



---

---

**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Maestría en Ciencias de la Producción y de la**  
**Salud Animal**

**Efecto de *Pediococcus acidilactici* (ATCC 8042) sobre  
*Escherichia coli* O157:H7 (EDL 933) en medio infusión  
carne modificado.**

**TESIS**

**Que para optar por el grado de**  
***MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN***  
***Y DE LA SALUD ANIMAL***

***Presenta:***

**Eridani Noemi Ortuño De la O**

***Tutor: Guillermo Valdivia Anda, FES Cuautitlán***

**Comité Tutor:**

**Carlos Gerardo García Tovar, FES Cuautitlán**  
**Hipólito Ángel Manjarrez Hernández, Facultad de**  
**Medicina**

**Estado de México, junio 2018**



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.

“De lo infinitamente pequeño surge lo infinitamente grande y maravilloso”

Louis Pasteur

## DEDICATORIAS

A Dios, por darme la oportunidad de seguir preparándome, por nunca dejarme sola, por sus planes perfectos para mí y por todas sus bendiciones. Todo es por Él y para Él.

*Je t'aime, Seigneur, tu es ma force. Le Seigneur est pour moi un roc, un refuge où je suis en sûreté. Mon Dieu est pour moi un rocher où je suis à l'abri du danger, un bouclier qui me protège, une forteresse où je suis sauvé. Ps. 18:1-2.*

A mi papá, por su soporte, ayuda e impulso para seguir un camino lleno de satisfacciones. Por tu amor y ejemplo.

A mi mamá, por ser mi cómplice, mi apoyo y mi consuelo. Por llenarme de enseñanzas, de amor y de seguridad.

A Moy, por sus consejos, apoyo y enseñanzas para seguir adelante. Por acompañarme siempre.

A Felipe, por su ejemplo, tenacidad, sus palabras fuertes y tiernas que me ayudan a ser mejor.

A Dany, por acompañarme, ayudarme, cuidarme y llenar de risas este camino. Por siempre estar.

A José Ignacio, a ti mi amor por acompañarme y apoyarme siempre. Por llenarme de felicidad y de ilusiones. Te pensamos siempre.

A Roxana y a Jimena por su apoyo y cariño. Gracias por llegar a esta familia a darnos más felicidad.

A Isabella, por ser esa niña llena de felicidad, amor y luz. Eres una gran bendición e impulso para mí y toda la familia.

“Todos los triunfos nacen cuando nos atrevemos a comenzar” Eugene Ware.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, “Máxima Casa de Estudios” por darme la oportunidad de seguir formando parte de esta comunidad, con todas las responsabilidades que ello implica, tanto con nuestra institución, en la comunidad y en el país.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, que ha sido durante mucho tiempo mi casa, el lugar donde me formé y que me ha proporcionado un cúmulo de recuerdos que me hace ver que todo lo que he vivido ha contribuido a que sea mejor persona, mejor estudiante, mejor amiga y mejor hija. Gracias por todos los retos, los conocimientos y las experiencias otorgadas, que me han hecho crecer y que ahora me siento preparada para enfrentar el presente y poder plantearme nuevos objetivos, tanto en lo personal como en lo profesional. Haré que todo el conocimiento que adquirí durante estos años se convierta en aportaciones para la sociedad mexicana.

Mi gratitud a todos mis profesores, quienes dieron parte de sí mismos para transmitirme conocimientos y aptitudes indispensables en el posgrado. A mis compañeros y amigos que han sido soporte y me han acompañado en este trayecto, que han sido testigos y cómplices del esfuerzo y dedicación necesarias para llegar hasta este punto, les agradezco su cariño y su impulso.

A mi tutor Dr. Guillermo Valdivia Anda por ser un excelente profesor y mentor; por el tiempo otorgado desde la licenciatura hasta este proyecto para que culminara en buenos resultados y por la confianza depositada en mí.

Al Dr. Carlos Gerardo García Tovar y al Dr. Ángel Hipólito Manjarrez Hernández por darme las herramientas necesarias y el apoyo para llevar a cabo esta investigación. Al M. en C. César Cuenca Verde por el apoyo técnico prestado para la adecuada realización del proyecto. De igual manera a mis sinodales, que me compartieron su tiempo para mejorar este trabajo.

El trabajo fue realizado gracias al equipo e instalación del Laboratorio de Patogenicidad Microbiana (L-3) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal de la FESC, Campo 4. También agradezco el apoyo otorgado por el programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

## RESUMEN

Las bacterias acidolácticas (BAL) han adquirido gran importancia en la industria alimenticia por su contribución al valor de los productos. Se les conocen como cultivos iniciadores y tienen la capacidad de mejorar la vida útil del producto, las características organolépticas y la seguridad microbiológica controlando cepas patógenas causantes de enfermedades emergentes. Este tipo de bacterias, ocupan un papel central en los fenómenos fermentativos y los géneros más utilizados son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Pediococcus*.

Esta investigación se enfocó en estudiar la acción de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre *Escherichia coli* O157:H7 (EDL 933). Empleando un medio líquido similar a la composición del salami, se evaluó la cinética de crecimiento de las bacterias en co-cultivo directo y separado por membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  y de diálisis de 16 kDa, así como la formación de biofilm y análisis de proteínas en el medio. Se demostró que *P. acidilactici* ejerció un efecto bacteriostático sobre *Escherichia coli* O157:H7 cuando las bacterias se encontraban en contacto directo y también en presencia de sustancias filtrables producidas por *P. acidilactici*. Por medio de microscopía electrónica de barrido, se demostró una alteración en la formación del biofilm y cambios morfológicos sobre la estructura bacteriana de *E. coli*. Se descartó la relación del pH con el efecto bacteriostático sobre la bacteria patógena. Asimismo, se realizó un análisis de proteínas y de acuerdo con los resultados obtenidos, se concluyó que la posible causa del efecto observado sobre *E. coli* O157:H7 fueron partículas de bajo peso molecular, menor a 16 kDa, que ejercieron un efecto probablemente sobre la regulación genética bacteriana.

Palabras clave: *Pediococcus acidilactici*, *Escherichia coli* O157:H7, efecto bacteriostático, biofilm

## ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) have become very important in the food industry because of their contribution to product value. They are known as starter cultures and they have the ability to improve the shelf life of the product, organoleptic characteristics and microbiological stability and quality controlling pathogenic strains that cause emerging diseases. This group of bacteria occupy a central role in the fermentative phenomena and the most used genera are: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Pediococcus*.

This research focused on studying the action of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 to control *Escherichia coli* O157: H7 (EDL 933). Using a liquid medium similar to the salami's composition, bacteria growth was evaluated in direct co-culture and separated by 0.22 µm and dialysis (16 kDa) membranes, as well as biofilm formation and protein analysis in the medium. It was demonstrated that *P. acidilactici* exerted a bacteriostatic effect on *Escherichia coli* O157: H7 when the bacteria were in direct contact and in the presence of filterable substances produced by *P. acidilactici*. Also, it was demonstrated an alteration in the formation of biofilm and by scanning electron microscopy, reversible morphological changes on the bacterial structure of *E. coli*. The relationship between pH and bacteriostatic effect on the pathogenic bacteria was rejected. Likewise, a protein analysis was carried out and, according to the results, it was concluded that the possible cause of the effect observed on *E. coli* O157: H7 were low molecular weight particles (less than 16 kDa) that probably exerted an effect on bacterial genetic regulation.

Key words: *Pediococcus acidilactici*, *Escherichia coli* O157:H7, bacteriostatic effect, biofilm

<b>Índice de contenido</b>	<b>Página</b>
1. Introducción.	1
2. Marco Teórico.	2
2.1. Inocuidad alimentaria.	2
2.2. Métodos de conservación de alimentos.	3
2.3. Patógenos emergentes.	4
2.4. Enfermedades Transmitidas por Alimentos.	4
2.5. <i>Escherichia coli</i> O157:H7.	5
2.6. Bacterias acidolácticas.	6
2.7. <i>Pediococcus acidilactici</i> .	9
2.8. <i>Quorum sensing</i> .	9
2.9. Biopelícula (Biofilm).	10
3. Antecedentes.	11
4. Justificación.	12
5. Objetivos.	12
5.1. General.	12
5.2. Específicos.	12
6. Hipótesis.	13
7. Material biológico.	13
8. Metodología.	13
8.1. Caracterización de cepas bacterianas.	13
8.2. Análisis de biofilm.	14
8.2.1. Microscopía óptica.	14
8.2.2. Microscopía Electrónica de Barrido.	14
8.3. Formulación de medio Infusión Carne Modificado (ICm).	14
8.4. Cinéticas de crecimiento de las cepas bacterianas.	15
8.5. Pruebas en co-cultivo.	16
8.6. Efecto sobre la formación de biofilm.	17
8.7. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.	17
8.8. Electroforesis de proteínas.	18
9. Resultados.	19
9.1. Formulación, preparación y composición de medio ICm.	19
9.2. Caracterización de la cepa <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (EDL 933).	21
9.3. Cultivo de <i>E. coli</i> en caldo Luria Bertani.	22
9.3.1. Cinética de crecimiento.	22
9.3.2. Formación de biofilm.	23
9.4. Cultivo de <i>E. coli</i> en medio ICm.	23
9.4.1. Cinética de crecimiento.	23
9.4.2. Formación de biofilm (microscopía óptica).	24
9.4.3. Formación de biofilm (tinciones diferenciales).	25
9.4.4. Formación de biofilm (MEB).	26
9.5. Cultivo de <i>E. coli</i> en medio ICm bifásico.	27
9.6. Cultivo de <i>E. coli</i> en caldo MRS.	29
9.7. Caracterización de la cepa <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.	30

9.8. Cultivo de <i>P. acidilactici</i> en caldo MRS	30
9.9. Cultivo de <i>P. acidilactici</i> en caldo ICm.	31
9.9.1. Cinética de crecimiento.	31
9.9.2. Formación de biofilm (microscopía óptica).	32
9.9.3. Formación de biofilm (tinciones diferenciales).	32
9.9.4. Formación de biofilm (MEB).	33
9.10. Formación de biofilm de <i>P. acidilactici</i> y <i>E. coli</i> en medio ICm	34
9.11. Co-cultivo con inoculación simultánea de <i>E. coli</i> y <i>P. acidilactici</i> en caldo MRS.	35
9.12. Co-cultivo con inoculación simultánea de <i>E. coli</i> y de <i>P. acidilactici</i> en caldo ICm.	36
9.12.1. Cinética de crecimiento (1:1).	36
9.12.2. Cinética de crecimiento (5:1).	37
9.12.3. Ensayo en placa para producción de biofilm.	38
9.12.4. Formación de biofilm (microscopía óptica).	39
9.12.5. Formación de biofilm (tinciones diferenciales).	39
9.12.6. Formación de biofilm (MEB).	40
9.13. Con-cultivo con inoculación simultánea con ajuste de pH.	42
9.14. Co-cultivo separado con membranas de 0.22µm con inoculación simultánea de <i>E. coli</i> y de <i>P. acidilactici</i> en caldo ICm.	43
9.14.1. Cinética de crecimiento.	43
9.14.2. Formación de biofilm (microscopía óptica).	45
9.14.3. Formación de biofilm (tinción diferencial).	45
9.14.4. Formación de biofilm (MEB).	46
9.15. Co-cultivo separado con membranas de diálisis con inoculación simultánea de <i>E. coli</i> y de <i>P. acidilactici</i> en caldo ICm.	48
9.15.1. Cinética de crecimiento.	48
9.15.2. Formación de biofilm (microscopía óptica).	49
9.15.3. Formación de biofilm (tinción diferencial).	49
9.15.4. Formación de biofilm (MEB).	50
9.16. Prueba de presencia de bacteriófagos.	54
9.17. Proporción de elementos de la matriz extracelular.	55
9.18. Análisis de proteínas.	57
10. Discusión	59
11. Sugerencias y aplicaciones	67
12. Conclusiones	68
13. Referencias bibliográficas.	69
14. Apéndice	76

<b>Índice de Tablas</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Bacteriocinas a partir de bacterias acidolácticas.	8
Tabla 2. Formulación de Medio Infusión Carne modificado.	19
Tabla 3. Composición química del medio ICm.	20
Tabla 4. Cuadro comparativo de análisis por EDS de los diferentes cultivos y co-cultivos.	56
Tabla 5. Cantidad de proteína de sobrenadantes de cultivos y co-cultivos.	58
Tabla 6. Iniciadores utilizados para los genes de virulencia de <i>E. coli</i> 157:H7.	76
Tabla 7. Protocolo para PCR de los genes de virulencia de <i>E. coli</i> O157:H7.	76
Tabla 8. Preparación del reactivo de Bradford.	77
Tabla 9. Gel separador (12%).	77
Tabla 10. Gel concentrador.	77
Tabla 11. Prueba T: formación de biofilm en medio ICm.	78
Tabla 12. Prueba T: formación de biofilm en la hora 8 de cultivo en medio ICm.	78
Tabla 13. Análisis de varianza: <i>E. coli</i> en diferentes proporciones con <i>P. acidilactici</i> .	79
Tabla 14. Prueba Tukey: <i>E. coli</i> en diferentes proporciones con <i>P. acidilactici</i> .	79
Tabla 15. Prueba T. <i>E. coli</i> en co-cultivo con neutralización de pH.	80
Tabla 16. Prueba T: <i>E. coli</i> en presencia y ausencia de <i>P. acidilactici</i> y/o de sus productos filtrables.	80
Tabla 17. Análisis de varianza: <i>P. acidilactici</i> en cultivo individual y en co-cultivo.	80
Tabla 18. Prueba Tukey: <i>P. acidilactici</i> en cultivo individual y en co-cultivo.	81
Tabla 19. Análisis de varianza: <i>E. coli</i> en cultivo individual y en co-cultivo.	81
Tabla 20. Prueba Tukey: <i>E. coli</i> en cultivo individual y en co-cultivo.	82

<b>Índice de Figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Vías de transmisión de <i>E. coli</i> O157:H7.	6
Figura 2. Fermentación homoláctica.	7
Figura 3. Dispositivo para co-cultivo.	16
Figura 4. Medio ICm.	19
Figura 5. Amplificación de genes de virulencia de <i>E. coli</i> O157:H7.	21
Figura 6. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> en medio LB.	22
Figura 7. Biofilm de <i>E. coli</i> en caldo LB.	23
Figura 8. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> en medio ICm.	24
Figura 9. Formación de biofilm de <i>E. coli</i> en medio ICm.	24
Figura 10. Formación de biofilm de <i>E. coli</i> en medio ICm (tinción PAS).	25
Figura 11. Formación de biofilm de <i>E. coli</i> en medio ICm (tinción Azul de Coomassie).	25
Figura 12. MEB de biofilm de <i>E. coli</i> en medio ICm (5000x).	26
Figura 13. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> en medio ICm (fase líquida).	27
Figura 14. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> en medio ICm (fase sólida).	28
Figura 15. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> en medio ICm (fases mezcladas).	28
Figura 16. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> en medio MRS.	29
Figura 17. Curva de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> en caldo MRS.	30
Figura 18. Curva de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> en medio ICm.	31
Figura 19. Formación de biofilm de <i>P. acidilactici</i> en medio ICm.	32
Figura 20. Formación de biofilm de <i>P. acidilactici</i> en medio ICm (tinción PAS).	32
Figura 21. Formación de biofilm de <i>P. acidilactici</i> en medio ICm (tinción Azul de Coomassie).	33
Figura 22. MEB de biofilm de <i>P. acidilactici</i> en medio ICm (1000x).	33
Figura 23. MEB de biofilm de <i>P. acidilactici</i> en medio ICm (5000x).	34
Figura 24. Formación de biofilm de <i>P. acidilactici</i> y <i>E. coli</i> en medio ICm.	34

Figura 25. Cinética de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> y <i>E. coli</i> en co-cultivo en caldo MRS.	35
Figura 26. Cinética de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> y <i>E. coli</i> en co-cultivo en caldo ICm (1:1).	36
Figura 27. Cinética de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> y <i>E. coli</i> en co-cultivo en caldo ICm (1:5).	37
Figura 28. Cuenta viable y densidad óptica de colorante eluído.	38
Figura 29. Biofilm de <i>P. acidilactici</i> en co-cultivo con <i>E. coli</i> en ICm.	39
Figura 30. Biofilm de <i>P. acidilactici</i> en co-cultivo con <i>E. coli</i> en ICm (PAS).	39
Figura 31. Biofilm de <i>P. acidilactici</i> en co-cultivo con <i>E. coli</i> en ICm (AC).	40
Figura 32. MEB de biofilm de <i>P. acidilactici</i> en co-cultivo con <i>E. coli</i> (1000x).	40
Figura 33. MEB de biofilm de <i>P. acidilactici</i> en co-cultivo con <i>E. coli</i> (5000x).	41
Figura 34. MEB de <i>E. coli</i> en co-cultivo con <i>P. acidilactici</i> en ICm (8000x).	41
Figura 35. Cinética de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> y <i>E. coli</i> con ajuste de pH.	42
Figura 36. Cinética de crecimiento de co-cultivo separado por membranas de 0.22µm.	43
Figura 37. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> después del co-cultivo separado por membranas de 0.22µm.	44
Figura 38. Formación de biofilm de bacterias en co-cultivo separadas por membranas de 0.22µm	45
Figura 39. Biofilm de bacterias en co-cultivo separadas por membranas de 0.22µm (AC).	45
Figura 40. MEB de <i>E. coli</i> en co-cultivo separado por membranas de 0.22µm (10000X).	46
Figura 41. MEB de <i>E. coli</i> en co-cultivo separado por membranas de 0.22µm (8000X).	47
Figura 42. MEB de biofilm de <i>P. acidilactici</i> en co-cultivo separado por membranas de 0.22µm (5000x).	47

Figura 43. Cinética de crecimiento de co-cultivo separado por membranas de diálisis.	48
Figura 44. Formación de biofilm de bacterias en co-cultivo separadas por membranas de diálisis.	49
Figura 45. Biofilm de bacterias en co-cultivo separadas por membranas de diálisis (AC).	49
Figura 46. MEB de <i>E.coli</i> en co-cultivo separado por membranas de diálisis (10000X).	50
Figura 47. MEB de <i>E.coli</i> en co-cultivo separado por membranas de diálisis (10000X).	51
Figura 48. MEB de <i>E.coli</i> en co-cultivo separado por membranas de diálisis (10000X).	51
Figura 49. MEB de <i>E.coli</i> en co-cultivo separado por membranas de diálisis (10000X).	52
Figura 50. MEB de <i>P. acidilactici</i> en co-cultivo separado por membranas de diálisis (5000X).	53
Figura 51. MEB de <i>P. acidilactici</i> en co-cultivo separado por membranas de diálisis (5000X).	53
Figura 52. Control positivo a presencia de bacteriófagos.	54
Figura 53. Sobrenadantes negativos a presencia de bacteriófagos.	54
Figura 54. EDS de <i>E. coli</i> en ICm.	55
Figura 55. Corrimiento electroforético de medio ICm sin inocular.	57
Figura 56. Corrimiento electroforético de sobrenadantes de cultivos individuales y co-cultivos.	58

## ABREVIATURAS

AST	Agar soya tripticaseína
CH	Colitis hemorrágica
<i>eae</i>	Gen codificador de la intimina
EDS	Espectroscopía de energía dispersiva
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ICm	Infusión carne modificado
LB	Luria Bertani
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MPEA	Microorganismos patógenos emergentes de los alimentos
MRS	Man Rogosa y Sharp
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
QS	“Quorum sensing”
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga
Stx	Toxina Shiga
<i>stx</i>	Gen de toxina Shiga
SUH	Síndrome urémico hemolítico
UFC	Unidades formadoras de colonias

## 1. INTRODUCCIÓN

La tendencia mundial hacia el consumo de alimentos poco procesados pone de manifiesto la importancia de garantizar que éstos sean inocuos y de alta calidad. La obtención de alimentos fermentados se ha basado en la actividad metabólica de la microbiota natural o contaminante existente en las propias materias primas. En consecuencia, la composición microbiana del material de partida ejerce una influencia determinante en la calidad del producto final (Fernández, 2004).

El descubrimiento respecto a que las bacterias lácticas eran vitales para las fermentaciones lácteas (Orla-Jensen, 1919) supuso la base para su aislamiento, caracterización y explotación industrial (Stanley, 1998). De este modo nació la industria de cultivos iniciadores, que posteriormente se extendería a otros tipos de alimentos fermentados.

Las bacterias acidolácticas se han utilizado en la obtención y elaboración de productos (embutidos cárnicos y quesos madurados), además de la materia prima de origen animal las cuales son llamadas comúnmente cultivos iniciadores. Estas bacterias ocupan un papel central en los fenómenos fermentativos; por una parte, provocan una acidificación rápida de las materias primas mediante la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, etc.). Por otra, producen otros compuestos importantes como etanol, compuestos aromáticos, bacteriocinas y otras sustancias antimicrobianas, exopolisacáridos y diversas enzimas. De esta manera, la vida útil, la seguridad microbiológica y la calidad organoléptica de los productos finales suelen aumentar notablemente en comparación con las de las materias primas de partida (Wood, 1997).

Existen propiedades metabólicas muy importantes para el desarrollo de los procesos fermentativos que están codificadas en plásmidos y que se pueden perder al someter a las cepas a subcultivos sistemáticos o al emplearlas en alimentos a los que no están adaptadas (Leroy y De Vuyst, 2003). Por lo anterior, se ha provocado una disminución en la biodiversidad de los cultivos iniciadores y, en consecuencia, una pérdida de las características originales de diversos productos fermentados (Caplice y Fitzgerald, 1999). Por ello, son importantes los avances tanto en la tecnología de los procesos fermentativos como en el conocimiento de los principales microorganismos involucrados (taxonomía, metabolismo, genética, ecología, etc.) (Fernández, 2004). Por lo tanto, existe una tendencia reciente que aboga por el aislamiento de cepas silvestres a partir de productos tradicionales para ser utilizadas como cultivos iniciadores en la fermentación de alimentos y bebidas (Hébert *et al.*, 2000).

El consumo de productos naturales y mínimamente procesados representa un gran problema de salud pública por la presencia de patógenos emergentes como *Escherichia coli* serotipo O157:H7, la cual ha sido aislada y es responsable de brotes reportados en diversos países en humanos y animales de producción (Roldán *et al.*, 2007).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Inocuidad alimentaria

Los microorganismos están presentes en todo el suministro de alimentos y pueden contaminarlos de diversas maneras, en todos los niveles de producción, desde la materia prima (a través del agua de riego, trabajadores del campo, insectos y contaminación fecal por animales salvajes), hasta por el equipo (agua de lavado, contaminación cruzada con otros alimentos, etc.). Estos microorganismos plantean dos problemas principales en el suministro de los alimentos: el riesgo para la salud humana por las enfermedades transmitidas por los alimentos y las pérdidas económicas asociadas con la pérdida de alimentos debido al deterioro (Davidson *et al.*, 2015).

Por ello, para que un alimento sea considerado como seguro para su consumo, éste debe cumplir con ciertas características aseguradas por aquellos involucrados en su proceso de producción (Hernández, 2013). La garantía de que el alimento no causará daño al consumidor, cuando sea preparado o ingerido y de acuerdo con el uso a que se destine, se denomina inocuidad alimentaria (Codex Alimentarius, 1969).

Los procedimientos que garantizan que un alimento es inocuo pueden clasificarse dentro de uno de estos tres rubros (Hernández, 2013):

- La protección del alimento contra contaminaciones.
- La prevención del desarrollo y diseminación de contaminación.
- La remoción efectiva de los contaminantes.

Además, existen diversos factores que afectan la inocuidad de los alimentos, algunos de ellos se mencionan a continuación (Astorga, 2014):

- Prácticas agrícolas inadecuadas;
- Falta de higiene en las fases de la cadena alimentaria;
- Ausencia de controles preventivos en las operaciones de elaboración y preparación de los alimentos;
- Utilización inadecuada de productos químicos;
- Contaminación de las materias primas, los ingredientes y el agua;
- Almacenamiento inadecuado;
- Aparición de nuevos peligros alimentarios y situaciones de emergencia;
- Aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos;
- Nuevas tecnologías alimentarias y agrícolas;
- Cambios del medio producidos por cambios climáticos;
- Cambios en los estilos de vida de las personas, ejemplo: viajes;
- Creciente comercialización de los alimentos.

La inocuidad de los alimentos engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Las políticas y actividades que persiguen dicho fin deberán abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo (OMS, 2007).

Actualmente se producen alimentos funcionales cuya particularidad importante es que, además de ser elaborados por sus características nutricionales, también cumplen una función específica: mejorar la salud al reducir el riesgo de contraer enfermedades. Para ello, se le agregan componentes biológicamente activos como minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibra alimenticia o antioxidantes, etc. A esta operación de añadir nutrientes exógenos se le denomina, también, fortificación (Olagnero *et al.*, 2007).

## 2.2 Métodos de conservación de alimentos

Para garantizar la inocuidad de los alimentos, se utilizan diversas técnicas que se han mejorado a lo largo de los años (Hernández, 2013). Una de ellas es la conservación de alimentos, la cual corresponde a un conjunto de técnicas encargadas de aumentar la vida y disponibilidad de los alimentos para el consumo. Los procesos, técnicas y métodos de conservación de alimentos son muy variados: sistemas como ebullición; esterilización; pasteurización; irradiación; refrigeración; congelación; deshidratación; enlatado; adición de sustancias químicas, entre otros (Camou *et al.*, 2014).

Por definición, un conservador puede ser considerado como una sustancia química útil para retrasar o inhibir el crecimiento microbiano con el fin de evitar el deterioro de los alimentos y / o la pérdida de la inocuidad alimentaria (Surekha y Reddy, 2000). Basándose en esta definición, la bioconservación es el uso de compuestos de origen "natural", por ejemplo, productos derivados del metabolismo microbiano para conservar alimentos (Astorga, 2014).

Una de las maneras más antiguas de enriquecer naturalmente un alimento con sustancias inhibitoras contra patógenos de alimentos es la fermentación. Este proceso es anaeróbico, o parcialmente anaeróbico, donde los carbohidratos o compuestos relacionados son oxidados para producir energía. Aunque los microorganismos no se identificaron como agentes de contaminación de alimentos hasta el siglo XIX, la producción de vinos, panes, quesos, ha sido practicada por más de 4000 años. Es probable que los alimentos producidos por actividad microbiana hayan sido descubiertos por accidente. Pasteur reconoció la importancia de los microorganismos en la contaminación de los vinos y Appert fue el primero en utilizar calor para destruir organismos en la industria de enlatados (Vega, 2008).

Los organismos que se utilizan para procesos de fermentación a nivel industrial deben tener las siguientes características (Vega, 2008):

1. Deben ser capaces de crecer rápidamente en el sustrato y ambiente adecuado;
2. Deben de cultivarse fácilmente en grandes cantidades;

3. Ser capaces de mantener constancia fisiológica bajo las condiciones de cultivo y producir abundantemente las enzimas esenciales para que ocurran los cambios deseados.

Los microorganismos que predominan en la fermentación para la producción de un alimento son levaduras y bacterias ácidolácticas (BAL): principalmente pertenecientes al género *Saccharomyces*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Pediococcus*.

### 2.3 Patógenos emergentes

Los alimentos permiten el desarrollo de: (a) microorganismos responsables de enfermedades transmisibles al hombre; (b) microorganismos responsables de enfermedades no transmisibles al hombre; (c) microorganismos de contaminación exógena responsables de toxiinfecciones alimentarias (TIA); y (d) microorganismos saprofitos, alterantes de los alimentos o involucrados en la producción de alimentos fermentados (Hernández, 2010).

Un amplio número de microorganismos patógenos (bacterias, virus y parásitos) se han transmitido de los alimentos al hombre durante miles de años. Se ha reconocido la existencia de microorganismos patógenos emergentes de los alimentos (MPEA) que son considerados los responsables de enfermedades cuya incidencia en las personas ha aumentado durante las dos últimas décadas o que podrían incrementarse en un futuro próximo, así como los responsables de nuevas enfermedades o de enfermedades que se manifiestan con signos clínicos diferentes (Altekruse *et al.*, 1998; Marano y Pappaioanou, 2004).

La aparición de los MPEA se debe, principalmente, a las modificaciones genéticas resultantes de la adquisición de nuevos genes, de la pérdida de otros, de mecanismos de recombinación genética, de la transmisión horizontal de factores de virulencia y de resistencia a agentes antimicrobianos, así como de resistencia a los nuevos métodos de procesado y conservación de los alimentos y de un control inadecuado de la protección de la salud pública. También, es importante mencionar que los MPEA se caracterizan por una rápida propagación y fácil difusión, por su capacidad de afectar a sectores poblacionales muy sensibles (niños, ancianos e inmunodeprimidos) (Orlandi *et al.*, 2002).

### 2.4 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva. Sus síntomas más comunes son diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etcétera (Rosas y Acosta, 2001).

Actualmente, se han descrito más de 250 ETA. La mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias, virus, hongos y parásitos. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA se encuentran especies de los géneros *Campylobacter* y *Salmonella*, así como la cepa O157:H7 de la enterobacteria *Escherichia coli* (Rosas y Acosta, 2001).

Las ETA constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en su ocurrencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan. La incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos y se ha demostrado que la contaminación de éstos, puede ocurrir durante su procesamiento o por el empleo de materia prima contaminada (González y Rojas, 2005).

## 2.5 *Escherichia coli* O157:H7

*Escherichia coli* es un microorganismo Gram negativo anaerobio. Sus cepas forman la mayor parte de la microbiota comensal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo de animales y humanos, eliminándose por las heces al medio ambiente (Máttar, 2001).

Existen cepas patógenas que son caracterizadas por su capacidad para causar distintos tipos de enfermedades intestinales y extraintestinales debido a la expresión de múltiples factores de virulencia incluyendo adhesinas, toxinas, sideróforos y sistemas de secreción, entre otros (Blanco *et al.*, 2002). Presentan una estructura antigénica que se caracteriza por antígenos somáticos (O), capsulares (K) y flagelares (H). Los antígenos O y K presentan propiedades antifagocitarias e inhibitoras de las sustancias bactericidas del suero y son responsables de la virulencia de las cepas invasivas. (Blanco 1991, Sherris 1993).

En los últimos años se han identificado 6 patotipos de *E. coli*:

1. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC, del inglés enterotoxigenic *E. coli*);
2. *E. coli* enteropatógena (EPEC, del inglés enteropathogenic *E. coli*);
3. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC, del inglés enteroinvasive *E. coli*);
4. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, del inglés enterohemorrhagic *E. coli*);
5. *E. coli* enteroagregativa (EAEC, del inglés enteroaggregative *E. coli*);
6. *E. coli* enteroadherente (DAEC, del inglés diffusely-adherent *E. coli*).

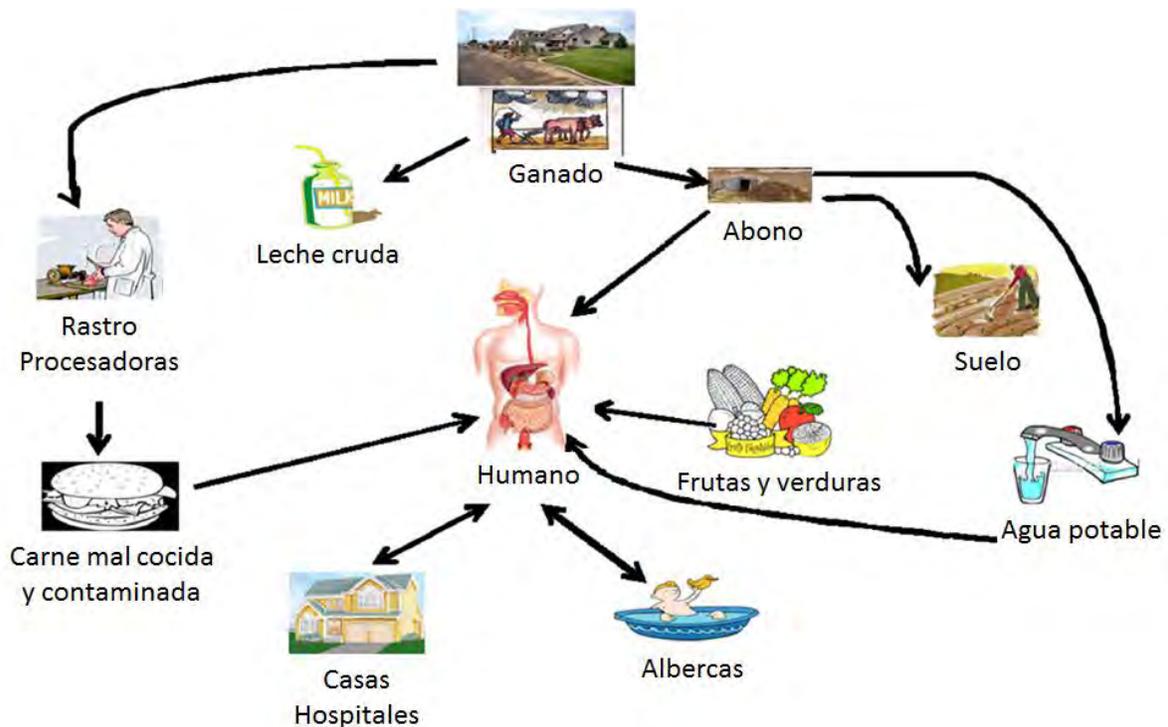
*Escherichia coli* O157:H7 es el serotipo de EHEC más prevalente. Es un patógeno emergente asociado con enfermedades transmitidas por alimentos. "En el año 1982 fue reconocido por primera vez en Estados Unidos, como causante de dos brotes de colitis hemorrágica (CH)." Esta clasificación se debe a que causa diarrea sanguinolenta (Marzocca *et al.*, 2006).

El serotipo O157:H7 es no fermentador de sorbitol. Pertenece al grupo de cepas productoras de toxina Shiga (STEC), las cuales son potentes citotoxinas (anteriormente conocidas como Vero

citotoxinas) y se denominan Stx1, Stx2 y variantes de Stx2. Estos factores de virulencia, son liberados en el intestino, generando lesiones típicas de adhesión y daño tisular a nivel de las microvellosidades. Posteriormente, pasan a la circulación sanguínea y causan daños a nivel del endotelio vascular y el síndrome urémico hemolítico (SUH) (Karmali, 1989) y ocasionando un importante problema de salud pública.

El ganado ha sido implicado como reservorio principal de *E.coli* O157:H7, considerándose la carne poco cocida y la leche sin pasteurizar como los mayores vehículos de la infección (Su y Brandt, 1995; Thomas, 1996). También se ha aislado en aguas no tratadas, aguas de lagos y jugos de frutas y verduras (Figura 1) (Blanco, 1993; Prado, 1995; Acheson, 1996).

Figura 1. Vías de transmisión de *E. coli* O157:H7 al hombre.



Los contactos de persona a persona son una forma de transmisión importante por vía oro-fecal (Prado, 1995).

## 2.6 Bacterias acidolácticas

Las bacterias acidolácticas (BAL) comprenden un diverso grupo de organismos anaerobios facultativos, Gram positivos, cocos y bacilos de longitud variable y de un grosor de 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  catalasa negativos (Savado, 2006). Carecen de actividad respiratoria pero contienen un grupo hembra que les permite poner en marcha la cadena respiratoria con el oxígeno como aceptor de electrones (Ekinci y Gurel, 2007).

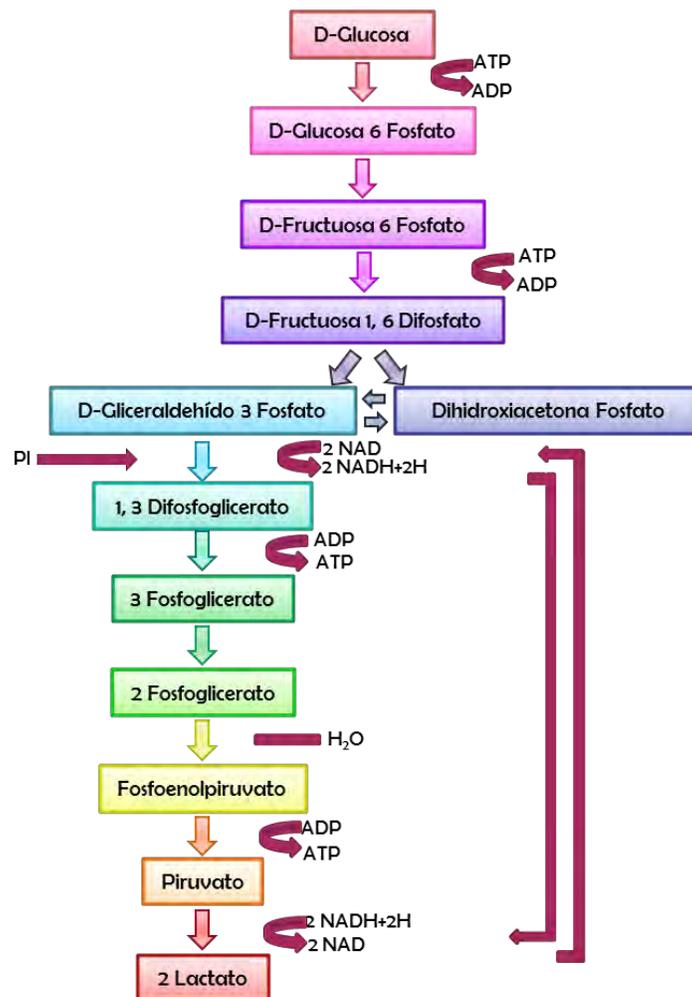
Estas bacterias acidolácticas son quimoorganotróficas y pueden utilizar carbohidratos fermentables o alcoholes, como fuentes de energía para formar principalmente ácido láctico, a través de la degradación de hexosas a lactato y productos adicionales como acetato, etanol, CO<sub>2</sub>, formato o succinato (Savadogo, 2006).

Según la fermentación que realizan, las BAL se clasifican en homofermentativas (que producen sólo ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias), y según la temperatura de crecimiento en mesófilos y termófilos (Bertrand y Haertllé, 2003).

- Homofermentativas

Este grupo se compone de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*. Utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas al convertir una molécula de glucosa en dos moléculas de ácido láctico (Figura 2) (Parra, 2010).

**Figura 2. Fermentación homoláctica.**



Las bacterias pertenecientes a este grupo poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, pero carecen de la fosfoetolasa (Axelsson, 1993).

- Heterofermentativas

Producen cantidades equimolares de lactato, CO<sub>2</sub> y etanol a partir de glucosa usando la hexosa monofosfato o la vía de las pentosas. Fermentan una molécula de glucosa para formar una molécula de ácido láctico, una de etanol y una de CO<sub>2</sub> (Parra, 2010).

Las funciones en la tecnología de productos alimenticios de las BAL son: formación de sabor ácido, inhibición de organismos patógenos, gelificación de la leche, reducción del contenido de lactosa, formación de aroma, producción de gas requerida para la formación de “ojos” en los quesos, proteólisis requerida en la maduración de los quesos y también han sido muy utilizadas como probióticos (Hill *et al.*, 2002).

Las BAL producen metabolitos que pueden cumplir ciertas funciones en los alimentos:

- Sustancias antimicrobianas: Inhiben el crecimiento de otros microorganismos; por ejemplo, ácidos orgánicos, diacetilo, acetoína, peróxido de hidrógeno, reuterina, reuterociclina, péptidos antifúngicos y bacteriocinas (Osorio *et al.*, 2003).
- Ácido láctico: clasificado como GRAS (generalmente reconocido como seguro) para su empleo como aditivo alimenticio por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos). Se caracteriza por tener una actividad antimicrobiana (Ghasemi *et al.*, 2009).
- Peróxido de hidrógeno: es metabólicamente producido por el grupo *Lactococcus* a través de la acción de NADH oxidasa la cual cataliza la oxidación de NADH por oxígeno molecular. Este sistema lactoperoxidasa es un sistema antimicrobiano natural (Macedo *et al.*, 2002).
- Bacteriocinas: péptidos bioactivos con efecto bactericida o bacteriostático. En la tabla 1 se muestran algunas bacteriocinas y el microorganismo que las produce.

**Tabla 1. Bacteriocinas de bacterias acidolácticas**

Bacteriocinas	Bacteria acidoláctica
Lactococcina	<i>Lactococcus lactis</i>
Lactacina	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Mesenterocina	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Curvaticina	<i>Lactobacillus curvatus</i>
Sakacina	<i>Lactobacillus sake</i>
Pediocina	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Piscicolina	<i>Carnobacterium piscicola</i>
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>
Lacticina	<i>Lactococcus lactis</i>
Lactocina	<i>Lactobacillus sake</i>
Carnocina	<i>Carnobacterium piscicola</i>
Variacina	<i>Micrococcus varians</i>
Leucocina	<i>Leuconostoc gelidum</i>

Tomado de Jagnow *et al.*, 1991

- Exopolisacáridos (EPS): polisacáridos de cadena larga formados principalmente de glucosa, galactosa y ramnosa en diferentes proporciones.

## 2.7 *Pediococcus acidilactici*

Es una bacteria Gram positiva de forma esférica, no móvil, perteneciente a la familia de las bacterias acidolácticas. El tamaño celular varía de 0.6 a 1.0  $\mu\text{m}$ . Estas bacterias producen ácido láctico como producto final del metabolismo de carbohidratos; éste, además de no ser tóxico para el hombre y de poseer un sabor agradable, influye en el pH del medio reduciéndolo e impidiendo así, el desarrollo de microorganismos perjudiciales (Carr, 1973). En medios sólidos las colonias miden aproximadamente de 1 a 2.5 mm de diámetro, lisas, redondas y de color blanco grisáceo (Wagner, 1993).

El desarrollo y crecimiento de los pediococos depende de la presencia de un carbohidrato fermentable; si bien la glucosa y la mayoría de los monosacáridos son fermentables, la capacidad de utilizar las pentosas se limita a *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *P. urinae-equi* y algunas cepas de *P. halophilus*. Los polisacáridos generalmente no los utilizan, con excepción de la dextrina que es fermentada por *P. dextrinicus* (London *et al.*, 1976).

*Pediococcus* sp. crece en condiciones que impiden el crecimiento de microorganismos aerobios Gram-negativos que puedan estar presentes en los alimentos y alteren sus características organolépticas, así como poner en riesgo la seguridad microbiológica del alimento. La carne cruda se altera rápidamente debido al crecimiento de bacterias, por lo que se han desarrollado muchos métodos para preservarla, incluidas las de curado y fermentación (Wagner, 1993).

Antes conocido como *Pediococcus cerevisiae*, *P. acidilactici* fue utilizado por primera vez como cultivo iniciador en 1957 (Garvie, 1986). Se ha utilizado como producto iniciador en cárnicos, aunque su aislamiento inicial proviene de productos lácteos y vegetales fermentados (Hernández, 2013).

## 2.8 Detección tipo quórum (*Quorum sensing*)

En un tiempo, a las bacterias se les percibía como organismos que rara vez interactúan entre ellas, con funciones aisladas, e individuales. Hoy se sabe que las bacterias llevan una vida muy social, en simbiosis, con la capacidad de desarrollar mecanismos y formas de comunicación (Ng *et al.*, 2009). Esta manera de adaptarse a una vida en comunidad y capacidad de sociabilidad les confiere la potencialidad de detectar la densidad celular local y por consiguiente la oportunidad de desarrollar y coordinar los comportamientos de un grupo. Esta capacidad denominada detección de quórum o "quorum sensing" (QS), la desarrollan a través de la secreción y detección de las moléculas autoinductoras que se acumulan en un espacio dependiente de la densidad poblacional y del espacio de convivencia (Moslehi-Jenabian *et al.*, 2009). Cuando las concentraciones de la

molécula autoinductora o molécula señal, llegan a una determinada concentración, se activa un mecanismo de detección de quórum al cual responden las células, lo que permite a las bacterias modular sus comportamientos, incrementar la eficacia y adecuación para el medio ambiente logrando una serie de beneficios que dependen de la presencia o ausencia de otras células o de ellas mismas (Williams *et al.*, 2009). Las características de esa comunidad en condiciones de QS son; desarrollan el control de detección de comunidad en la superficie, lo que incluye la posibilidad de lograr la fijación a los sustratos, la producción de polímeros extracelulares, la síntesis de biosurfactante, la esporulación, la competencia, la bioluminiscencia, la secreción de nutrientes, la síntesis de compuestos y la producción de factores de virulencia (Duan *et al.*, 2009).

Las biopelículas son estructuras complejas de asociación de microorganismos similares y de diferentes especies bacterianas, con el fin de organizarse en forma de un supra organismo con características superiores a las que presentan individualmente las bacterias (Czaran *et al.*, 2009).

El principio de la formación de una biopelícula se establece como parte de los procesos que se pueden presentar en el mecanismo QS. Las bacterias mantienen una comunicación permanente entre ellas, dentro de los diferentes ambientes o microambientes donde permanecen y conviven. Los mecanismos de comunicación le permiten reconocer cuándo se alcanza el umbral o nivel de presencia, para desarrollar nuevas funciones, especialmente un comportamiento social, simbiótico y de permanente reconocimiento, útil para las tareas que adquieren en el mecanismo de QS (Nowak *et al.*, 2009).

## 2.9 Biopelícula (Biofilm)

Las biopelículas son comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo. También se definen como una comunidad estructurada de microorganismos inmovilizados, adheridos a una superficie inerte o viva, encapsulados en una matriz polimérica orgánica de origen bacteriano, que representa una forma de crecimiento protegida en un medio hostil. Las comunidades microbianas mantienen una forma de comunicación a través de la detección del quórum, emplean diferentes señales químicas para supervisar su entorno, alterar la expresión genética y obtener ventaja sobre sus competidores (Díaz *et al.*, 2011).

La formación de una biopelícula se desarrolla en varias fases y está influenciada por parámetros ambientales e inherentes a la fijación de la célula. Las biopelículas también sirven como nichos de protección para los agentes patógenos. Varios aspectos de la patogenia en humanos están directamente relacionados con el desarrollo de la biopelícula. Diversos tipos de superficies en entornos clínicos son propensos a la formación de la biopelícula y por lo tanto puede representar un mayor riesgo para la enfermedad (Walker *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2001).

El término biopelícula hace referencia a una serie de microorganismos que se encuentran agregados en un exopolímero compuesto de glicocálix (75%) y que se organizan en forma de

colonias adheridas a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas (Zhang *et al.*, 2009).

La hidrodinámica juega un papel importante en el desarrollo de la biopelícula, puesto que se desarrolla en una interfase líquido-sólido donde la velocidad del flujo que lo atraviesa influye en el desprendimiento físico de los microorganismos. Además, poseen un sistema de canales que les permiten el transporte de nutrientes y desechos. Esto resulta de vital importancia cuando se piensa en modificar el ambiente que priva a los microorganismos de las moléculas necesarias para su desarrollo. Otra característica de las biopelículas es su resistencia a las defensas del hospedero y agentes antimicrobianos (Kjelleberg *et al.*, 2002). Mientras que los microorganismos aislados son susceptibles a estos factores de control, las colonias organizadas e incluidas en el exopolímero forman una capa impermeable en donde sólo los microorganismos más superficiales son afectados, permitiendo la supervivencia de la gran mayoría de ellos (Janakiraman *et al.*, 2009).

### 3. ANTECEDENTES

En 1999, en Estados Unidos, Kang y Fung evaluaron el efecto de *Pediococcus acidilactici* sobre *E. coli* O157:H7. Encontraron una inhibición en el crecimiento de la bacteria patógena en caldo infusión cerebro corazón. También se demostró el aumento de producción de ácido láctico por parte de *P. acidilactici*, al agregar sulfato de manganeso y un sistema enzimático llamado Oxyrase.

En un trabajo realizado por Carey *et al.* en 2008 (Canadá), se demostró que las BAL producen ácidos orgánicos, los cuales son capaces de regular la expresión de genes de virulencia. Cuando *E. coli* fue incubada con concentraciones sub-letales de diferentes tipos de BAL, se observó una disminución de pH, así como una disminución en la expresión del gen de toxina *stx2* de *E. coli*.

En Argentina, Vallejo *et al.* (2009) evaluaron la actividad inhibitoria sobre *Escherichia coli* O157:H7 por 6 cepas seleccionadas de *Lactobacillus* spp. aisladas de queso preparado con leche de ovino. El efecto antimicrobiano de los sobrenadantes, de los cultivos de las cepas ensayadas, no se inhibió por la actividad enzimática de la catalasa o la tripsina. La alcalinización neutralizó el efecto antibacteriano de los sobrenadantes, resultado que demostró que las cepas seleccionadas ejercieron la inhibición del crecimiento de *E. coli* O157:H7, debido a la producción de ácidos orgánicos, especialmente ácido láctico. La aplicación directa de cepas de bacterias ácido lácticas y/o sus metabolitos antimicrobianos para inhibir bacterias patógenas en alimentos, introdujo el concepto de bioconservación.

En trabajos previos realizados en el laboratorio de Patogenicidad Microbiana de la FES Cuautitlán, se demostró el efecto antagónico de *Pediococcus acidilactici* sobre *E. coli*, pero requiriendo la interacción bacteria-bacteria y no siendo sustancias filtrables, producidas en medios de cultivo artificiales comerciales [Luria Bertani (LB) y Man Rogosa y Sharp modificado (MRSm)]. La disminución en el crecimiento bacteriano se logró solamente cuando se inocularon las cepas

bacterianas al mismo tiempo en caldo MRSm (Hernández, 2013). Estos ensayos fueron realizados en un dispositivo diseñado exprofeso.

Es conocido que los mecanismos de regulación genética y la expresión de los factores de virulencia dependen del medio en el que se desarrollan las bacterias, por lo que la pregunta del presente trabajo fue si la expresión de los factores responsables de la inhibición del crecimiento de *E. coli* se presenta igual en medios similares a los salamis o en el propio salami.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El interés por sistemas de conservación más “naturales” y con propiedades beneficiosas para la salud (alimentos funcionales) se ha acentuado en los últimos años, como consecuencia del creciente conocimiento que tienen los consumidores sobre las relaciones entre la alimentación y la salud (Nutrition Business Journal, 2002).

Debido a que se ha demostrado que *P. acidilactici* ATCC 8042 tiene una actividad inhibitoria sobre *E. coli* O157:H7 *in vitro* y en medios sintéticos, se probará el efecto del cultivo iniciador (BAL) en condiciones similares al proceso de producción del salami; evaluando su posible utilización como inhibidor de *E. coli* patógena en el producto comercial.

Mediante el dispositivo desarrollado previamente, es posible acercarse al tipo de interacción necesaria para inhibir el crecimiento y deducir el tipo de modulador (interacción bacteria-bacteria, *quorum sensing* o regulación genética), que se presenta en la inhibición observada previamente. El cambio de los medios de cultivo hacia un medio líquido, que simule las condiciones de fabricación del salami, permitirá realizar un acercamiento paulatino al efecto buscado en este producto cárnico.

El conocimiento de los factores que participan en la inhibición de bacterias patógenas y sus mecanismos de acción permitirá desarrollar tecnologías de uso práctico en la fabricación del salami.

#### 5. OBJETIVOS

##### GENERAL

Evaluar la acción de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre *Escherichia coli* O157:H7 en caldo infusión de carne modificado (tipo salami).

##### ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre *E. coli* O157:H7 (EDL 933) en co-cultivo con interacción directa de bacterias.

2. Evaluar el efecto de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre *E. coli* O157:H7 (EDL 933) en co-cultivo con interacción indirecta de las bacterias empleando membranas.
3. Determinar si existen diferencias en los patrones de proteínas de los compartimientos separados por membranas.
4. Relacionar los patrones de proteínas con el efecto sobre el crecimiento de *E. coli* por parte de *P. acidilactici*.
5. Analizar la formación de biofilm de *E. coli* en co-cultivo con *P. acidilactici*.

## 6. HIPÓTESIS

En medio infusión carne modificado se producirán los mismos efectos de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre *Escherichia coli* O157:H7 que los observados en el medio sintético comercial (Man Rogosa y Sharp modificado).

## 7. MATERIAL BIOLÓGICO

Cepas bacterianas:

- *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (CDBB-B-67), fue proporcionada por la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. (CINVESTAV).
- *Escherichia coli* O157:H7 (EDL 933, cepa de referencia), fue proporcionada por el Dr. Guillermo Valdivia Anda del Laboratorio de Patogénesis Microbiana de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC).

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 Caracterización de cepas bacterianas:

Para la caracterización de *P. acidilactici* ATCC 8042, se realizó tinción de Gram (Gram, 1884 in Vázquez *et al.*, 2010). Posteriormente se llevó a cabo el perfil bioquímico mediante las pruebas de catalasa, oxidasa y carbohidratos (MacFaddin, 2000).

Para la caracterización de *Escherichia coli* O157:H7, se realizó tinción de Gram (Gram, 1884 in Vázquez *et al.*, 2010). Se efectuó el perfil bioquímico mediante pruebas de catalasa, oxidasa e IMVyc (MacFaddin, 2000), así como la identificación de los genes de virulencia (stx1, stx2 y eae) de *E. coli* mediante el protocolo tipo multiplex de PCR basado en López y col, del año 2003. Se probaron tres cepas patógenas y una cepa negativa a los tres genes (*E. coli* K12) como control negativo del método.

8.2. Análisis de biofilm: Se llevó a cabo en los cultivos individuales de *E. coli* y de *P. acidilactici*, evaluando el biofilm por medio de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.

#### 8.2.1. Microscopía Óptica

Se realizaron cinéticas de crecimiento de *E. coli* en caldo LB y en medio ICm. En los matraces con los cultivos, se depositaron cubreobjetos redondos y estériles, como soporte para la formación de biofilm bacteriano. En condiciones de esterilidad, se obtuvieron muestras en las horas 1, 2, 4, 6, 8 y 24. Posteriormente se tiñeron con cristal violeta (0.1%), añadiendo el colorante sobre el cubreobjetos durante 20 minutos. Se lavaron con agua destilada y se observaron por medio de un microscopio óptico, se analizaron 10 campos y se procesaron los datos.

En los cultivos de *P. acidilactici*, se depositaron cubreobjetos estériles, se obtuvieron a las 8 horas de incubación en condiciones de esterilidad, se tiñeron con cristal violeta al 0.1% durante 20 minutos, se lavaron con agua destilada y fueron observados 10 campos por medio de microscopía óptica.

En todos los cultivos, también fueron depositados cubreobjetos, los cuales se obtuvieron a las 8 horas del cultivo y se fijaron con Karnosky durante dos horas, se lavaron con PBS estéril y se realizaron tinciones diferenciales para conocer la naturaleza de la matriz presente alrededor de las bacterias. Las tinciones utilizadas se realizaron de acuerdo a Ross y col. (2007) y fueron las siguientes: Azul de Coomassie, PAS (Ácido Peryódico de Schiff), Azul de Toluidina, Sudán y Lugol.

#### 8.2.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se siguió la técnica de González *et al.* (2003). Se realizó con ayuda de cubreobjetos de cristal, redondos y estériles contenidos en los cultivos. Se tomaron en condiciones de esterilidad a la hora 8 del cultivo, se fijaron durante 2 horas en Karnosky y se lavaron con buffer de fosfatos. Las muestras se secaron durante 12 horas a 37°C y se recubrieron con oro para ser observadas en el microscopio electrónico de barrido.

También se obtuvieron cubreobjetos de los cultivos, los cuales fueron fijados y secados de la misma forma y se realizó un análisis por espectrometría de dispersión de energía (EDS) para conocer la composición química en 100  $\mu\text{m}^2$  de la muestra.

### 8.3. Formulación del medio infusión carne modificado.

Existen diferentes tipos de salami, de acuerdo con su origen y sus ingredientes. Debido a esa gran diversidad, se tomaron solo 10 recetas, de las cuales se obtuvieron los ingredientes presentes con mayor frecuencia y se calculó el promedio de la cantidad empleada de estos componentes para 1kg de salami. Después de tener la lista de ingredientes, se mezclaron con 9 litros de agua destilada y la composición se sometió a un molido fino y se reservó para lograr una buena infusión de los ingredientes. Después se filtró dos veces para cada uno de los siguientes procedimientos: tela manta de cielo; papel filtro Whatman grado 1 (11  $\mu\text{m}$ ); papel filtro Whatman grado 2 (8  $\mu\text{m}$ ) y

papel filtro Whatman grado 3 (6 µm). Posteriormente se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión.

Finalmente para conocer la composición química del medio, se realizó un análisis bioquímico de 16 elementos de acuerdo con el protocolo de análisis bioquímico A15 del Laboratorio de Análisis Clínicos DIVET<sup>R</sup>.

#### 8.4. Cinéticas de crecimiento de las cepas bacterianas, siguiendo la técnica de Hernández, 2013.

Se realizaron cinéticas en diferentes medios de cultivo: caldo Luria Bertani (LB), caldo Man Rogosa y Sharp (MRS) y medio Infusión Carne modificado (ICm). Para todas, se siguió la siguiente metodología:

##### **Pre-inóculo**

En 4 ml de medio se inoculó una colonia bacteriana y se incubó a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 18 horas. Esto se efectuó con la finalidad de que la bacteria pudiera adaptarse al medio y así reducir el tiempo de la fase de latencia del crecimiento bacteriano.

##### **Cultivo**

Se prepararon 40 ml de medio estéril en un matraz, se inoculó con el total del volumen del pre-inóculo y se incubó bajo las mismas condiciones durante 8 horas y sin agitación.

##### **Toma y proceso de muestras**

Se obtuvieron muestras del cultivo cada hora, incluyendo al inicio de la inoculación del cultivo con el pre-inóculo (tiempo 0), tomando 100 µl y se realizaron diluciones decimales en buffer fosfato salino (PBS) estéril. Para realizar la cuenta viable, se seleccionaron las diluciones adecuadas para inocularlas por duplicado en cajas de Petri. Se tomaron 100 µl de la dilución seleccionada, se depositaron en tubos con agar blando, se agitaron en un vórtex marca Thermolyne (tipo 16700) y se vaciaron sobre agar MRS para *P. acidilactici* y AST para *E. coli*. Las cajas de Petri se incubaron durante 24 horas a 37°C y después se realizó el conteo de colonias para determinar unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Además, en cada cultivo se midió el pH inicial y final-

##### **Proceso de datos**

Finalmente, las UFC por mililitro fueron graficadas con respecto al tiempo y se calcularon velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación a partir de las siguientes fórmulas:

$$n = \frac{\log y - \log x}{\log 2}$$

Dónde:

n= generaciones entre conteos

x= UFC/ml tiempo 0

y= UFC/ml tiempo 8

t= tiempo

n= d

Tasa/Velocidad de Crecimiento =  $d/t$

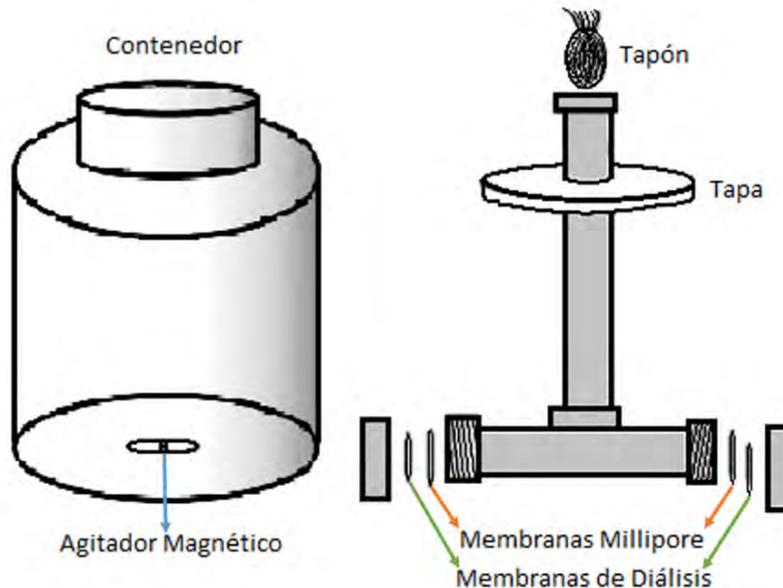
Tiempo de generación (G) =  $t/d$

### 8.5. Pruebas en co-cultivo.

Se realizaron tres diferentes tipos de interacción:

- Co-cultivo directo en Caldo Infusión Carne modificado sin membranas.
- Co-cultivo indirecto en el dispositivo diseñado (Figura 3), separado por membranas Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ .
- Co-cultivo indirecto en el mismo dispositivo (Figura 3), separado por membranas de diálisis (16 kDa) (Hernández, 2013).

**Figura 3. Dispositivo para co-cultivo (Valdivia *et al.*, 2013).**



El dispositivo diseñado se compone de un contenedor o compartimiento mayor de cristal y un compartimiento menor que es una "T" invertida de acero inoxidable. El compartimiento menor se caracteriza por poseer, en la parte inferior, una abertura a cada lado del tubo donde se pueden poner diferentes tipos de membranas y, con un empaque y un tapón de rosca, se pueden separar los dos compartimientos.

El medio de cultivo se distribuye en los dos compartimientos con ayuda de un agitador magnético incluido en el contenedor de cristal.

Los 3 tipos de co-cultivo se realizaron en el dispositivo bajo las siguientes condiciones:

#### **Pre-inóculos**

Se prepararon dos matraces con 40 ml de caldo ICm estéril, en uno se inoculó *P. acidilactici* y en el otro *E. coli*, y se incubaron durante 18 horas a 35°C.

#### **Cultivo**

Se prepararon 800 ml de caldo ICm estéril en el dispositivo, se vaciaron los 80 ml de los pre-inóculos y se incubó el cultivo a 35°C durante 8 horas con agitador magnético.

### **Toma y proceso de muestras**

Se tomaron muestras de 100 µl cada hora, tomando en cuenta el tiempo 0 y se realizaron diluciones decimales en PBS que permitieran el conteo de colonias bacterianas.

De la dilución seleccionada, se tomaron 100 µl y se depositaron en tubos con agar blando, se agitaron en vórtex (Termocycle) y se inocularon en cajas de Petri sobre agar MacConkey y MRS (*E. coli* O157:H7 y *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, respectivamente) por duplicado. Se incubaron a 35°C por 24 h y se realizó la cuenta de colonias, comparando las UFC/ml de cada microorganismo determinando su comportamiento en crecimiento en co-cultivo. Cuando se trataba de co-cultivos indirectos se realizaba toma y proceso de muestras para cada compartimiento del dispositivo.

### **Proceso de datos**

Por último, se construyó una gráfica y se calcularon los valores de velocidad de crecimiento y tiempo de generación con las fórmulas mencionadas en el apartado 8.3. Con estos datos, se realizó el análisis estadístico con ayuda del software SPSS Statistics utilizando las pruebas: análisis de varianza; Tukey y Prueba T.

### 8.6. Efecto sobre la formación de Biofilm.

Se elaboró en los tres tipos de co-cultivo, siguiendo las técnicas de microscopía óptica y microscopía electrónica como se menciona en el punto 8.2.

Además, se realizó el ensayo en placa para producción de biofilm (modificado de O'Toole *et al.*, 2011) en los co-cultivos directos. Se efectuó en tubos Eppendorf de 0.6 ml. Se agregaron 100 µl de caldo ICM y 10 µl de preinóculo de *E. coli* y *P. acidilactici* en una relación 1:6 y se incubaron a 37°C. Se tomó como control positivo un cultivo de *E. coli* preparado bajo las mismas condiciones. Se procesaron en diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 24 horas).

A la hora de procesar cada tubo, primero se decantó el medio, se realizaron 2 lavados con agua destilada estéril, después se agregaron 125 µl de cristal violeta al 0.1% (15 minutos), se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril y se agregaron 125 µl de etanol al 97%. Por último se tomó todo el contenido de los tubos y se depositaron en una placa de 96 pozos para medir la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro a una longitud de 575 nm.

A la par, se realizó una cinética de crecimiento del cultivo. Se tomaron muestras para cuenta viable como se describe en el punto 8.3 y se graficaron los resultados. Así se pudo comparar la densidad óptica y la concentración bacteriana para medir la formación de biofilm. Por último, se observaron con un microscopio óptico, cubreobjetos depositados en el mismo cultivo y muestreados al mismo tiempo y en las mismas condiciones que la medición cuantitativa de biofilm; lo que permitió comparar la formación de biofilm de acuerdo con las fases de crecimiento bacteriano.

#### 8.7. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Se cuantificaron las proteínas de los diferentes compartimientos en cada co-cultivo por medio del método de Bradford. Se utilizó como control el medio ICM sin inocular y como testigos los cultivos individuales de *P. acidilactici* y de *E. coli*.

Se realizó, por triplicado, una curva patrón con Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 0.1% a diferentes concentraciones y se hizo la lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm. Seguidamente, en una placa de 96 pozos, se colocaron 50 µl de la muestra concentrada en un pozo y en otros dos pozos las siguientes diluciones de la muestra con agua desionizada: 1:10 y 1:100. A cada pozo se le agregaron 200 µl del reactivo de Bradford, se agitó la placa y se hizo la lectura a 620 nm en el espectrofotómetro. Finalmente, se realizó la gráfica donde se interpolaron los valores para conocer la cantidad de proteína de cada muestra.

#### 8.8. Electroforesis de proteínas (Hernández, 2013).

Se determinó el tamaño molecular de las proteínas más abundantes del medio Infusión Carne modificado sin inocular, de los sobrenadantes de co-cultivos y como testigos de la prueba se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos bacterianos individuales. Este proceso se llevó a cabo para comparar el patrón de proteínas existentes en los co-cultivos directos y los que se encontraban separados por membranas de 0.22 µm y de diálisis. La técnica se realizó en gel de poliacrilamida al 12 % y se llenaron los pozos con 20 µl de muestra y 10 µl de Buffer de Lemley. Se usó un marcador de peso molecular de la marca BIO-RAD® (Precision Plus Protein, Dual Color), se llevó a cabo el proceso de electroforesis con 150 volts, 120 mA durante 15 minutos para la alineación y 120 volts, 85 mA durante 60 minutos aproximadamente para la fase de separación, finalmente se tiñó el gel con nitrato de plata.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Formulación, preparación y composición del medio Infusión Carne modificado (ICm).

Después de revisar la variedad de recetas indicadas por los fabricantes de salami, se tomó un promedio general para la preparación. Esta composición se presenta en la tabla 2.

**Tabla 2. Formulación de Medio Infusión Carne Modificado.**

Ingrediente	Cantidad (g) para 1 kg de salami
Carne de cerdo	327.26
Carne de res	535.08
Sal común	16.02
Sal de cura	0.77
Azúcar	5.63
Pimienta negra	1.36
Ajo	1.07
Tocino	225.65
Nitrato de sodio	1.00

Ingredientes del medio de cultivo obtenidos de 10 recetas diferentes de salami que fueron mezclados y molidos con agua destilada.

Después de la preparación y filtración del medio con los componentes anteriores, se obtuvo una solución coloidal. Al esterilizarse en autoclave, las proteínas se coagularon por la desnaturalización y se formó una mezcla o medio bifásico (Figura 4A). Al sedimentarse, se formó una solución transparente de color ámbar (Figura 4B) que fue utilizada como medio de cultivo (ICm).

**Figura 4. Imagen que muestra el producto obtenido Medio de Cultivo Infusión Carne Modificado (ICm).**



4A: medio bifásico estéril. 4B: sobrenadante utilizado como medio de cultivo.

Se realizó el análisis químico de elementos a la solución o sobrenadante obtenido después de la esterilización del medio y se muestra en la siguiente tabla su composición química:

**Tabla 3. Composición química del Medio ICm.**

<b>Componente</b>	<b>Valor</b>
Proteínas Totales	3 g/L
Glucosa	1 mg/dl
Urea	5.9 mg/dl
Creatinina	8.94 mg/dl
Triglicéridos	27.3 mg/dl
Bicarbonato	1 mmol/L
Calcio	3.79 mg/dl
Fósforo	17.49 mg/dl
Sodio	49 meq/L
Potasio	11 meq/L
Cloro	67.8 meq/L
Lactato deshidrogenasa	5.1 U/L
Gamma glutamil transpeptidasa	1.2 U/L
Fosfatasa alcalina	7.7 U/L
Aspartato aminotransferasa	1.3 U/L
Creatina quinasa	27.9 U/L
pH	5.7

Se empleó el sistema automatizado A15 del laboratorio de análisis clínicos DIVET.

## 9.2. Caracterización de la cepa *Escherichia coli* O157:H7 (EDL 933)

Como resultado de la tinción de Gram se observaron bacilos Gram negativos, los cuales coinciden con las características y morfología de la bacteria *E. coli*.

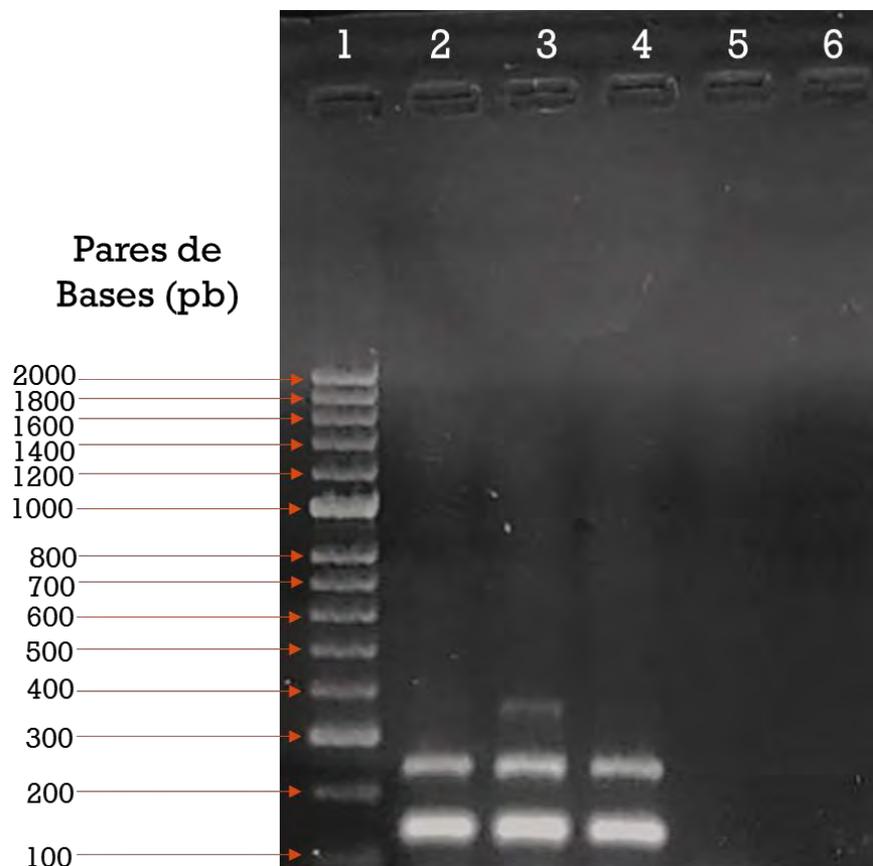
Posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas de tres cepas de *E. coli* O157:H7 y de una cepa control (*E. coli* K12). Los resultados obtenidos del perfil bioquímico corresponden al género y especie *Escherichia coli* reportada en la bibliografía.

Confirmación de genes de virulencia: *stx1* (+), *stx2* (+) y *eae* (+)

Al efectuarse la técnica de PCR multiplex, solo en el caso de la cepa EDL 933 E02 (carril 3), se logró la amplificación de 3 bandas de distinto peso molecular, que corresponden a los genes de virulencia de *E. coli* O157:H7 *stx1* (150 pb), *stx2* (255 pb) y *eae* (384 pb) (figura 5).

Debido a los resultados de perfil bioquímico y PCR, se decidió trabajar durante toda la investigación con la cepa EHEC EDL 933 (E02).

Figura 5. Amplificación de los genes de virulencia de *E. coli* O157:H7.

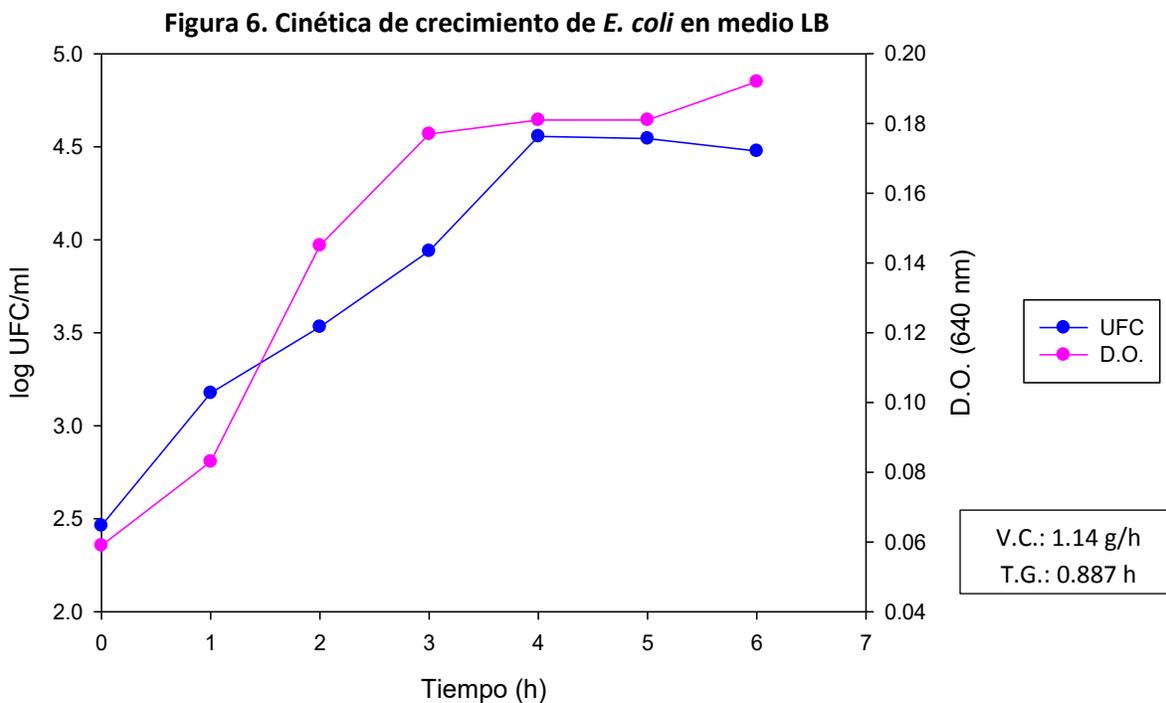


Técnica de PCR multiplex. Gel de Agarosa al 1.5% tras corrimiento electroforético y teñido con Bromuro de Etidio. Carril 1: marcador de peso molecular (HyperLadder 50bp). Carril 2: EHEC MDCV positivo a *stx1* y *stx2*, carril 3: EHEC EDL 933 positivo a *stx1*, *stx2* y *eae*, carril 4: EHEC *stx1/stx2* positivo a *stx1* y *stx2*, carril 5: control negativo (*E. coli* K12), carril 6: blanco.

### 9.3. Cultivo de *E. coli* en caldo Luria Bertani (LB).

9.3.1. Se llevó a cabo la cinética de crecimiento de *E. coli* en caldo LB y con los datos obtenidos se realizó una gráfica con el programa Sigma Plot 11.0 (Figura 6).

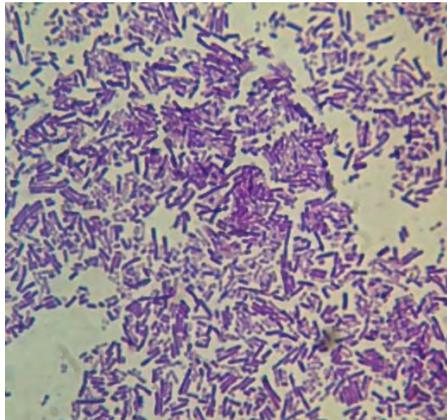
De acuerdo con la gráfica, se puede observar el crecimiento típico de *E. coli* en este medio. A causa del pre-inóculo, donde la bacteria pudo adaptarse al medio, la fase de latencia no es evidente. Desde el inicio del cultivo se observa el crecimiento acelerado cuyo comportamiento corresponde a la fase logarítmica de la cinética. A partir de las 4 horas de cultivo se puede ver el inicio de la fase estacionaria.



Medición de densidad óptica y recuento de UFC por mililitro de *E. coli* en medio LB durante 6 horas de cultivo bacteriano. D.O.: densidad óptica. UFC: unidades formadoras de colonias. V.C.: velocidad de crecimiento. T.G.: tiempo de generación. g/h: generaciones por hora. h: horas.

9.3.2. Formación de biofilm: En el cultivo mostrado en la figura 6, se realizó el análisis de formación de biofilm por medio de microscopía óptica, donde se pudo evidenciar su formación entre la fase logarítmica tardía y la fase estacionaria inicial. Se observó la presencia de cúmulos bacterianos en varios planos o estratos como se muestra en la figura 7.

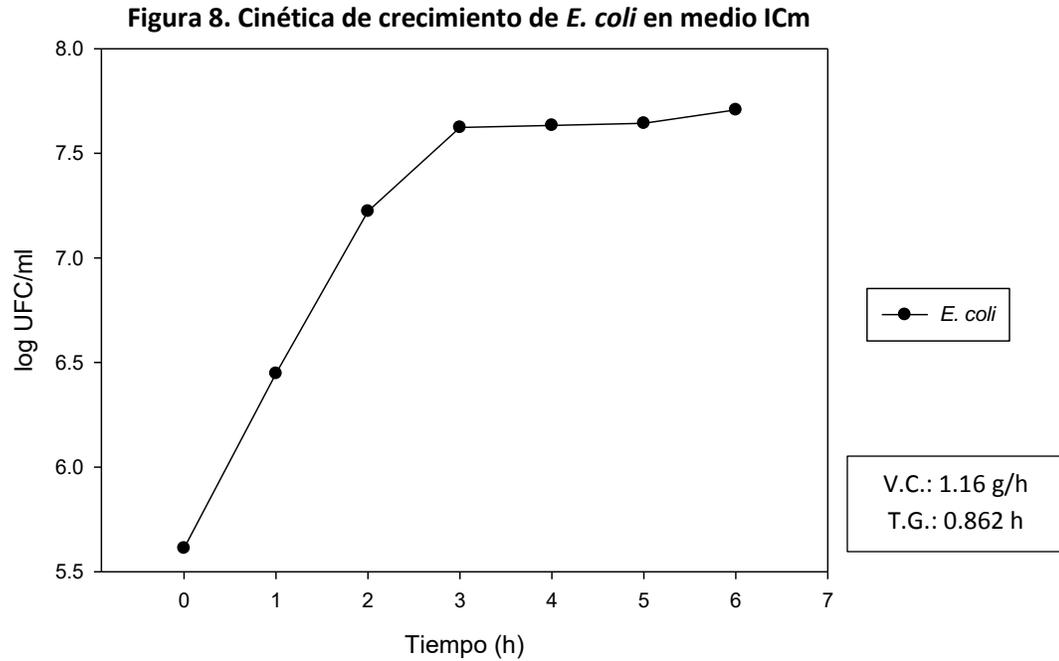
**Figura 7. Biofilm de *E. coli* cultivada en caldo LB.**



Tinción: cristal violeta. 100x. Se observan bacterias en diferentes tonos de violeta debido a su disposición en diferentes niveles o estratos.

#### **9.4. Cultivo de *E. coli* en medio ICM**

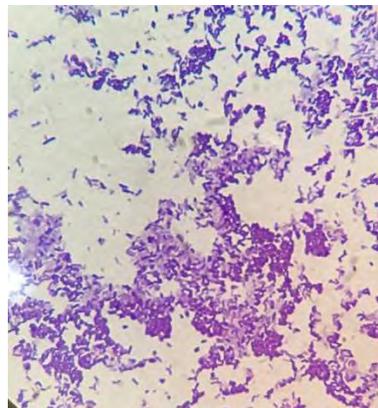
9.4.1. Se realizó la cinética de crecimiento en el medio complejo no comercial, donde no fue posible medir la densidad óptica, debido a la presencia de pequeñas partículas flotantes propias del medio que no se lograron sedimentar y quedaron en el sobrenadante después de esterilizar el medio. Por lo tanto, sólo se determinó la cuenta viable para conocer el crecimiento bacteriano. Se midió el pH al final del experimento resultando 5.90 y se construyó la gráfica en el programa antes mencionado. En la figura 8 se observa la fase de crecimiento logarítmico desde el inicio del cultivo alcanzando su punto más alto a las 3 horas y posteriormente la fase estacionaria. La fase de latencia no se evidenció debido al uso del pre-inóculo donde la bacteria se adaptó al medio.



Recuento de UFC por mililitro de *E. coli* en medio ICm durante 6 horas de cultivo bacteriano. UFC: unidades formadoras de colonias. V.C.: velocidad de crecimiento. T.G.: tiempo de generación. g/h: generaciones por hora. h: horas.

9.4.2. Formación de biofilm: Por medio de microscopía óptica, se analizó la formación de biofilm de *E. coli* en medio ICm al final de la curva de crecimiento y se observaron cúmulos o agrupaciones de bacterias. En la figura 9 se pueden observar zonas con coloraciones violeta más intensas y otras más tenues, que demuestran la aglutinación de las bacterias formando capas o estratos característicos de biofilm.

**Figura 9. Formación de biofilm de *E. coli* en ICm.**

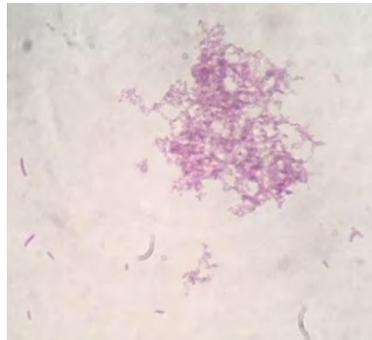


Muestra teñida con cristal violeta y observadas en microscopio óptico. 100x.

9.4.3. Tinciones diferenciales: Después de analizar el biofilm bacteriano se realizaron tinciones diferenciales para conocer la naturaleza de la matriz que las agrupa o rodea. Se obtuvieron resultados positivos con la tinción de PAS (Figura 10) y Azul de Coomassie (Figura 11).

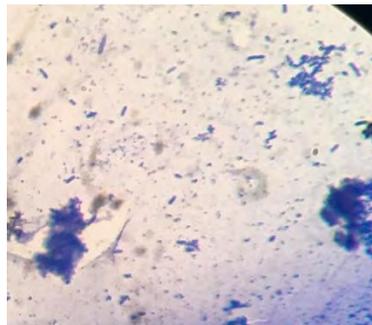
La tinción Azul de Coomassie (AC) tiñe proteínas y la tinción de PAS se utiliza para identificar glucoproteínas, esta coloración se logra por el contacto con los grupos aldehídos; por lo anterior se considera la presencia de una matriz probablemente de naturaleza glucoproteica.

**Figura 10. Formación de biofilm de *E. coli* en ICm (PAS).**



Muestra tomada a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. Tinción: PAS (ácido peryódico de Schiff). 100x. Se observan bacterias con una matriz “rojiza” a su alrededor.

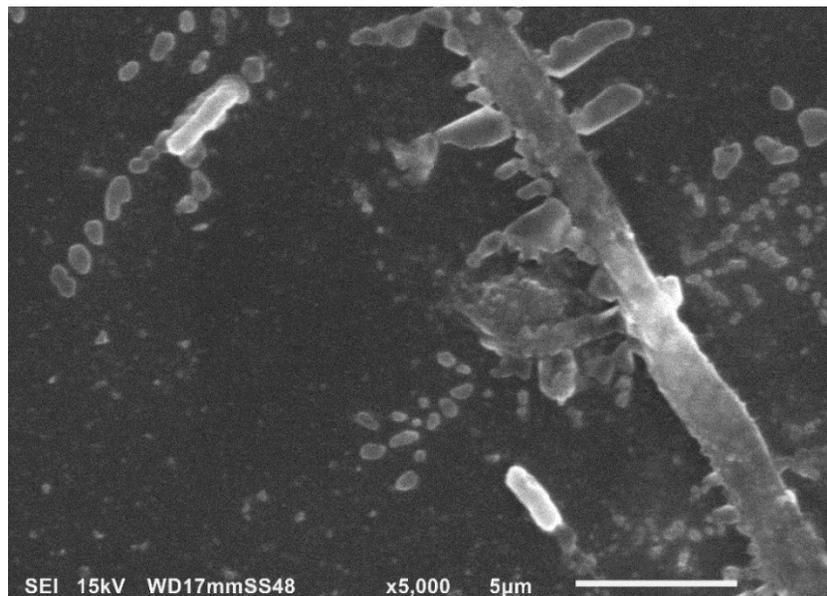
**Figura 11. Formación de biofilm de *E. coli* en ICm (AC).**



Muestra tomada a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. Tinción: Azul de Coomassie. 100x. Se observan cúmulos bacterianos de diferentes tamaños con una matriz de color azul.

9.4.4. Microscopía electrónica de barrido: Se analizó la formación de biofilm de *E. coli* por medio de microscopía electrónica. De acuerdo con los resultados de microscopía óptica (Figura 9), se evaluó al final del cultivo. Se observaron bacterias separadas y rodeadas por una especie de red o matriz sugiriendo la producción de esta “sustancia” por parte de las mismas bacterias (Figura 12).

**Figura 12. Microscopía Electrónica de Barrido de formación de biofilm de *E. coli* en ICm.**



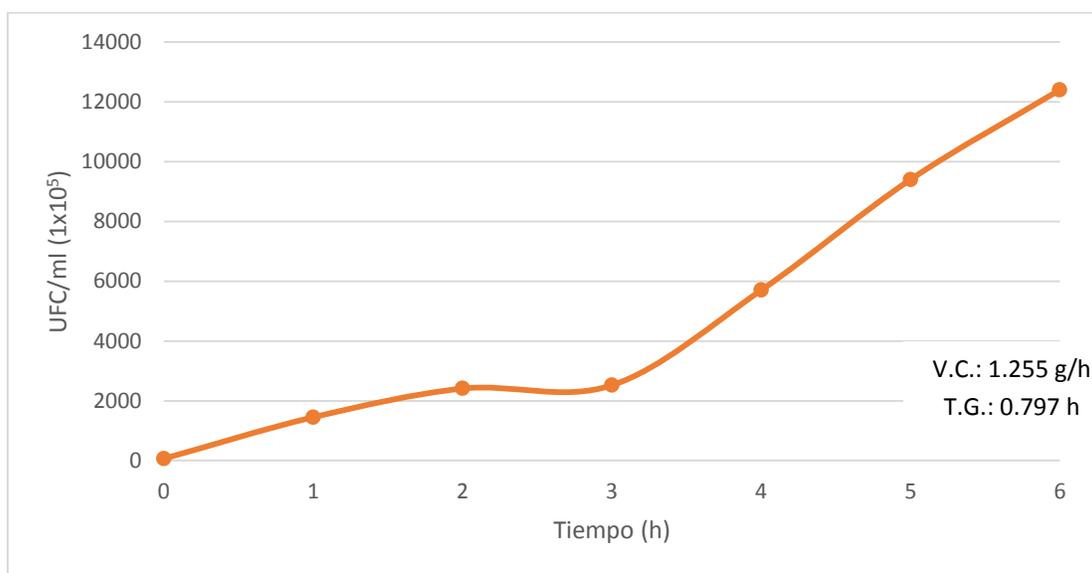
Muestra tomada a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. 5000x. Se observan bacterias aisladas con una matriz alrededor de ellas.

### 9.5. Cultivo de *E. coli* en medio ICM bifásico

El medio ICM es un medio bifásico con pequeñas diferencias de nutrientes en cada fase, por lo que se comparó el crecimiento de *E. coli* en la fase sólida, la fase líquida y en las fases mezcladas. Se utilizó un pre-inóculo para ayudar al microorganismo a adaptarse al medio y disminuir la fase de latencia en la cinética de crecimiento; sin embargo se pudo observar en los cultivos en fase sólida y líquida un periodo de latencia más largo.

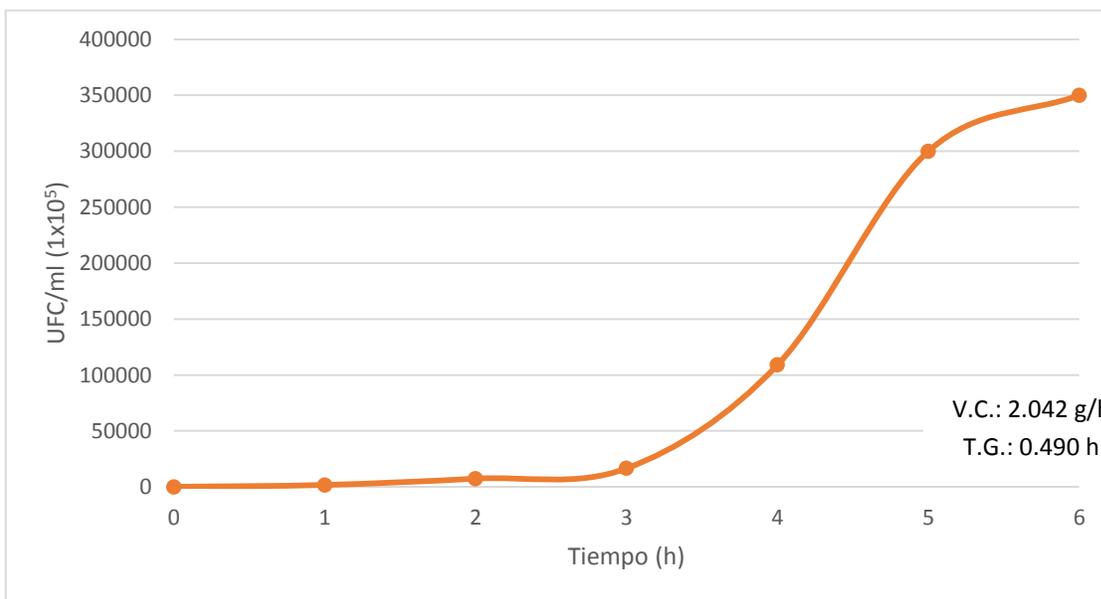
Los cultivos de fase sólida y líquida se realizaron al mismo tiempo y del mismo matraz, tomando muestras en las diferentes fases para realizar la cuenta viable. Debido a esto, en el caso de la cinética de crecimiento en fase líquida, se observó un crecimiento logarítmico constante (Figura 13) debido a la disposición continua de nutrientes por las partículas en la fase sólida que se precipitaban a la fase líquida. Por otro lado, en la cinética de crecimiento en fase sólida (Figura 14) se observa el inicio del crecimiento logarítmico a las tres horas del inicio del cultivo y nunca se observó el periodo estacionario. Se demostró que en fase sólida la bacteria tenía una velocidad de crecimiento mayor (2.042 generaciones por hora) y se relacionó con la adherencia de las bacterias a partículas sólidas ricas en nutrientes. Para el caso de la cinética de crecimiento con fases mezcladas (Figura 15) no se evidenció el periodo de latencia, teniendo un crecimiento logarítmico desde el inicio hasta las dos horas. Posteriormente se observa un descenso en su cuenta viable. Por todo lo anterior, se decidió usar la fase líquida, el sobrenadante o solución, para el cultivo de todas las cepas bacterianas, además de tener mejores características que permitieran realizar las técnicas de crecimiento y formación de biofilm.

**Figura 13. Cinética de crecimiento de *E. coli* en fase líquida del medio ICM**



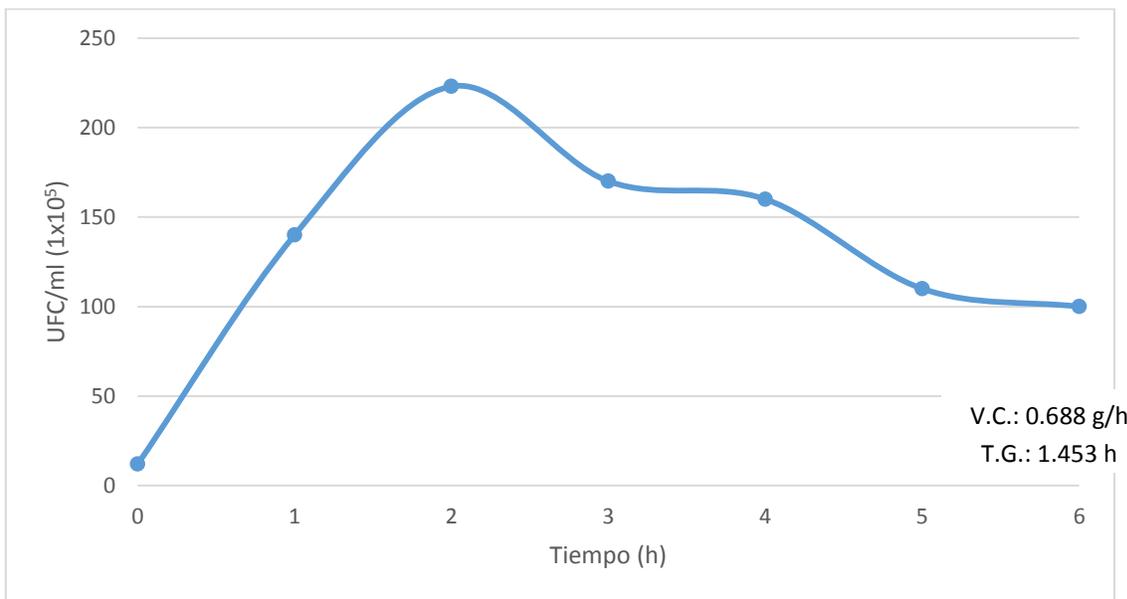
Recuento de UFC por mililitro de *E. coli* en medio ICM (fase líquida) durante 6 horas de cultivo bacteriano. UFC: unidades formadoras de colonias. V.C.: velocidad de crecimiento. T.G.: tiempo de generación. g/h: generaciones por hora. h: horas.

**Figura 14. Cinética de crecimiento de *E. coli* en fase sólida del medio ICm**



Recuento de UFC por mililitro de *E. coli* en medio ICm (fase sólida) durante 6 horas de cultivo bacteriano. UFC: unidades formadoras de colonias. V.C.: velocidad de crecimiento. T.G.: tiempo de generación. g/h: generaciones por hora. h: horas.

**Figura 15. Cinética de crecimiento de *E. coli* en fases mezcladas del medio ICm**

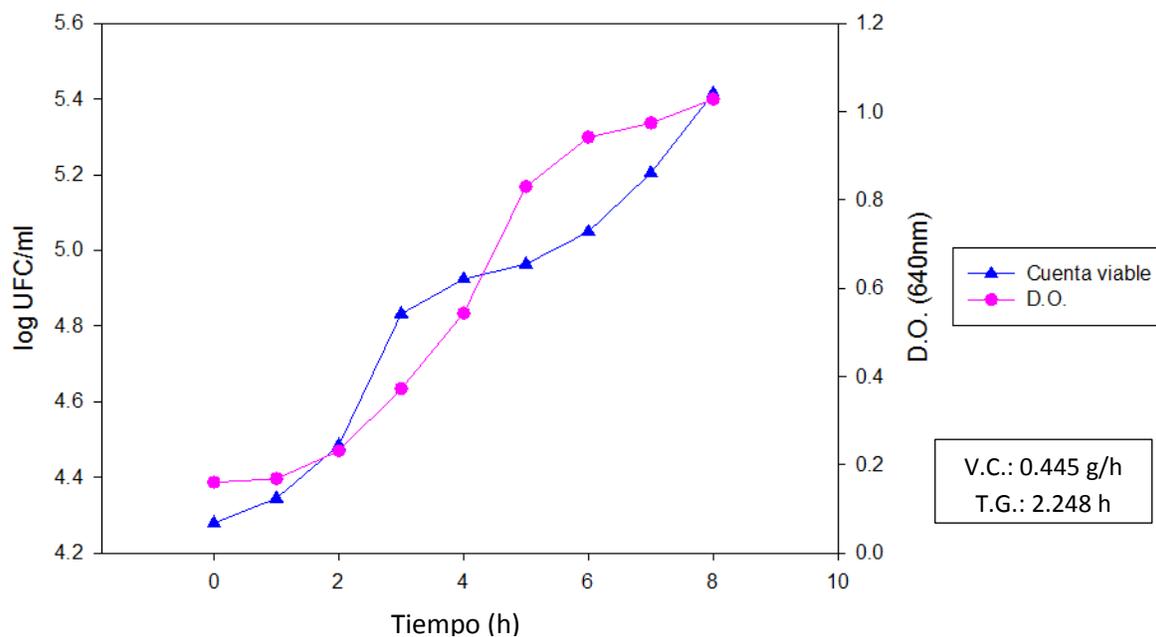


Recuento de UFC por mililitro de *E. coli* en medio ICm (fase sólida y líquida mezcladas) durante 6 horas de cultivo bacteriano. UFC: unidades formadoras de colonias. V.C.: velocidad de crecimiento. T.G.: tiempo de generación. g/h: generaciones por hora. h: horas.

### 9.6. Cultivo de *E. coli* en caldo MRS

Por último, se realizó una cinética de crecimiento (Figura 16) para conocer su adaptación al medio y comparar los resultados en co-cultivo con otra bacteria en el mismo medio. Se observa un crecimiento constante, sin embargo, la velocidad de crecimiento fue notablemente menor que la alcanzada en medio LB (Figura 6) y en medio ICM (Figura 8).

**Figura 16. Cinética de crecimiento de *E. coli* en medio MRS**



Medición de densidad óptica y recuento de UFC por mililitro de *E. coli* en caldo MRS durante 6 horas de cultivo bacteriano. D.O.: densidad óptica. UFC: unidades formadoras de colonias. V.C.: velocidad de crecimiento. T.G.: tiempo de generación. g/h: generaciones por hora. h: horas.

## 9.7. Caracterización de la cepa *Pediococcus acidilactici* (ATCC 8042)

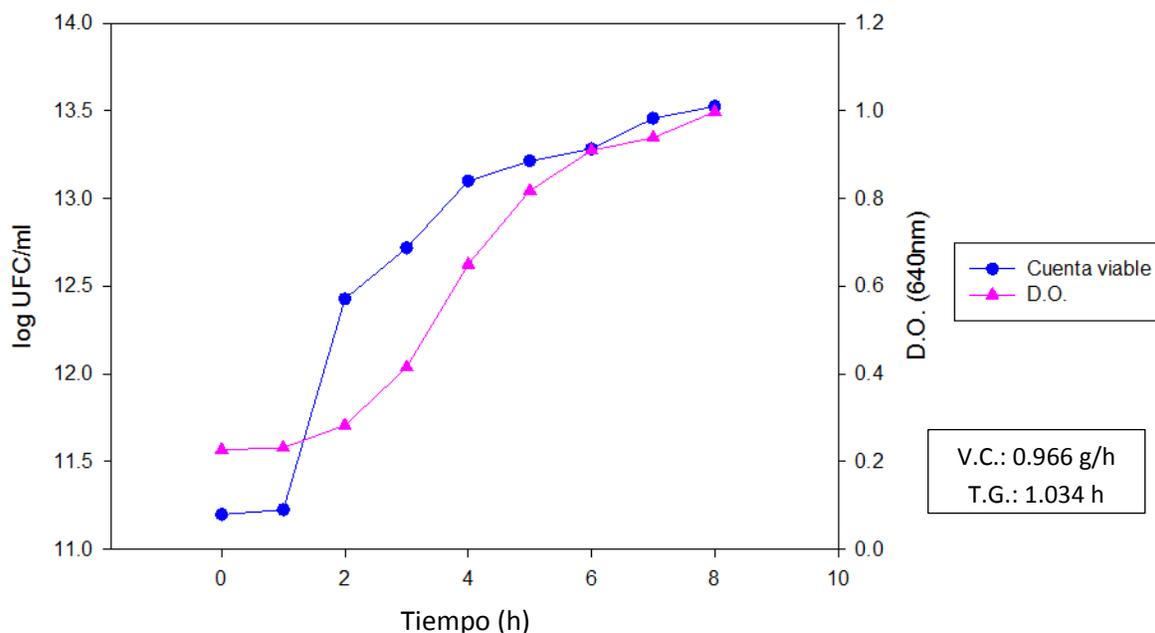
9.7.1. Como resultado de la tinción de Gram se observaron cocos gram negativos, los cuales coinciden con las características y morfología de la bacteria.

Posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas y un perfil de fermentación de carbohidratos cuyos resultados coinciden con las características de *P. acidilactici* reportados en la bibliografía.

## 9.8. Cultivo de *P. acidilactici* en caldo MRS

Se llevó a cabo el cultivo de *P. acidilactici* en medio MRS, con el objetivo de conocer su cinética de crecimiento, velocidad y tiempo de duplicación en este medio especial para bacterias acidolácticas. Se observó el comportamiento típico reportado (Figura 17), con un crecimiento logarítmico a partir de la primera hora del cultivo hasta la hora 8 sin evidenciarse la fase estacionaria.

**Figura 17. Cinética de crecimiento de *P. acidilactici* en medio MRS**

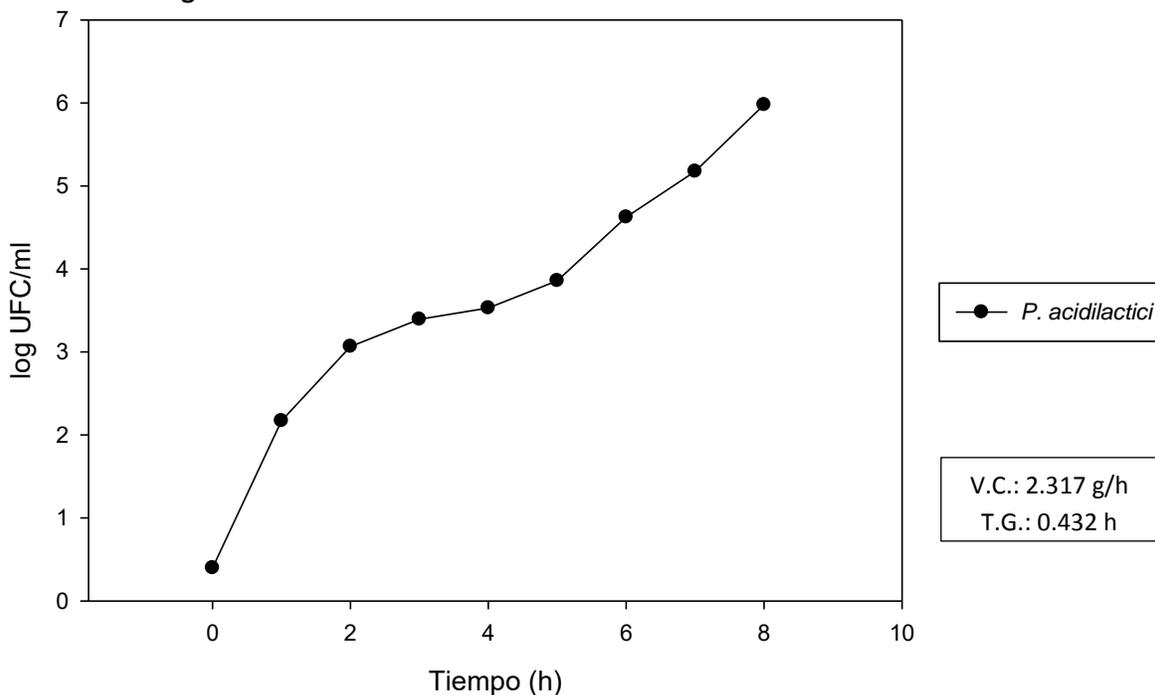


Medición de densidad óptica y recuento de UFC por mililitro de *P. acidilactici* en caldo MRS durante 8 horas de cultivo bacteriano. D.O.: densidad óptica. UFC: unidades formadoras de colonias. V.C.: velocidad de crecimiento. T.G.: tiempo de generación. g/h: generaciones por hora. h: horas.

### 9.9. Cultivo de *P. acidilactici* en medio ICm

9.9.1. Posteriormente se realizó un cultivo en el medio complejo para conocer la cinética de crecimiento. Se demostró que la adaptación y el comportamiento bacteriano fueron mejor que en el medio sintético comercial (MRS) al presentar el doble de la velocidad de crecimiento y una fase logarítmica desde el inicio hasta el final del cultivo, sin presentarse una fase estacionaria (Figura 18). También se midió el pH; al inicio de la cinética de crecimiento fue de 5.7 y al término del cultivo disminuyó a 4.75.

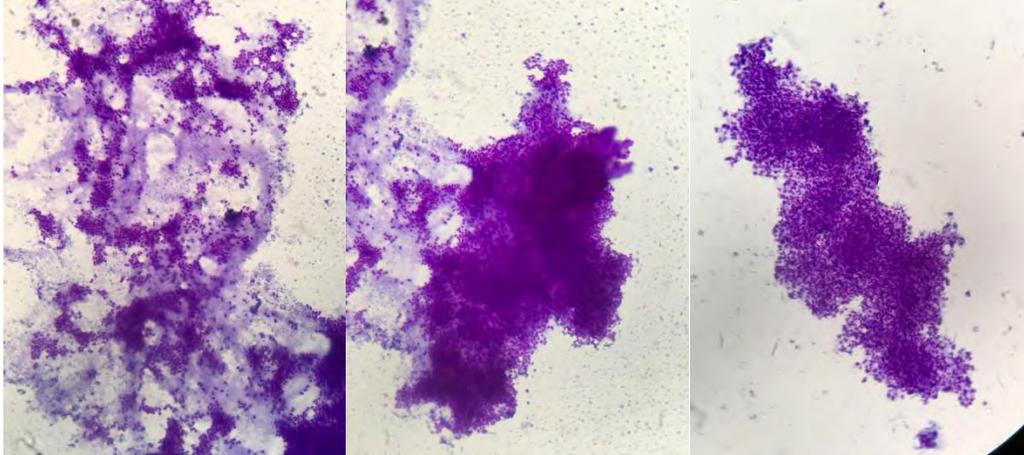
**Figura 18. Cinética de crecimiento de *P. acidilactici* en medio ICm**



Recuento de UFC por mililitro de *P. acidilactici* en medio ICm durante 8 horas de cultivo bacteriano. UFC: unidades formadoras de colonias. V.C.: velocidad de crecimiento. T.G.: tiempo de generación. g/h: generaciones por hora. h: horas.

9.9.2. Formación de biofilm: Se analizó la formación de biofilm al final de la curva de crecimiento y se observaron grandes agrupaciones de bacterias rodeadas de una sustancia más clara (figura 19).

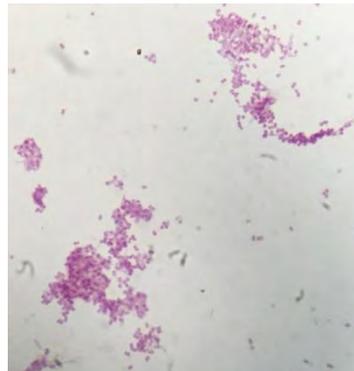
**Figura 19. Formación de biofilm de *P.acidilactici* en ICm.**



Tinción: Cristal violeta. Muestras tomadas a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. 100x. Se observan “cúmulos” bacterianos grandes con una clara matriz alrededor de las células.

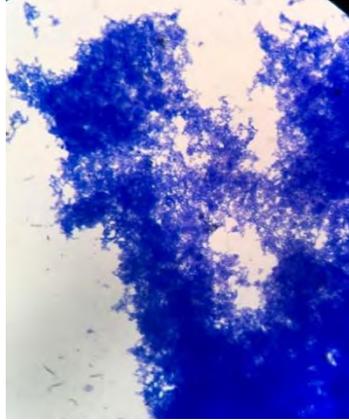
9.9.3. Tinciones diferenciales: Para conocer la naturaleza de la matriz que rodea a las agrupaciones bacterianas se realizaron tinciones diferenciales. Se encontraron resultados positivos en las tinciones de PAS (Figura 20) y Azul de Coomassie (AC) (Figura 21) demostrando que la naturaleza de la matriz era probablemente glucoproteica.

**Figura 20. Formación de biofilm de *P. acidilactici* en ICm (PAS).**



Muestra tomada a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. Tinción: PAS (Ácido Peryódico de Schiff). 100x. Se observan bacterias con una matriz “rojiza” a su alrededor.

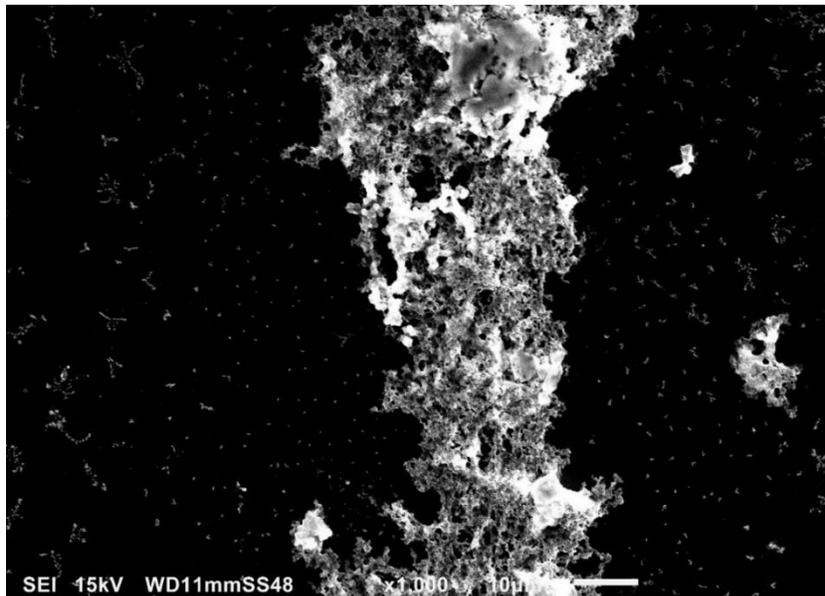
**Figura 21. Formación de biofilm de *P. acidilactici* en ICm (AC).**



Muestra tomada a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. Tinción: Azul de Coomassie. 100x. Se observan cúmulos de bacterias con una matriz azulada a su alrededor.

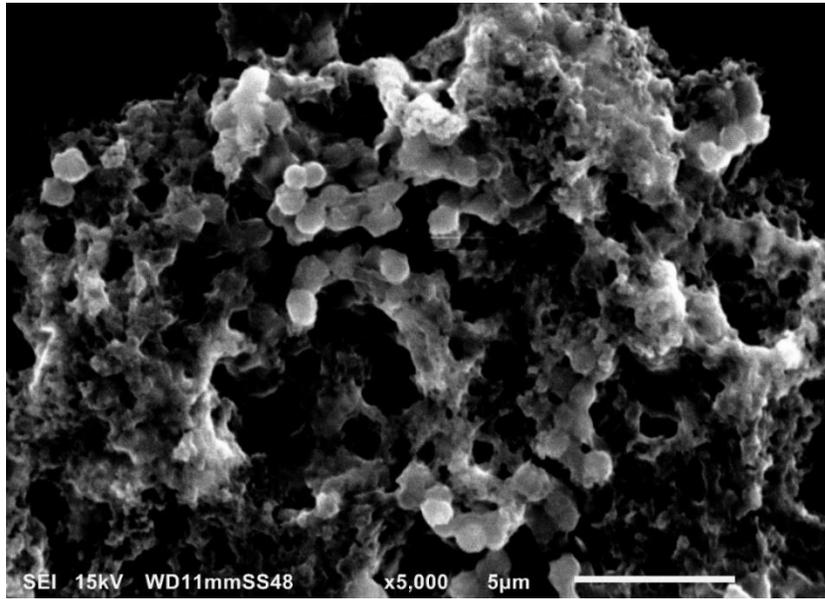
9.9.4. Microscopía Electrónica de Barrido: Al analizar la formación de biofilm por medio de microscopía electrónica, se apreciaron conglomerados de bacterias rodeadas por una sustancia o matriz como se muestra en las figuras 22 y 23.

**Figura 22. Microscopía Electrónica de Barrido de formación de biofilm de *P. acidilactici* en ICm.**



Muestra tomada a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. 1000x. Se observa un cúmulo de bacterias unidas por una matriz.

Figura 23. Microscopía Electrónica de Barrido de formación de biofilm de *P. acidilactici* en ICm.

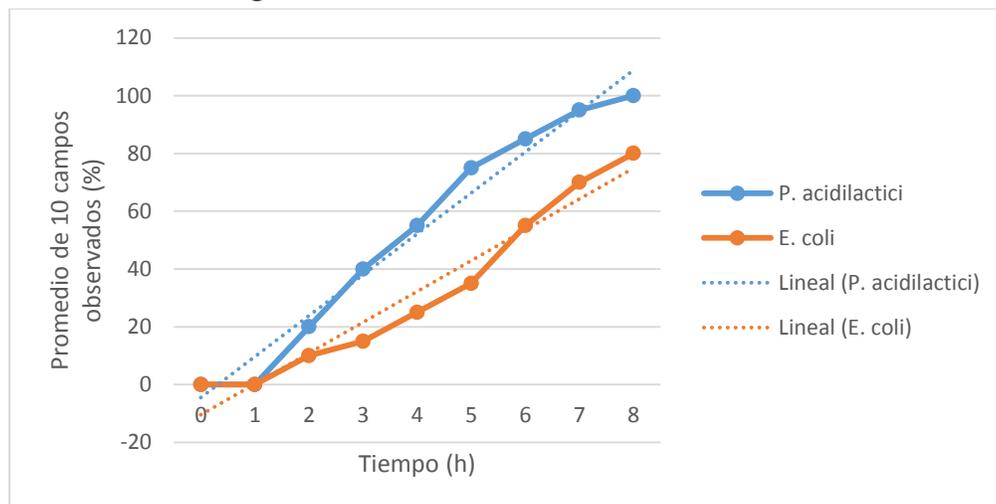


Muestra tomada a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. 5000x. Se observan bacterias rodeadas de una sustancia que las mantiene unidas.

### 9.10. Formación de biofilm de *E. coli* y *P. acidilactici*

Se analizó por medio de microscopía óptica la formación de biofilm de *E. coli* y de *P. acidilactici* durante sus cultivos individuales en medio ICm. De los campos observados, se tomaron en cuenta 10 y de acuerdo con las agrupaciones bacterianas en dichos campos se asignaron porcentajes. Los resultados encontrados se representaron en la siguiente gráfica (Figura 24).

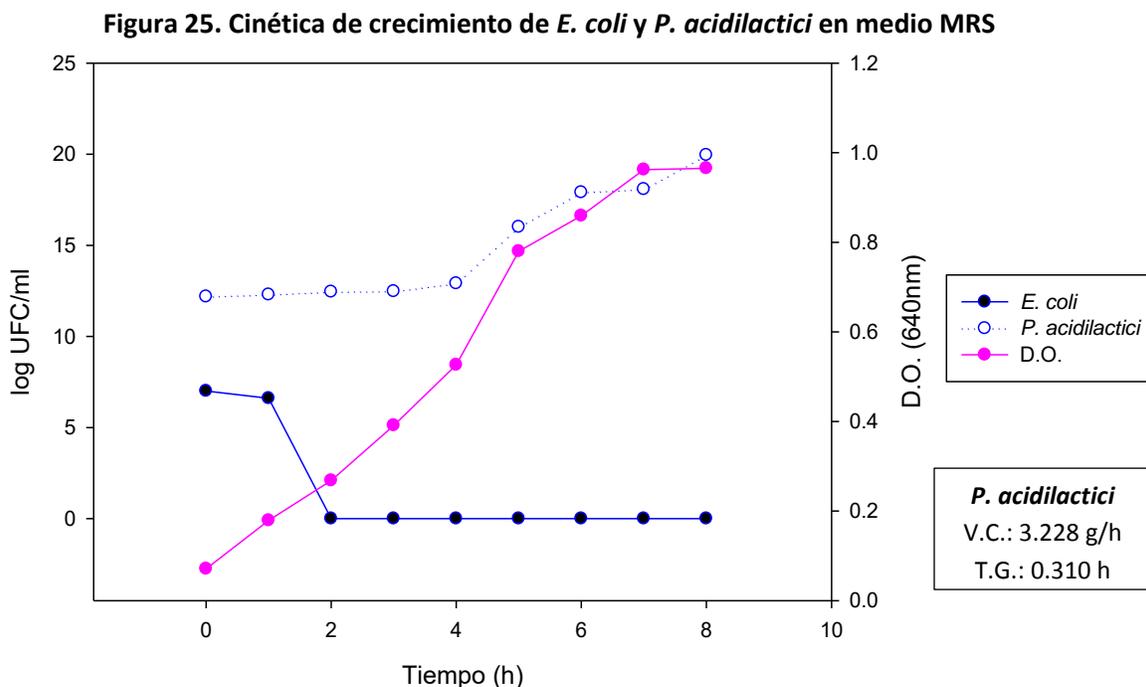
Figura 24. Formación de biofilm en medio ICm



Biofilm de *P. acidilactici* y *E. coli* en cultivo individual en medio ICm. h: hora.

### 9.11. Co-cultivo con inoculación simultánea de *E. coli* y de *P. acidilactici* en caldo MRS

Se efectuó el co-cultivo de *P. acidilactici* y *E. coli* en medio MRS para conocer la interacción entre las dos bacterias. Se puede observar que *P. acidilactici* tuvo un crecimiento normal o similar al que tuvo en cultivo individual; sin embargo, desde el inicio del co-cultivo, *E. coli* disminuyó su crecimiento y a la hora 2 del inicio de la curva todas las bacterias se encontraban muertas (Figura 25).

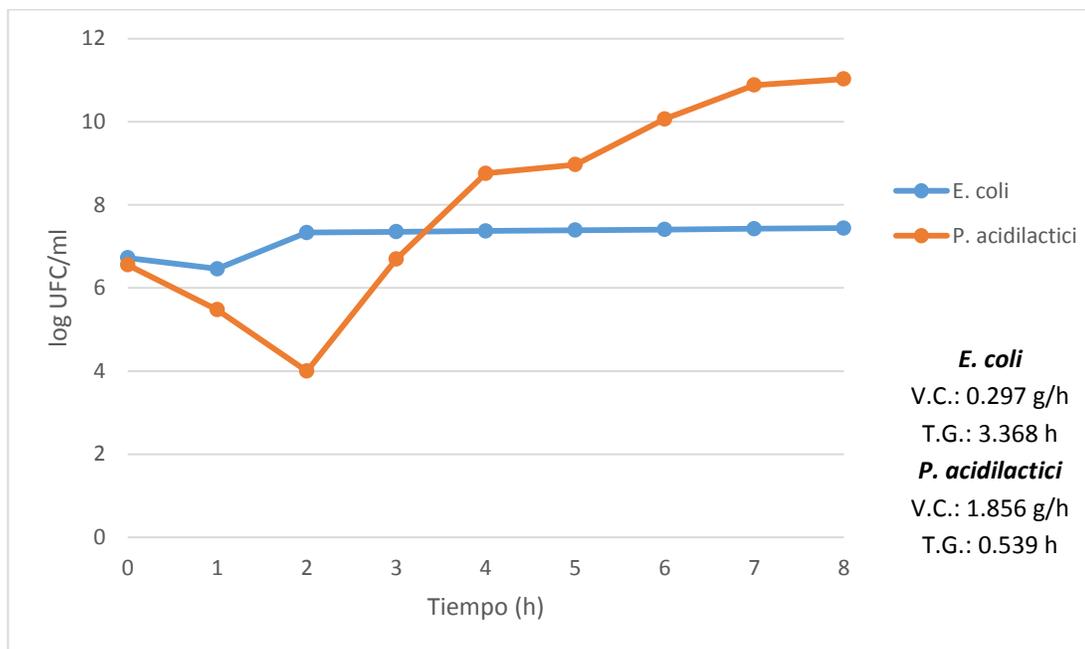


Cinética de crecimiento de *P. acidilactici* y *E. coli* en una relación 5:1. Medición de densidad óptica y recuento de UFC por mililitro de *P. acidilactici* y *E. coli* en co-cultivo en caldo MRS durante 8 horas de cultivo bacteriano. D.O.: densidad óptica. UFC: unidades formadoras de colonias. V.C.: velocidad de crecimiento. T.G.: tiempo de generación. g/h: generaciones por hora. h: horas.

## 9.12. Co-cultivo con inoculación simultánea de *E. coli* y de *P. acidilactici* en caldo ICm

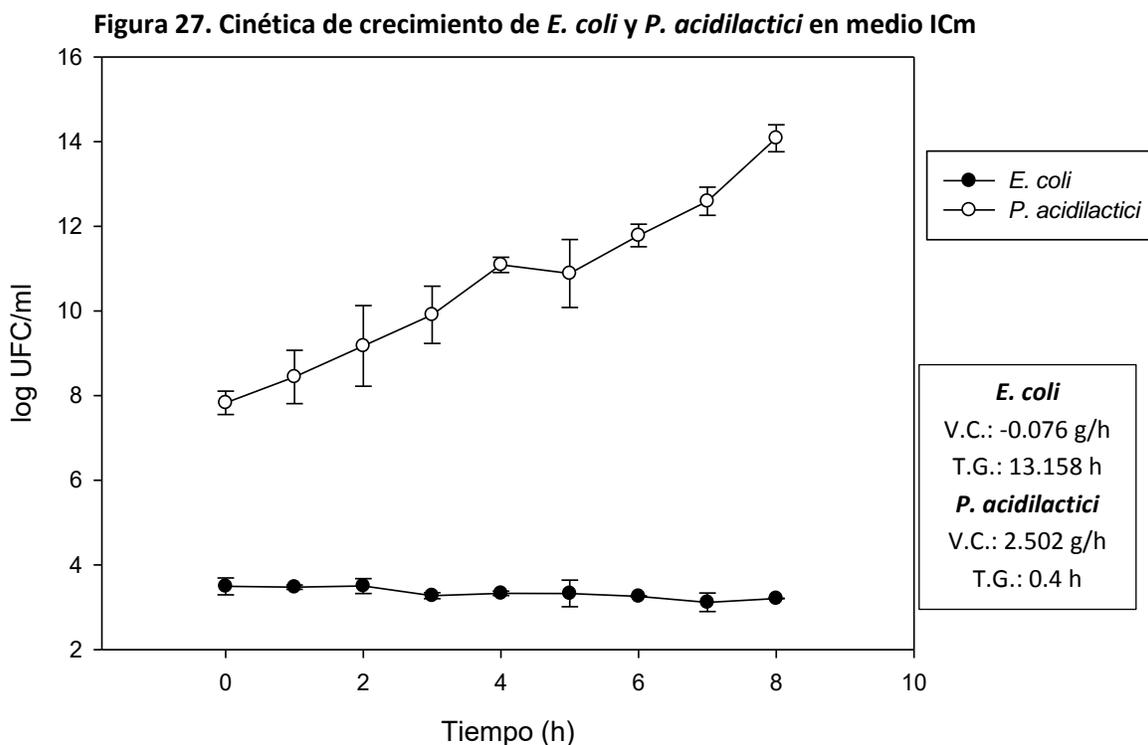
9.12.1. Para conocer la interacción entre las dos bacterias en medio ICm, se realizó una cinética de crecimiento utilizando una relación 1:1 de *P. acidilactici* y *E. coli*. Se pudo observar que hubo un descenso en el crecimiento de *P. acidilactici* al inicio cuando *E. coli* aumentó su crecimiento. Sin embargo, posteriormente *P. acidilactici* inició una fase de crecimiento logarítmico constante y el crecimiento de *E. coli* se mantuvo igual sin aumentar desde la hora 2 del cultivo (Figura 26). Se midió el pH al final del co-cultivo obteniendo como resultado 4.77.

Figura 26. Cinética de crecimiento de *P. acidilactici* y *E. coli* en medio ICm



Recuento de UFC por mililitro de *P. acidilactici* y *E. coli* en co-cultivo en caldo ICm durante 8 horas de cultivo bacteriano. UFC: unidades formadoras de colonias. V.C.: velocidad de crecimiento. T.G.: tiempo de generación. g/h: generaciones por hora. h: horas.

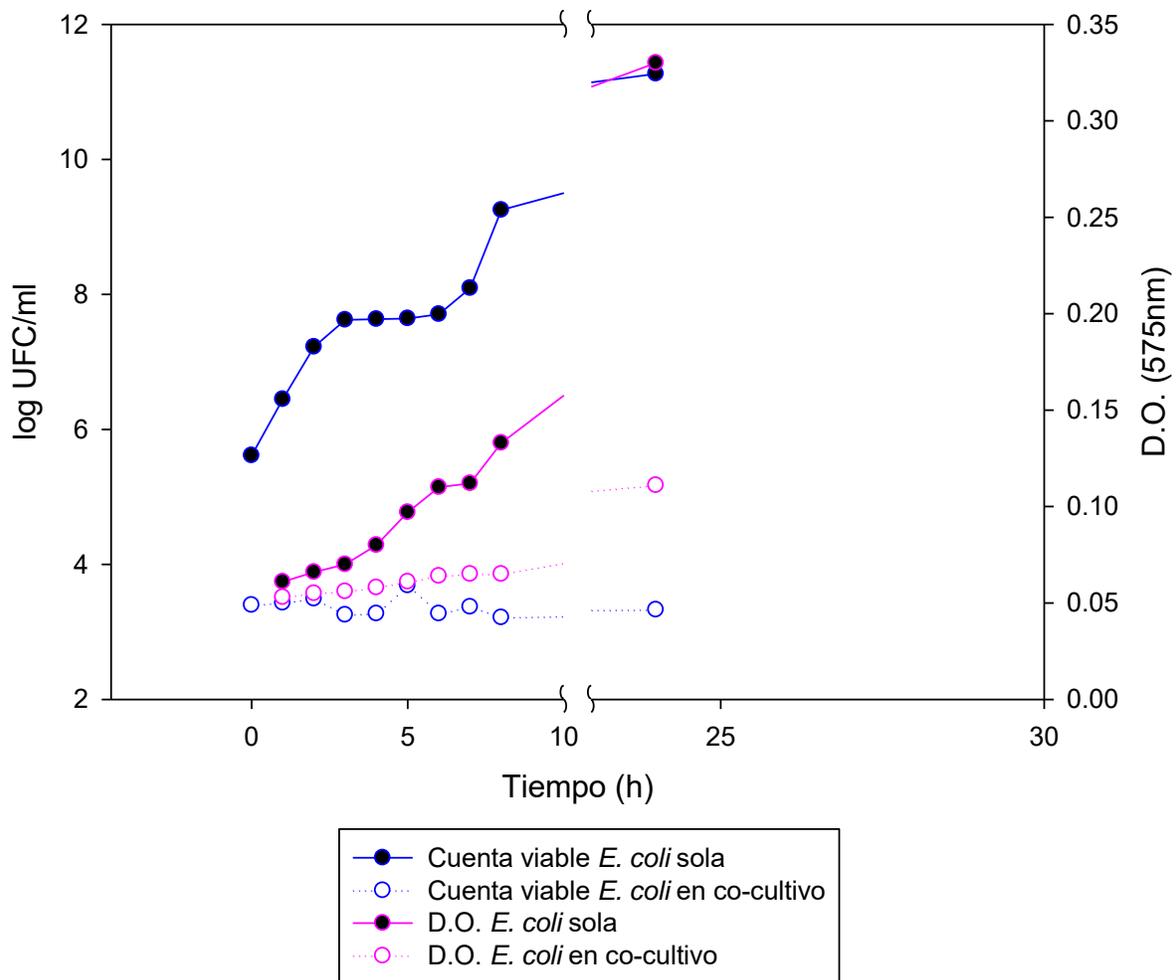
9.12.2. De acuerdo con el efecto observado durante las primeras tres horas del co-cultivo anterior, se realizaron cinéticas de crecimiento cambiando las proporciones de las bacterias entre ellas. Cuando se realizó la cinética de crecimiento con una relación de 5:1 de *P. acidilactici* y *E. coli* se obtuvieron resultados diferentes. Se pudo observar un crecimiento normal de *P. acidilactici* mientras que *E. coli* nunca aumentó su crecimiento, sin embargo se mantuvo viable todo el tiempo (Figura 27). Se midió el pH cuando terminó el co-cultivo resultando 5.28.



Recuento de UFC por mililitro de *P. acidilactici* y *E. coli* en co-cultivo en caldo ICm durante 8 horas de cultivo bacteriano. UFC: unidades formadoras de colonias. V.C.: velocidad de crecimiento. T.G.: tiempo de generación. g/h: generaciones por hora. h: horas.

9.12.3. Cuantificación de biofilm: Para poder evaluar el efecto de la interacción bacteriana sobre la formación de biofilm por parte de *E. coli*, se utilizó el método ensayo en placa para producción de biofilm. Se tomó como control positivo, un cultivo de *E. coli* y el co-cultivo de *P. acidilactici* y *E. coli* como muestra problema. Se observó (Figura 28) cómo la densidad óptica del colorante eluído aumentó al igual que la concentración bacteriana medida por medio de cuenta viable. Para el caso de la muestra problema, el crecimiento de *E. coli* fue inhibido por la presencia de *P. acidilactici*, sin embargo hubo un ligero aumento en la densidad óptica del colorante eluído. Se puede pensar que este aumento se debe a la formación de biofilm por parte de *P. acidilactici* y no por parte de *E. coli*, ya que al evaluar muestras por medio de microscopía óptica se demostró que *E. coli* no fue capaz de formar biofilm y las células bacterianas se encontraban aisladas, por lo tanto se perdían en los lavados durante la técnica.

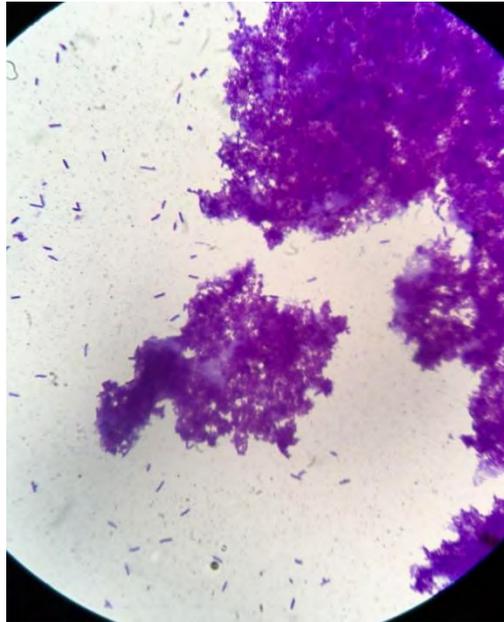
**Figura 28. Cuenta viable y densidad óptica de colorante eluído**



Cuantificación de biofilm de *P. acidilactici* y *E. coli* en co-cultivo. Cultivo de *E. coli* utilizado como control positivo. D.O.: densidad óptica. UFC: unidades formadoras de colonias. h: horas.

9.12.4. Formación de biofilm: Se evaluaron las muestras del co-cultivo directo por medio de microscopía óptica para analizar la formación de biofilm. Se demostró (Figura 29) que *P. acidilactici* formaba biofilm mientras que en el caso de *E. coli*, solo se encontraban células bacterianas aisladas alrededor de los cúmulos de *P. acidilactici*.

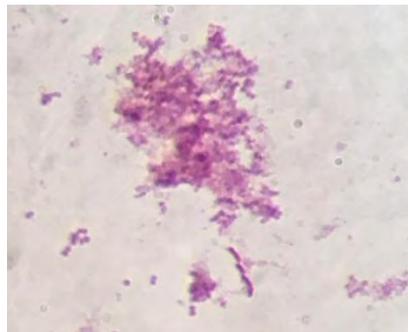
**Figura 29. Biofilm de *P. acidilactici* en co-cultivo con *E. coli* en ICm.**



Tinción: cristal violeta. 100x. Se observa la formación de biofilm de *P. acidilactici* y bacterias *E. coli* aisladas.

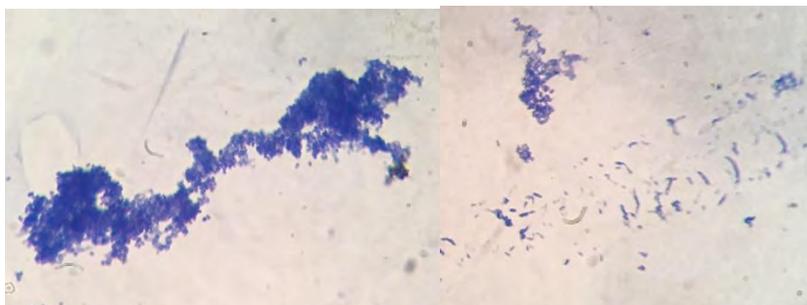
9.12.5. Tinciones diferenciales: Para conocer la naturaleza del biofilm en co-cultivo, se realizaron las mismas tinciones y los resultados fueron positivos para el caso de la tinción de PAS (Figura 30) y tinción Azul de Coomassie (AC) (Figura 31).

**Figura 30. Biofilm de *P. acidilactici* en co-cultivo con *E. coli* en ICm (PAS).**



Muestra tomada a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. Tinción: PAS (Ácido Peryódico de Schiff). 100x. Se observan bacterias (*P. acidilactici*) con una matriz “rojiza” a su alrededor y bacterias *E. coli* aisladas.

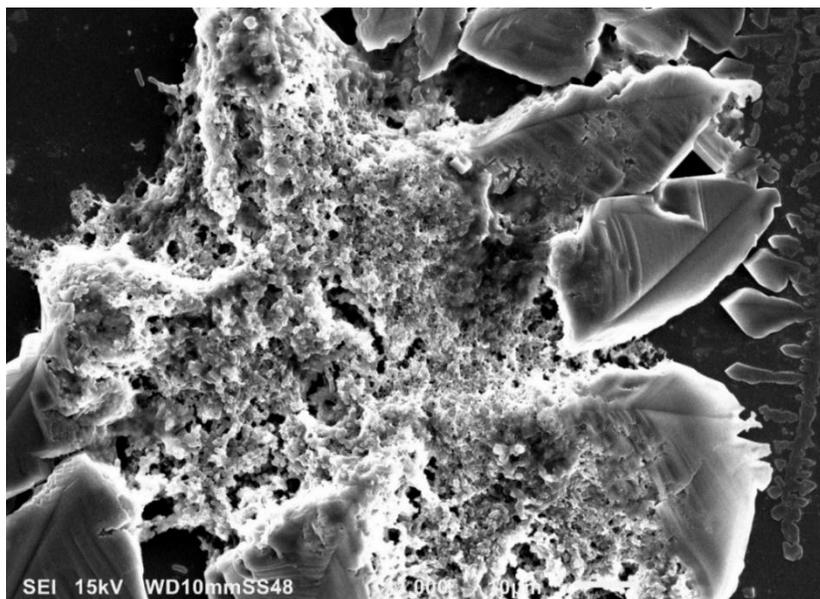
**Figura 31. Biofilm de *P. acidilactici* en co-cultivo con *E. coli* en ICm (AC).**



Muestra tomada a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. Tinción: Azul de Coomassie. 100x. Se observan cúmulos de bacterias (*P. acidilactici*) con una matriz azulada a su alrededor y las *E. coli* se encuentran aisladas.

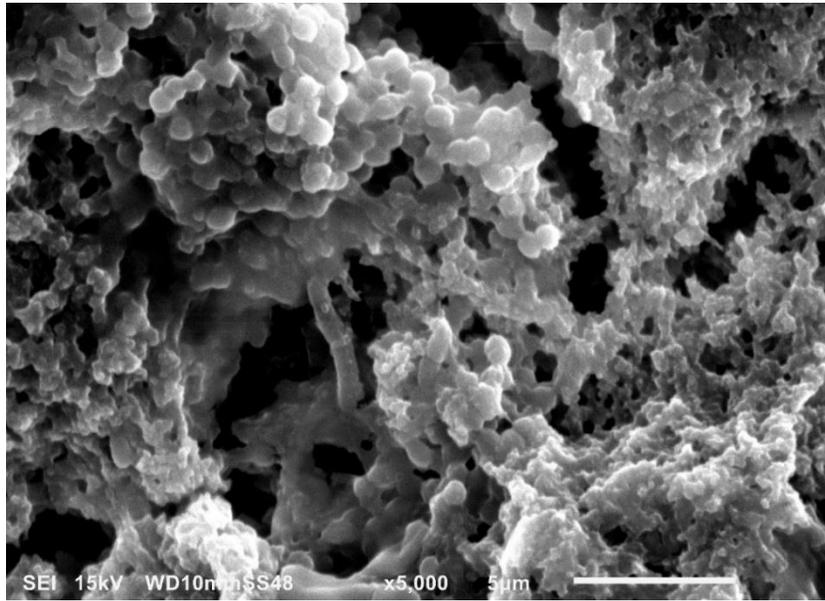
9.12.6. Microscopía electrónica de barrido: Asimismo se evaluó el efecto del co-cultivo sobre la formación de biofilm por medio de microscopía electrónica. Se pudo observar que el biofilm de *P. acidilactici* era un gran conjunto de bacterias (Figura 32) rodeadas de una matriz o sustancia que las agrupaba. Mientras que los bastones de *E. coli* se encontraban aislados; ya sea fuera o entre el biofilm de *P. acidilactici* (Figura 33).

**Figura 32. Microscopía electrónica de barrido de biofilm de *P. acidilactici* en co-cultivo con *E. coli* en medio ICm.**



Muestra tomada a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. 1000x. Se observa un cúmulo de bacterias unidas por una matriz.

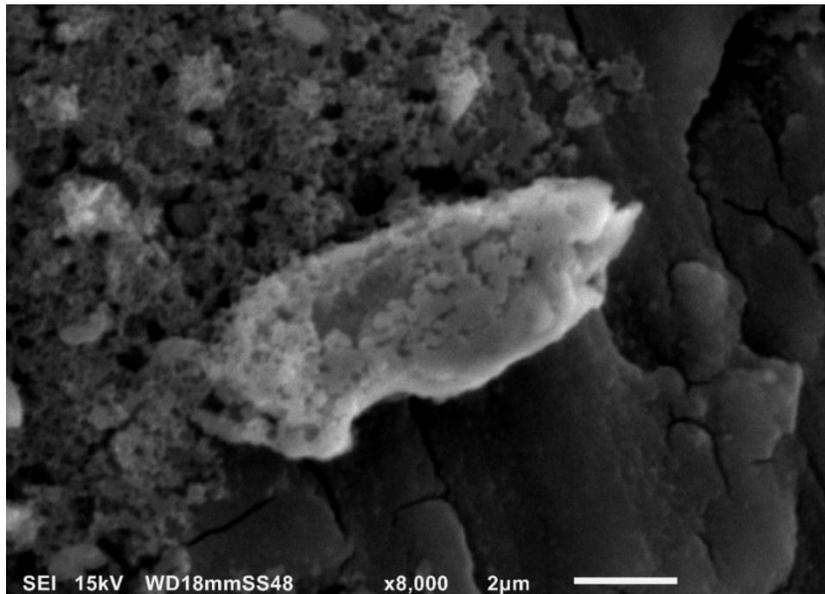
**Figura 33. Microscopía electrónica de biofilm de *P. acidilactici* en co-cultivo con *E. coli* en caldo ICm.**



Muestra tomada a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. 5000x. Se observa un cúmulo de cocos unidos por una matriz y un bacilo (*E. coli*) con estructuras circulares a su alrededor.

Igualmente, se observaron gran cantidad de bastones de *E. coli* rodeados de una sustancia o matriz como se muestra en la figura 34.

**Figura 34. Microscopía electrónica de barrido de *E. coli* en co-cultivo con *P. acidilactici* en ICm.**



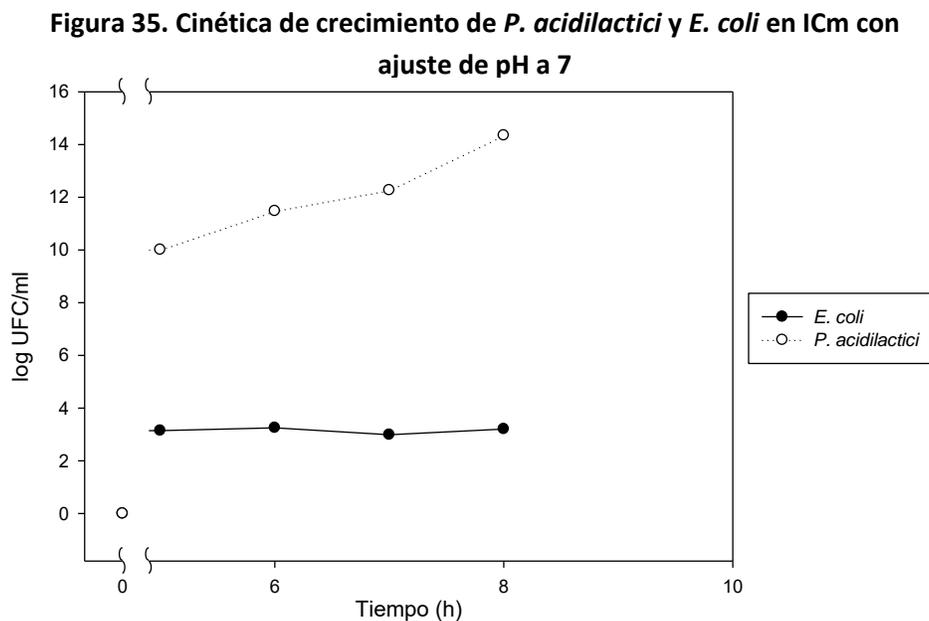
Muestra tomada a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. 8000x. Se observa una bacteria cubierta por una matriz.

### 9.13. Co-cultivo con inoculación simultánea de *E. coli* y de *P. acidilactici* en caldo ICm con ajuste de pH a la hora 5 del cultivo.

Para descartar la relación del pH con el efecto observado de *P. acidilactici* sobre *E. coli*, se realizó una cinética de crecimiento de 8 horas. A la hora 5 del cultivo, se agregó hidróxido de sodio estéril hasta llegar a un pH de 7 y posteriormente se realizó una cuenta viable de la hora 5 a la hora 8.

El pH inicial (del medio sin inocular) fue de 5.7, después de 5 horas de co-cultivo se obtuvo un pH de 5.47, el cual se ajustó a 7.32 y finalmente, se midió al término del co-cultivo sin haber variaciones del mismo.

Después de realizar la cuenta viable se observó que *P. acidilactici* siguió creciendo de la misma forma y *E. coli* continuó inhibida en su crecimiento como se muestra en la siguiente gráfica (Figura 35).

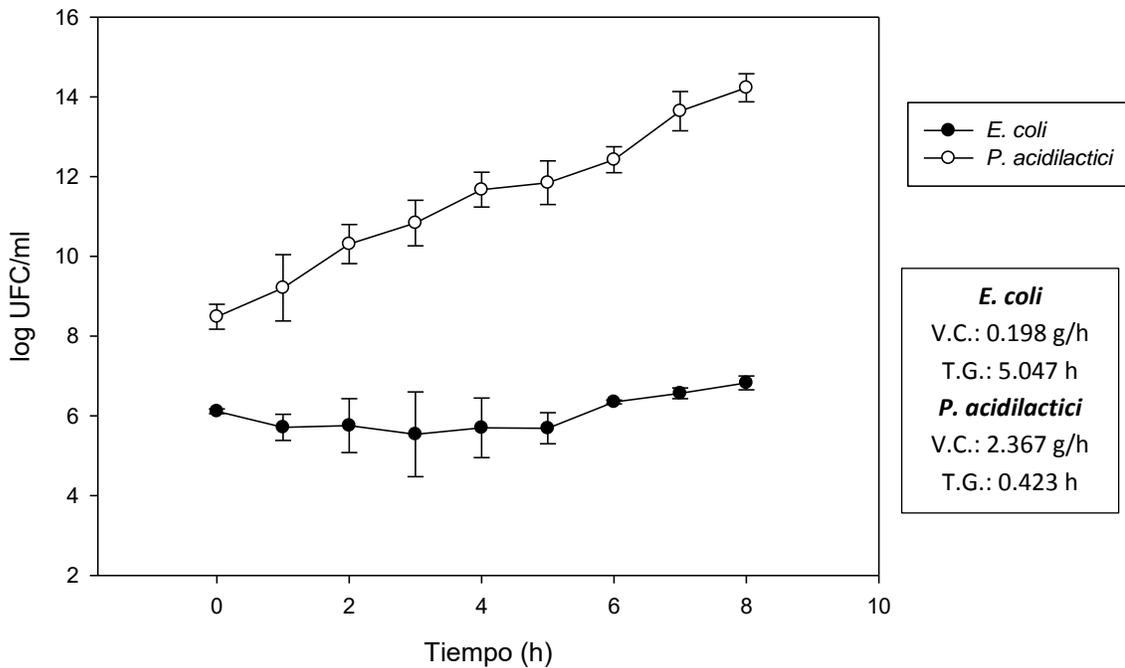


Cuenta viable de UFC por mililitro de *P. acidilactici* y *E. coli* en co-cultivo en caldo ICm con ajuste de pH a 7 en la hora 5. UFC: unidades formadoras de colonias. h: horas.

#### 9.14. Co-cultivo separado por membranas de 0.22 $\mu\text{m}$ , con inoculación simultánea de *E. coli* y de *P. acidilactici* en caldo ICm

9.14.1. Una vez observado el efecto de *P. acidilactici* sobre *E. coli* en interacción directa, se realizó el co-cultivo separado por membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  donde se aseguró el intercambio continuo del medio de cultivo y los productos generados por las bacterias sin que éstas estuvieran en contacto. Después de obtener los datos, se realizó la gráfica (Figura 36) en el programa antes mencionado. Se pudo observar el mismo efecto, ya que *P. acidilactici* tuvo un crecimiento normal, mientras que *E. coli* tuvo una inhibición en su crecimiento pero siempre se mantuvo viable.

**Figura 36. Cinética de crecimiento de co-cultivo separado por membranas de 0.22 $\mu\text{m}$  en medio ICm**

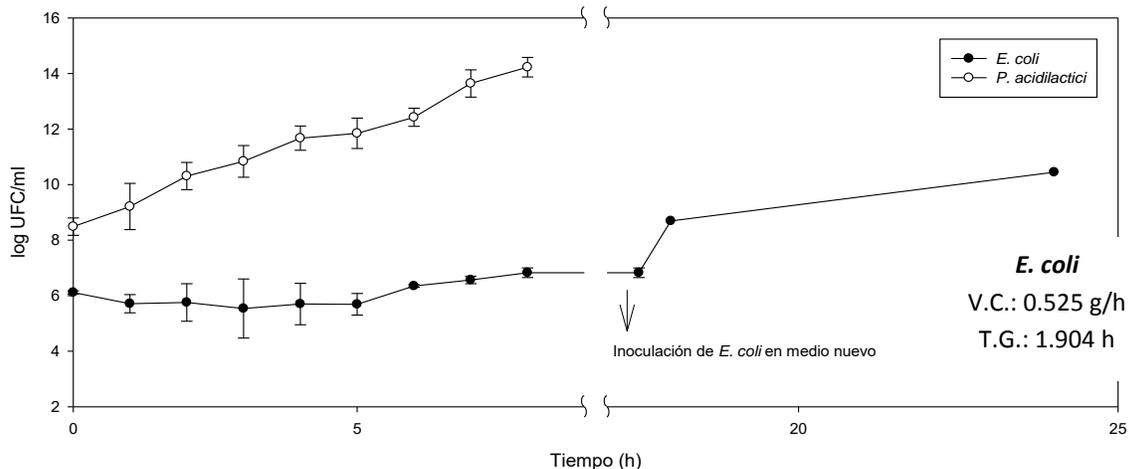


Recuento de UFC por mililitro de *P. acidilactici* y *E. coli* en co-cultivo separado por membranas (0.22 $\mu\text{m}$ ), en caldo ICm durante 8 horas de cultivo bacteriano. UFC: unidades formadoras de colonias. V.C.: velocidad de crecimiento. T.G.: tiempo de generación. g/h: generaciones por hora. h: horas.

Con los resultados anteriores (Figura 36), se realizó un experimento paralelo, donde se quiso conocer si el efecto sobre *E. coli* era dependiente de la presencia de *P. acidilactici*. Por lo anterior, se tomó una muestra de *E. coli* al término del co-cultivo y se colocó en un matraz con medio ICM estéril. Posteriormente se realizó una cinética de crecimiento, tomando muestras para cuenta viable a las 18 y a las 24 horas y se calcularon los valores de tiempo de duplicación y velocidad de crecimiento.

En la figura 37, se observa el co-cultivo hasta las 8 horas y posteriormente se evidencia el crecimiento logarítmico y constante de *E. coli* desde que se inoculó sola en medio estéril hasta las 24 horas de cultivo.

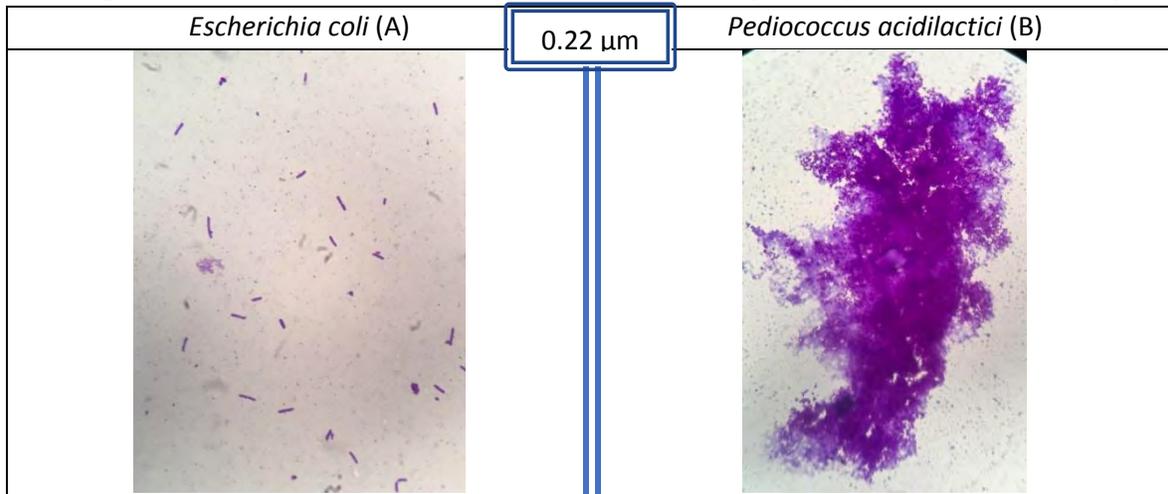
**Figura 37. Cinética de crecimiento de co-cultivo separado por membranas de 0.22µm (separación de *E. coli* a la hora 8)**



Cinética de crecimiento de *E. coli* después de cambiar el medio e inocularla de manera individual. UFC: unidades formadoras de colonias. V.C.: velocidad de crecimiento. T.G.: tiempo de generación. g/h: generaciones por hora. h: horas.

9.14.2. Formación de biofilm: Para analizar el efecto sobre la formación de biofilm, se tomaron muestras del compartimiento mayor y del menor del dispositivo y se observó que por parte de *E. coli*, todas las células estaban aisladas, mientras que *P. acidilactici* formaba biofilm sin alteraciones aparentes.

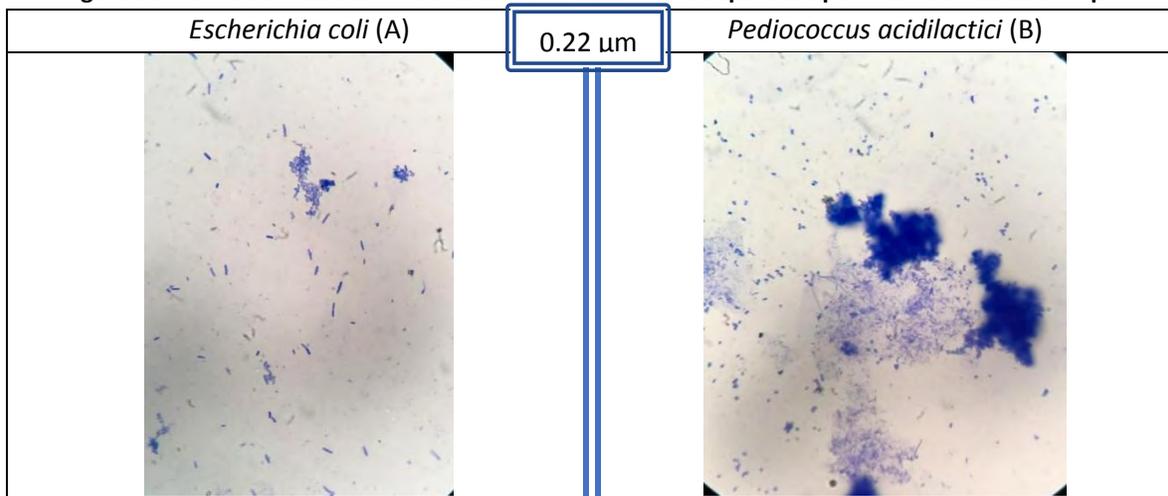
**Figura 38. Formación de biofilm de bacterias en co-cultivo separadas por membranas de 0.22  $\mu\text{m}$ .**



Bacterias teñidas con cristal violeta. A) compartimiento donde se inoculó *E. coli*. Se observan bacterias aisladas. B) compartimiento donde se inoculó *P. acidilactici*. Se observa un cúmulo de bacterias con una matriz a su alrededor. 100x. Muestras tomadas a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento.

9.14.3. Tinción diferencial: Siguiendo el mismo procedimiento de tiempo y toma de muestra, se observó una naturaleza proteica gracias a la tinción azul de Coomassie realizada sobre los cubreobjetos muestra.

**Figura 39. Formación de biofilm de bacterias en co-cultivo separadas por membranas de 0.22  $\mu\text{m}$ .**



Bacterias teñidas con azul de Coomassie. A) compartimiento donde se inoculó *E. coli*. Se observan bacterias aisladas. B) compartimiento donde se inoculó *P. acidilactici*. Se observa un cúmulo de bacterias con una matriz a su alrededor. 100x. Muestras tomadas a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento.

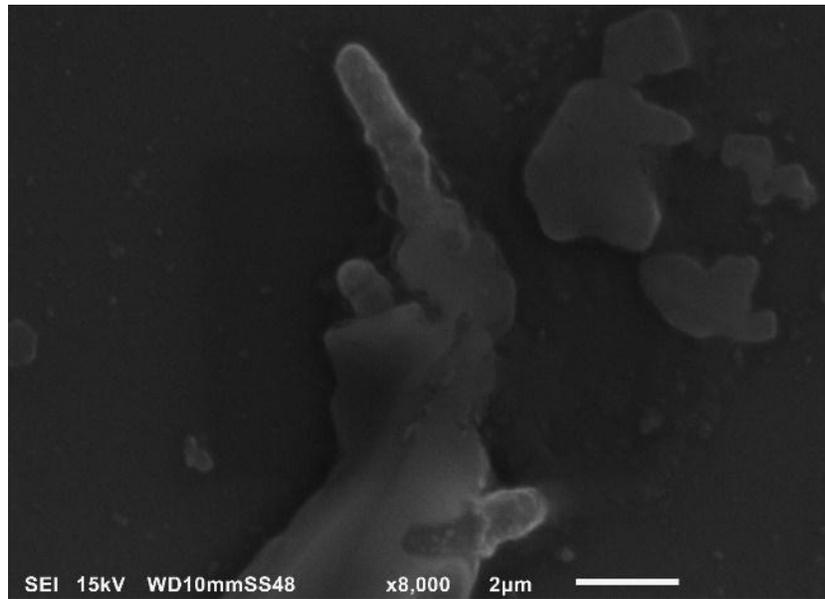
9.14.4. Microscopía electrónica de barrido: De acuerdo con los resultados de formación de biofilm por microscopía óptica (Figura 38) se analizó la formación de biofilm de *P. acidilactici* del compartimiento mayor por medio de microscopía electrónica, esperando encontrar bacterias *E. coli* aisladas en el compartimiento menor. Como se muestra en las figuras 40 y 41 se observan bacterias *E. coli* sin formar biofilm y con alteraciones morfológicas.

**Figura 40. Microscopía Electrónica de Barrido de *E.coli* en co-cultivo separado por membranas de 0.22 $\mu$ m.**



Muestra tomada del compartimiento donde se inoculó *E. coli* a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. Se observa una bacteria con estructuras circulares a su alrededor. 10000x.

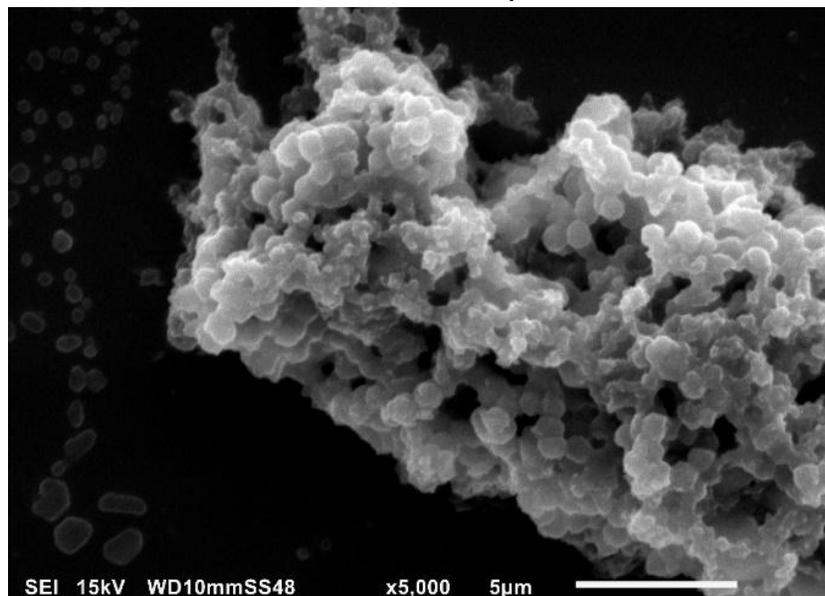
**Figura 41. Microscopía Electrónica de Barrido de *E.coli* en co-cultivo separado por membranas de 0.22 $\mu$ m.**



Muestra tomada del compartimiento donde se inoculó *E. coli*. Se observa una bacteria con estructuras esféricas a su alrededor y un puntillito sobre la pared. 8000x.

En el caso del compartimiento mayor, se evidenció la formación de biofilm por parte de *P. acidilactici* como se muestra en la figura 42.

**Figura 42. Microscopía Electrónica de Barrido de biofilm de *P. acidilactici* en co-cultivo separado por membranas de 0.22 $\mu$ m.**

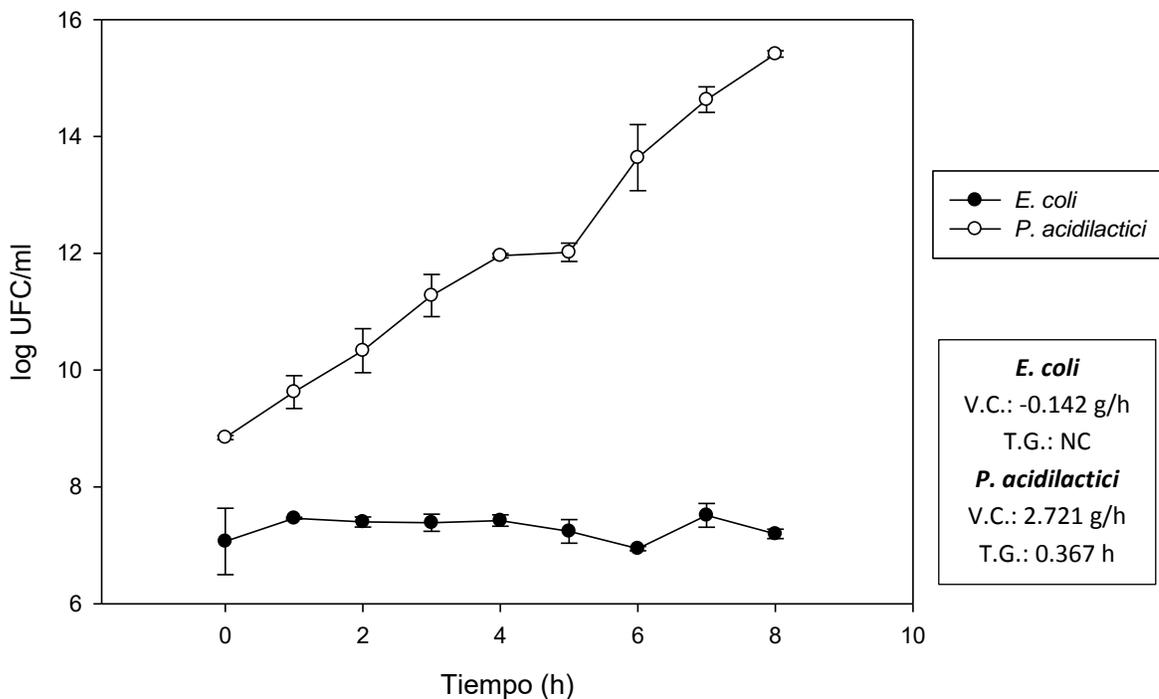


Muestra tomada del compartimiento donde se inoculó *P. acidilactici* a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. Se observa la formación de biofilm, bacterias agrupadas rodeadas de una matriz. 5000x.

### 9.15. Co-cultivo separado por membranas de diálisis, con inoculación simultánea de *E. coli* y de *P. acidilactici* en caldo ICm

9.15.1. Después de analizar el efecto de *P. acidilactici* sobre *E. coli* en co-cultivo separado por membranas de 0.22 $\mu$ m, se realizó el co-cultivo separado por membranas de diálisis de 16 kDa. Se utilizó una relación 5:1 de *P. acidilactici* y *E. coli* y después de obtener los datos se construyó una gráfica (Figura 43) donde se pudo observar el mismo efecto; *P. acidilactici* tuvo un crecimiento normal con una fase logarítmica constante, mientras que *E. coli* no creció pero se mantuvo viable.

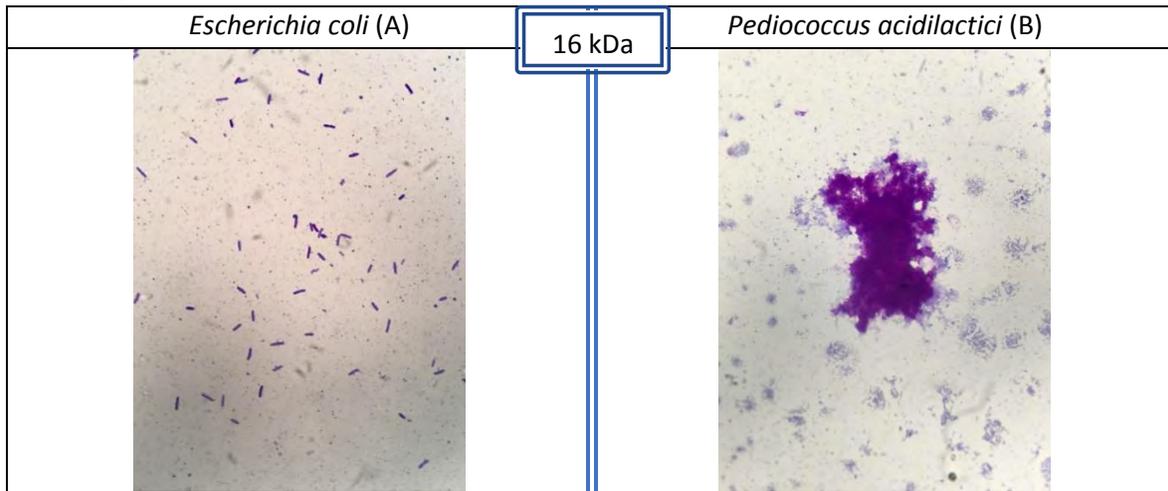
**Figura 43. Cinética de crecimiento de co-cultivo separado por membranas de diálisis en medio ICm**



Recuento de UFC por mililitro de *P. acidilactici* y *E. coli* en co-cultivo separado por membranas de diálisis, en caldo ICm durante 8 horas de cultivo bacteriano. UFC: unidades formadoras de colonias. V.C.: velocidad de crecimiento. T.G.: tiempo de generación. g/h: generaciones por hora. NC: no calculable. h: horas.

9.15.2. Formación de biofilm: Se tomaron muestras de cada compartimiento para analizar la formación de biofilm; teñido con cristal violeta, por medio de microscopía óptica. Se observaron bacterias *E. coli* aisladas del compartimiento menor (Figura 44A), sin embargo, del compartimiento mayor se observaron cúmulos bacterianos unidos por una sustancia de color más claro que correspondían a biofilm de *P. acidilactici* (Figura 44B).

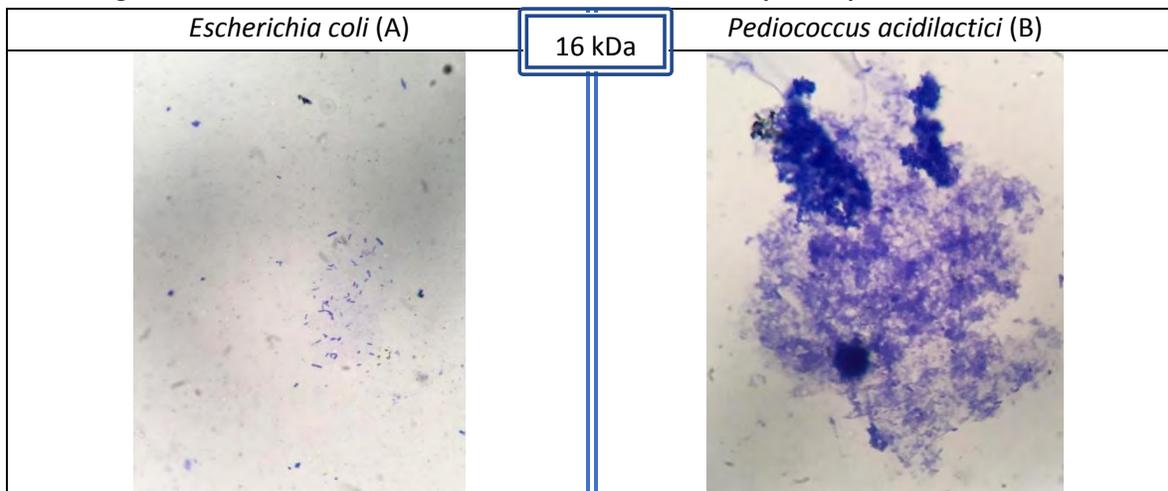
**Figura 44. Formación de biofilm de bacterias en co-cultivo separado por membranas de diálisis.**



Muestras tomadas a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento y teñidas con cristal violeta A) compartimiento donde se inoculó *E. coli*. Se observan bacterias aisladas. B) compartimiento donde se inoculó *P. acidilactici*. Se observa el biofilm bacteriano. 100x.

9.15.3. Tinciones diferenciales: Se analizó la naturaleza de biofilm por parte de las bacterias en co-cultivo por medio de la tinción Azul de Coomassie, donde se demostró que el biofilm de *P. acidilactici* era probablemente de naturaleza proteica (Figura 45B).

**Figura 45. Formación de biofilm de bacterias en co-cultivo separado por membranas de diálisis.**

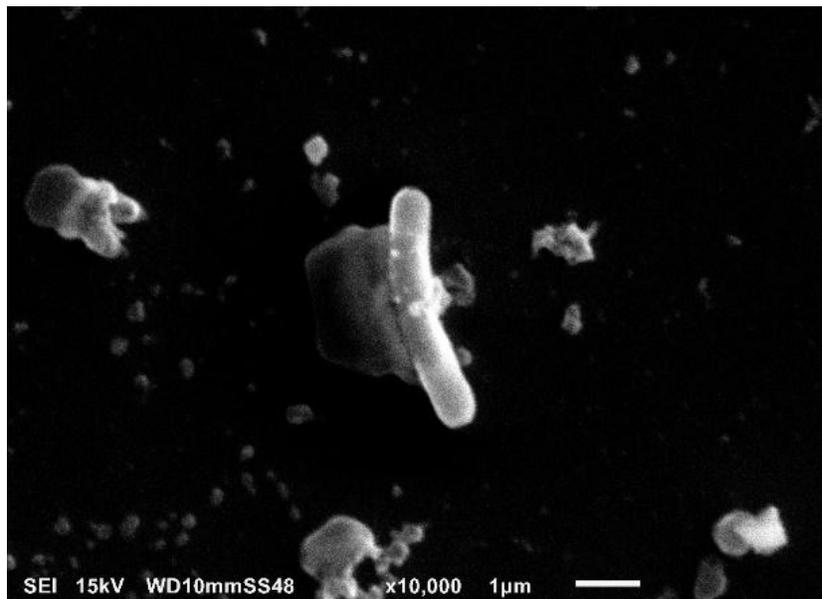


Muestras teñidas con azul de Coomassie. A) compartimiento donde se inoculó *E. coli*. Se observan bacterias aisladas. B) compartimiento donde se inoculó *P. acidilactici*. Se observa un cúmulo de bacterias con una matriz a su alrededor. 100x.

9.15.4. Microscopía Electrónica de Barrido: De acuerdo con los resultados obtenidos por microscopía óptica (Figura 44), se analizó la formación de biofilm de *P. acidilactici* y el efecto sobre bacterias *E. coli* por medio de microscopía electrónica.

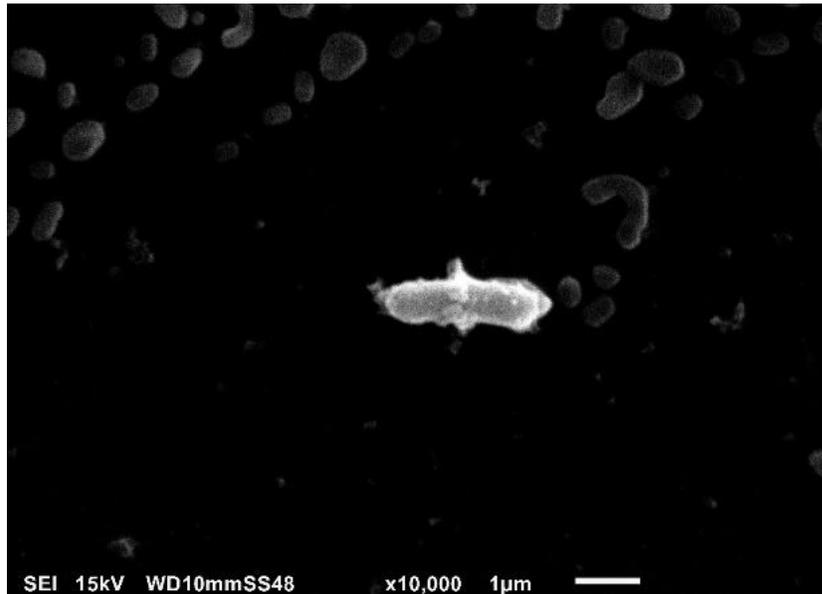
Se demostraron cambios morfológicos en las bacterias *E. coli*, así como presencia de estructuras esféricas sobre la bacteria (Figuras de la 46 a la 49).

**Figura 46. Microscopía Electrónica de Barrido de *E. coli* en co-cultivo separado por membranas de diálisis.**



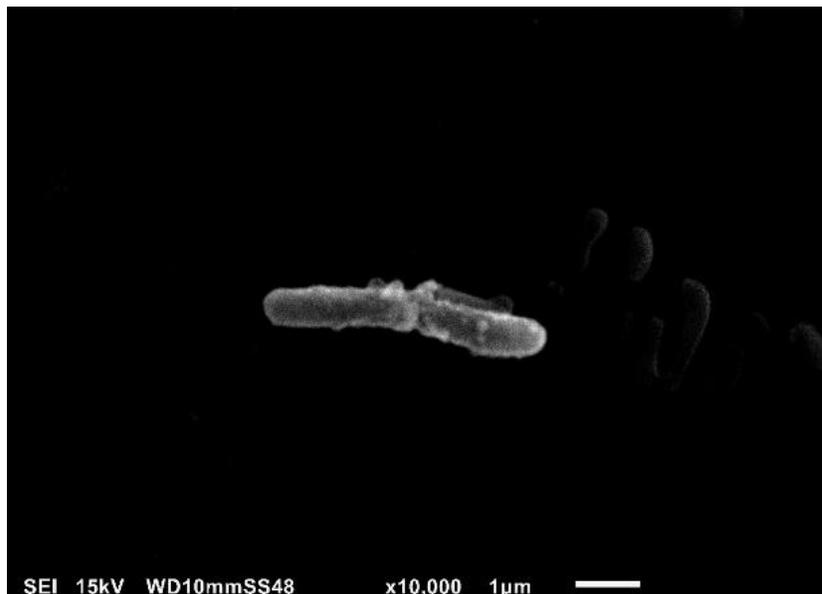
Muestra tomada del compartimiento donde se inoculó *E. coli* a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. Se observa una bacteria con estructuras redondas pegadas a su pared. 10000x.

**Figura 47. Microscopía Electrónica de Barrido de *E. coli* en co-cultivo separado por membranas de diálisis.**



Muestra tomada del compartimiento donde se inoculó *E. coli* a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. Se observa una bacteria con estructuras redondas sobre su pared. 10000x.

**Figura 48. Microscopía Electrónica de Barrido de *E. coli* en co-cultivo separado por membranas de diálisis.**



Muestra tomada del compartimiento donde se inoculó *E. coli* a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. Se observan una bacteria en proceso de duplicación, con estructuras redondas sobre la pared, principalmente cerca de la zona del septo bacteriano. 10000x.

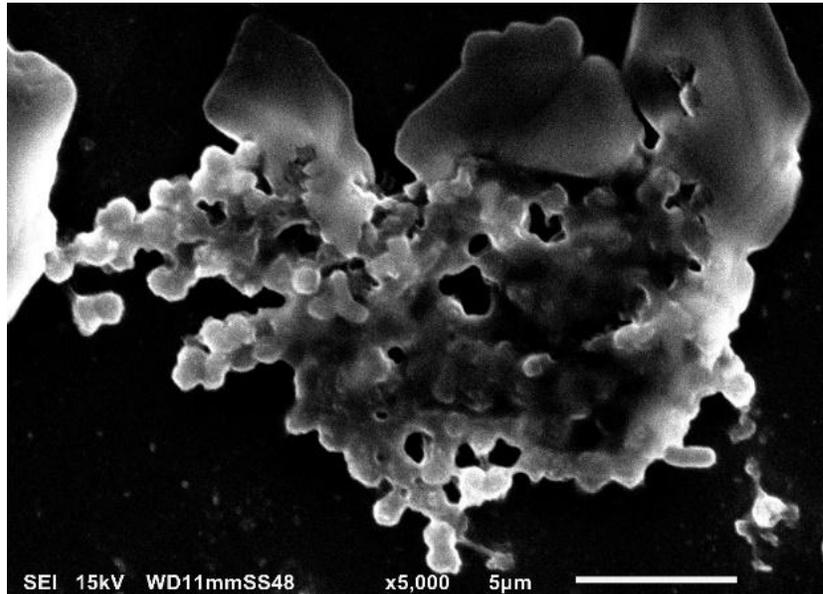
**Figura 49. Microscopía Electrónica de Barrido de *E. coli* en co-cultivo separado por membranas de diálisis.**



Muestra tomada del compartimiento donde se inoculó *E. coli* a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. Se observa una bacteria con estructuras redondas localizadas principalmente en la parte central de la bacteria y un puntilleo sobre su superficie. 10000x.

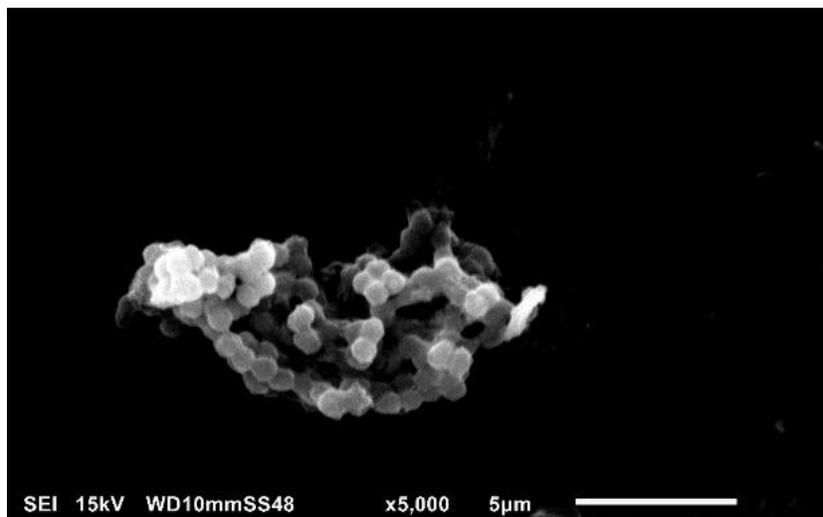
En el caso del compartimiento mayor, se observó el biofilm de *P. acidilactici*, con las mismas características y sin alteraciones (Figuras 50 y 51) como las observadas en cultivos individuales y en co-cultivos anteriores.

**Figura 50. Microscopía Electrónica de Barrido de *P. acidilactici* en co-cultivo separado por membranas de diálisis.**



Muestra tomada del compartimiento donde se inoculó *P. acidilactici* a las 8 horas del inicio de la curva de crecimiento. Se observa un cúmulo de bacterias rodeadas por una matriz (formación de biofilm). 5000x.

**Figura 51. Microscopía Electrónica de Barrido de *P. acidilactici* en co-cultivo separado por membranas de diálisis.**



Muestra tomada del compartimiento donde se inoculó *P. acidilactici*. Se observan cocos unidos por una matriz extracelular. 5000x.

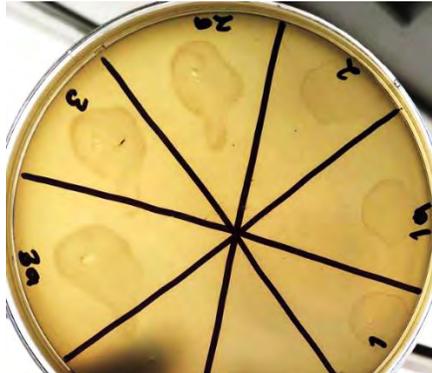
### 9.16. Prueba de presencia de bacteriófagos en sobrenadantes de cultivos bacterianos.

De acuerdo con las estructuras presentes alrededor de las bacterias *E. coli*, observadas por microscopía electrónica de barrido; se realizó la técnica de Weigle (1953) para descartar la presencia de bacteriófagos.

Como control positivo (Figura 52), se utilizó la misma cepa (EDL 933), se cultivó durante 18 horas y se expuso a Rayos UV a 37cm, 15 watts y durante 10 segundos. Se depositaron gotas de 10  $\mu$ l del sobrenadante sobre un césped de *E. coli* K12 en agar Luria Bertani, y se incubó a 37°C durante 24 horas.

Para probar los sobrenadantes, se depositaron gotas (10  $\mu$ l) en otras cajas de Petri sobre un césped de *E. coli* K12 y se incubaron bajo las mismas condiciones. A las 24 horas se llevaron a cabo las lecturas obteniendo resultados negativos para el caso de todos los sobrenadantes de cultivos y co-cultivos (Figura 53).

**Figura 52. Control positivo de prueba de presencia de bacteriófagos.**



Se probaron diferentes sobrenadantes del mismo cultivo de *E. coli*. Se observan placas líticas.

**Figura 53. Prueba de presencia de bacteriófagos en sobrenadantes de cultivos y co-cultivos bacterianos.**

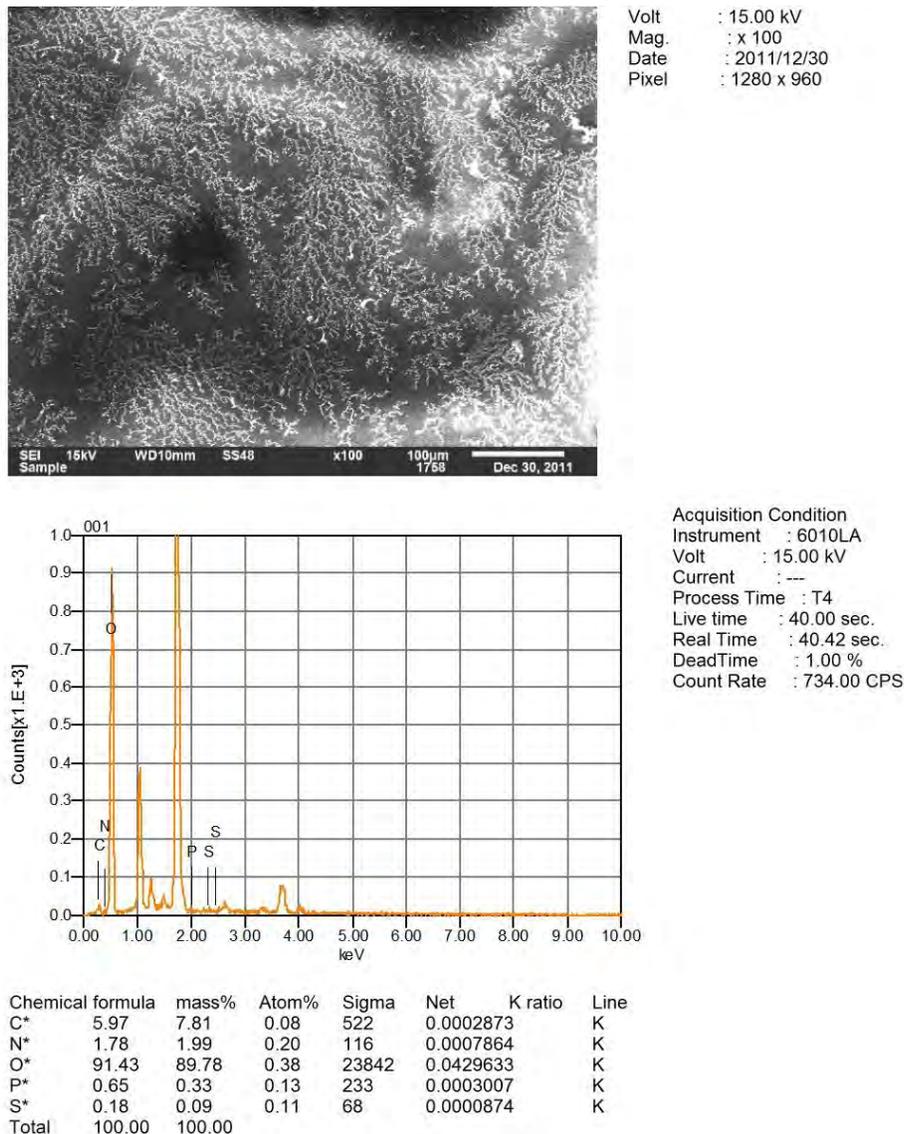


Se probaron los sobrenadantes de cultivos individuales y de co-cultivos bacterianos. No se observan placas líticas.

## 9.17. Proporción de elementos de la matriz extracelular.

9.16.1. En el microscopio electrónico de barrido, se llevó a cabo un análisis por Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS) para conocer la proporción de elementos (carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre) en  $100 \mu\text{m}^2$  de muestra. Se utilizaron cubreobjetos depositados en los cultivos individuales y co-cultivos, se fijaron y se secaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 12 horas. Además de éstas muestras, se probaron el medio ICm sin inocular y frotis bacterianos cuyas bacterias fueron lavadas previamente en PBS para también ser analizados por EDS. En la figura 54 se muestra un ejemplo del informe que emite el equipo por cada muestra.

**Figura 54. Análisis por EDS de cultivo de *E. coli* en caldo ICm.**



Ejemplo de informe emitido por el equipo de microscopía electrónica JEOL SYSTEM sobre el análisis por EDS de muestra de *E. coli* obtenida a las 8 horas de cultivo en ICm.

Finalmente, se realizó un cuadro comparativo con los datos emitidos por el microscopio electrónico mostrado en la tabla 4, donde se observa que los elementos más abundantes son el oxígeno y el carbono; resultados que concuerdan al tratarse de materia orgánica y también coinciden con la naturaleza del biofilm y de las propias bacterias.

**Tabla 4. Cuadro comparativo de proporción de elementos en los diferentes cultivos y co-cultivos.**

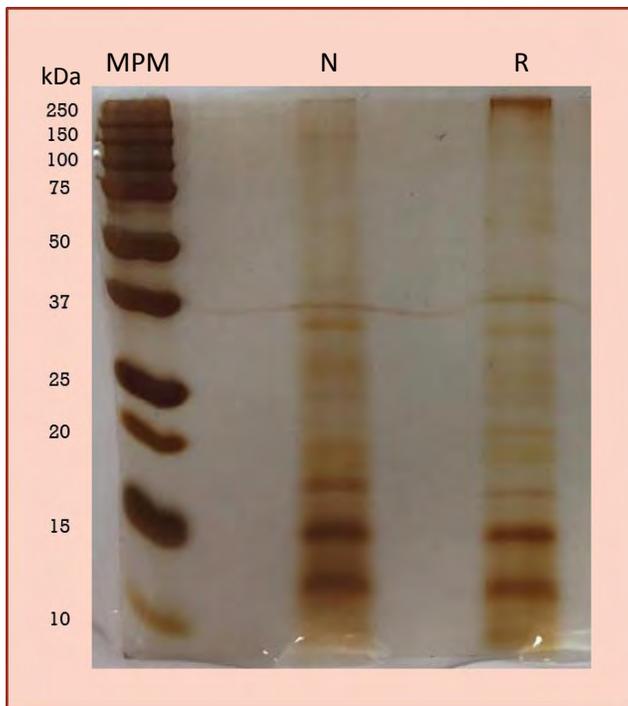
Cultivo/Elemento	Carbono%	Nitrógeno%	Oxígeno%	Fósforo%	Azufre%	Total%
Medio ICM sin inocular	7.38	2.72	87.28	1.89	0.73	100
Bacterias <i>E. coli</i> lavadas	27.85	8.80	62.07	1.10	0.19	100
Bacterias <i>P. acidilactici</i> lavadas	16.51	3.89	78.89	0.71	0	100
<i>E. coli</i> en medio ICM	5.97	1.78	91.43	0.65	0.18	100
<i>P. acidilactici</i> en medio ICM	19.62	2.43	77.73	0.04	0.18	100
Co-cultivo directo en medio ICM	14.12	2.55	82.80	0.47	0.07	100
<i>E. coli</i> en co-cultivo (0.22 $\mu$ m)	13.63	1.56	83.33	1.48	0	100
<i>P. acidilactici</i> en co-cultivo (0.22 $\mu$ m)	12.06	1.19	84.42	2.02	0.32	100
<i>E. coli</i> en co-cultivo (diálisis)	12.46	1.27	84.97	1.3	0	100
<i>P. acidilactici</i> en co-cultivo (diálisis)	10.32	0.42	89.22	0.04	0	100

Resultados tomados de informes emitidos por el equipo de Microscopía Electrónica de Barrido JEOL EDS SYSTEM al hacer el análisis por EDS.

### 9.18. Análisis de Proteínas

Cuando se preparó el medio de cultivo ICm se cuantificó la proteína por el método de Bradford obteniendo como resultado 392.32  $\mu\text{g/ml}$  y se realizó una electroforesis de proteínas del mismo. Como se muestra en la figura 55, se observaron bandas que ponen de manifiesto que las proteínas más abundantes tienen un peso molecular menor a 37 kDa.

**Figura 55. Corrimiento electroforético de medio ICm sin inocular.**



Corrimiento electroforético SDS PAGE de medio de cultivo ICm estéril en gel de poliacrilamida al 12%. Tinción con nitrato de plata. kDa: kilodalton, MPM: marcador de peso molecular. N: natural. R: reducido.

Una vez realizados todos los cultivos individuales y co-cultivos, se tomaron los sobrenadantes en condiciones de esterilidad y se cuantificó la proteína por el método de Bradford (Tabla 5) de cada uno de ellos, así como del medio de cultivo sin inocular.

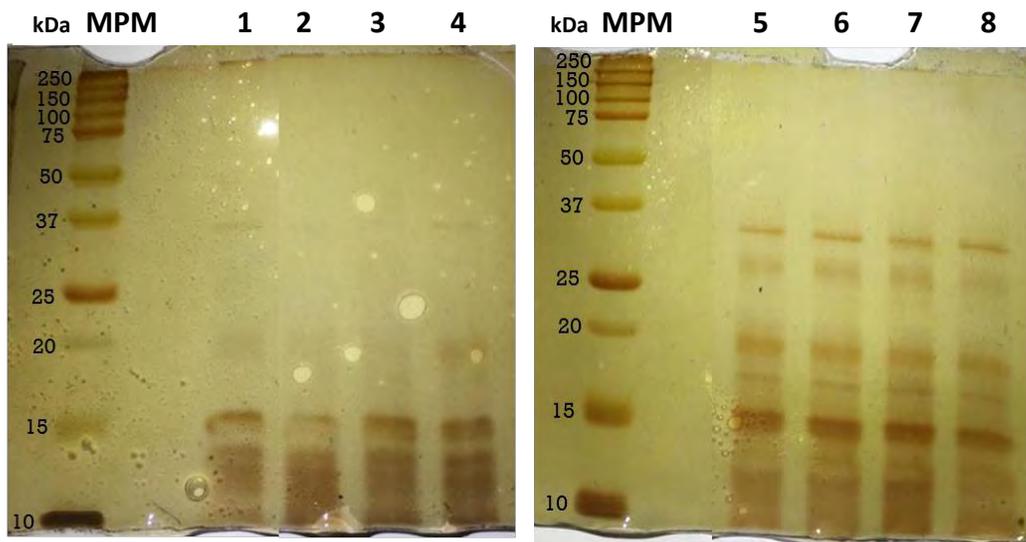
**Tabla 5. Cantidad de Proteína de sobrenadantes de cultivos y co-cultivos.**

Muestra	Proteína (µg/ml)
Medio sin inocular	529.3
<i>E. coli</i> en medio ICm	425.5
<i>P. acidilactici</i> en medio ICm	470.8
Co-cultivo directo en medio ICm	315.9
<i>E. coli</i> en co-cultivo separado por membranas de 0.22 µm.	434.9
<i>P. acidilactici</i> en co-cultivo separado por membranas de 0.22 µm	195.0
<i>E. coli</i> en co-cultivo separado por membranas de diálisis.	489.7
<i>P. acidilactici</i> en co-cultivo separado por membranas de diálisis	387.7

Se cuantificó la proteína de cada sobrenadante por el método de Bradford utilizando una curva patrón de albúmina sérica bovina al 0.1%.

Posteriormente se llevó a cabo la electroforesis de los sobrenadantes de cultivos individuales y co-cultivos. Se evidenció (Figura 56) que las proteínas más abundantes tienen un peso molecular menor a 37 kDa.

**Figura 56. Corrimiento electroforético de sobrenadantes de cultivos individuales y co-cultivos bacterianos.**



Corrimiento electroforético de SDS PAGE en gel de poliacrilamida al 12%. Tinción con nitrato de plata. kDa: kiloDálton, MPM: marcador de peso molecular, 1: medio ICm sin inocular, 2: sobrenadante de cultivo de *E. coli* en ICm, 3: sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* en ICm, 4: sobrenadante de co-cultivo directo, 5: sobrenadante tomado del compartimiento menor (*E. coli*) de co-cultivo separado por membranas de 0.22 µm, 6: sobrenadante tomado del compartimiento mayor (*P. acidilactici*) de co-cultivo separado por membranas de 0.22 µm, 7: sobrenadante tomado del compartimiento menor (*E. coli*) de co-cultivo separado por membranas de diálisis, 8: sobrenadante tomado del compartimiento mayor (*P. acidilactici*) de co-cultivo separado por membranas de diálisis.

## 10. DISCUSIÓN

### Medio Caldo Infusión Carne Modificado

En el presente trabajo, se formuló un medio de cultivo líquido semejante, en cuanto a la composición química, al salami. Debido a la gran variedad de recetas, solo se seleccionaron diez de manera aleatoria y se promediaron los ingredientes que se encontraban en todas las recetas (Tabla 2). De este modo, se obtuvo un modelo representativo de un salami que permitiera una simulación en un medio líquido y dinámico de fácil medición y control de variables, constituyendo un medio complejo elaborado a partir de ingredientes naturales (Zabriskie *et al.*, 1999). Se utilizó dicho embutido porque este alimento no tiene un proceso de cocción, solo fermentación y secado (Soto, 2004), y su inocuidad es difícil si no se llevan a cabo las buenas prácticas de manufactura por ser un producto mínimamente procesado. Asimismo, el principal ingrediente es la carne. Este componente, además de ser altamente susceptible al deterioro constituye un vehículo para la propagación de enfermedades transmitidas por alimentos (Heredia *et al.*, 2014). También, se han hecho aislamientos de *E. coli* O157:H7 del tracto digestivo de cerdos y bovinos, así como de carne para producción de derivados cárnicos (Aranguré, 2007).

Después de analizar los ingredientes, se pensaba que la grasa y el ajo, por tener propiedades antimicrobianas (Chalar *et al.*, 2014), podía afectar el crecimiento bacteriano. Sin embargo se descartó puesto que *E. coli* y *P. acidilactici* tuvieron mejores valores de velocidad de crecimiento que en el medio sintético (LB y MRS respectivamente).

El medio debía esterilizarse para controlar todas las variables y condiciones durante los experimentos, para ello, se filtraría por membranas millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ , sin embargo las partículas eran muy grandes y no fue posible. Por lo tanto, se planteó la esterilización en autoclave, ya que no se contaba con el equipo de esterilización por rayos UV. Al esterilizar en autoclave, las proteínas se desnaturalizaron por la temperatura y presión alcanzada (121°C y 21 lb de presión). Debido a lo anterior, se obtuvo una mezcla en donde las proteínas se sedimentaron formando un medio bifásico. Se utilizó el sobrenadante como medio de cultivo, sin embargo presentaba algunas partículas que impedían que se hicieran lecturas por medio de espectrofotometría, por lo tanto, para evaluar el crecimiento bacteriano solo se realizó cuenta viable. A la solución translúcida utilizada como medio de cultivo se le realizó un análisis bioquímico para asegurar que el medio tenía las características esenciales de un medio de cultivo después de la gran cantidad de proteína perdida. Con los resultados de la bioquímica (Tabla 3), se encontró que contenía una fuente de carbono, de nitrógeno y otros componentes necesarios para el desarrollo bacteriano (Montoya, 2008).

### Cultivo de *E. coli* y *P. acidilactici* en medio infusión carne modificado (ICm)

Se realizaron cinéticas de crecimiento para conocer su adaptación y crecimiento en el medio complejo (ICm) comparándolo con su comportamiento en medios sintéticos comerciales.

El hecho de conocer el crecimiento de *P. acidilactici* y *E. coli* en el medio complejo, permitió utilizar su comportamiento como control cuando se llevaron a cabo los co-cultivos directo y separados por membranas y así poder estudiar la interacción entre las bacterias.

Se observó que el crecimiento de *P. acidilactici* fue mejor en el medio complejo (Figura 18), que en el medio sintético (MRS) (Figura 17), con una velocidad de crecimiento de 0.966 generaciones por hora y en ICm de 2.317 generaciones por hora. La buena adaptación y óptimo crecimiento se debió principalmente a la cantidad de nutrientes que contenía el medio ICm a diferencia del MRS, puesto que el salami es un medio óptimo para el crecimiento de cultivos iniciadores como las bacterias acidolácticas, capaces de crecer en medios con pH ácidos y concentraciones elevadas de sales (Camou *et al.*, 2014).

Por otro lado, el crecimiento de *E. coli* fue muy similar en caldo LB y en el medio ICm con una velocidad de crecimiento de 1.14 y 1.16 generaciones por hora, respectivamente (Figuras 6 y 8).

Debido al crecimiento observado por parte de las dos bacterias, se descartó el efecto de los ingredientes del medio como el ajo, por su acción antimicrobiana (Chalar *et al.*, 2014) y el nitrato de sodio por su acción como conservador (Villada, 2010), sobre la adaptación bacteriana y crecimiento en éste medio.

Debido a que el medio ICm resultó un medio bifásico después de la esterilización en autoclave, por la desnaturalización de proteínas, se realizaron curvas de crecimiento en tres tipos de condiciones para conocer mejor el comportamiento de *E. coli* en el medio complejo:

- Fase sólida  
Se evaluó el crecimiento en la parte sólida de la mezcla, es decir, en las partículas formadas después de la esterilización en autoclave y que se sedimentaban posteriormente. El crecimiento de *E. coli* fue más rápido debido a la disposición y cantidad de nutrientes que se encontraban en éstas partículas. Se obtuvieron velocidades de crecimiento de 2.042 generaciones por hora (Figura 14).
- Fase líquida  
Se realizó la cinética de crecimiento en fase líquida en el mismo matraz del experimento de la fase sólida, pero el lugar de muestreo fue diferente. El crecimiento de *E. coli* fue similar al observado en los cultivos en medio ICm decantado (Figura 8). Se obtuvo una velocidad de crecimiento de 1.255 generaciones por hora (Figura 13). Se puede notar un ligero aumento en la velocidad de crecimiento debido a la permanencia de partículas sólidas al fondo del cultivo. Se multiplicaban en la fase sólida y por consiguiente había mayor cantidad de células que eran liberadas a la fase líquida.
- Fases sólida y líquida mezcladas  
Por último se realizó la cinética de crecimiento en las fases sólida y líquida mezcladas. *E. coli* mostró una cinética de crecimiento favorable durante casi todo el tiempo de muestreo hasta el final de su fase de crecimiento logarítmico (a las 2 horas). Sin embargo, no se presentó una fase estacionaria, debido a que se observó una disminución constante en su cuenta viable. La velocidad de crecimiento fue de 0.668 generaciones por hora (Figura 15).

Además de los cultivos en medio ICm, se realizó una cinética de crecimiento de *E. coli* en el medio especial para bacterias acidolácticas, caldo MRS, para comparar el crecimiento; sin embargo, se observó un crecimiento lento con una velocidad de crecimiento de 0.445 generaciones por hora (Figura 16). Hernández (2013) obtuvo resultados similares de *E. coli* en medio MRS, con una velocidad de crecimiento de 0.43 generaciones por hora, esto indica que no es un medio apropiado para el crecimiento de *E. coli*. En 1997, Diez y Russel mencionaron que el acetato inhibe

el metabolismo bacteriano, sin embargo *E. coli* O157:H7 tiene una buena resistencia al efecto del acetato, pero a un nivel suficientemente elevado puede ser inclusive bactericida. El medio MRS contiene acetato de sodio en su composición, lo que podría explicar en cierta medida la alteración del patrón de crecimiento de *E. coli* O157:H7 cuando se realizaron las cinéticas de crecimiento (Hernández, 2013).

Finalmente, se evaluó la formación de biofilm bacteriano en este medio complejo por medio de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.

Se observó por medio de microscopía óptica, tanto *E. coli* como *P. acidilactici*, formaron conglomerados o cúmulos bien definidos de bacterias (Figuras 9 y 19 respectivamente) en diferentes estratos o niveles y debido a su posición y por la tinción con cristal violeta algunos bastones o cocos, según el caso, se observaron más claros que otros; esto demostró una agrupación tridimensional característica de un biofilm (Lasa *et al.*, 2005). En la figura 24, Se observó que el 100% de las bacterias de *P. acidilactici* se encontraban formando biofilm a las 8 horas de cultivo. Sin embargo, en el caso de *E. coli*, a las 8 horas, solo el 80% de las bacterias se encontraba formando biofilm. Se calcularon las pendientes de la gráfica y se realizó un análisis estadístico de las mismas (Tabla 11). Con una prueba T, a un nivel de significancia del 95%, se demostró que no había diferencia significativa entre ellas ( $p=0.089$ ), es decir, la formación de biofilm durante las 8 horas de cultivo era similar entre las dos bacterias.

También, se realizó un análisis estadístico (prueba T) del porcentaje de biofilm formado en la hora 8 del cultivo (Tabla 12) y con un nivel de confianza del 95%, se demostró que la diferencia de formación de biofilm entre *P. acidilactici* y *E. coli* no fue significativa ( $p=0.846$ ).

Para el caso del análisis por medio de microscopía electrónica de barrido, *P. acidilactici* se caracterizó por presentar una matriz o sustancia que cubría a todas las bacterias agrupadas (Figuras 22 y 23). Por otro lado, para *E. coli* se observó una sustancia que parecía ser producida por las mismas bacterias, la cual rodeaba cada uno de los bastones. Las bacterias no estaban tan agrupadas pero si se encontraban en una especie de red o canales formados por la sustancia o matriz anteriormente mencionada (Figura 12). Los resultados observados fueron similares a la aseveración de Lasa en el año 2005, quien estableció que cuando la bacteria comienza a secretar el exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm, forma estructuras similares a setas entre las cuales se observa la presencia de canales.

#### Co-cultivo directo de *E. coli* y *P. acidilactici* en medio infusión carne modificado (ICm)

Se realizaron co-cultivos ya que esta técnica de cultivo se lleva a cabo con tipos de células mixtas *in vitro* para permitir que sus interacciones sinérgicas o antagonistas se lleven a cabo (OMS, 2017) y poder medir el comportamiento de las bacterias en cuestión.

Se llevó a cabo un co-cultivo en caldo MRS y se utilizó posteriormente como control para los co-cultivos en caldo infusión carne modificado, debido a que ya se conocía el comportamiento de ambas bacterias reportado por Hernández (2013). Se observó una inhibición completa del crecimiento de *E. coli*, mientras que *P. acidilactici* creció sin ninguna variación con una velocidad de crecimiento de 3.228 generaciones por hora (Figura 25). El efecto observado de *P. acidilactici*

sobre *E. coli* fue bactericida, ya que la bacteria *E. coli* murió a las dos horas del inicio del co-cultivo. Resultados similares obtuvo Hernández (2013), sin embargo, en ese estudio la muerte de *E. coli* fue hasta las ocho horas después del inicio de la cinética de crecimiento y *P. acidilactici* tuvo una alteración en su crecimiento presentando una velocidad de crecimiento de 0.56 generaciones por hora.

En el presente trabajo, *P. acidilactici* se encontraba en mayor proporción con respecto a *E. coli*; debido a esto, la inhibición de la cepa patógena se logró en menor tiempo y el crecimiento de *P. acidilactici* no se vio afectado (Aguilar *et al.*, 2011).

Cuando se realizó el co-cultivo en el medio ICm, se evaluó el comportamiento de ambas cepas bacterianas al ser inoculadas en una relación 1:1 (Figura 26). *P. acidilactici* tuvo una disminución en su cuenta viable durante la primera hora, sin embargo, después de ese tiempo presentó una fase de crecimiento logarítmico durante el resto del tiempo de la cinética. En el caso de *E. coli*, se apreció un aumento en su cuenta viable durante la primera hora y después se mantuvo viable pero ya no hubo un crecimiento. De acuerdo con lo anterior, se demostró un efecto bacteriostático aunque fue tardío. La velocidad de crecimiento de *P. acidilactici* fue menor (1.856 generaciones por hora) en comparación con el valor obtenido en cultivo individual en el mismo medio (2.317 generaciones por hora). Y la velocidad de crecimiento de *E. coli* fue notablemente menor (0.297 generaciones por hora) en comparación con el valor en cultivo individual (1.16 generaciones por hora), debido a la falta de crecimiento a partir de las dos horas del inicio de la cinética de crecimiento.

En el co-cultivo directo de *P. acidilactici* y *E. coli* inoculadas con una relación de 1:1 se observó un efecto inhibitorio de *E. coli* sobre *P. acidilactici* similar al observado por Hernández (2013), cuando inoculó las bacterias al mismo tiempo y en proporciones iguales. Por lo anterior, se decidió aumentar la proporción de *P. acidilactici* con respecto a *E. coli* y disminuir el efecto de la cepa patógena sobre *P. acidilactici*. Se calcularon las velocidades de crecimiento de *E. coli* en cada co-cultivo y con estos datos se llevó a cabo un análisis de varianza (Tabla 13), con un nivel de confianza del 95%, donde se demostró que había una diferencia significativa entre las velocidades de crecimiento de *E. coli* en co-cultivo al aumentar la concentración de *P. acidilactici* ( $p=0.003$ ). Posteriormente, con la prueba de Tukey (Tabla 14) se demostró que había diferencia significativa exclusivamente entre las velocidades de crecimiento de *E. coli*, cuando se inoculaba *P. acidilactici* y *E. coli* a una relación de 5:1. Debido a éste resultado, todos los co-cultivos posteriores se realizaron con dicha relación donde el efecto sobre *E. coli* fue más evidente. El crecimiento de *P. acidilactici* se presentó de manera normal, con una velocidad de crecimiento de 2.502 generaciones por hora, sin embargo, el crecimiento de *E. coli* fue afectado, con un tiempo de generación de 13.158 horas; pero la bacteria no murió, se mantuvo viable (Figura 27). De acuerdo con Paredes y colaboradores (2004), un comportamiento bacteriostático se refiere a la inhibición del crecimiento bacteriano, aunque el microorganismo permanece viable, de forma que, cuando se suspende el tratamiento, puede volver a recuperarse y multiplicarse. Por lo tanto se consideró un efecto bacteriostático de *P. acidilactici* sobre *E. coli*.

De manera paralela al experimento, se realizaron cuantificaciones de biofilm de las bacterias en co-cultivo. Se utilizó como control positivo un cultivo individual de *E. coli*, donde se observó que la cantidad de colorante que se fijaba al biofilm y que posteriormente era eluído iba aumentando

conforme pasaba el tiempo, es decir, la producción de biofilm era cada vez mayor. Para el caso del co-cultivo el colorante eluído era mucho menor y la cantidad existente se atribuyó al biofilm formado por *P. acidilactici* y no a *E. coli* (Figura 28). Esto se comprobó por medio de microscopía óptica, observando bacterias aisladas de *E. coli* alrededor de grandes agrupaciones de bacterias o biofilm de *P. acidilactici* (Figura 29). La formación de biofilm se logra en la fase logarítmica tardía de la cinética de crecimiento, debido a que está relacionada con el crecimiento bacteriano porque es un proceso dependiente de quorum sensing (Lasa, 2005). Por ello, como la bacteria no alcanzó una densidad de población suficiente y por ende no hubo una adecuada acumulación de molécula señal o autoinductor, no fue capaz de llevar a cabo el proceso de producción de biofilm.

Posteriormente, se evaluó la formación de biofilm por medio de microscopía electrónica de barrido, donde se evidenció el biofilm de *P. acidilactici* sin alteraciones aparentes (Figuras 32 y 33). Mientras que en el caso de *E. coli*, se encontraron bacterias rodeadas de una matriz desconocida (Figura 34), la cual se relacionó al efecto bacteriostático observado durante la cinética de crecimiento.

También se realizaron tinciones diferenciales para conocer la naturaleza de la matriz extracelular contenida en el biofilm. Se determinó que tenía una naturaleza proteica ya que la tinción con azul de Coomassie fue positiva (Figura 31). Dicha tinción se genera por la atracción electrostática entre las moléculas del colorante y los grupos amino de las proteínas. Las proteínas y el colorante forman complejos mediados por fuerzas de Van Der Waals (Carrillo *et al.*, 2013). Otra tinción positiva fue PAS (Figura 30); indicando una naturaleza glucoproteica. La técnica de PAS permite la tinción de componentes que contienen hidratos de carbono, ya que el ácido periódico oxida a los grupos oxhidrilo formando grupos aldehídos compuestos por carbono, oxígeno e hidrógeno; así la leucofucsina reacciona con estos grupos y se produce una tinción rojiza (Hajar *et al.*, 2012). Estos resultados coinciden con las características del EPS (sustancias poliméricas extracelulares), que comprenden polisacáridos y proteínas que representan del 75 al 89% de estas sustancias constituyentes importantes del biofilm (Barreto, 2013; Fontecha, 2014).

Una de las sustancias antimicrobianas que produce *P. acidilactici*, es el ácido láctico. Esta especie bacteriana, se caracteriza por ser homofermentativa (Santamaría, 2013). Debido a que se observó una disminución del pH en los cultivos individuales de *P. acidilactici*, se quiso averiguar si el efecto bacteriostático estaba relacionado al pH. Para ello, se realizó un co-cultivo bajo las mismas condiciones que los demás pero se ajustó el pH a 7 y se analizó el comportamiento de ambas bacterias. Se demostró que *P. acidilactici* había tenido un crecimiento sin alteraciones y *E. coli* seguía siendo inhibida (Figura 35). Se realizó el análisis estadístico (prueba T), a un nivel de confianza del 95% (Tabla 15), donde se indicó que no había diferencia significativa entre la velocidad de crecimiento de *E. coli* en co-cultivo con *P. acidilactici* con y sin ajuste de pH ( $p=0.141$ ). Esto demuestra que *E. coli* se mantuvo inhibida aun cuando fue neutralizado el pH, así se descartó la relación del pH con el efecto bacteriostático.

#### Co-cultivo separado por membranas de 0.22 $\mu\text{m}$ de *E. coli* y *P. acidilactici* en medio infusión carne modificado (ICm)

En este tipo de co-cultivo también se observó un efecto bacteriostático. El crecimiento de *P. acidilactici* no tuvo alteraciones, la velocidad de crecimiento (2.367 generaciones por hora) fue similar a la que presentó en el co-cultivo directo (2.502 generaciones por hora). El crecimiento de *E. coli* fue inhibido pero no por completo, ya que la bacteria se mantuvo viable todo el tiempo (Figura 36). Se consideró que el efecto bacteriostático fue mejor con contacto directo entre las bacterias, ya que el tiempo de generación disminuyó (5.047 horas) en comparación con el que presentó en el co-cultivo directo (13.158 horas); sin embargo, se demostró que la acción de *P. acidilactici* sobre *E. coli* no dependía del contacto directo entre bacterias y este efecto podía atribuirse a moléculas de peso molecular menor a 0.22  $\mu\text{m}$ .

Para confirmar si el efecto era bacteriostático, se realizó el experimento, en donde se separaban las bacterias. A las 8 horas del co-cultivo, se tomó una muestra de *E. coli* y se inoculó en medio ICm limpio. Cuando se realizó la cuenta viable se observó que el crecimiento de la bacteria se recuperaba presentando una velocidad de crecimiento de 0.595 generaciones por hora. Posteriormente, se realizó un análisis estadístico (prueba T), con un nivel de confianza del 95% (Tabla 16), donde se demostró una diferencia significativa entre las velocidades de crecimiento de *E. coli* en co-cultivo con *P. acidilactici* y de *E. coli* separada e inoculada en medio estéril ( $p=0.048$ ). De esta manera, se confirmó que el efecto era bacteriostático; es decir, la inhibición de *E. coli* sólo se llevaba a cabo en presencia de *P. acidilactici* y/o de sus productos filtrables.

Para la evaluación de biofilm se llevó a cabo el análisis por microscopía óptica y *E. coli* fue incapaz de producir biofilm, se observaban las bacterias aisladas (Figura 38A). Por medio de microscopía electrónica de barrido, se observaron cambios morfológicos en *E. coli* (Figuras 40 y 41). Presentaban estructuras esféricas sobre su superficie cuya morfología y tamaño eran similares a un bacteriófago (Dini, 2011). Por el contrario la formación de biofilm por parte de *P. acidilactici* no tuvo alteraciones, por medio de microscopía óptica se observaban conglomerados rodeados de una matriz extracelular (Figura 38B) cuyas características se evidenciaron de manera más clara por medio del microscopio electrónico de barrido (Figura 42), donde se observaron bacterias embebidas en una matriz como lo descrito por Lasa en el año 2005.

Se analizó la naturaleza del EPS del biofilm de *P. acidilactici* por medio de microscopía óptica teñido con azul de Coomassie (Figura 39) y se presentaron los mismos resultados que en cultivo individual y co-cultivo directo; una matriz de naturaleza proteica, coincidiendo con las características descritas de un biofilm bacteriano (Nazar, 2007).

#### Co-cultivo separado por membranas de diálisis (16 kDa) de *E. coli* y *P. acidilactici* en medio infusión carne modificado (ICm)

En el co-cultivo separado por membranas de diálisis se observó un crecimiento sin alteraciones por parte de *P. acidilactici* con una velocidad de crecimiento de 2.721 generaciones por hora. Sin embargo, *E. coli* no se duplicó, pero al igual que los co-cultivos anteriores sólo se mantuvo viable (Figura 43). Se presentó el mismo efecto bacteriostático, pero la inhibición fue más evidente. Con esto se demostró que el efecto se puede dar por contacto directo entre bacterias y por contacto

con partículas de tamaño pequeño producidas por *P. acidilactici*, capaces de atravesar la membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y la de diálisis de 16 kDa.

Se analizó de la misma manera la formación de biofilm, encontrando sin alteraciones el biofilm de *P. acidilactici* (Figura 44B) y presentando la misma naturaleza proteica por medio de la tinción de Coomassie (Figura 45B). En la microscopía electrónica tampoco se observó alguna alteración en la producción de biofilm (Figuras 50 y 51).

*E. coli* no fue capaz de establecer un biofilm, la formación de éste se vio afectada por la falta de crecimiento bacteriano durante el co-cultivo. Por medio de microscopía óptica se observan células aisladas sin aparente alteración (Figura 44A). Sin embargo, por medio de microscopía electrónica se observaron estructuras esféricas sobre los bacilos de *E. coli* y alteraciones en su membrana (Figuras 46, 47, 48 y 49). Dichas estructuras tenían morfología y tamaño similares a un bacteriófago descrito por Dini (2011).

#### Análisis estadístico de velocidades de crecimiento bacteriano en cultivo individual y co-cultivos

Se realizó un análisis estadístico para conocer si había diferencia significativa entre las velocidades de crecimiento de *P. acidilactici* durante las cinéticas de crecimiento. Se llevó a cabo un análisis de varianza (Tablas 17 y 18), con un nivel de confianza del 95%, donde se demostró que todas las velocidades de crecimiento de *P. acidilactici* en medio ICM en cultivo individual, co-cultivo directo, co-cultivo separado por membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  y de diálisis no tuvieron diferencia significativa ( $p=0.322$ ).

También se realizó el análisis estadístico para conocer si había diferencia significativa entre las velocidades de crecimiento de *E. coli*. Se llevó a cabo un análisis de varianza (Tabla 19), con un nivel de confianza del 95%, donde se demostró que las velocidades de crecimiento de *E. coli* tuvieron diferencias significativas ( $p=0.003$ ) y con un análisis Tukey (Tabla 20) se determinó que existían diferencias significativas entre las velocidades de crecimiento presentadas en el cultivo individual y los co-cultivos con *P. acidilactici* y/o sus productos filtrables.

#### Presencia de bacteriófagos en cultivos bacterianos

Debido a las estructuras esféricas observadas alrededor de los bastones de *E. coli* por medio de microscopía electrónica de barrido, se evaluaron los sobrenadantes para confirmar o descartar la presencia de bacteriófagos en los co-cultivos. Los bacteriófagos son virus que afectan específicamente a bacterias y fueron descritos por primera vez por Frederick Twort en 1915 (Dini, 2011). De acuerdo con Weigle (1953), *E. coli* O157:H7 está infectada con el fago  $\lambda$ ; dicho fago se encuentra como profago en DNA bacteriano teniendo un ciclo lisogénico (Reece *et al.*, 2011). Este profago puede salir del DNA bacteriano e incorporarse al ciclo lítico por agentes que dañen al mismo; por ejemplo, la radiación UV y productos químicos (Holmes *et al.*, 1996). Por esta razón, se utilizó la radiación UV para activar la salida de fagos y una vez obtenido el cultivo se usó como control positivo sobre el césped de una cepa bacteriana de *E. coli* no infectada por fagos (*E. coli* K12). Se observan placas líticas del control positivo (Figura 52) como las descritas en la bibliografía

(Dini, 2011). Se probaron los sobrenadantes de todos los cultivos y co-cultivos y no se observaron placas líticas (Figura 53). Así se descartó la presencia de bacteriófagos en los co-cultivos.

#### Proporción de elementos de la matriz extracelular

Al realizar los co-cultivos y analizar las muestras bacterianas por medio de microscopía óptica y de microscopía electrónica de barrido, los resultados obtenidos se consideraron como positivos a biofilm, ya que poseían las características reportadas en la bibliografía, como agrupaciones de microorganismos rodeados de una matriz mucilagenosa (Chmielewski *et al.*, 2003). Este material extracelular consiste en un conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros – conocidos como Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS) – que forman el soporte para la estructura tridimensional del biofilm. Algunos de los componentes que se reportan son exopolisacáridos y proteínas extracelulares, como los que se pudieron evidenciar por medio de las tinciones diferenciales realizadas en cada cultivo y co-cultivo; sin embargo, también puede haber ADN extracelular, tensoactivos, lípidos y agua (Flemming *et al.*, 2010). Es por ello, que se realizó un análisis de dicha matriz; para confirmar su naturaleza bioquímica. La técnica utilizada, la espectroscopía de energía dispersiva, permite hacer un mapeo de la composición, ya que la emisión del haz de electrones sobre la muestra, provoca la generación de rayos X y de acuerdo a esta energía específica de cada átomo, se pueden identificar los elementos presentes, así como establecer su concentración en la muestra (Garratt-Reed *et al.*, 2003).

Se evaluó la proporción de carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre en  $100 \mu\text{m}^2$ . Estos elementos componen las macromoléculas más importantes: carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. El estudio se realizó sobre cubreobjetos de vidrio extraídos de cultivos de *E. coli*, de *P. acidilactici* y de todos los diferentes tipos de co-cultivos. De acuerdo a los resultados obtenidos, la mayor proporción fue de oxígeno y carbono (Tabla 4); principales elementos de los carbohidratos. Esta proporción de elementos se relacionó al biofilm producido por *E. coli* y *P. acidilactici* según el tipo de cultivo y/o de co-cultivo, cuya composición consiste de agua y carbohidratos principalmente (Lasa, 2004).

Se demostró que la proporción de elementos era muy similar en todos los cultivos y co-cultivos (Tabla 4). Por lo tanto, se sugirió que la alta proporción de oxígeno, carbono y nitrógeno era debido a la composición de biofilm (carbohidratos) y a la estructura de las bacterias contenidas en las muestras (proteínas).

#### Análisis de proteínas

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano, como por ejemplo, en la biogénesis de organelos, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia (Koster *et al.*, 2000). Existen diversas estrategias de secreción que tienen sus propias ventajas y limitaciones respecto al número, tamaño, estado de plegamiento y destino de los sustratos a secretarse (González *et al.*, 2003).

Debido a que estos procesos de secreción son mecanismos mediante los cuales las bacterias interactúan con su entorno y les ayudan a poder adaptarse a él, se evaluaron los sobrenadantes de

cultivos y co-cultivos para poder evidenciar, a través de las sustancias producidas, el comportamiento de una bacteria en un medio complejo; así como, su comportamiento o adaptación en presencia de otro microorganismo. Para ello, se realizaron cuantificación de proteínas y electroforesis.

Se cuantificó la proteína del medio complejo (ICm) sin inocular y recién preparado y esterilizado, obteniendo 392.32 µg/ml de proteína. Después de realizar los cultivos y los co-cultivos, se obtuvieron los sobrenadantes y se cuantificó la proteína. Se volvió a analizar el medio sin inocular para compararlo con los sobrenadantes de los cultivos y se observó una mayor cantidad de proteína del mismo (Tabla 5); esto se debe a que con el paso del tiempo, las proteínas del medio se degradaron y se precipitaron, acumulándose en la fase líquida del mismo.

La cuantificación de proteínas totales por métodos como la técnica de Bradford (1976), permite entre otras cosas, conocer la biomasa en un cultivo bacteriano. La principal desventaja de la determinación de proteínas es que su cantidad producida por las células está sujeta a fuertes variaciones debido, fundamentalmente, a cambios en las condiciones fisicoquímicas y al estado fisiológico celular (Arnáiz *et al.*, 2000). Sin embargo, pudimos observar que todos los sobrenadantes tenían una cantidad de proteína muy similar y esto se debe a que fueron cultivos con concentraciones bacterianas controladas y la recuperación de sobrenadantes se realizó en las mismas condiciones de tiempo; además de las proteínas presentes en el medio sin inocular. Por ello, no se observó diferencia significativa entre el medio sin inocular y los sobrenadantes de los diferentes cultivos y co-cultivos.

De acuerdo a los resultados de la electroforesis, las proteínas fueron similares en todos los co-cultivos y las más abundantes tuvieron un peso molecular menor a 37 kDa (Figuras 55 y 56); resultado equivalente al obtenido por Hernández (2013) de cultivos de *E. coli* O157:H7 donde evidenció bandas de un peso molecular alrededor de 32 kDa. Así, se demuestra que las proteínas producidas en todos los cultivos y co-cultivos, son muy similares y se sugiere que existen proteínas de bajo peso molecular que pudiesen estar involucradas en el efecto bacteriostático observado.

## 11. SUGERENCIAS Y APLICACIONES

Las bacterias aprenden a interpretar las señales de su entorno para prevenir acontecimientos venideros. Existe un sistema llamado “sistema SOS”, que es un mecanismo de adaptación y compensación para superar condiciones y estímulos que sean desfavorables para su supervivencia (Hernández, 2013). Este sistema es responsable de la activación de genes que le permiten a la célula bacteriana contrarrestar efectos nocivos presentes en el medio aunque también causa el bloqueo de otros que normalmente, bajo condiciones favorables, se expresarían continuamente. La finalidad de estos mecanismos es el tratar de sobrellevar y superar las condiciones que de otra forma llevarían a la muerte de la bacteria, permitiéndole sobrevivir bajo diferentes estímulos adversos. Las funciones reguladas mediante estos sistemas incluyen la reparación del daño al ADN, mutagénesis, inhibición de la división celular, el regreso a las funciones normales una vez que el daño ha sido superado e inclusive desencadenar la muerte celular en caso de un daño mayor (D’Ari, 1985).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, como el efecto bacteriostático sobre *E. coli*, los cambios en su morfología y la ausencia de formación de biofilm, se sugiere que *E. coli* desarrolla algún mecanismo de supervivencia. La purificación y caracterización de la sustancia responsable del efecto, podría permitir un estudio detallado de la interacción bacteriana y de la aplicabilidad del uso del sobrenadante como agente de conservación en alimentos e inclusive como auxiliar en el control de contaminaciones o infecciones por patógenos.

Los resultados demuestran que no se puede utilizar a *P. acidilactici* como cultivo iniciador. Esto se explica porque el efecto se llevó a cabo a una concentración específica de bacterias y en condiciones específicas de tiempo de inoculación y en la industria no pasa de esta forma; ya que *E. coli* O157:H7 se encuentra, la mayoría de las veces, en materia prima y/o en equipo y personal durante el procesamiento de productos cárnicos. En 1996, Clavero y colaboradores realizaron pruebas de supervivencia de *E. coli* O157:H7 en salamis madurados utilizando diferentes cantidades de inóculo. Se concluyó que un nivel inicial de 100 UFC/g es incapaz de sobrevivir en el producto terminado si se almacena a 5°C durante 32 días, por otra parte si existieran niveles de contaminación de entre 4 y 5 Log de UFC/g el panorama no es tan prometedor. Aunque esto no está permitido por las buenas prácticas de manufactura y el sistema HACCP porque no se debe utilizar materia prima con esos niveles de contaminación y debe existir un monitoreo adecuado de la materia prima. Además, un efecto bacteriostático sobre la bacteria patógena no es suficiente para asegurar la inocuidad en alimentos que pueden estar preparados con materia prima contaminada, sabiendo que la dosis mínima infectante de *E. coli* O157:H7 es tan solo de 10 a 50 bacterias en población susceptible. Por todo lo anterior, la necesidad de caracterizar la sustancia responsable del efecto, podría permitir que se optimizara el efecto siendo bactericida y que su resultado no dependiera del tiempo de inoculación ni de la concentración de *E. coli* en la materia prima para que fuera una alternativa de bioconservación.

## 12. CONCLUSIONES

- Se demostró un efecto bacteriostático sobre *E. coli*, cuando las bacterias estaban en contacto directo, así como cuando solo estaba en presencia de sustancias filtrables de *P. acidilactici*.
- Se sugiere que este efecto se encuentra mediado por partículas de bajo peso molecular y ellas tienen una acción directa sobre la regulación genética de la bacteria.
- Se descartó la relación del pH con el efecto bacteriostático observado.
- Cuando *P. acidilactici* estaba en co-cultivo, no se vio afectado su crecimiento ni la producción de biofilm. Sin embargo, para el caso de *E. coli*, se vio alterado su crecimiento, no es capaz de formar biofilm y se demostraron cambios morfológicos en las bacterias.
- Se descartó la presencia y acción de bacteriófagos sobre la cepa *E. coli*.
- Debido al efecto bacteriostático, no se recomienda el uso de *P. acidilactici* como cultivo iniciador en productos cárnicos frente a patógenos emergentes como *E. coli* O157:H7.

### 13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acheson D., Keusch G. 1996. Which Shiga toxin-producing types of *E. coli* are important? ASMNews, USA.
2. Aguilar C., Klotz B. 2011. Inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* por bacterias ácido lácticas: presencia de quorum sensing? Facultad de Ingeniería, Universidad de la Sabana. Cundinamarca, Colombia.
3. Altekruuse, S. F., Swerdlow, D. L. & Wells, S. J. 1998. Factors in the emergence of foodborne diseases. Veterinary Clinics of North America. USA.
4. Aranguré P.P.R. 2007. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina de Shiga aisladas de bovinos en la zona norte del valle de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Estado de México, México.
5. Arnáiz C., Isac L., Lebrato J. 2000. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. Grupo de Tratamiento de Aguas Residuales. Escuela Universitaria Politécnica. Universidad de Sevilla. Sevilla, España.
6. Astorga O.R. 2014. Conceptos básicos de Inocuidad Alimentaria. Ministerio de Agricultura. Valparaíso, Chile.
7. Axelsson L. 1993. Lactic acid bacteria classification and physiology. Salminen, S. y von Wright, A. Ed. Nueva York: Marcel Dekker. Nueva York, USA.
8. Barreto A.C. 2015. Quorum sensing: sistemas de comunicación bacteriana. Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Montealegre, Editorial Bonaventuriana, Universidad de San Buenaventura. Bogotá, Colombia.
9. Bertrand C., Haertllé T. 2003. Evolution of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\gamma$ -lactoglobulin content during yogurt fermentation. International Dairy Journal.
10. Blanco J., Blanco M., Blanco J., Alonso M., Escribano A. 1993. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico de las infecciones producidas por *Escherichia coli* enterohemorrágicos productores de verotoxinas. Enferm Infecc Microbiol Clin.
11. Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Alonso M.P., González E.A., Bernárdez M.I. 2002. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia* In: Manual de microbiología Veterinaria, Vadillo S, Píriz S, Mateos E., Eds., McGraw-Hill Interamericana España. 301-325.
12. Blanco J., Blanco M., González E. 1991. Mecanismos de patogénesis de las *Escherichia coli* entetopatogénicas, enterotoxigénicas, enteroinvasivas y enterohemorrágicas. Rev Esp Microbiol Clin.
13. Bradford M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem. 72. 248-254.
14. Camou A.J.P., González R.H., Valenzuela M.M. 2014. Cap. 12. Alimentos Funcionales Cárnicos, en Los Alimentos Funcionales: Un nuevo reto para la industria de alimentos. Editorial AGT Editor S.A de C.V.- CIAD, A.C. ISBN 978-607-7551-37-9. México D.F. México.
15. Caplice E., Fitzgerald G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation International Journal of Food Microbiology. 50: 131–149.

16. Carey C.M., Kostrzynska M., Ojha S y Thompson S. 2008. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Journal of Microbiological Methods.
17. Carr, J. G. 1973. Lactics of the word unite. Proc. 4th Long Ashton Symposium Lactie Acid Bacteria in Beverages and Eood. Bristol Inglaterra PP.
18. Carrillo S.J.G., Candia P.M.C., Lugo S.R.E., Espinoza O.E., Noriega R.J.A. 2013. Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). Universidad de Sonora. Sonora, México.
19. Chalar V.L.R., Moya M.J.C., Vargas A.E., Sejas R.M., Romero B. 2014. Función antimicrobiana de la alicina de ajo en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Facultad de Medicina Auréleo Melean Cochabamba, Universidad Mayor de San Simón. Bolivia.
20. Chmielewski R.A.N., Frank J.F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2.
21. Cobas H., Pavoni S., Zayas A., Rodríguez F., Álvarez E., Contreras R. 2007. Aplicación de la voltametría en el análisis del crecimiento microbiológico. VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería. La Habana, Cuba.
22. Codex Alimentarius. Principios generales de higiene de los alimentos. CAC/RCP 1-1969. Disponible en: [http://www.codexalimentarius.net/download/standards/23/cxp\\_001s.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/23/cxp_001s.pdf)
23. Costa João Carlos Miguel, Espeschit Isis de Freitas, Pieri Fábio Alessandro, Laércio Anjos Benjamin, Scatamburlo Moreira Maria Aparecida. 2014. Increase in biofilm formation by *Escherichia coli* under conditions that mimic the mastitic mammary gland. Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.
24. Czarán T, Hoekstra RF. 2009. Microbial communication, cooperation and cheating: quorum sensing drives the evolution of cooperation in bacteria. PLoS One.
25. D'Ari R. 1985. The SOS system. Biochimie. 67: 343-347.
26. Davidson P.M., Bozkurt Cekmer H., Monu E.A., Techathuvanan C. 2015. The use of natural antimicrobials in food: an overview. University of Tennessee, Knoxville, TN, USA.
27. Díaz Caballero A.J., Vivas Reyes R., Puerta L., Ahumado Monterrosa M., Arévalo Tovar L., Cabrales Salgado R., Herrera Herrera A. 2011. Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing: Una revisión. Univerisdad de Cartagena. Madrid, España.
28. Diez G.F., Russel J.B. 1997. The ability of *Escherichia coli* O157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid. Microbiology. 143; 1: 175-1 180.
29. Dini C. 2011. Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Universidad Nacional de la Plata. Ciudad de la Plata, Buenos aires, Argentina.
30. Duan K, Sibley CD, Davidson CJ, Surette MG. 2009. Chemical interactions between organisms in microbial communities. Contrib Microbiol.
31. Ekinci F., Gurel M. 2007. Effect of using propionic acid bacteria as an adjunct culture in yogurt production. Journal Dairy Science. Vol 91.

32. Fernández D.A. 2004. Producción inducible de Lactococina a, Pediocina Pa-1, Colicina V e Interleuquina-2 en cepas de *Lactococcus lactis* productoras de Nisina. Memoria presentada para optar al grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
33. Flemming H.C., Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. Duisburg, Alemania.
34. Fontecha U.F. 2014. Estudio de la eficacia bactericida y bacteriostática de productos químicos embebidos en materiales. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
35. Garratt-Reed A.J., Bell D.C. 2003. *Energy-Dispersive X-Ray Analysis in the Electron Microscope*. BIOS Scientific Publishers Limited.
36. Garvie E.I. 1986. Genus *Pediococcus*. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (Sneath, P.H.A. Ed.). Vol 2 Williams and Wilkins, Baltimore. pp 1075- 1079.
37. Ghasemi M. et al. 2009. Effect of different media on production of lactic acid from whey by *Lactobacillus bulgaricus*. *African Journal of Biotechnology*. Vol 8.
38. González F.T., Rojas H.R.A. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Unidad Sureste del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. Guadalajara, Jalisco, México.
39. González, G.S., Ruíz, V.M.R., Hernández, B.E.M. 2003. *Guía de Microscopía Electrónica*. Primera Edición. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.
40. González P.B., Georges D. 2003. *Sistemas de Secreción de Proteínas en las Bacterias Gram Negativas: Biogénesis Flagelar y Translocación de Factores de Virulencia*. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, CDMX, MÉXICO.
41. Hajar S.T., Kresch T.N.S., Moreno C.G., Arenas R., Vega M.M.E. 2012. Utilidad de la tinción PAS para el diagnóstico histopatológico. Departamento de Dermatología, Hospital General "Dr. Manuel Gea González". Secretaría de Salud. CDMX, México.
42. Hébert E.M., Raya R.R., Tailliez P., Giori G.S. 2000. Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 59: 19-27.
43. Heredia N., Dávila A.J.E., Solís S.L., García S. 2014. Productos cárnicos: principales patógenos y estrategias no térmicas de control. Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.
44. Hernández P.A., Alfaro A.I., Arrieta C.R. 2003. *Microbiología Industrial*. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica.
45. Hernández C.O.A. 2013. Efecto antagónico de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre una cepa de *Escherichia coli* O157:H7. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. México.
46. Hernández C.P.E. 2010. Bacterias patógenas emergentes transmisibles por los alimentos. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
47. Hill C., Okeeffe T., Ross P. 2002. Antimicrobial factors produced by lactic acid bacteria. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Vol 14.

48. Holmes R.K., Jobling M.G. 1996. Genome organization. En S. Barron (Ed.), Medical Microbiology (4th edition) University of Texas Medical Branch. Galveston, Texas, USA.
49. Janakiraman V, Englert D, Jayaraman A, Baskaran H. 2009. Modeling growth and quorum sensing in biofilms grown in microfluidic chambers. Ann Biomed Eng.
50. Kang D.H., Fung D.Y.C. 1999. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 by stimulated *Pediococcus acidilactici*. Food Microbiology Laboratory, Department of Animal Sciences and Industry. Kansas State University. USA.
51. Karmali M.A. 1989. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, American Society for Microbiology. USA.
52. Kjelleberg S, Molin S. 2002. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? Curr Opin Microbiol.
53. Knight P. 1993. Hemorrhagic *E. coli* the danger increases. ASM News 59(5): 247-250.
54. Koster M., Bitter W., y Tommassen J. 2000. Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. Int J Med Microbiol 290:325-331.
55. Lasa U.I., del Pozo J.L., Penadés J.R., Leiva J. 2005. Biofilms bacterianos e infección. Sistema Sanitario de Navarra. Pamplona, España.
56. Lembke C, Podbielski A, Hidalgo-Grass C, Jonas L, Hanski E, Kreikemeyer B. 2006. Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. Appl Environ Microbiol.
57. Leroy F., De Vuyst L. 2003. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci. Technol., 15: 67-78.
58. London J., Chace N.M. 1976. Aldolase of the lactic acid bacteria. Demonstration of immunological relationship among eight genera of gram positive bacteria using antipediococcal aldolase serum. Arch. Microbiol. 110: 121-128.
59. Lopez-Saucedo C., Cerna J.F., Estrada G.T., Villegas S.N., Thompson R., Velázquez F.R., Torres J., Tarr P.I. 2003. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. Emerging Infectious Diseases. USA.
60. Macedo M.G., Lacroix C., Gardner N.J., Champagne C.P. 2002. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-959M in whey permeate. International Dairy Journal. Vol 12.
61. MacFaddin J.F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª edición. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España.
62. Madigan M., Martinko J.M., Parker J. 2001. Biología de los microorganismos. 8ª ed, Prentice Hall.
63. Marano, N. & Pappaioanou, M. 2004. Historical, new, and reemerging links between human and animal health. Emerging Infectious Diseases. USA.
64. Marzocca M.A., Marucci P.L., Sica M.G., Álvarez E.E. 2006. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. Laboratorio Control de Calidad, Cooperativa Obrera Limitada. Santa Fe 391 (8000) Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.
65. Máttar S., Visbal J., Arrieta G. 2001. *E. coli* O157:H7 enterohemorrágico: un agente etiológico de diarrea en columbiasubestimado. Revista MVZ Córdoba, vol. 6. Universidad de Córdoba. Montería, Colombia.

66. Montoya V.H.H. 2008. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2ª edición. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
67. Moslehi-Jenabian S, Gori K, Jespersen L. 2009. AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus* spp. Int J Food Microbiology.
68. Nazar C.J. 2007. Biofilm bacteriano. Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello, v.67 n.1. Santiago, Chile.
69. Ng WL, Bassler BL. 2009. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. Annu Rev Genet.
70. Nowak M, Kurnatowski P. 2009. Biofilm caused by fungistrukture, quorum sensing, morphogenetic changes, resistance to drugs. Wiad Parazytol. Łódź, Polonia.
71. O'Toole G.A. 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. US National Library of Medicine National Institutes of Health 10.3791/2437. USA.
72. Ogawa M., Shimizu K., Nomoto K., Tanaka R., Hamabata T., Yamasaki S., Takeda T., Takeda Y. 2001. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. International Journal of Food Microbiology 74(1-2) 167. Japan.
73. Olagnero G., Abad A., Bendersky S., Genevois C., Granzella L., Montonati M. 2007. Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. Diaeta 25 (121), 20-33.
74. Organización Mundial de la Salud. 2007. Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos. Departamento de inocuidad de los alimentos, zoonosis y enfermedades de transmisión alimentaria. Francia.
75. Orellana O.O. 2002. Perspectivas de la secuenciación de genomas bacterianos: nuevas estrategias en el desarrollo de terapias antimicrobianas. Programa de Biología Celular y Molecular. Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Chile.
76. Orla-Jensen S. 1919. The Lactic Acid Bacteria. Andr. Fred. Host & Son, Copenhagen, Dinamarca.
77. Orlandi, P. A., Chu, D. T., Bier, J. W. & Jackson, G. J. 2002. Parasites and the food supply. Scientific Status Summary. Institute of Food Technologists. Chicago, IL, USA.
78. Osorio L., Roldan J. 2003. Volvamos al campo. Lácteos y derivados. Ed. Ltda Bogotá Grupo Latino. Colombia.
79. Paredes F., Roca J.J. 2004. Acción de los antibióticos, perspectiva de la medicación antimicrobiana. Ámbito Farmacéutico, Farmacología. OFFARM, vol 23, núm 3. España.
80. Parra H.R.A. 2010. Review. Bacterias Ácido Lácticas: Papel Funcional en los Alimentos. Grupo de Investigación en Química y Tecnología de los Alimentos. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Colombia.
81. Peña J., Uffo O. 2013. Producción de biofilm en genotipos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en Cuba. Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.
82. Pierce B.A. 2009. Genética. Un enfoque conceptual. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. USA.
83. Prado V., Cordero J., Garreaud C., Olguin H., Arellano C., Nachar C. 1995. *Escherichia coli* enterohemorrágica en el síndrome hemolítico urémico en niños chilenos. Evaluación de diferentes técnicas de diagnóstico de infección. Revista Médica. Chile.

84. Prats G., Frias C., Margall N. 1996. Colitis hemorrágica por *Escherichia coli* verotoxigénica – presentación de 9 casos. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. España.
85. Ramírez C.R., González T.A.I., Gómez D., Trinidad A., Ibáñez A., García B.J.R., Verdaguer J.M., González G.J.A., San Román J. 2008. Microscopia electrónica de barrido ambiental para la detección de biopelículas en las amígdalas. Madrid, España.
86. Reece J.B., Urry L.A., Cain M.L., Wasserman S.A., Minorsky P.V., Jackson R.B. 2011. The lysogenic cycle. Campbell Biology (10ª ed.) San Francisco, USA.
87. Ren D., Sims J.J., Wood T.K. 2001. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by 5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. Environ Microbiol. USA.
88. Rivera Q.J. 2005. Evaluación del efecto de bioconservación en salamis al adicionar *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como cultivo iniciador. Tesis de Maestría. UNAM. México.
89. Roldán M.L., Chinen I., Otero J.L., Miliwebsky E.S., Alfaro N., Burns P., Rivas M. 2007. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. Revista argentina de microbiología 39 (2), 113-119. Argentina.
90. Rosas G.A., Acosta V.M. 2001. Manual de manejo higiénico de los alimentos. Secretaría de Salud. CDMX, México.
91. Ross M.H., Pawlina W. Histología, texto y atlas color con Biología Celular y Molecular. 5ª edición. Editorial Médica Panamericana. México.
92. Santamaría N.J.I. 2013. Efecto de la administración de *P. acidilactici* MA 18/5M (Bactocell) sobre los resultados productivos en una granja comercial de gallinas ponedoras. Selecciones avícolas, Real Escuela de Avicultura. España.
93. Savadogo A. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria a minireview. African Journal of Biotechnology. Vol 18.
94. Sherris J.C. 2010. Microbiología Médica. 5ª edición. Mc Graw Hill. CDMX, México.
95. Soto C.R.I. 2004. Viabilidad de un microorganismo probiótico en un producto cárnico fermentado. Ingeniería Química y Alimentos, Escuela de Ingeniería, Universidad de Puebla. Puebla, México.
96. Stanley G. Cheeses. 1998. Microbiology of fermented foods, Vol. 1, pp. 263-307. Wood B.J.B. (ed.). Blackie, Londres.
97. Su Ch., Brandt L. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 infections in humans. American College of Physicians. Medical Center and Albert Einstein College of Medicine. New York, USA.
98. Surekha M., Reddy S.M. 2000. Classification and properties. In: Robinson R.K. (Ed.), Preservatives. NY: Academic Press, pp. 1710-1717.
99. Thomas A, Cheosty T., Frost J., Chart H., Smith H., Rowe B. 1996. Verocytotoxin producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O157 associated with human infections in England and Wales: 1992-1994. Epidemiol - Infect.
100. Vallejo M., Etchechoury V., Horiszny C. y Marguet E. 2009. Inhibición de *Escherichia coli* O157:H7 por cepas de *Lactobacillus* aisladas de queso Ovino. Analecta Veterinaria. Argentina.
101. Vázquez C., Martín A., Silóniz M.A., Serrano S. 2010. Técnicas básicas de Microbiología, observación de bacterias. Departamento de Microbiología III. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid, España.

102. Vega Z.E. 2008. Producción de Alimentos por Actividad Bacteriana – Fermentación. Biología. Colegio Universitario de Humacao. Universidad de Puerto Rico. Puerto Rico.
103. Villada M.J.J. 2010. Conservadores químicos utilizados en la industria alimentaria. División de Ciencia Animal, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila, México.
104. Wagner L.M.D.S. 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
105. Walker T.S., Bais H.P., Deziel E., Schweizer H.P., Rahme L.G., Fall R. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. Plant Physiol.
106. Weigle J.J. 1953. Induction of mutations in a bacterial virus. Genetics, California Institute of Technology. Pasadena, USA.
107. Williams P., Camara M. 2009. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. Curr Opin Microbiol.
108. Woese C. 1987. Bacterial evolution. Microb Rev; 51: 221-71.
109. Wood, B.J.B. 1997. Microbiology of Fermented Foods. Blackie, Londres, Inglaterra.
110. Zabriskie D.W., Armiger W.B., Philips D.H., Albano P.A. 1999. Trader's guide to fermentation media formulation. Traders protein. Fifth edition. Tennessee, USA.
111. Zhang K., Ou M., Wang W., Ling J. 2009. Effects of quorum sensing on cell viability in *Streptococcus mutans* biofilm formation. Biochem Biophys Res Commun.

14. APÉNDICE

Tabla 6. Iniciadores utilizados para los genes de virulencia de *E. coli* 157:H7 (López et al., 2003).

<i>stx1</i>	F	5' CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G 3'
	R	5' AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC 3'
<i>stx2</i>	F	5' GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC 3'
	R	5' TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G 3'
<i>eae</i>	F	5' GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC 3'
	R	5'CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG 3'

Tabla 7. Protocolo para PCR de los genes de virulencia de *E. coli* O157:H7 (modificado de López et al., 2003):

Componente / (concentración inicial)	Cantidad / (Concentración final)
Solución amortiguadora (10x) (Mg Cl <sub>2</sub> 15 mM)	2.5 µl (1x) (Mg Cl <sub>2</sub> 15 mM)
dNTP's (10mM)	1 µl (0.4 mM)
Iniciadores (1:10 del original)	<i>Stx1</i> 0.45 µM c/u <i>Stx2</i> 0.37 µM c/u <i>eae</i> 0.30 µM c/u
Taq Polimerasa (0.5 U/µl)	2 µl (1 U)
H <sub>2</sub> O	Cbp
ADN (muestra)	2 µl
<b>Total</b>	<b>25 µl</b>

Composición de la mezcla de reacción para PCR

Fase	Desnaturalización inicial	Alineación	Extensión	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Enfriamiento
T °C	94°	55°	72°	94°	55°	72°	4°
Tiempo	5 min	2 min	45 seg	45 seg	45 seg	10 min	4 min
Ciclos	1	1	35			1	1

Protocolo de amplificación para PCR de los genes de virulencia de *E. coli* O157:H7.

**Tabla 8. Preparación del reactivo de Bradford:**

Reactivo	Concentración
Colorante azul de Coomassie G-250	0.01%
Etanol 95%	4.7%
Ácido fosfórico	8.5%

Preparación de geles para electroforesis:

**Tabla 9. Gel separador (12%)**

Reactivo	Cantidad
Agua desionizada	3.35 ml
1.5 M Tris – HCl, pH 8.8	2.5 ml
10% (w/v) SDS stock	100 µl
Acrylamida / Bis (30% stock)	4 ml
Persulfato de Amonio (10%)	50 µl
TEMED	5 µl
Total del monómero	10 ml

**Tabla 10. Gel concentrador**

Reactivo	Cantidad
Agua desionizada	3.05 ml
1.5 M Tris – HCl, pH 6.8	1.5 ml
10% (w/v) SDS	50 µl
Acrylamida / Bis (30% stock)	0.65 ml
Persulfato de Amonio (10%)	30 µl
TEMED (0.1%)	7 µl
Total del monómero	5 ml

Análisis estadístico

**Tabla 11. Prueba T: formación de biofilm en medio ICm**

**Estadísticas para una muestra**

	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
Pendiente	2	12.41700	2.474874	1.750000

**Prueba para una muestra**

Valor de prueba = 0

	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
Pendiente	7.095	1	.089	12.417000	-9.81886	34.65286

**Tabla 12. Prueba T: formación de biofilm en la hora 8 de cultivo en medio ICm**

**Estadísticas de grupo**

Bacteria	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
Porcentaje 1	10	94.60	5.441	1.720
2	10	76.00	6.992	2.211

**Prueba de muestras independientes**

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
Porcentaje	Se asumen varianzas iguales	.039	.846	6.639	18	.000	18.600	2.802	12.714	24.486
	No se asumen varianzas iguales			6.639	16.975	.000	18.600	2.802	12.689	24.511

1: *P. acidilactici*, 2: *E. coli*

**Tabla 13. Análisis de varianza: velocidades de crecimiento de *E. coli* en diferentes proporciones con *P. acidilactici*.**

<b>Pruebas de efectos inter-sujetos</b>					
Variable dependiente: Velocidad					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	.200 <sup>a</sup>	4	.050	8.522	.003
Intersección	1.139	1	1.139	193.781	.000
Relación	.200	4	.050	8.522	.003
Error	.059	10	.006		
Total	1.399	15			
Total corregido	.259	14			

a. R al cuadrado = .773 (R al cuadrado ajustada = .682)

**Tabla 14. Prueba Tukey: velocidades de crecimiento de *E. coli* en diferentes proporciones con *P. acidilactici*.**

<b>Velocidad</b>			
HSD Tukey <sup>a,b</sup>			
Relación	N	Subconjunto	
		1	2
5	3	.05067	
1	3		.30233
3	3		.32033
2	3		.32300
4	3		.38167
Sig.		1.000	.715

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
 Se basa en las medias observadas.  
 El término de error es la media cuadrática (Error) = .006.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.  
 b. Alfa = .05.

*P. acidilactici* y *E. coli* en una relación 1:1 (1), 2:1 (2), 3:1 (3), 4:1 (4) y 5:1 (5).

**Tabla 15. Prueba T. Velocidad de crecimiento de *E. coli* en co-cultivo con neutralización de pH**

**Estadísticas para una muestra**

	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
Velocidad	2	.06200	.019799	.014000

**Prueba para una muestra**

Valor de prueba = 0

	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
Velocidad	4.429	1	.141	.062000	-.11589	.23989

**Tabla 16. Prueba T: velocidad de crecimiento de *E. coli* en presencia y ausencia de *P. acidilactici* y/o de sus productos filtrables**

**Prueba para una muestra**

Valor de prueba = 0

	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
Velocidad	13.375	1	.048	.214000	.01070	.41730

**Tabla 17. Análisis de varianza: velocidades de crecimiento de *P. acidilactici* en cultivo individual y en co-cultivo.**

**Pruebas de efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: Velocidad

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	.052 <sup>a</sup>	3	.017	1.361	.322
Intersección	72.609	1	72.609	5742.443	.000
Cultivo	.052	3	.017	1.361	.322
Error	.101	8	.013		
Total	72.762	12			
Total corregido	.153	11			

a. R al cuadrado = .338 (R al cuadrado ajustada = .090)

**Tabla 18. Prueba Tukey: velocidades de crecimiento de *P. acidilactici* en cultivo individual y en co-cultivo.**

**Subconjuntos homogéneos**

Velocidad			
	Cultivo	N	Subconjunto
HSD Tukey <sup>a,b</sup>	2	3	2.41467
	1	3	2.41733
	3	3	2.43467
	4	3	2.57267
	Sig.		.374

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .013.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

b. Alfa = .05.

*P. acidilactici* en cultivo individual (1), co-cultivo directo (2), co-cultivo separado por membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  (3) y co-cultivo separado por membranas de diálisis (4).

**Tabla 19. Análisis de varianza: velocidades de crecimiento de *E. coli* en cultivo individual y en co-cultivo.**

**Pruebas de efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: Velocidad

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	2.222 <sup>a</sup>	3	.741	10.799	.003
Intersección	2.539	1	2.539	37.015	.000
Tratamiento	2.222	3	.741	10.799	.003
Error	.549	8	.069		
Total	5.310	12			
Total corregido	2.771	11			

a. R al cuadrado = .802 (R al cuadrado ajustada = .728)

**Tabla 20. Prueba Tukey: velocidades de crecimiento de *E. coli* en cultivo individual y en co-cultivo.**

**Subconjuntos homogéneos**

**Velocidad**

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
4	3	.13600	
3	3	.13967	
2	3	.37867	
1	3		1.18567
Sig.		.680	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
 Se basa en las medias observadas.  
 El término de error es la media cuadrática (Error) = .069.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = .05.

*E. coli* en cultivo individual (1), co-cultivo directo (2), co-cultivo separado por membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  (3) y co-cultivo separado por membranas de diálisis (4).