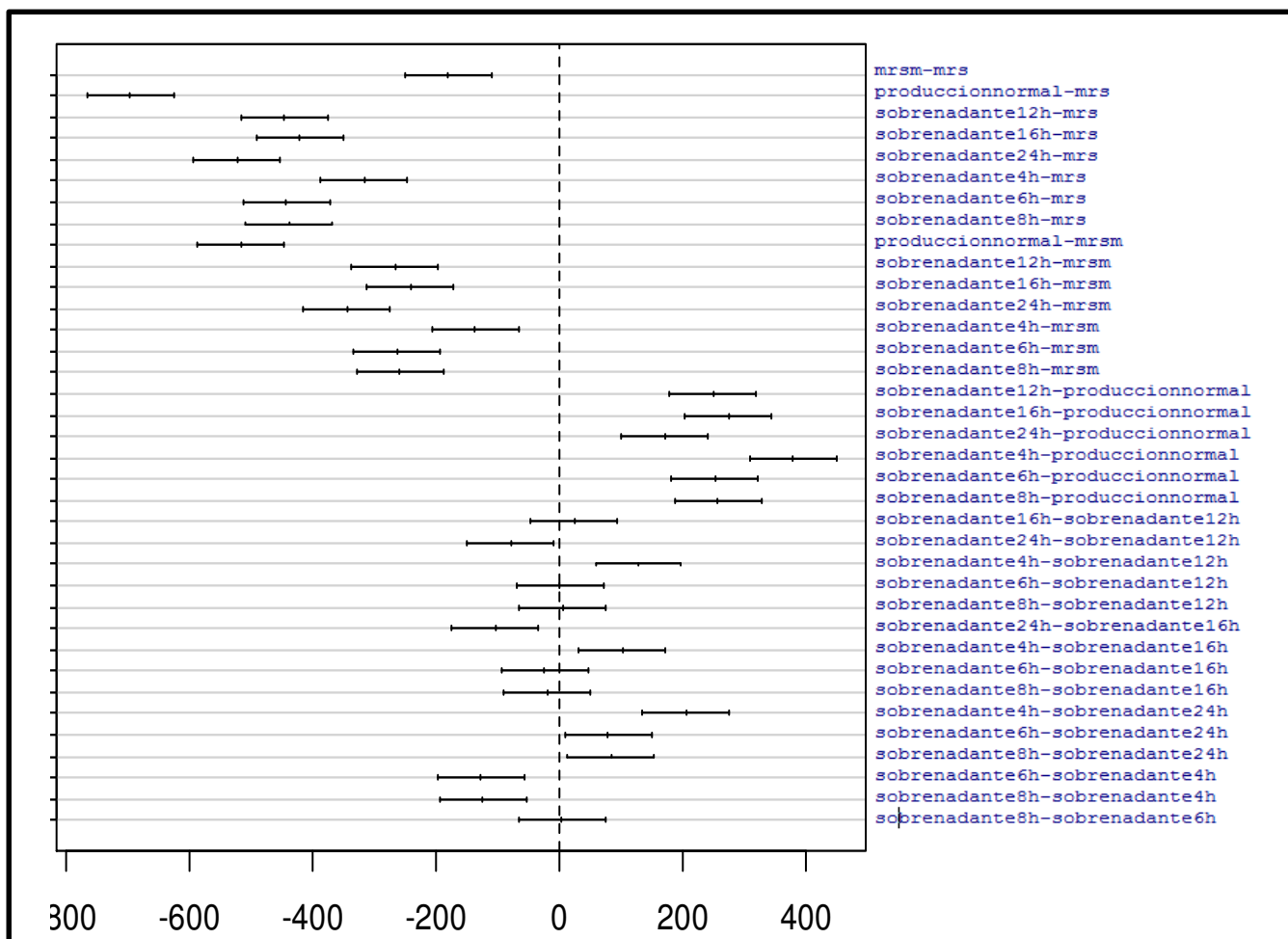


Figura 55. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Cuadro 27. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 36 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ ó H ₁
MRSm vs. MRS	0.4462181	H ₀
Producción Normal vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRS	0.0000095	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRS	0.0000018	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRSm	0.0000116	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRSm	0.0203281	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRSm	0.0000155	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRSm	0.0000005	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRSm	0.0056099	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRSm	0.0000001	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Sobrenadante 12 h	0.4794729	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 12 h	1.0000000	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9974997	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 12 h	0.7523771	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9331818	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 16 h	0.5279901	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 16 h	0.1145542	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 16 h	0.9999721	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0298510	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 24 h	0.9953114	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 24 h	0.7939813	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 24 h	0.9103735	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 4 h	0.2738411	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 4 h	0.9998495	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 6 h	0.0895838	H ₀

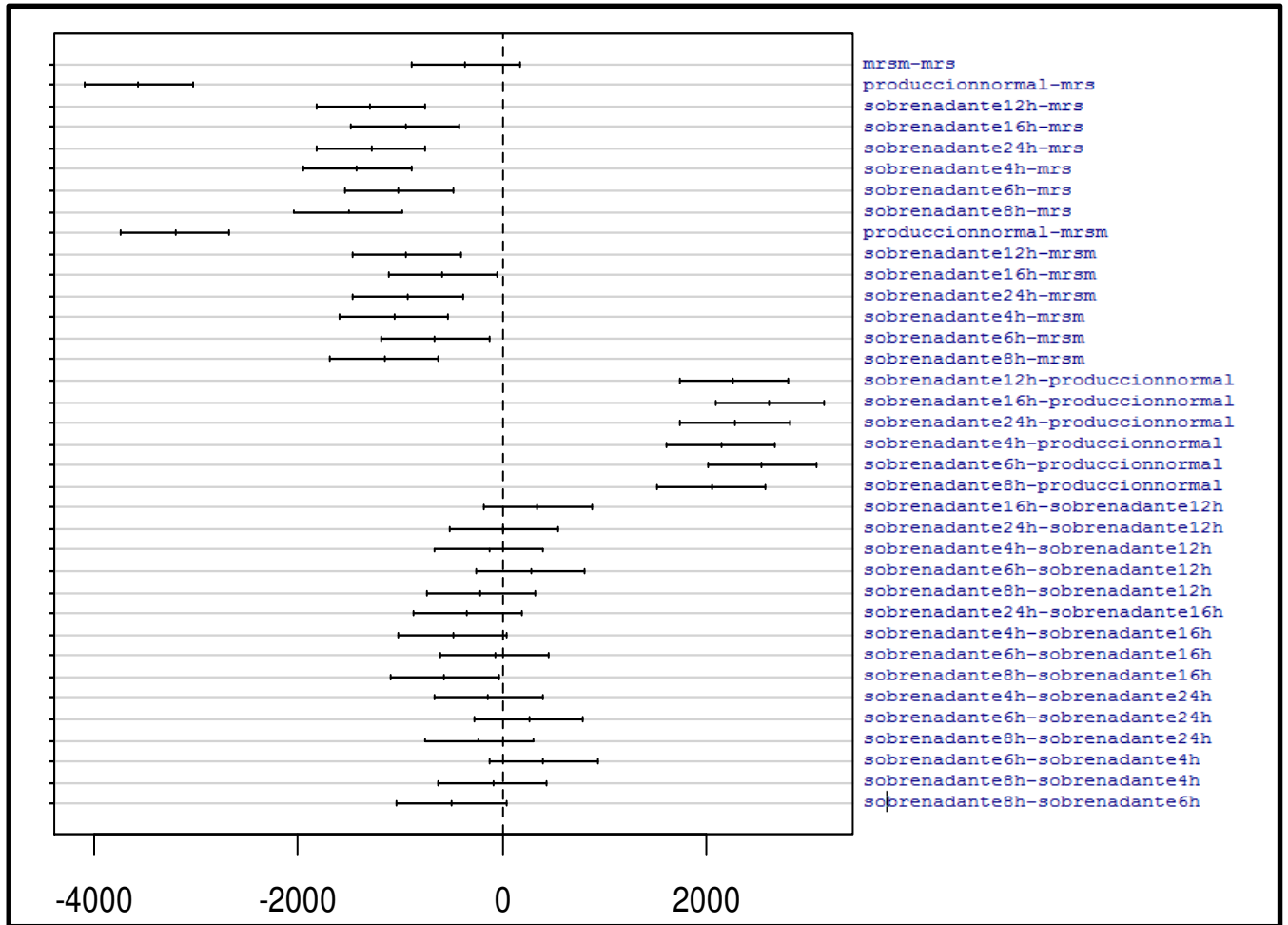


Figura 56. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 36 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Cuadro 28. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 48 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ ó H ₁
MRSm vs. MRS	0.9011725	H ₀
Producción Normal vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRS	0.0001783	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRSm	0.0193641	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRSm	0.0000114	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0414224	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 12 h	0.8800543	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0030316	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000128	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 16 h	0.6610324	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 16 h	0.9945839	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0010835	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 16 h	0.3384482	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 24 h	0.1712915	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000009	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0026457	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 4 h	0.0176424	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 4 h	0.8627431	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 6 h	0.9588556	H ₀

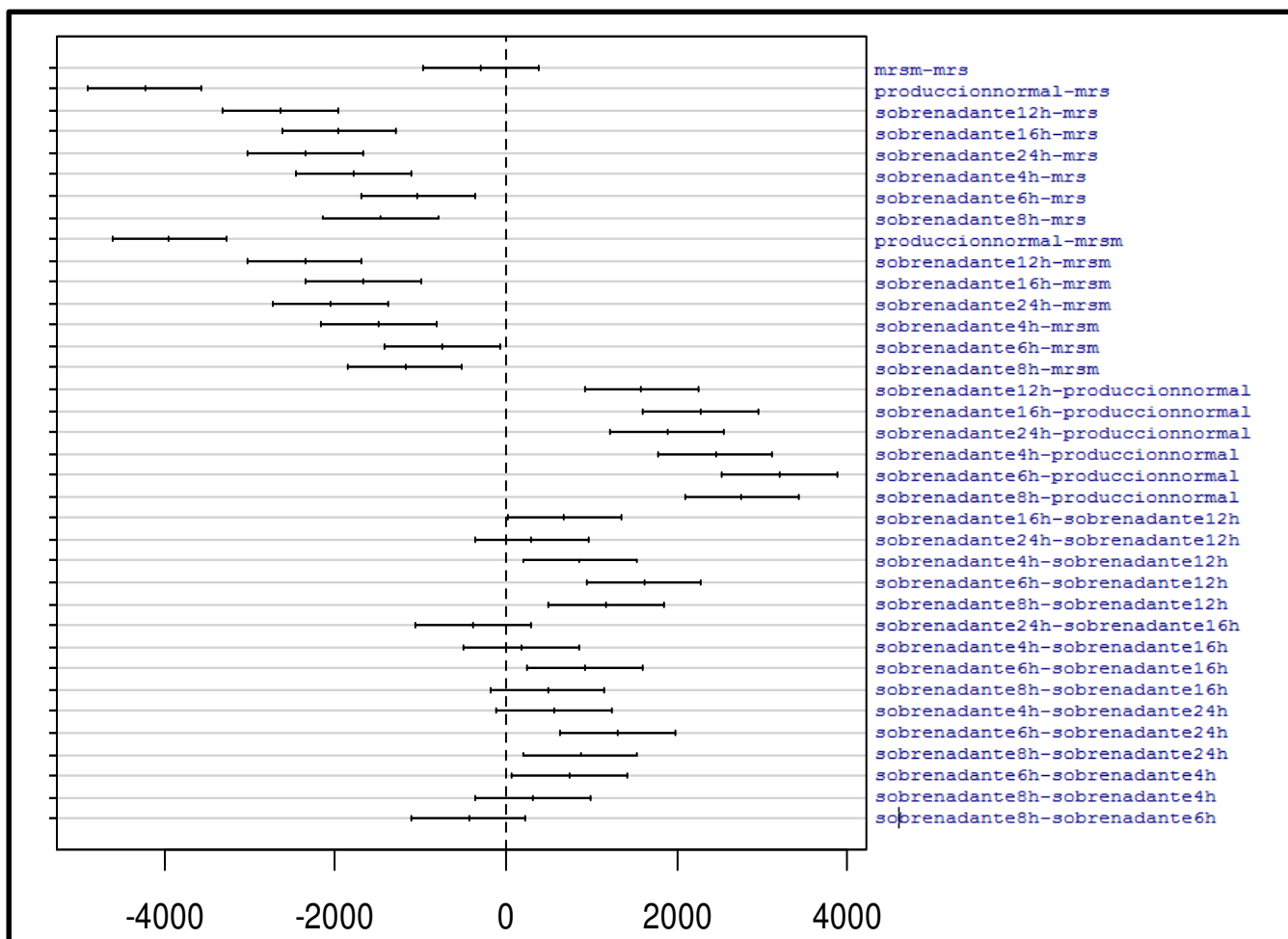


Figura 57. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 48 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

ANEXO 11

Cuadro 29. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Tratamientos en comparación	Valor P	H₀ ó H₁
MRSm vs. MRS	0.5688104	H ₀
Producción Normal vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRS	0.0000021	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRS	1.0000000	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRS	0.0009724	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRS	0.9016109	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. MRS	0.0010766	H ₁
Producción Normal vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRSm	0.5349104	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRSm	0.2582029	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. MRSm	0.0330078	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRSm	0.2724745	H ₀
Sobrenadante 12 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Producción Normal	0.0346257	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000026	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0004585	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 16 h	0.008137	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 16 h	0.9188582	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0009016	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 4 h	0.0000050	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 4 h	1.0000000	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 6 h	0.0000056	H ₁

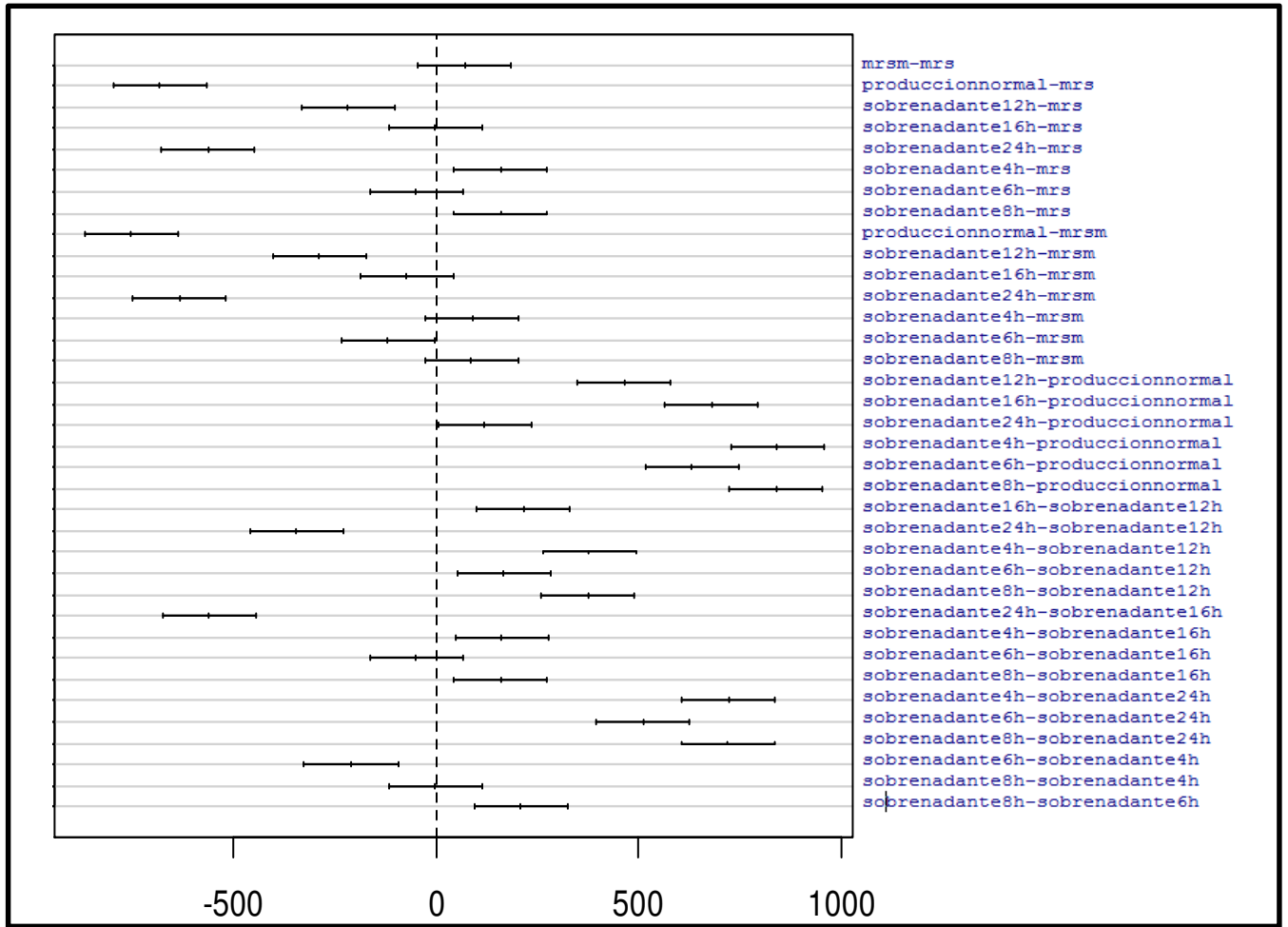


Figura 58. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Cuadro 30. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 36 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ ó H ₁
MRSm vs. MRS	0.3696605	H ₀
Producción Normal vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRS	0.0000069	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRSm	0.0000355	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRSm	0.0230435	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Producción Normal	0.0072816	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Producción Normal	0.0015084	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Sobrenadante 12 h	0.5453063	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 12 h	0.6409156	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000001	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 12 h	0.1756312	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0000738	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0069817	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0004325	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 16 h	0.9990150	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 24 h	0.9999266	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 24 h	0.00008801	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 4 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 4 h	0.0007178	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 6 h	0.0002582	H ₁

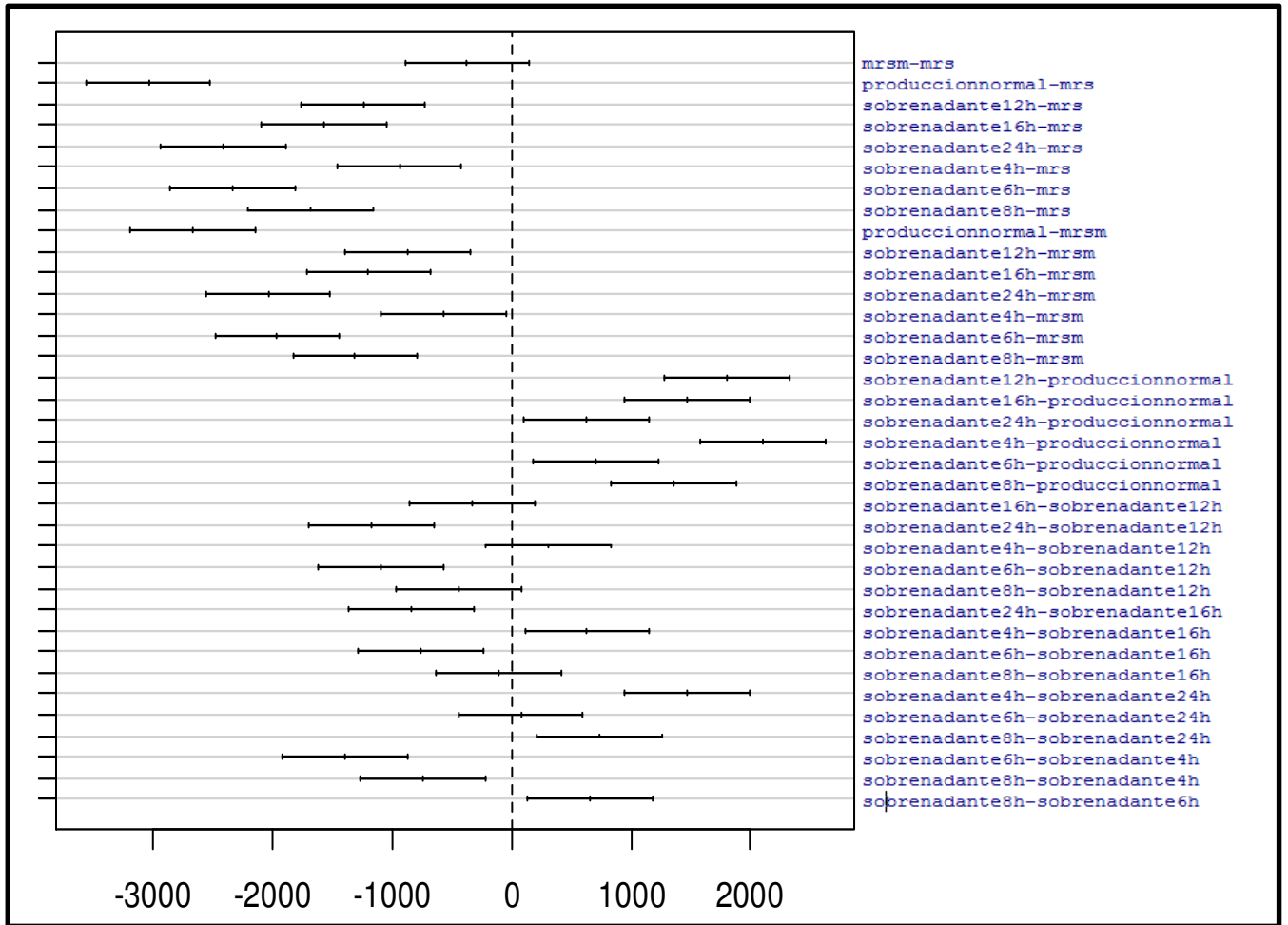


Figura 59. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 36 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Cuadro 31. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 48 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ ó H ₁
MRSm vs. MRS	0.0027623	H ₁
Producción Normal vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRS	0.0005812	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRSm	0.0264108	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRSm	0.9999524	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. MRSm	0.0028107	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Producción Normal	0.0000021	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Producción Normal	0.0505737	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9778266	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0060001	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000023	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000397	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 16 h	0.1181863	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0000005	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 4 h	0.0867644	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 4 h	0.9984162	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 6 h	0.0118591	H ₁

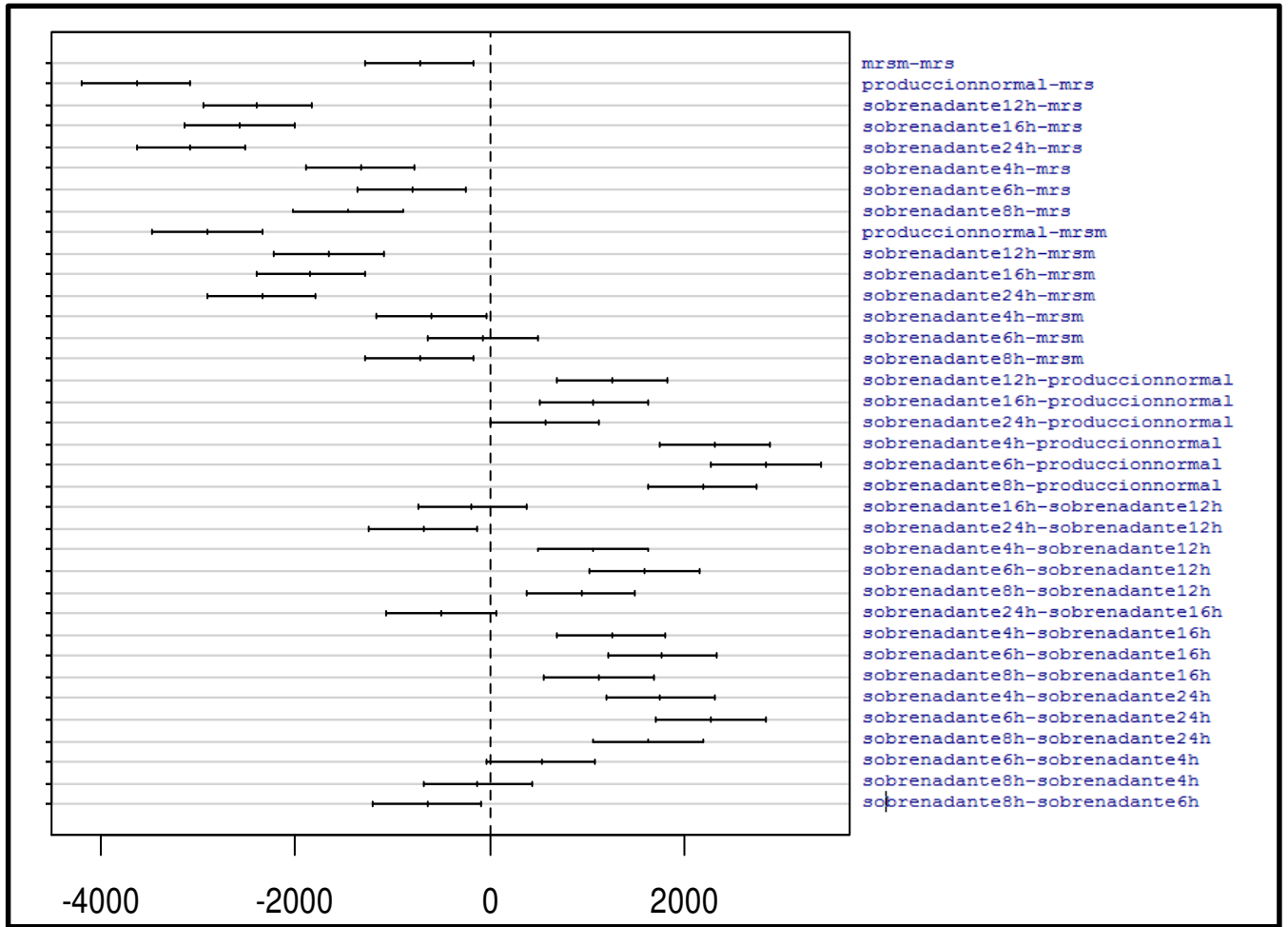


Figura 60. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 48 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

ANEXO 12

Cuadro 32. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.

Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ ó H ₁
Ácido Ascórbico vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Citrato de Amonio vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Fosfato Dipotásico vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Sacarosa vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Citrato de Amonio vs. Ácido ascórbico	0.9644405	H ₀
Fosfato Dipotásico vs. Ácido ascórbico	0.9989522	H ₀
Producción Normal vs. Ácido ascórbico	0.8790323	H ₀
Sacarosa vs. Ácido ascórbico	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Ácido Ascórbico	0.9314031	H ₀
Tween 80 vs. Ácido ascórbico	0.9999821	H ₀
Fosfato Dipotásico vs. Citrato de Amonio	0.9997659	H ₀
Producción Normal vs. Citrato de Amonio	0.9999901	H ₀
Sacarosa vs. Citrato de Amonio	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Citrato de amonio	0.9999999	H ₀
Tween 80 vs. Citrato de Amonio	0.8678798	H ₀
Producción Normal vs. Fosfato Dipotásico	0.9946573	H ₀
Sacarosa vs. Fosfato Dipotásico	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Fosfáto Dipotásico	0.9986693	H ₀
Tween 80 vs. Fosfato Dipotásico	0.9847346	H ₀
Sacarosa vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Producción Normal	0.9999999	H ₀
Tween 80 vs. Producción Normal	0.7120680	H ₀
Sulfato de Magnesio vs. Sacarosa	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Sacarosa	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Sulfato de Magnesio	0.7992681	H ₀

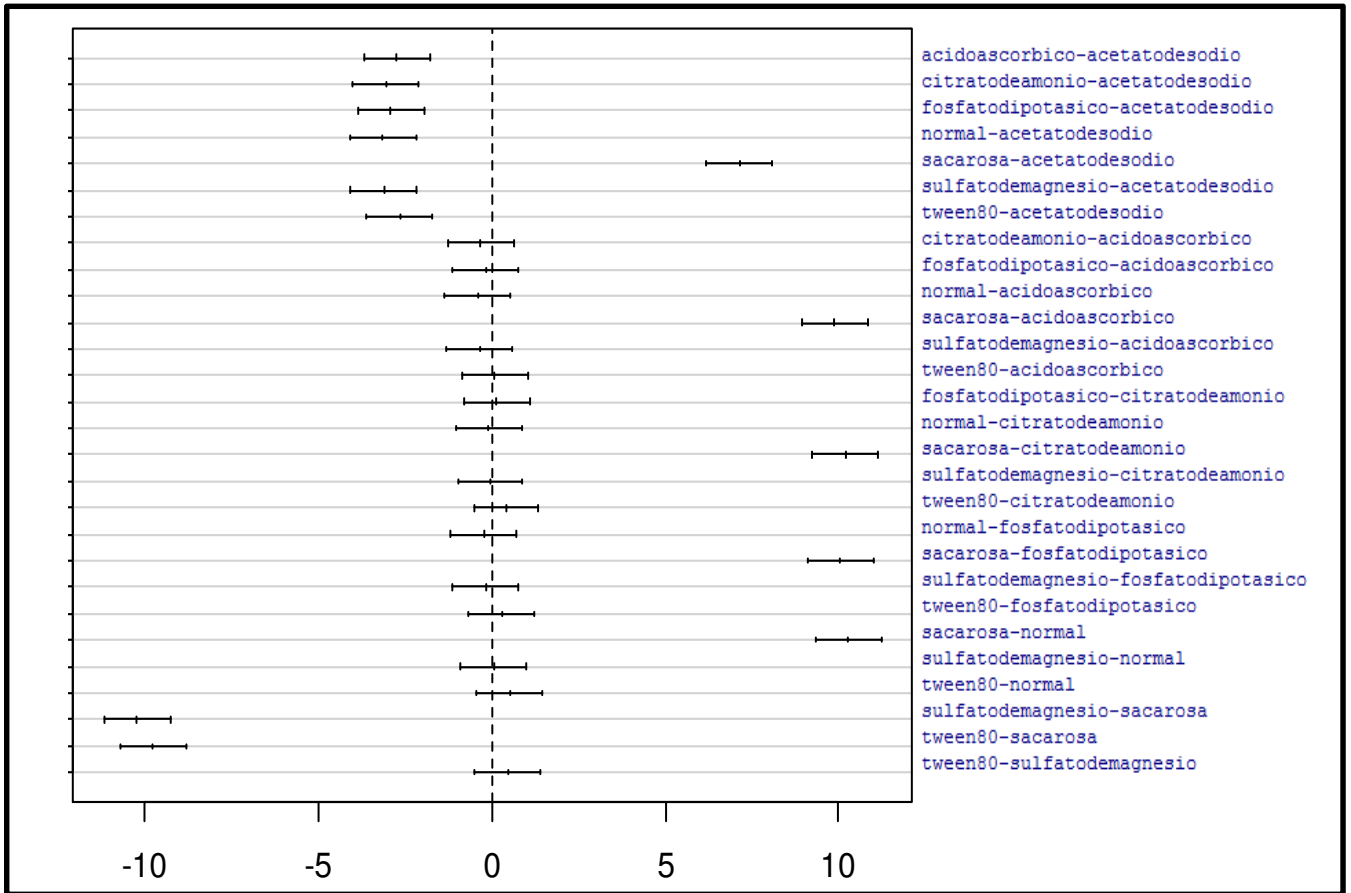


Figura 61. Prueba de Tukey para la producción de Carbohidratos Totales a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.

ANEXO 13

Cuadro 33. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.

Tratamientos en comparación	Valor P	H₀ ó H₁
Ácido Ascórbico vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Citrato de Amonio vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Fosfato Dipotásico vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Sacarosa vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Citrato de Amonio vs. Ácido ascórbico	0.0000000	H ₁
Fosfato Dipotásico vs. Ácido ascórbico	0.0000079	H ₁
Producción Normal vs. Ácido ascórbico	0.9998246	H ₀
Sacarosa vs. Ácido ascórbico	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Ácido Ascórbico	0.1436240	H ₀
Tween 80 vs. Ácido ascórbico	0.8973148	H ₀
Fosfato Dipotásico vs. Citrato de Amonio	0.0002367	H ₁
Producción Normal vs. Citrato de Amonio	0.0000000	H ₁
Sacarosa vs. Citrato de Amonio	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Citrato de amonio	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Citrato de Amonio	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. Fosfato Dipotásico	0.00000147	H ₁
Sacarosa vs. Fosfato Dipotásico	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Fosfáto Dipotásico	0.2461448	H ₀
Tween 80 vs. Fosfato Dipotásico	0.0068372	H ₁
Sacarosa vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Producción Normal	0.0492747	H ₁
Tween 80 vs. Producción Normal	0.6608424	H ₀
Sulfato de Magnesio vs. Sacarosa	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Sacarosa	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Sulfato de Magnesio	0.8549272	H ₀

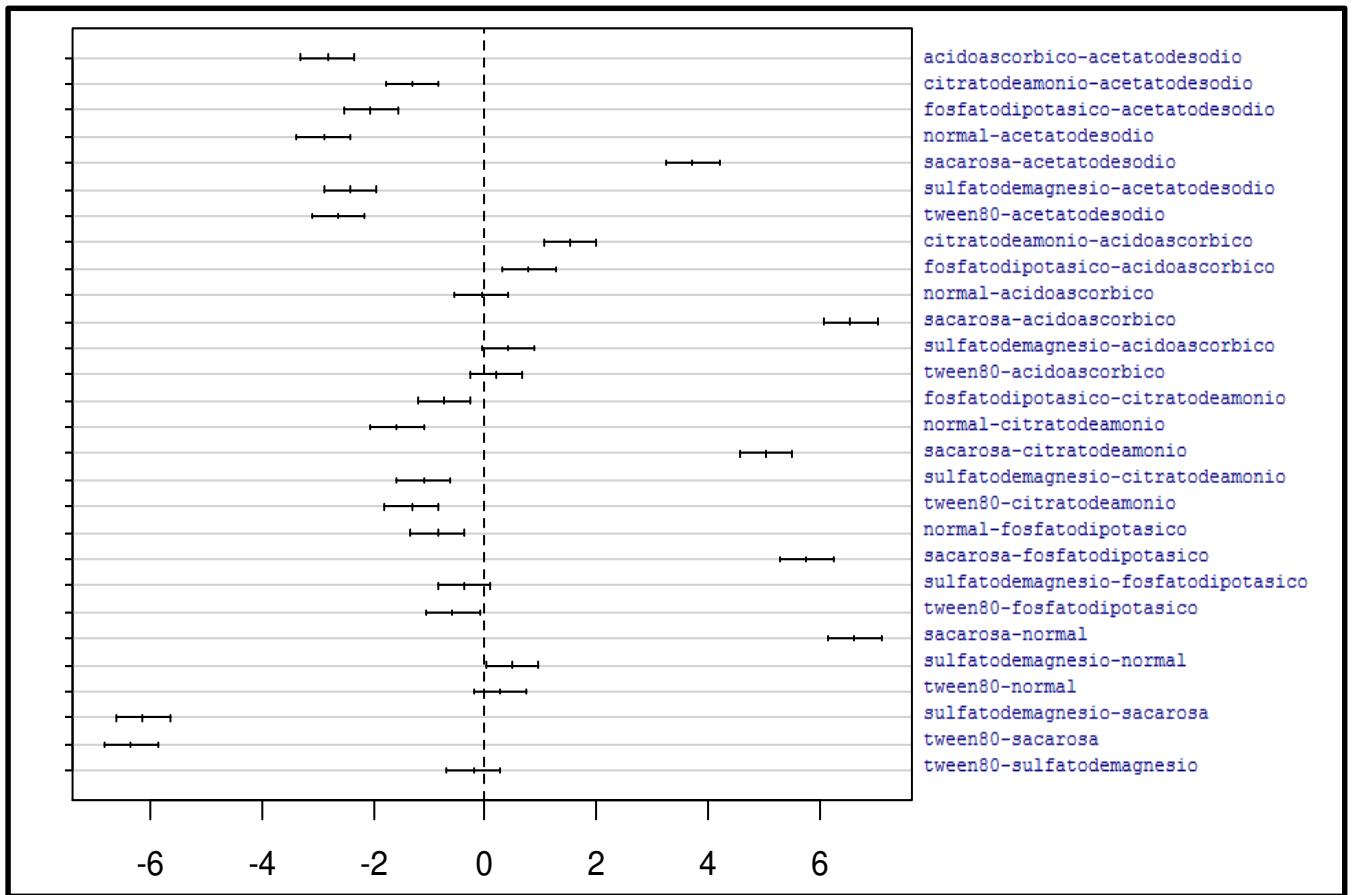


Figura 62. Prueba de Tukey para la producción de Ácidos Urónicos a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.

ANEXO 14

Cuadro 34. Prueba de Tukey para la producción de Piocianina a las 12 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Tratamientos en comparación	Valor P	H₀ ó H₁
MRSm vs. MRS	0.9638677	H ₀
Producción Normal vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRS	0.9980523	H ₀
Sobrenadante 16 h vs. MRS	0.9997959	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. MRS	1.0000000	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. MRS	0.9999890	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. MRS	0.9999819	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. MRS	0.9990808	H ₀
Producción Normal vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRSm	0.9999711	H ₀
Sobrenadante 16 h vs. MRSm	0.9994746	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. MRSm	0.9787879	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. MRSm	0.9969446	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. MRSm	0.9975492	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. MRSm	0.9999003	H ₀
Sobrenadante 12 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9999999	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9993006	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9999890	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9999936	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 12 h	1.0000000	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 16 h	0.99999552	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 16 h	1.00000000	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 16 h	1.00000000	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 16 h	1.00000000	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 24 h	0.99999990	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 24 h	0.99999981	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 24 h	0.99997158	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 4 h	1.00000000	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 4 h	0.99999985	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 6 h	1.00000000	H ₀

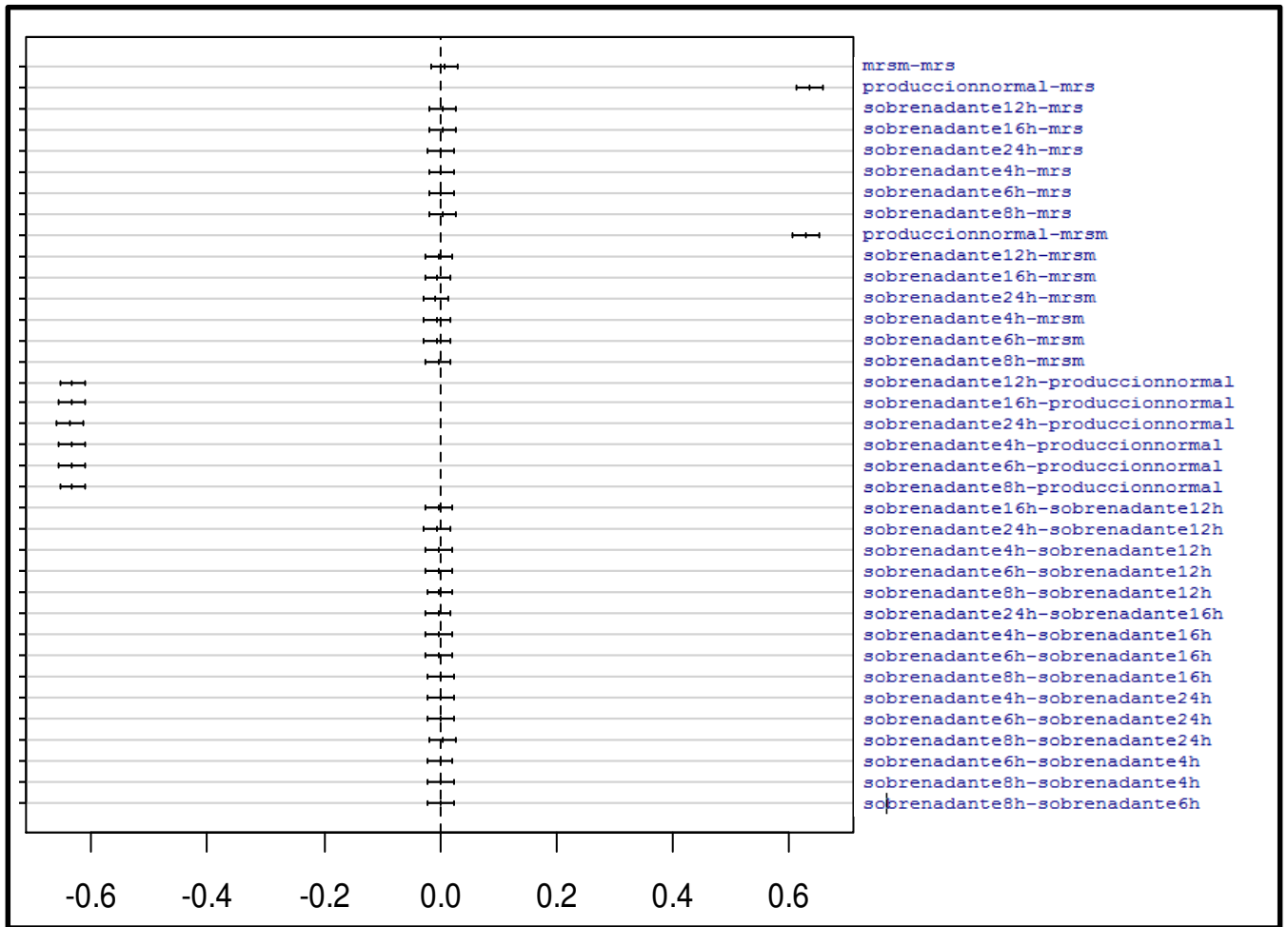


Figura 63. Prueba de Tukey para la producción de Piocyanina a las 12 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Cuadro 35. Prueba de Tukey para la producción de Pilocianina a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ ó H ₁
MRSm vs. MRS	0.9999975	H ₀
Producción Normal vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRS	1.0000000	H ₀
Sobrenadante 16 h vs. MRS	0.9999924	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. MRS	0.9980580	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. MRS	0.9973421	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. MRS	0.9999912	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. MRS	0.3737415	H ₀
Producción Normal vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRSm	0.9999999	H ₀
Sobrenadante 16 h vs. MRSm	1.0000000	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. MRSm	0.9999622	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. MRSm	0.9999328	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. MRSm	1.0000000	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. MRSm	0.5636611	H ₀
Sobrenadante 12 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9999995	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9993273	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9990212	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9999993	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 12 h	0.4341100	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 16 h	0.9999845	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 16 h	0.9999703	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 16 h	1.0000000	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 16 h	0.5945598	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 24 h	1.0000000	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 24 h	0.9999865	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 24 h	0.8241054	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 4 h	0.9999738	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 4 h	0.8404900	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 6 h	0.5989680	H ₀

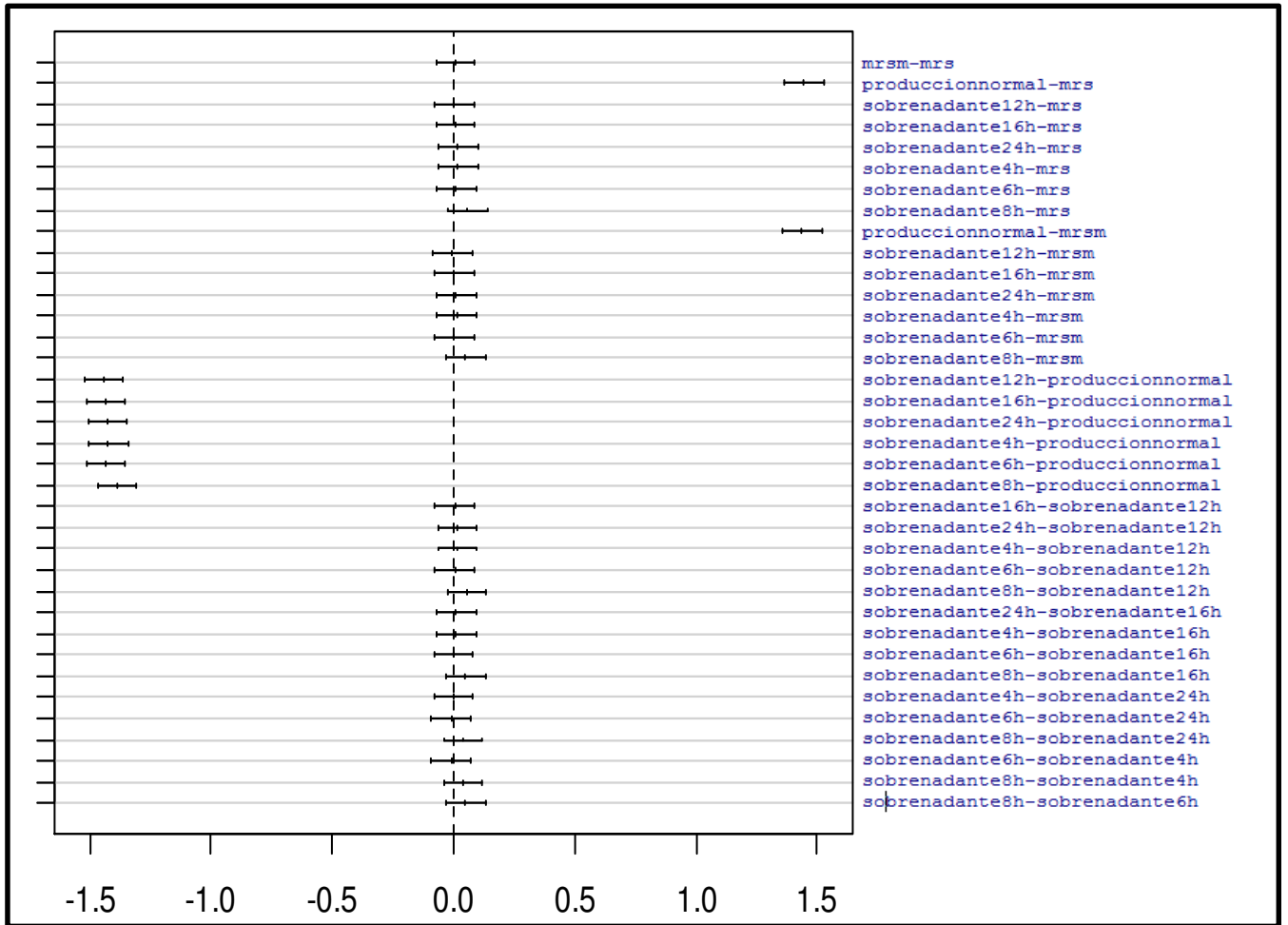


Figura 64. Prueba de Tukey para la producción de Piocianina a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Cuadro 36. Prueba de Tukey para la producción de Piocianina a las 48 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ ó H ₁
MRSm vs. MRS	0.9999928	H ₀
Producción Normal vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRS	0.7207192	H ₀
Sobrenadante 16 h vs. MRS	0.2107300	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. MRS	0.9324552	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. MRS	1.0000000	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. MRS	0.9893590	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. MRS	0.9996178	H ₀
Producción Normal vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRSm	0.4970429	H ₀
Sobrenadante 16 h vs. MRSm	0.1021645	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. MRSm	0.9897166	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. MRSm	0.9999949	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. MRSm	0.9999675	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. MRSm	0.9999996	H ₀
Sobrenadante 12 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9933178	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0892523	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 12 h	0.7116413	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 12 h	0.1858487	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 12 h	0.3523372	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0090698	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 16 h	0.2047849	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0234326	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0584873	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 24 h	0.9365763	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 24 h	0.9999936	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 24 h	0.9986093	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 4 h	0.9904036	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 4 h	0.9996841	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 6 h	0.9999910	H ₀

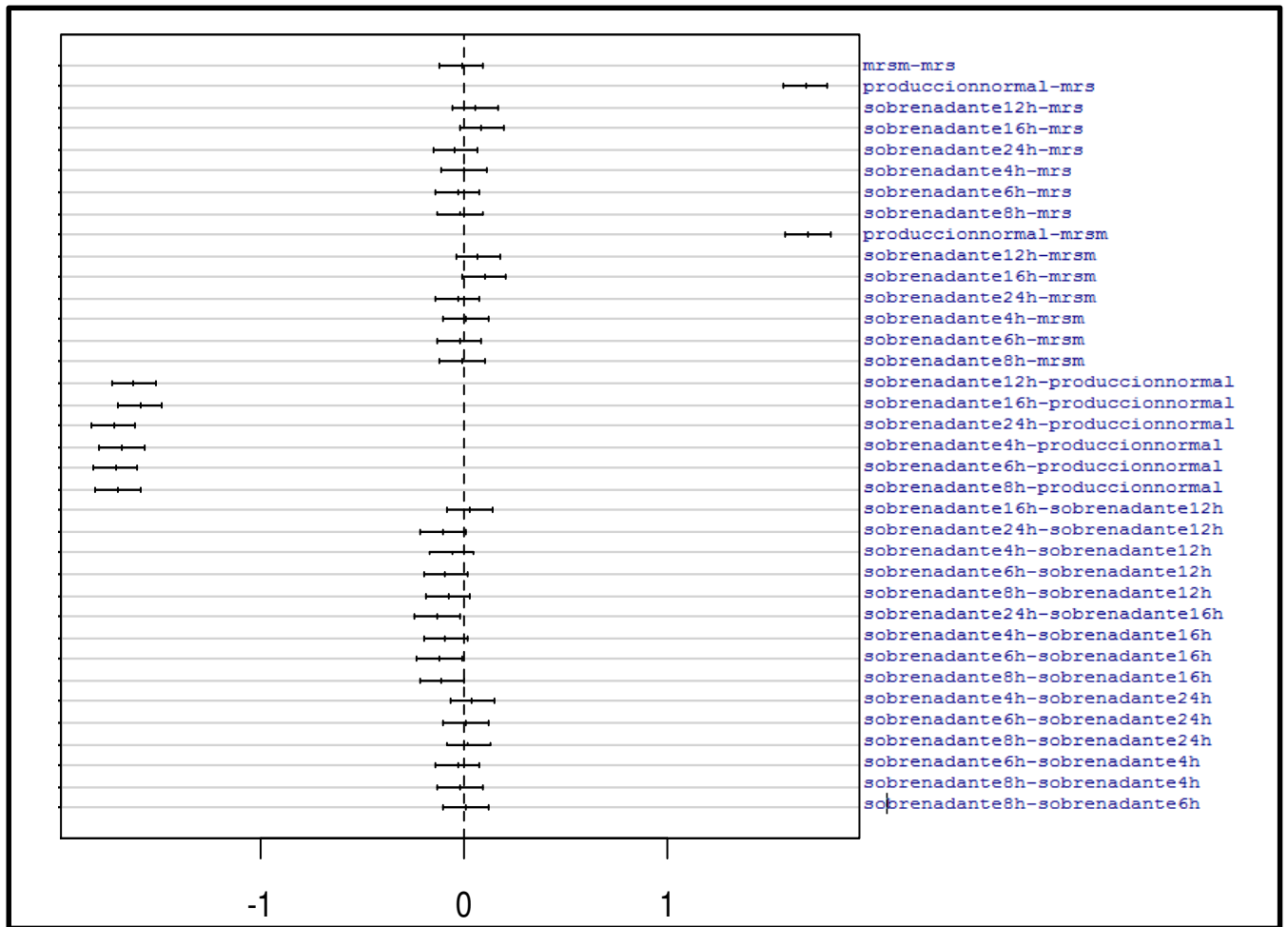


Figura 65. Prueba de Tukey para la producción de Piocianina a las 48 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Cuadro 37. Prueba de Tukey para la producción de Piocianina a las 60 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ ó H ₁
MRSm vs. MRS	0.9994848	H ₀
Producción Normal vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRS	0.0001068	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRS	1.0000000	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRS	0.9685613	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRSm	0.0000352	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRSm	0.9978031	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRSm	0.9998243	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000034	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0001382	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000010	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000139	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000451	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 16 h	0.9971806	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 16 h	0.8699042	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 24 h	0.9407913	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 4 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 4 h	0.4567034	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 6 h	0.0000000	H ₁

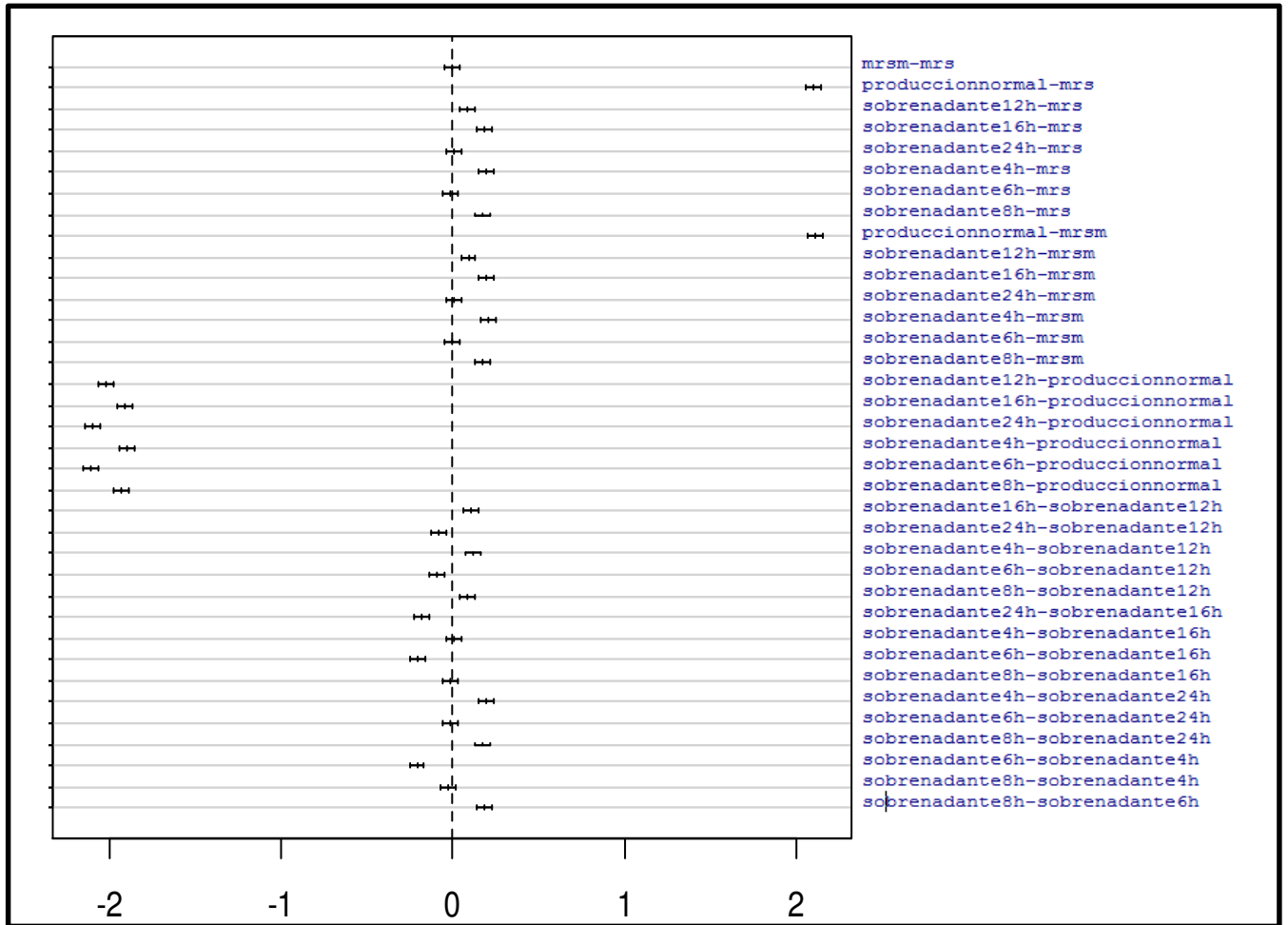


Figura 66. Prueba de Tukey para la producción de Piocianina a las 60 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Cuadro 38. Prueba de Tukey para la producción de Pilocianina a las 72 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ ó H ₁
MRSm vs. MRS	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRS	0.1061139	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRS	0.0407404	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRSm	0.0000009	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRSm	0.9953340	H ₀
Sobrenadante 12 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000035	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 16 h	0.9998338	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 24 h	0.5590561	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 4 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 4 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 6 h	0.0000000	H ₁

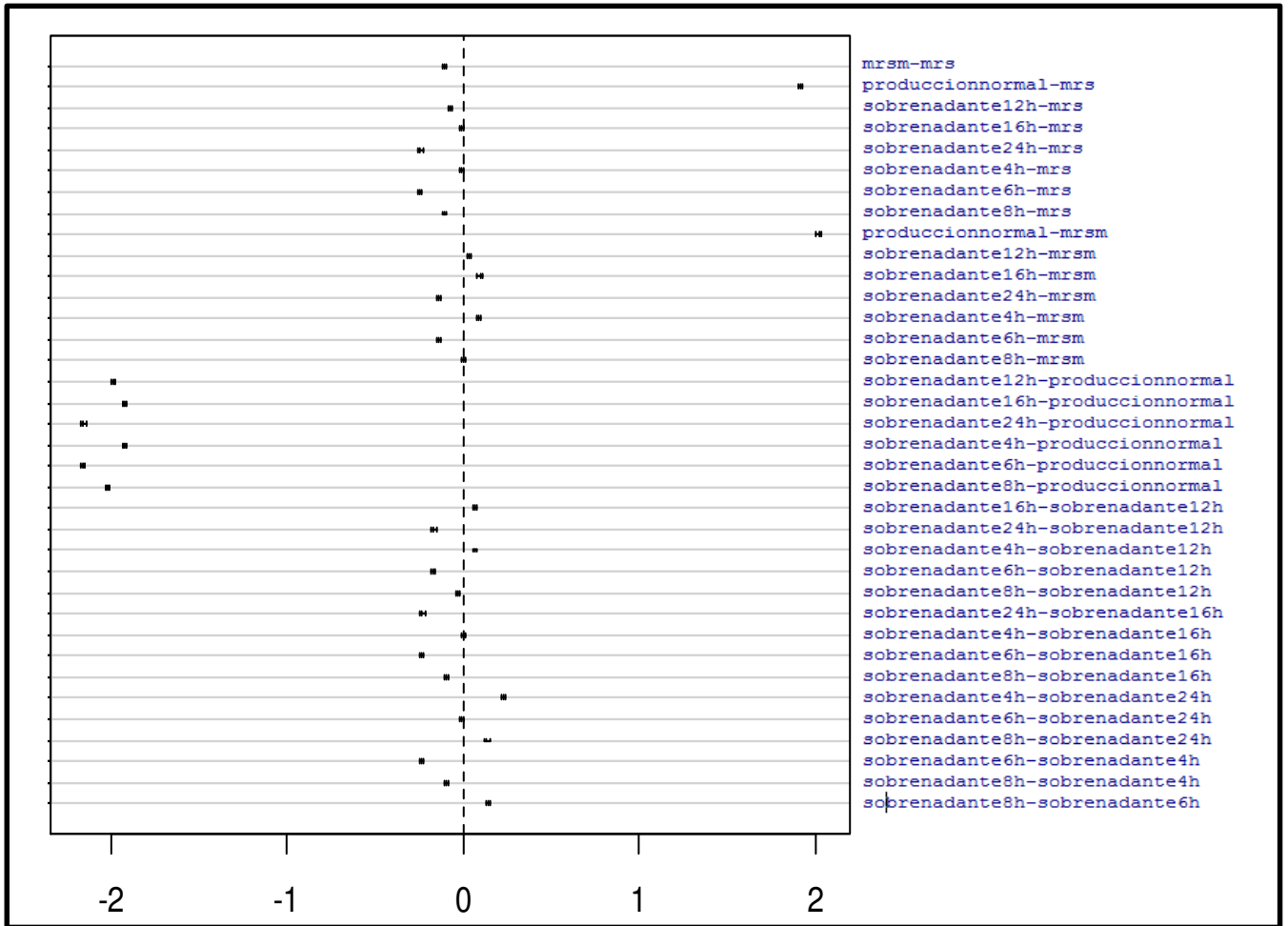


Figura 67. Prueba de Tukey para la producción de Piocianina a las 72 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

ANEXO 15

Cuadro 39. Prueba de Tukey para la producción de Píocianina a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.

Tratamientos en comparación	Valor P	H₀ ó H₁
Ácido Ascórbico vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Citrato de Amonio vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Fosfato Dipotásico vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. Acetato de Sodio	0.0000108	H ₁
Sacarosa vs. Acetato de Sodio	0.0465389	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Acetato de Sodio	0.8187106	H ₀
Tween 80 vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Citrato de Amonio vs. Ácido ascórbico	0.0000001	H ₁
Fosfato Dipotásico vs. Ácido ascórbico	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. Ácido ascórbico	0.7171940	H ₀
Sacarosa vs. Ácido ascórbico	0.00400248	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Ácido Ascórbico	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Ácido ascórbico	0.0000000	H ₁
Fosfato Dipotásico vs. Citrato de Amonio	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. Citrato de Amonio	0.0000000	H ₁
Sacarosa vs. Citrato de Amonio	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Citrato de amonio	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Citrato de Amonio	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. Fosfato Dipotásico	0.0000000	H ₁
Sacarosa vs. Fosfato Dipotásico	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Fosfato Dipotásico	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Fosfato Dipotásico	0.0008082	H ₁
Sacarosa vs. Producción Normal	0.2879128	H ₀
Sulfato de Magnesio vs. Producción Normal	0.0000001	H ₁
Tween 80 vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Sacarosa	0.0004608	H ₁
Tween 80 vs. Sacarosa	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Sulfato de Magnesio	0.0000000	H ₁

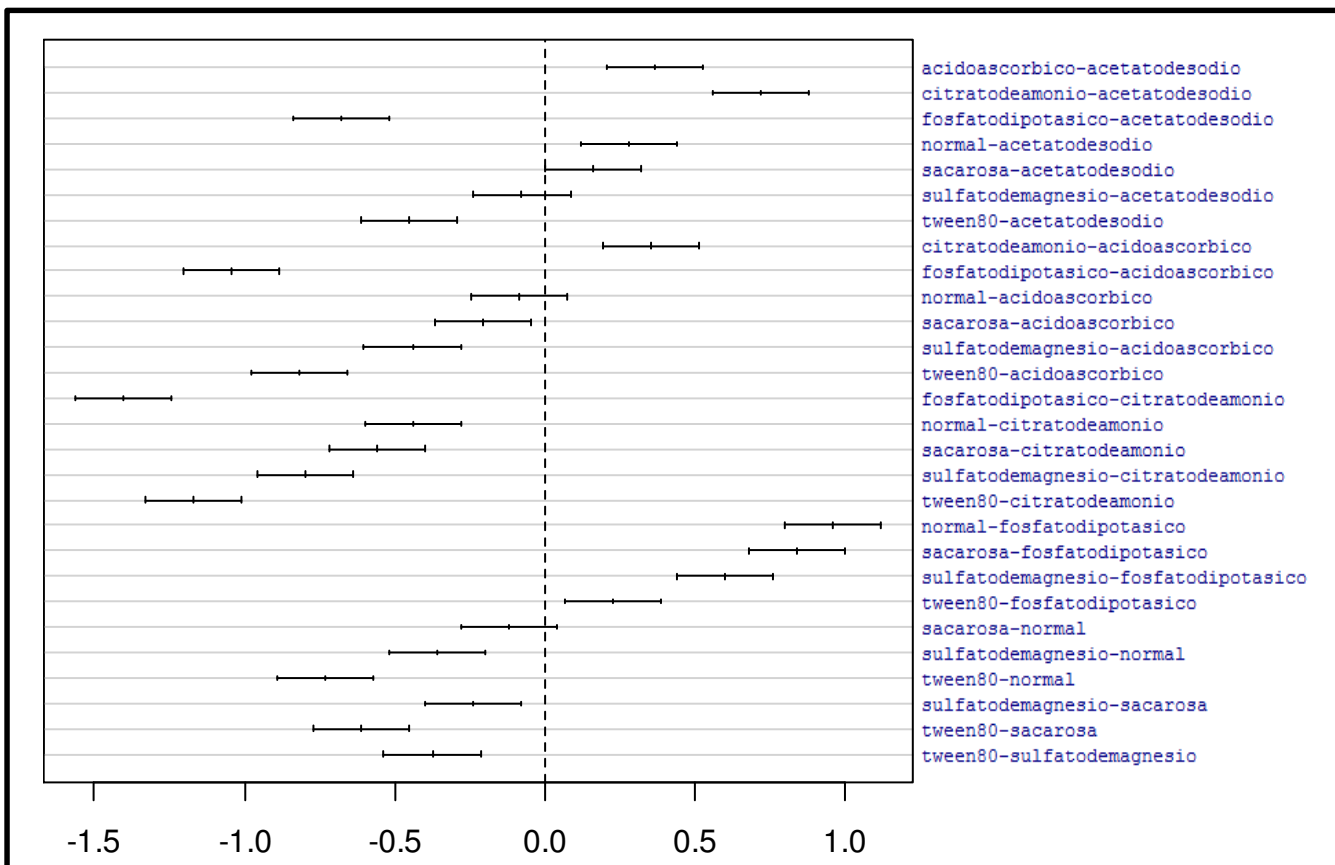


Figura 68. Prueba de Tukey para la producción de Picrocianina a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.

Cuadro 40. Prueba de Tukey para la producción de Pilocianina a las 72 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.

Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ ó H ₁
Ácido Ascórbico vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Citrato de Amonio vs. Acetato de Sodio	0.9993890	H ₀
Fosfato Dipotásico vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. Acetato de Sodio	0.9993103	H ₀
Sacarosa vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Acetato de Sodio	0.0000170	H ₁
Citrato de Amonio vs. Ácido ascórbico	0.0000000	H ₁
Fosfato Dipotásico vs. Ácido ascórbico	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. Ácido ascórbico	0.0000000	H ₁
Sacarosa vs. Ácido ascórbico	0.0000001	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Ácido Ascórbivo	0.0000130	H ₁
Tween 80 vs. Ácido ascórbico	0.0000000	H ₁
Fosfato Dipotásico vs. Citrato de Amonio	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. Citrato de Amonio	1.0000000	H ₀
Sacarosa vs. Citrato de Amonio	0.0000001	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Citrato de amonio	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Citrato de Amonio	0.0000021	H ₁
Producción Normal vs. Fosfato Dipotásico	0.0000000	H ₁
Sacarosa vs. Fosfato Dipotásico	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Fosfáto Dipotásico	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Fosfato Dipotásico	0.0000000	H ₁
Sacarosa vs. Producción Normal	0.0000001	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Producción Normal	0.0000020	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Sacarosa	0.9106845	H ₀
Tween 80 vs. Sacarosa	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Sulfato de Magnesio	0.0000000	H ₁

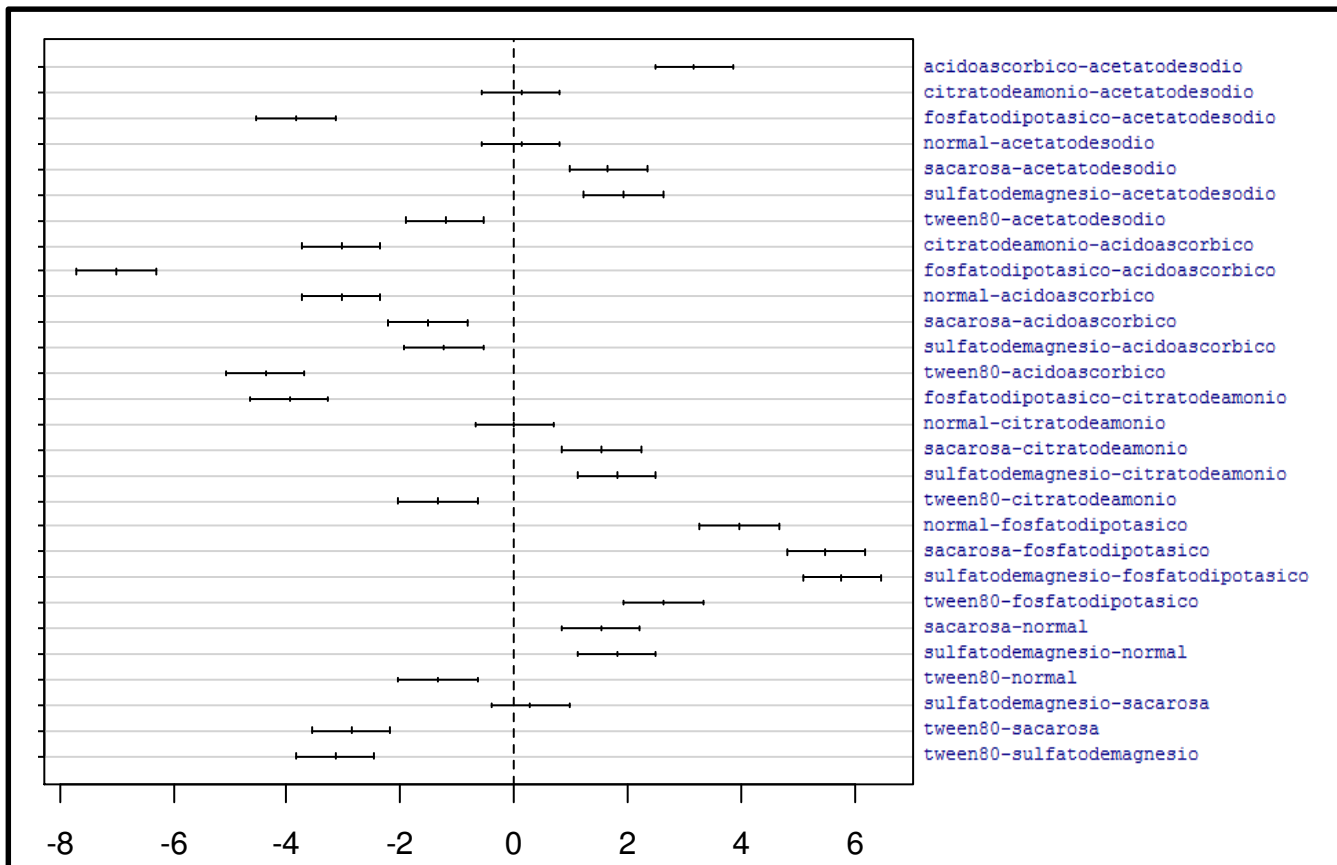


Figura 69. Prueba de Tukey para la producción de Picrocianina a las 72 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.

ANEXO 16

Cuadro 41. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 12 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Tratamientos en comparación	Valor P	H₀ ó H₁
MRSm vs. MRS	0.0039233	H ₁
Producción Normal vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRS	0.0000102	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRS	0.2108081	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. MRS	0.0159541	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRS	0.0480725	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRS	0.9046012	H ₀
Producción Normal vs. MRSm	0.1002986	H ₀
Sobrenadante 12 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRSm	0.0000002	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRSm	0.9999543	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRSm	0.0000262	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Producción Normal	0.0315044	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0698138	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 16 h	0.2775463	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0017482	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000012	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 24 h	0.9993919	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 24 h	0.9508063	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 4 h	0.0000001	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 4 h	0.0001447	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 6 h	0.6553155	H ₀

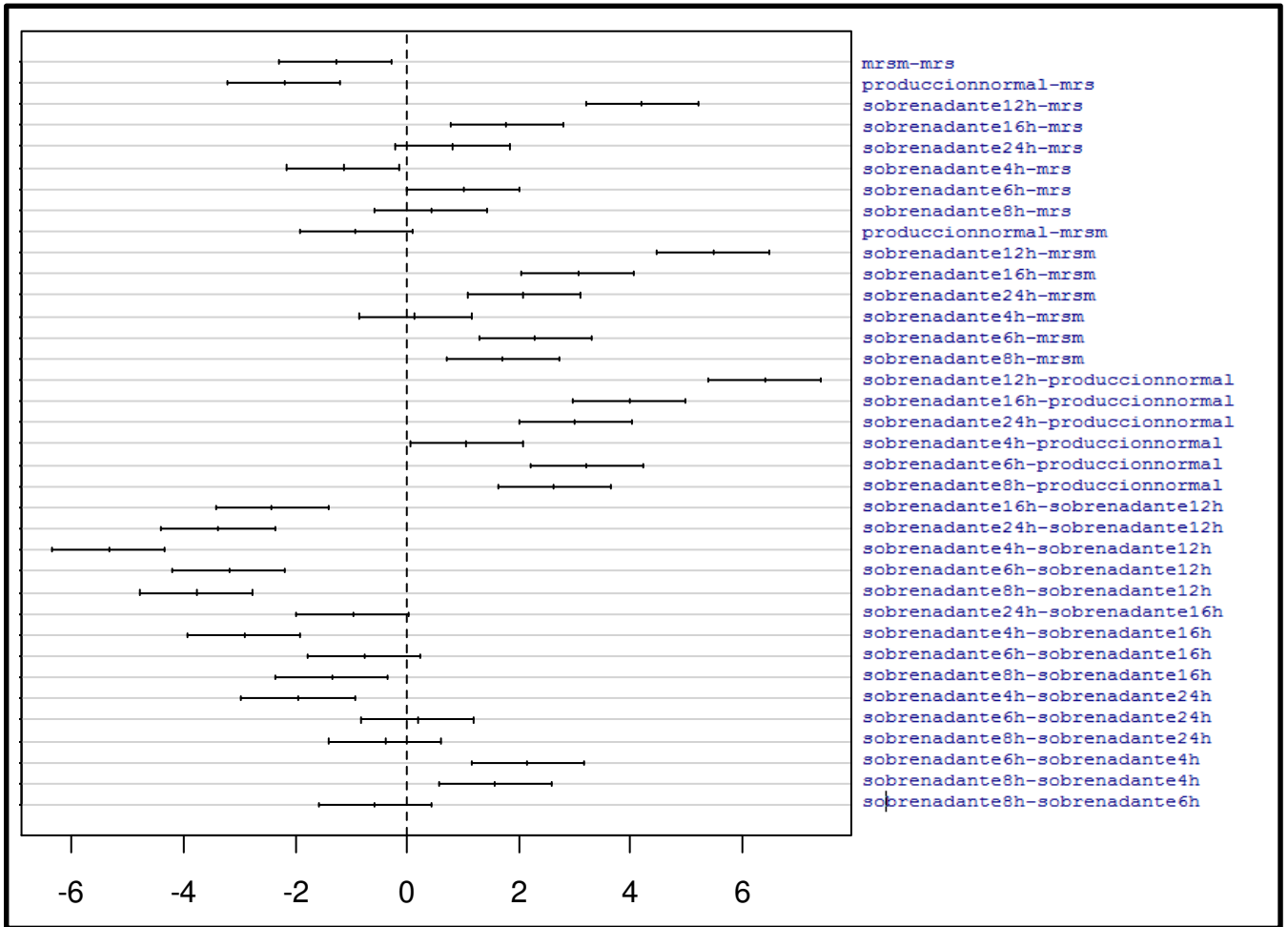


Figura 70. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Cuadro 42. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ ó H ₁
MRSm vs. MRS	0.9443254	H ₀
Producción Normal vs. MRS	0.9710283	H ₀
Sobrenadante 12 h vs. MRS	0.9971892	H ₀
Sobrenadante 16 h vs. MRS	0.0000079	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRS	0.0000004	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRS	0.9631958	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. MRS	0.8134736	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. MRS	0.54866049	H ₀
Producción Normal vs. MRSm	0.3285739	H ₀
Sobrenadante 12 h vs. MRSm	0.5383616	H ₀
Sobrenadante 16 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRSm	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRSm	1.0000000	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. MRSm	0.9999943	H ₀
Sobrenadante 12 h vs. Producción Normal	0.9975514	H ₀
Sobrenadante 16 h vs. Producción Normal	0.9999951	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Producción Normal	0.0005565	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Producción Normal	0.0000385	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Producción Normal	0.3775817	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Producción Normal	0.1710752	H ₀
Sobrenadante 16 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0631603	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0001632	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0000104	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 12 h	0.5951468	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 12 h	0.3249777	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 16 h	0.1407911	H ₀
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 16 h	0.9985059	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0000001	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 4 h	0.9999683	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 4 h	0.9949541	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 6 h	0.9999690	H ₀

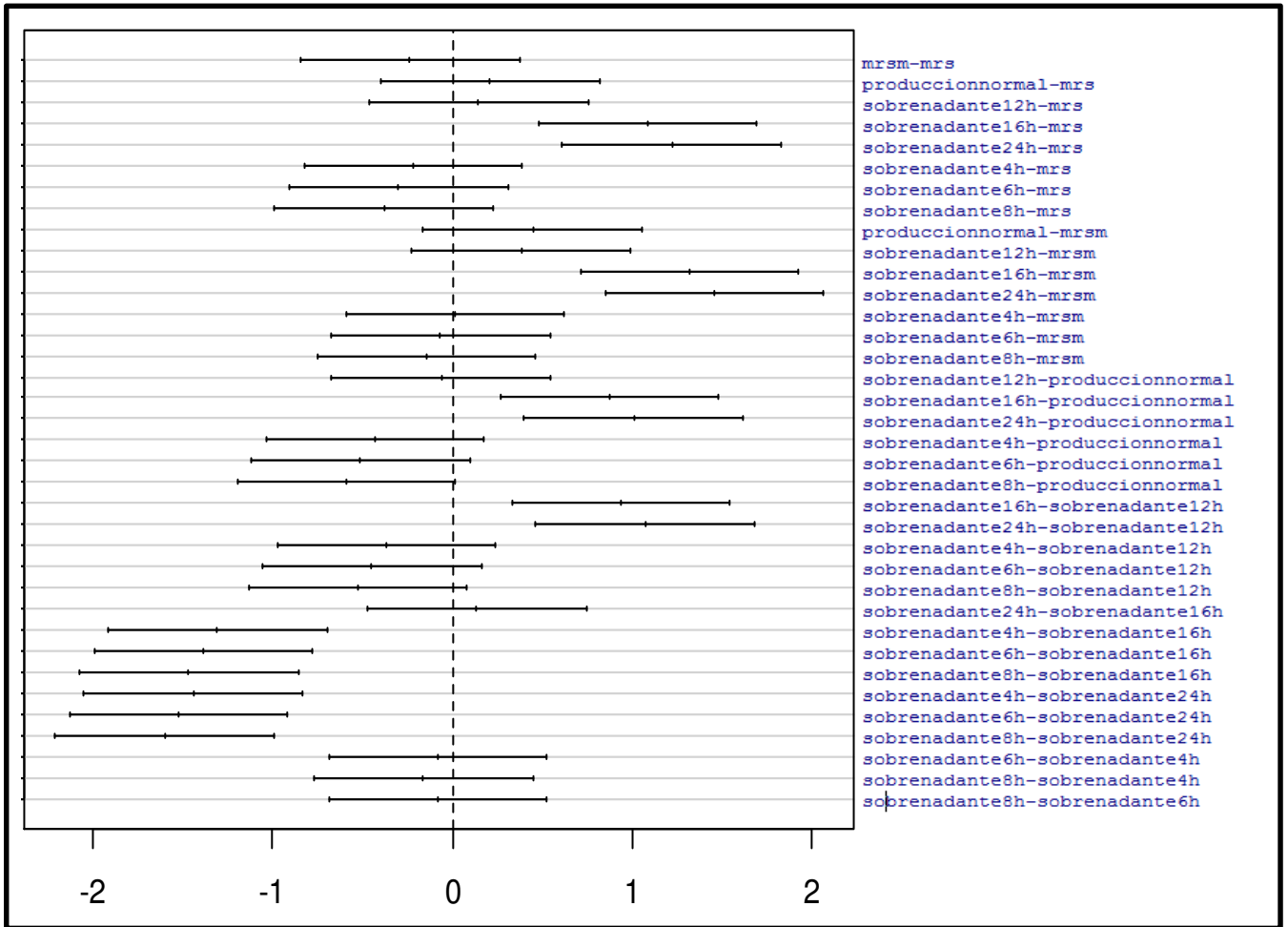


Figura 71. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Cuadro 43. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 48 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ ó H ₁
MRSm vs. MRS	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 12 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 24 h vs. MRS	0.0224742	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRS	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. MRS	0.0006218	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRS	0.0000002	H ₁
Producción Normal vs. MRSm	0.3123512	H ₀
Sobrenadante 12 h vs. MRSm	0.9982956	H ₀
Sobrenadante 16 h vs. MRSm	0.9270998	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. MRSm	0.0000720	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. MRSm	0.8131704	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. MRSm	0.0036844	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. MRSm	0.5711121	H ₀
Sobrenadante 12 h vs. Producción Normal	0.0646107	H ₀
Sobrenadante 16 h vs. Producción Normal	0.9762416	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Producción Normal	0.0052572	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Producción Normal	0.0000004	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Producción Normal	0.0014217	H ₁
Sobrenadante 16 h vs. Sobrenadante 12 h	0.5305193	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0010397	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9945317	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 12 h	0.0339068	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 12 h	0.9437196	H ₀
Sobrenadante 24 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0000004	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 16 h	0.1105007	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0000318	H ₁
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 16 h	0.0411769	H ₁
Sobrenadante 4 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0170992	H ₁
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 24 h	0.9735735	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 24 h	0.0511675	H ₀
Sobrenadante 6 h vs. Sobrenadante 4 h	0.2565796	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 4 h	0.9999837	H ₀
Sobrenadante 8 h vs. Sobrenadante 6 h	0.4834706	H ₀

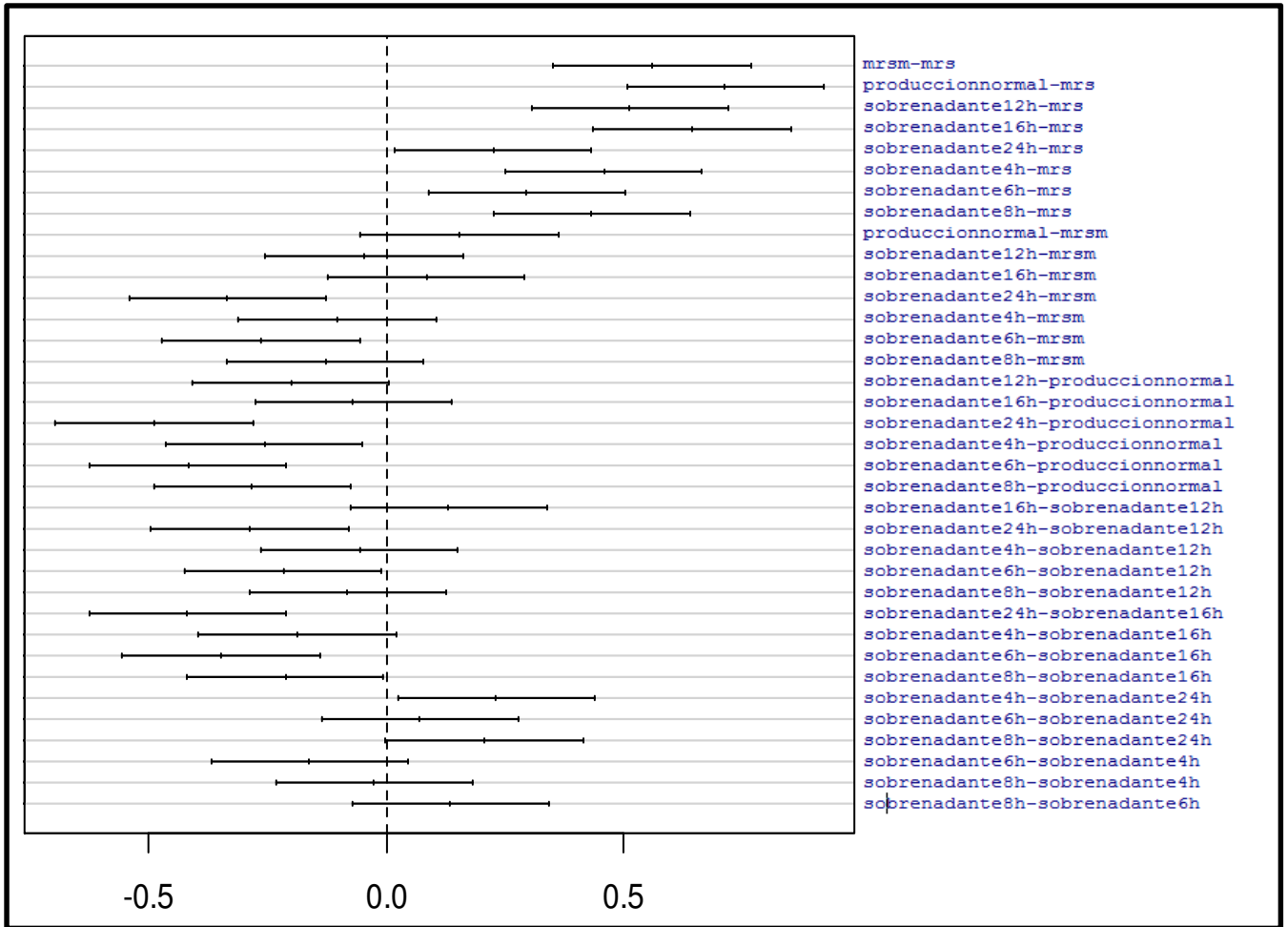


Figura 72. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 48 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

ANEXO 17

Cuadro 44. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 12 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.

Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ ó H ₁
Ácido Ascórbico vs. Acetato de Sodio	0.0000001	H ₁
Citrato de Amonio vs. Acetato de Sodio	0.0881887	H ₀
Fosfato Dipotásico vs. Acetato de Sodio	0.0018825	H ₁
Producción Normal vs. Acetato de Sodio	0.0205638	H ₁
Sacarosa vs. Acetato de Sodio	0.0002365	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Acetato de Sodio	0.7079164	H ₀
Tween 80 vs. Acetato de Sodio	0.0001210	H ₁
Citrato de Amonio vs. Ácido ascórbico	0.0000000	H ₁
Fosfato Dipotásico vs. Ácido ascórbico	0.1599323	H ₀
Producción Normal vs. Ácido ascórbico	0.0235921	H ₁
Sacarosa vs. Ácido ascórbico	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Ácido Ascórbivo	0.0000587	H ₁
Tween 80 vs. Ácido ascórbico	0.0000000	H ₁
Fosfato Dipotásico vs. Citrato de Amonio	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. Citrato de Amonio	0.0000007	H ₁
Sacarosa vs. Citrato de Amonio	0.5465251	H ₀
Sulfato de Magnesio vs. Citrato de amonio	0.0005696	H ₁
Tween 80 vs. Citrato de Amonio	0.4268820	H ₀
Producción Normal vs. Fosfato Dipotásico	0.9942428	H ₀
Sacarosa vs. Fosfato Dipotásico	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Fosfato Dipotásico	0.1910506	H ₀
Tween 80 vs. Fosfato Dipotásico	0.0000000	H ₁
Sacarosa vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Producción Normal	0.6283576	H ₀
Tween 80 vs. Producción Normal	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Sacarosa	0.0000004	H ₁
Tween 80 vs. Sacarosa	0.999996	H ₀
Tween 80 vs. Sulfato de Magnesio	0.000002	H ₁

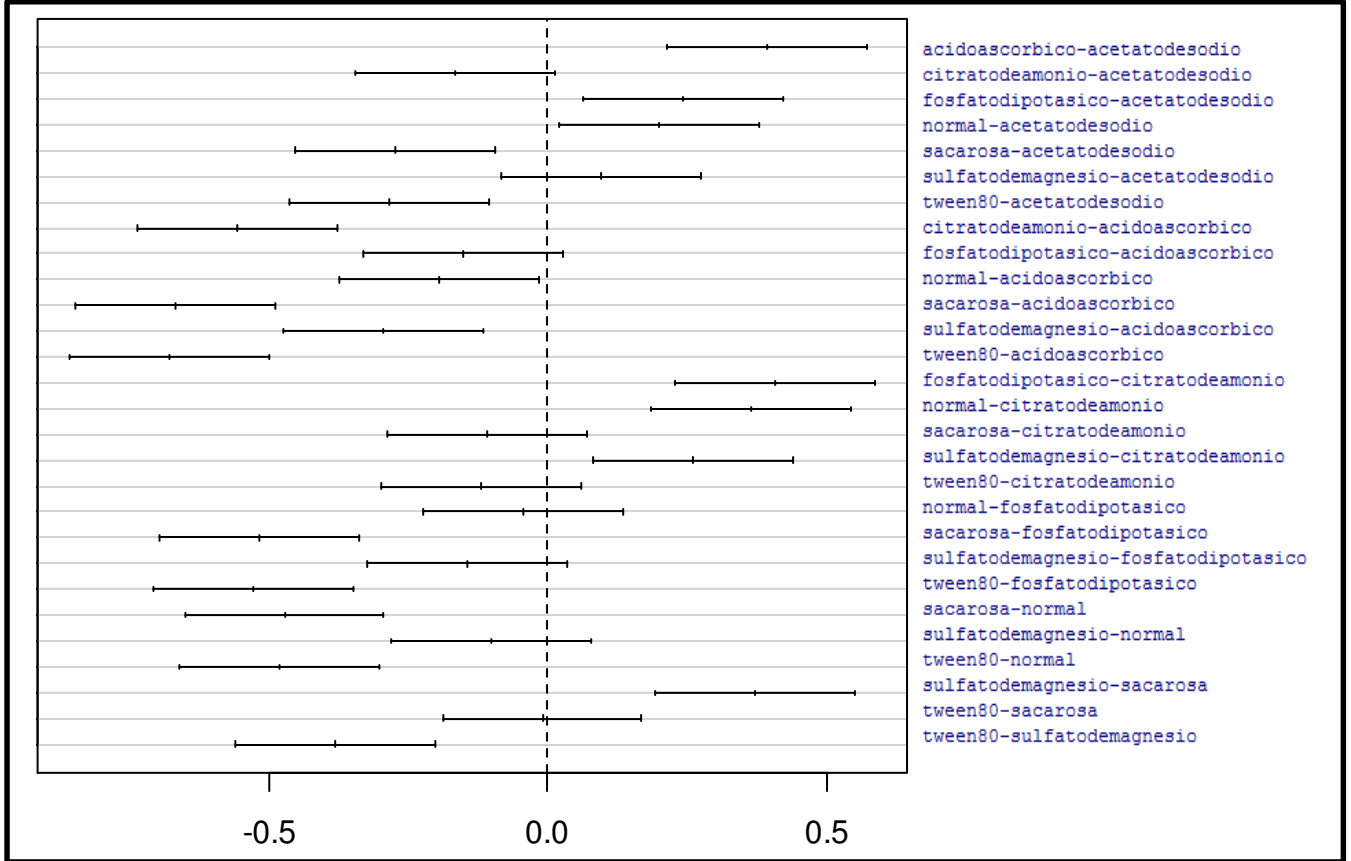


Figura 73. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 12 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.

Cuadro 45. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.

Tratamientos en comparación	Valor P	H ₀ ó H ₁
Ácido Ascórbico vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Citrato de Amonio vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Fosfato Dipotásico vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Sacarosa vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Tween 80 vs. Acetato de Sodio	0.0000000	H ₁
Citrato de Amonio vs. Ácido ascórbico	0.0000090	H ₁
Fosfato Dipotásico vs. Ácido ascórbico	0.0001071	H ₁
Producción Normal vs. Ácido ascórbico	0.0149789	H ₁
Sacarosa vs. Ácido ascórbico	0.7841528	H ₀
Sulfato de Magnesio vs. Ácido Ascórbico	0.4525549	H ₀
Tween 80 vs. Ácido ascórbico	0.8846198	H ₀
Fosfato Dipotásico vs. Citrato de Amonio	0.9978021	H ₀
Producción Normal vs. Citrato de Amonio	0.4087735	H ₀
Sacarosa vs. Citrato de Amonio	0.0000000	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Citrato de amonio	0.0121708	H ₁
Tween 80 vs. Citrato de Amonio	0.0000000	H ₁
Producción Normal vs. Fosfato Dipotásico	0.8195064	H ₀
Sacarosa vs. Fosfato Dipotásico	0.0000003	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Fosfato Dipotásico	0.737102	H ₀
Tween 80 vs. Fosfato Dipotásico	0.000006	H ₁
Sacarosa vs. Producción Normal	0.000838	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Producción Normal	0.7998533	H ₀
Tween 80 vs. Producción Normal	0.0001806	H ₁
Sulfato de Magnesio vs. Sacarosa	0.0137556	H ₁
Tween 80 vs. Sacarosa	0.9999990	H ₀
Tween 80 vs. Sulfato de Magnesio	0.0251994	H ₁

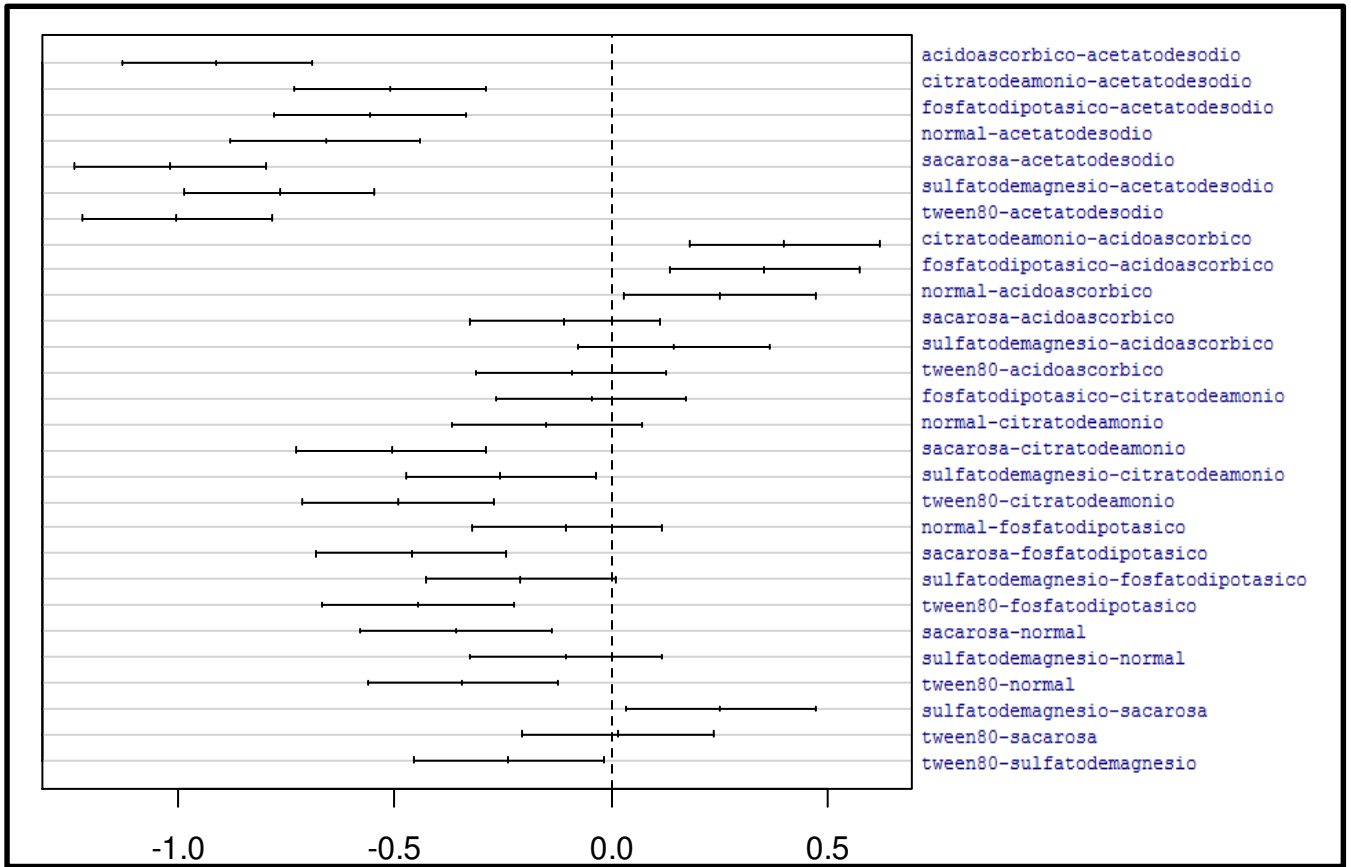


Figura 74. Prueba de Tukey para la producción de Pioverdina a las 24 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 tratadas con los ingredientes del medio MRS y MRSm.