



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio de la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus lactis* aisladas del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

YOATZI KETZALI AGUILERA MARTÍNEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX., AÑO 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: FRANCISCO RUÍZ TERAN
VOCAL: GLORIA DÍAZ RUIZ
SECRETARIO: KARLA MERCEDES DÍAZ GUTIÉRREZ
1er. SUPLENTE: ALEIDA MINA CETINA
2° SUPLENTE: ANA LILIA CRUCES MARTÍNEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 324, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Gloria Díaz Ruiz

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. María del Carmen Wacher Rodarte

SUSTENTANTE:

Yoatzi Ketzali Aguilera Martínez

RECONOCIMIENTO

Esta tesis se realizó en el laboratorio 324 del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, con apoyo del proyecto PAIP 5000-9099.

ÍNDICE

Índice de abreviaturas	I
Índice de tablas	II
Índice de figuras	III
RESUMEN	1
ANTECEDENTES	3
Fermentación	3
Alimentos fermentados	3
Características benéficas de los alimentos fermentados (Druider y Rivera, 2016)	4
Alimentos fermentados tradicionales	5
Bebidas fermentadas a base de cereales.	5
Bebidas fermentadas a base de maíz tradicionales en México	6
Bacterias ácido lácticas (BAL)	10
Producción de nisina	15
Bacteriocinas	16
Clasificación de las bacteriocinas	16
Mecanismos de acción	18
Bacteriocinas en alimentos	21
Enfermedades transmitidas por alimentos	22
Patógenos de importancia alimentaria	23
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS PARTICULARES	28
DIAGRAMA GENERAL	29
METODOLOGÍA	30
1. Microorganismos empleados	30
2. Reactivación de cepas	30
3. Comprobación de pureza de las cepas	30
4. Establecimiento de condiciones óptimas de crecimiento de las cepas BAL a partir de cinéticas de crecimiento a pH y temperatura diferentes.	31
5. Sobrevivencia de patógenos en caldo MRS frente a <i>Lactobacillus plantarum</i> (17) y <i>Lactococcus lactis</i> (X).	32

6.	Obtención de sobrenadantes liofilizados de <i>L. plantarum</i> (17) y <i>L. lactis</i> (X).	33
6. 1.	Efecto antimicrobiano en sobrenadantes de cultivos de BAL. Prueba difusión en agar.	34
7.	Sobrevivencia de bacterias patógenas en los sobrenadantes liofilizados de cultivos de BAL.	36
8.	Obtención de sobrenadantes de cultivos de BAL y concentración en rotavapor.	36
8.1	Sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> en los sobrenadantes de cultivos de BAL concentrados en rotavapor.	37
	RESULTADOS	38
1.	Selección de BAL aisladas del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.	38
2.	Reactivación de cepas	38
3.	Comprobación de pureza de las cepas	38
4.	Cinéticas de crecimiento a pH y temperatura diferentes.	42
5.	Sobrevivencia de patógenos en caldo MRS	48
6.	Efecto antimicrobiano. Prueba difusión en agar.	54
7.	Sobrevivencia de patógenos en los sobrenadantes liofilizados.	65
8.	Sobrevivencia de bacterias patógenas en sobrenadantes de cultivos de cepas BAL tratados térmicamente y concentrados en rotavapor.	68
	CONCLUSIONES	72
	REFERENCIAS	74
	ANEXOS	86
	Anexo A. Preparación de medios de cultivos utilizados durante el proyecto	86
	Anexo B. Diluciones utilizadas en las fermentaciones para ambas BAL.	87
	Anexo C. Preparación de medios tamponados y no tamponados para la prueba de difusión en agar	89
	ANEXO D. Imágenes durante algunas etapas del proyecto.	90

Índice de abreviaturas

BAL: Bacteria ácido láctica

CDC: Centers for disease control and prevention

DO: densidad óptica

EUA: Estados Unidos de América

FDA: Food and drug administration

GRAS: Generally recognized as safe

LPSN: List of prokaryotic names

MRS: Man, Rogossa y Sharpe

OMS: Organización mundial de la salud

UFC: unidades formadoras de colonias

XLD: Xilosa-lisina-desoxicolato

%: porcentaje

mL: mililitro

μL: microlitro

RPM: revoluciones por minuto

Índice de tablas

Tabla 1. Bebidas fermentadas a base de los cereales más utilizados en el mundo.	5
Tabla 2. Bacteriocinas reportadas en la literatura	21
Tabla 3. Bacterias ácido lácticas seleccionadas para el proyecto.	30
Tabla 4. Condiciones de temperatura y pH evaluadas para <i>L. plantarum</i> y <i>L. lactis</i> en cada fermentación en medio MRS.	31
Tabla 5. Microorganismos patógenos seleccionados para prueba de sobrevivencia en caldo MRS	32
Tabla 6. Controles y diluciones utilizadas para el ensayo de sobrevivencia de bacterias patógenas en caldo MRS frente a las BAL.	32
Tabla 7. Tratamientos aplicados a sobrenadantes de los cultivos de BAL antes de liofilizar.	34
Tabla 8. Microorganismos indicadores para prueba de difusión en agar, tiempo de incubación previo a la prueba y dilución empleada.	35
Tabla 9. Descripción macroscópica, en agar MRS, y microscópica a través de Tinción de Gram de <i>L. plantarum</i> (17) y <i>L. lactis</i> (X).	39
Tabla 10. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes liofilizados de cultivos de cepas BAL, sin tratamiento térmico y pH 3-4, frente a bacterias patógenas presentes en alimentos.	55
Tabla 11. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes liofilizados de cultivos de cepas BAL, con tratamiento térmico y pH 3-4, frente a bacterias patógenas presentes en alimentos.	61

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama para la elaboración del atole agrio	9
Figura 2. Rutas de fermentación utilizadas por bacterias ácido lácticas, homofermentativas y heterofermentativas	12
Figura 3. Clasificación de bacteriocinas	17
Figura 4. Mecanismos de acción de las diferentes clases de bacteriocinas	20
Figura 5. Diagrama de flujo del procedimiento general del proyecto.	29
Figura 6. Ensayo de sobrevivencia de bacterias patógenas en caldo MRS frente a BAL.	33
Figura 7. Distribución de las muestras evaluadas. Ensayo de difusión en agar.	35
Figura 8. Crecimiento de cepas BAL, 17 y X, en caldo MRS incubado por 24 h.	38
Figura 9. Colonias de <i>L. plantarum</i> 17 en agar MRS mediante técnica de estría por agotamiento.	40
Figura 10. Colonias de <i>L. lactis</i> X en agar MRS mediante técnica de estría por agotamiento.	40
Figura 11. Observación microscópica 1000X de <i>L. plantarum</i> , 17	41
Figura 12. Observación microscópica 1000X de <i>L. lactis</i> , X.	41
Figura 13. Efecto de la temperatura y pH en el crecimiento de <i>L. plantarum</i> (17) en caldo MRS con pH inicial 6.0.	43
Figura 14. Efecto de la temperatura y pH en el crecimiento de <i>L. plantarum</i> (17) en caldo MRS con pH inicial 7.5.	45
Figura 15. Efecto de la temperatura y pH en el crecimiento de <i>L. lactis</i> (X) en caldo MRS con pH inicial 6.0.	46
Figura 16. Efecto de la temperatura y pH en el crecimiento de <i>L. lactis</i> (X) en caldo MRS con pH inicial 7.5.	47
Figura 17. Sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en caldo MRS frente a <i>L. plantarum</i> (17) a 37°C, pH inicial del medio 7.5.	49
Figura 18. Sobrevivencia de <i>S. Typhimurium</i> en caldo MRS frente a <i>L. plantarum</i> (17) a 37°C, pH inicial del medio 7.5.	50
Figura 19. Sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> en caldo MRS frente a <i>L. lactis</i> (X) a 37°C pH inicial del medio 7.5.	52
Figura 20. Sobrevivencia de <i>S. Typhimurium</i> en caldo MRS frente a <i>L. lactis</i> (X) a 37°C pH inicial del medio 7.5.	53
Figura 21. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de cepas BAL, sin tratamiento térmico, frente a <i>Listeria monocytogenes</i> en medio no tamponado NT (izquierda) y tamponado (derecha). (+) control positivo clorhexidina 2%; (-) control negativo caldo MRS estéril.	56
Figura 22. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de cepas BAL, sin tratamiento térmico, frente a <i>Listeria innocua</i> en medio no tamponado NT y tamponado	57
Figura 23. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de cepas BAL, sin tratamiento térmico, frente a <i>Salmonella</i> Typhimurium en medio no tamponado NT y tamponado	57

Figura 24. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de cultivos de cepas BAL con pH 5.5. a) <i>Listeria monocytogenes</i> b) <i>Salmonella</i> Typhimurium c) <i>Listeria innocua</i> , en medio no tamponado NT y tamponado	60
Figura 25. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de cepas BAL, con tratamiento térmico y pH 3-4 frente a <i>Listeria monocytogenes</i> en medio no tamponado NT y tamponado	62
Figura 26. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de cepas BAL, con tratamiento térmico y pH 3-4 frente a <i>Listeria innocua</i> en medio no tamponado NT (izquierda) y tamponado (derecha). (+) control positivo clorhexidina 2%;(-) control negativo caldo MRS estéril.	62
Figura 27. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de cepas BAL, con tratamiento térmico y pH 3-4, frente a <i>Salmonella</i> Typhimurium en medio no tamponado NT	63
Figura 28. Ensayo de sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> en sobrenadantes de cultivos de cepas BAL tratados térmicamente (SN) y liofilizados de <i>L. plantarum</i> (SN17) y <i>L. lactis</i> (SNX); incubados a 37°C.	66
Figura 29. Sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> en los sobrenadantes de <i>L. plantarum</i> 17 (SN 17), concentrados con rotavapor e incubados a 37°C	69
Figura 30. Sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> en los sobrenadantes de <i>L. lactis</i> X (SN X), concentrados con rotavapor incubados a 37°C.	70

RESUMEN

El atole agrio es una bebida fermentada tradicional no alcohólica que se elabora a partir de maíz de doble con o sin nixtamalización, se produce y se consume en el sureste de México, especialmente en los estados de Tabasco, Chiapas, el sur de Veracruz y Puebla.

En la fermentación intervienen microorganismos que están presentes en las materias primas o en los materiales empleados en su preparación. Se ha observado que en este proceso participa una microbiota compleja, siendo las bacterias ácido lácticas (BAL) el grupo mayoritario, dentro de éstas se han identificado miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*.

Las BAL contribuyen al perfil sensorial del atole agrio, además, ayudan en la conservación del alimento debido a que producen metabolitos con actividad antimicrobiana como; ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, enzimas y bacteriocinas. Estas últimas son péptidos cortos sintetizados ribosómicamente, liberados extracelularmente, con actividad antimicrobiana frente a células sensibles, como algunos patógenos de importancia alimentaria. De forma que son de gran interés en términos de inocuidad alimentaria y se ha demostrado que tienen un gran potencial para su uso como bioconservadores.

Se ha observado un efecto antimicrobiano de *Lactobacillus plantarum* cepa 17 y *Lactococcus lactis* cepa X, aisladas del atole agrio de Villahermosa, Tabasco frente a *Listeria monocytogenes* y a *Salmonella* Typhimurium, asociado a ácidos orgánicos y posibles bacteriocinas (Moya, 2018). La producción de bacteriocinas está influenciada por el crecimiento microbiano el cual a su vez es afectado por la temperatura, pH y composición del medio, principalmente. Por esta razón, se realizaron cinéticas de crecimiento en medio MRS para observar el efecto de la temperatura y pH en el crecimiento y así establecer las condiciones óptimas. Siendo 37°C y un pH inicial del medio de 7.5 las mejores condiciones de crecimiento tanto para *Lactobacillus plantarum* cepa 17, como para *Lactococcus lactis* cepa X.

A través de una prueba de reto en caldo MRS a 37°C se observó que *Lactobacillus plantarum* cepa 17 y *Lactococcus lactis* cepa X a partir de 12 h disminuyen la concentración de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium y después de 24 h no hay crecimiento.

Con la prueba de difusión en agar, los sobrenadantes liofilizados obtenidos de los cultivos de las BAL en caldo MRS sin ajuste de pH con y sin tratamiento térmico conservaron su efecto antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *Salmonella* Typhimurium.

Finalmente, en los ensayos de sobrevivencia de los sobrenadantes de las dos cepas BAL, liofilizados y concentrados con rotavapor, se observó inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* a partir de 3 h.

ANTECEDENTES

Fermentación

El término "fermentación" se deriva del verbo latino *fervere*, hervir, describiendo así la apariencia de la acción de la levadura sobre los extractos de fruta o grano malteado. La apariencia de ebullición se debe a la producción de burbujas de dióxido de carbono causadas por el catabolismo anaeróbico del azúcar presente en el extracto. Su significado bioquímico se refiere a la generación de energía mediante el catabolismo de compuestos orgánicos (Stanbury, *et al.*, 2016).

La fermentación ha sido una importante forma de conservación de los alimentos desde hace siglos. El crecimiento microbiano, tanto de poblaciones naturales como de poblaciones inoculadas, produce interesantes cambios químicos, de textura, o ambos, en los alimentos, de tal forma que el producto final puede almacenarse durante un período de tiempo más prolongado. El proceso de la fermentación también se emplea para producir nuevos olores y sabores agradables en los alimentos (Prescott, 2004). A su vez, la fermentación mejora de manera significativa la calidad y el valor nutricional, mediante el enriquecimiento biológico de sustratos alimenticios con vitaminas, proteínas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos esenciales.

Alimentos fermentados

En muchos países los alimentos fermentados son una fuente importante de alimentación para ciertos grupos de personas por ser una opción económica.

Más de 3500 diferentes alimentos fermentados son consumidos en todo el mundo; muchos por comunidades indígenas y se producen en pequeñas cantidades, dando lugar a los alimentos fermentados tradicionales, sin embargo, el consumo de muchos alimentos fermentados ha aumentado gradualmente (Lacerda y Freitas, 2019).

Los alimentos fermentados se definen como aquellos sustratos de alimentos que son invadidos o cubiertos por microorganismos comestibles cuyas enzimas, particularmente amilasas, proteasas y lipasas hidrolizan los polisacáridos, proteínas y los lípidos en productos no tóxicos, con sabores, aromas y texturas agradables y atractivos para el consumidor (Drider y Rivera, 2016).

Los alimentos fermentados se producen en todo el mundo utilizando diversas técnicas de fabricación, materias primas y microorganismos. No obstante, solo hay cuatro

procesos principales de fermentación: alcohólico, ácido láctico, ácido acético y fermentación alcalina (Blandino, *et al.*, 2003).

1. Fermentación alcohólica, se produce etanol principalmente por levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* que es la levadura más utilizada en la industria, por ejemplo, en la producción de vinos y cervezas. También, algunas bacterias como *Zimomonas* pueden llevar a cabo una fermentación alcohólica; *Zimomonas mobilis* es la especie más importante (Ciani, *et al.*, 2013).
2. Fermentación ácido láctica (leches fermentadas y cereales), se lleva a cabo principalmente por bacterias ácido lácticas (BAL), a menudo en combinación con otras especies y cooperando para generar el producto final.
3. Fermentación a partir de bacterias productoras de ácido acético, de las especies *Acetobacter* spp., *Gluconobacter* spp., *Gluconoacetobacter* spp. Éstas convierten el etanol en ácido acético en presencia de oxígeno.
4. Fermentación alcalina, a menudo tiene lugar durante la fermentación de pescados y semillas, popularmente utilizadas como condimento.

Características benéficas de los alimentos fermentados (Dridier y Rivera, 2016)

- Enriquecimiento de la dieta humana a través del desarrollo de una gran diversidad de sabores, aromas y texturas en los alimentos.
- Preservación de importantes cantidades de alimentos a través del ácido láctico, acético, o las fermentaciones alcalinas.
- Enriquecimiento biológico de sustratos alimenticios con vitaminas, proteínas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos esenciales.
- Desintoxicación durante la fermentación.
- Disminución en los tiempos de cocción y las necesidades de combustible.

En función de la materia prima empleada, se pueden distinguir nueve grupos de alimentos fermentados: cereales, verduras, legumbres, raíces/tubérculos, leche, carne y productos pesqueros (secos o ahumados), productos fermentados diversos y bebidas alcohólicas (Tamang, *et al.*, 2016).

Alimentos fermentados tradicionales

Los alimentos fermentados tradicionales son producidos y consumidos en pequeñas regiones donde tienen una gran importancia tanto a nivel nutricional como cultural. Son aquellos en los cuales la fermentación no se lleva a cabo por la acción de un cultivo iniciador si no de forma natural por acción de los microorganismos presentes en las materias primas, utensilios y materiales empleados en su elaboración, así como en el medio ambiente (Wacher, *et al.*, 1993).

Se elaboran a partir de sustratos amiláceos, maíz, sorgo, trigo, etc. o azucarados como frutas y la savia de algunas plantas (Díaz y Wacher, 2003).

Bebidas fermentadas a base de cereales.

Los cereales son considerados uno de los más importantes grupos alimentarios ya que tienen un alto aporte de proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales y fibra (Esquivel, 2016).

A nivel mundial, los cereales ocupan el primer lugar como sustratos fermentables. Los cereales más utilizados para la elaboración de alimentos y bebidas fermentados son el arroz, trigo, maíz y sorgo (Sangwan, *et al.*, 2014). Las bebidas fermentadas, pueden ser alcohólicas o no alcohólicas, algunos ejemplos se enlistan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Bebidas fermentadas a base de los cereales más utilizados en el mundo
(adaptada de Blandino, *et al.*, 2003; García, *et al.*, 2019).

Producto	Bebida	Cereal para su elaboración	Región
Sake	Alcohólica		Japón, China
Masato	Alcohólica	Arroz	Colombia
Khaomak	Alcohólica		Tailandia
Boza	No alcohólica		Bulgaria, Turquía
Takju	Alcohólica	Trigo	Corea
Busaa	Alcohólica	Maíz	Nigeria, Ghana
Chicha	Alcohólica		Sudamérica
Mahewu	No alcohólica		África oriental
Merissa	Alcohólica		Nigeria
Otika	Alcohólica	Sorgo	Sudán
Talla	Alcohólica		Etiopia

La microbiota en los alimentos fermentados es compleja, sin embargo, en fermentaciones a base de cereales se han asociado principalmente a especies de bacterias ácido lácticas y levaduras.

Dentro de las bacterias ácido lácticas se podrían destacar a *Lactococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Leuconostoc* spp, *Pediococcus* spp, *Streptococcus* spp y *Weisella* spp. Algunas levaduras asociadas incluyen a *Candida* spp, *Debaryomyces* spp, *Hansenula* spp, *Pichia* spp, *Trichosporon* spp (Tamang, 2015).

Bebidas fermentadas a base de maíz tradicionales en México

La preparación y consumo de bebidas fermentadas se realiza desde épocas prehispánicas en México, y con esos fines destacan dos de las plantas que mayor importancia tuvieron por sus valores nutricionales: el maguey y el maíz (Fournier y Barrios, 2012).

Actualmente, el maíz es el tercer cereal más importante en el mundo (Arendt y Zannini, 2013). En México, es un cultivo representativo por su importancia económica, social y cultural; ha sido la base de la alimentación, se consume de diferentes maneras, tostado, hervido, en tortillas, tamales, entre otros, y en bebidas como el atole (Wacher, 2002). Debido a su importancia existe una variedad de alimentos fermentados preparados a base de este cereal, algunos ejemplos de bebidas fermentadas a base de maíz se presentan a continuación:

Bebidas alcohólicas

- Tesgüino

El tesgüino es una bebida alcohólica semejante a la cerveza, con contenido alcohólico entre 1-3% (Arendt y Zannini, 2013). Preparada a base de maíz germinado o jugo de caña de maíz. Este vocablo viene del náhuatl *tecuini*, que significa latido del corazón (Fournier y Barrios, 2012).

Lo consumen grupos étnicos del Norte y noreste de México como los yaquis y pirras de Sonora; los tarahumaras de Chihuahua; los guarijíos de Chihuahua y Sonora; los tepehuanos de Durango; los huicholes de Jalisco y Nayarit y los zapotecos de Oaxaca (Wacher, 2002). Se consume como bebida durante reuniones familiares, con fines ceremoniales o en festividades, al ser diluido con agua es una bebida para niños y recién nacidos (Fournier y Barrios, 2012).

- Tejuino

El tejuino es una modalidad del tesgüino, éste tiene un menor grado alcohólico y se mezcla con azúcar o piloncillo. Se consume como refresco y en ocasiones se añade sal, jugo y nieve de limón (Wacher, 2002).

Bebidas no alcohólicas

- Pozol

El pozol es una bebida de maíz de origen maya; el nombre pozol es de origen náhuatl, *pozolli*, que quiere decir espumoso (Wacher, 2014).

Forma parte de la alimentación básica de muchos grupos étnicos del sur y el sureste de México. Se prepara con bolas de masa de maíz nixtamalizado (blanco, amarillo o negro) envueltas en hojas del árbol de plátano, que se dejan fermentar por tiempos que varían considerablemente, ya que en algunos casos únicamente se fermenta por unas horas, mientras que en otros el tiempo de fermentación es de varios días, 3 a 7 días.

Las bolas de maíz fermentado se consumen disueltas en agua durante la comida, el trabajo o en cualquier momento como una bebida refrescante; tiene usos medicinales, rituales y, debido a su alto grado de conservación, las bolas de pozol son utilizadas como provisiones en travesías largas. Los lacandones, en Chiapas, utilizan el pozol mezclado con miel para bajar la fiebre y controlar la diarrea (Wacher, 2014).

- Chorote

El chorote es una variante del pozol, consiste en agregar granos de cacao molidos a la masa de maíz; también se puede añadir azúcar, miel de abeja, pulpa de coco o diferentes clases de chiles secos, tostados y molidos (Castillo, *et al.*, 2005; Wacher, 2014). Se elabora en los estados de Tabasco, Chiapas y Oaxaca (Wacher, 2005).

- Agua agria

Del náhuatl "xocóatl", agua agria, es una bebida preparada con maíz molido mezclado con agua, a manera de masa y fermentado durante la noche. Es utilizada por los indígenas de origen nahua para extinguir el ardor de la orina, tomándose en ayunas durante varios días (Ulloa y Ulloa, 1973).

- Atole agrio

El Atole agrio (del náhuatl *xocoatolli*, *xococ*: agrio, *atolli*: atole) es otro ejemplo de bebida fermentada no alcohólica tradicional a base de maíz, con o sin nixtamalizar (Valderrama, 2012), producida por la acción de bacterias ácido lácticas y bacterias del ácido acético, levaduras y mohos (García, *et al.*, 2019).

En México, se produce en diferentes estados de la República Mexicana, por ejemplo, en el sureste de México, especialmente en los estados de Tabasco, Chiapas, el sur de Veracruz (Väkeväinen *et al.*, 2020) y Puebla (Manrique, 2017) por lo que el proceso de elaboración puede diferir en el tipo de maíz o tiempo de fermentación.

El atole agrio elaborado en Villahermosa, Tabasco se elabora a partir de maíz joven o de dobla no nixtamalizado, éste se cosecha y se deja secar para obtener el maíz duro. El maíz recién cosechado o joven contiene aproximadamente 30% de humedad por lo que los microorganismos presentes podrían desarrollarse fácilmente, para evitar esto el maíz se dobla y se deja que pierda humedad. El doblado del tallo se realiza treinta días antes de cosechar (Esquivel, 2012; Esquivel, 2016; Pérez-Cataluña, *et al.*, 2018). El atole se elabora únicamente en el periodo de dobla, en los meses de octubre y noviembre. Es consumido por grupos indígenas, tradicionalmente por las mujeres que acaban de dar a luz y se encuentran en el periodo de lactancia, ya que se cree aumenta la cantidad de leche que se produce (Moya, 2018). También se prepara durante la celebración de día de muertos para colocarlos en las ofrendas (Valderrama, 2012, Manrique, 2017).

Para la preparación del atole agrío, el maíz se cosecha, se desgrana y se muele y a partir de la molienda del maíz el atole agrio se puede obtener a través de dos tipos de fermentación:

- Fermentación sólida

Se forman bolas con la masa y se dejan fermentar por 12 h a temperatura ambiente para después adicionar agua.

- Fermentación líquida

Se adiciona agua inmediatamente a la masa obtenida de la molienda, se homogeniza y se deja fermentar por 6 horas a temperatura ambiente.

Para ambos procesos se realiza el colado antes de someterlo a ebullición hasta lograr la consistencia espesa, característica de la bebida (Moya, 2018).

El producto final se puede consumir natural o se puede adicionar azúcar, canela o cocoa.

En la **Figura 1** se muestra el diagrama de bloques para la elaboración del atole agrio a través de los dos tipos de fermentación.

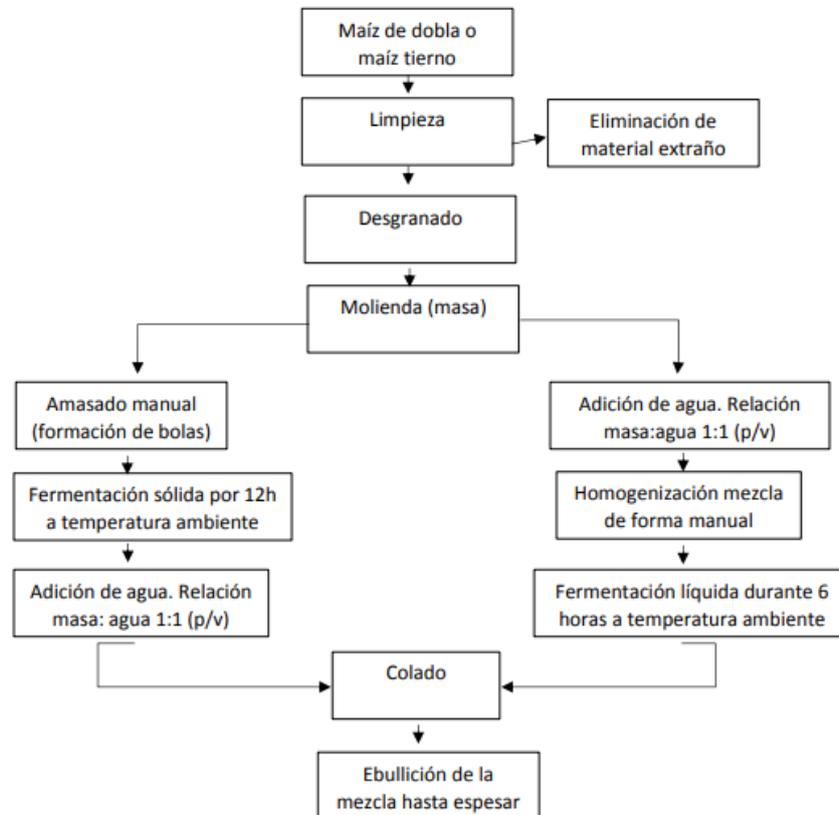


Figura 1. Diagrama para la elaboración del atole agrio (Esquivel, 2012).

En la fermentación participa una microbiota compleja que, aunque no está totalmente definida se sabe que comprende **bacterias ácido lácticas** (BAL) asociadas con la acidificación de la bebida. Se ha revelado la presencia de miembros de los géneros *Pediococcus*, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus*, y el predominio de *Pediococcus pentosaceus* y *Weissella confusa* en lotes líquidos y sólidos, respectivamente (Pérez-Cataluña, et al., 2018). También se han identificado **Enterobacterias**, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* ssp. pneumoniae, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* spp. sibonii, *Raoultella terrigena*, así como *Pseudomonas leuteola* y *Pseudomonas aeruginosa* (Esquivel, 2012). Y **levaduras**, *Candida intermedia*, *Pichia kudriavzevii*, *Clavispora lusitaniae*, *Candida parapsilosis*, *Pseudozyma parantarctica*, *Ustilago esculenta*, *Ustilago longissima* y *Moesziomyces*

bullatus, siendo las primeras 3 los microorganismos dominantes en la bebida (Manrique, 2018).

Las BAL se han usado en la producción de alimentos y bebidas fermentados ya que contribuyen al sabor, textura, es decir, al perfil sensorial de los productos finales. A su vez, las bacterias del ácido láctico son microorganismos fermentadores que modifican el contenido de carbohidratos de los alimentos, sintetizan aminoácidos, mejoran la disponibilidad de vitaminas del grupo B, degradan los antinutrientes y, por lo tanto, aumentan la disponibilidad de hierro, zinc y calcio. Además, presentan actividades antimicrobianas contra patógenos y microorganismos de descomposición (Väkeväinen, *et al.*, 2018).

Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas son bacterias Gram positivas, no móviles, no esporuladas, catalasa negativas, anaerobios o aerotolerantes, nutricionalmente exigentes (Doyle, *et al.*, 2019; Mozzi, 2016), requieren de aminoácidos, péptidos, nucleótidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos y carbohidratos, por lo que suelen estar en hábitats con altos contenidos de estos nutrientes como tejidos vegetales, alimentos lácteos, productos cárnicos, alimentos fermentados o en el tracto gastrointestinal de animales (Mozzi, 2016). El rango de pH óptimo para su crecimiento varía entre 4-8, aunque algunas especies pueden crecer a valores de pH bajos como 3.2 y tan altos como 9.6 (Sangwan, 2014).

Pertencen al filo Firmicutes, clase Bacilli, orden *Lactobacillales*, comprenden los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weisella* (Doyle, *et al.*, 2019; Mozzi, 2016; Parra, 2010). También se han incluido géneros de *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella* (Mozzi, 2016)

Las bacterias lácticas se han clasificado de acuerdo con su morfología, bacilo o coco y la habilidad para crecer bajo diferentes temperaturas, mesófilas o termófilas. La mayoría de las bacterias ácido lácticas son mesófilas y generalmente crecen en un rango de temperatura de 10-40°C, teniendo una temperatura óptima entre 25 °C y 35°C (Sangwan, 2014).

En función de los productos formados durante la fermentación, se distinguen dos grupos: homofermentativas y heterofermentativas (Doyle, *et al.*, 2019; García, *et al.*, 2019).

- Homofermentativas

El ácido láctico es el principal producto final de la fermentación de la glucosa, a través de la glucólisis o vía Embden-Meyerhof (EMP). Bacterias ácido lácticas como, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y algunos *Lactobacillus*, por ejemplo: *L. casei*, *L. plantarum* y *L. curvatus*, utilizan esta vía de fermentación.

A través de la glicólisis, la glucosa se transforma en piruvato, posteriormente a ácido láctico por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). La enzima fructosa-1-6-difosfato aldolasa (recuadro rojo, **Figura 2** izquierda) cataliza la conversión de dihidroxiacetona fosfato a gliceraldehido 3-fosfato para obtener piruvato. Se sintetizan dos moléculas de ATP por cada una de glucosa.

- Heterofermentativas

Generan cantidades equimolares de lactato, CO₂ y etanol o ácido acético a partir de glucosa, a través de la vía hexosa monofosfato o pentosas fosfato. Por ejemplo: *Oenococcus*, *Leuconostoc* y algunas especies de *Lactobacillus* como, *L. brevis*, *L. fermentum* y *L. reuteri*.

Las hexosas como glucosa, fructosa y manosa, pueden ser convertidas a ácido láctico, CO₂ y etanol. El CO₂ se produce a partir de la degradación de 6-fosfogluconato, durante la conversión de hexosas a pentosas. La enzima de la fermentación heterofermentativa es D-xilulosa-5-fosfato (fosfocetolasa), (**Figura 2**, derecha, recuadro rojo) la cual cataliza la reacción de conversión de xilulosa-5-fosfato a gliceraldehido-3-fosfato (GAP) y acetil-P. La eficiencia es menor que por la vía EMP, se obtiene una molécula de ATP por una de glucosa.

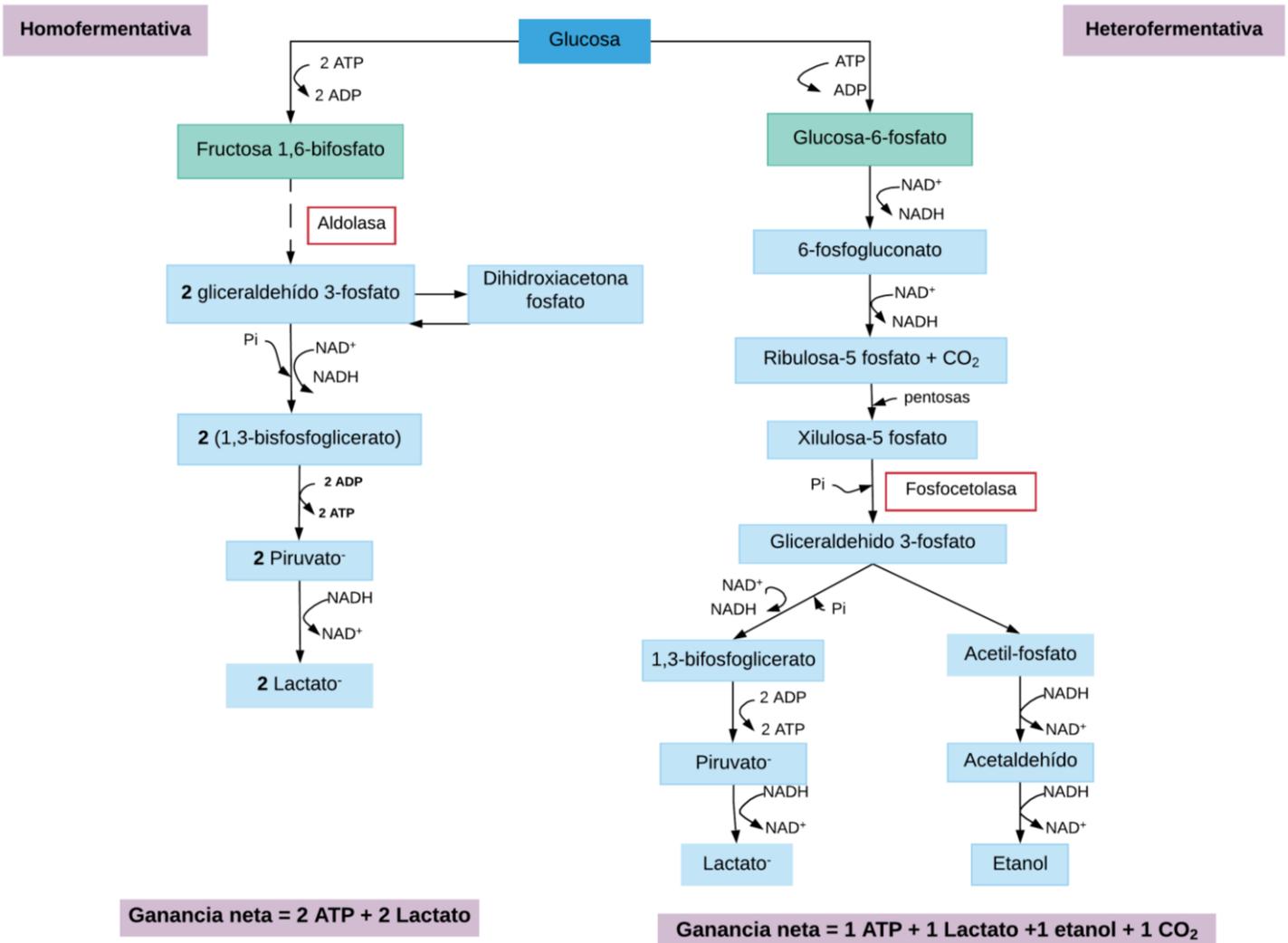


Figura 2. Rutas de fermentación utilizadas por bacterias ácido lácticas, homofermentativas y heterofermentativas (adaptado de Sangwan, *et al.*, 2013).

Las BAL son consideradas seguras para la salud, por lo que reciben la designación de GRAS (por sus siglas en inglés, Generally Recognized As Safe) otorgado por la FDA (Salvucci, *et al.*, 2016).

Además de la producción de ácido láctico durante la fermentación, las bacterias ácido lácticas también pueden producir otros compuestos como ácidos orgánicos, etanol, diacetilo, exopolisacáridos, peróxido de hidrógeno, varias enzimas y bacteriocinas (O'Bryan, *et al.*, 2015).

- Ácidos orgánicos

Son productos finales de ambas fermentaciones (homo y hetero fermentación de BAL) por ejemplo; ácido láctico, acético y propiónico, generando un medio poco favorable

para el crecimiento de patógenos debido a que actúan como agentes antimicrobianos por la interferencia en el potencial de la membrana celular, inhibe el transporte activo, reduce el pH intracelular de la célula provocando la desnaturalización de proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales e inhibe otras funciones metabólicas (Fernández, *et al.*, 2014).

- Diacetilo

Algunas BAL producen diacetilo, el cual se forma por el exceso de piruvato originado por el citrato. Es una dicetona no polar, volátil. Se ha reportado que inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas debido a que inactiva la utilización de arginina.

- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Es producido en presencia de oxígeno como resultado de la acción de la flavoproteína oxidasa o NADH peroxidasa. El efecto antimicrobiano del H₂O₂ es resultado de la oxidación de grupos sulfhidrilo que causan la desnaturalización de enzimas o la lipoperoxidación (degradación oxidativa de los lípidos de la membrana celular), en consecuencia, hay un aumento en la permeabilidad de la membrana de los microorganismos patógenos. Además, es precursor de la producción de radicales libres (bactericidas) como radicales superóxidos e hidroxilo, que causan daño al ADN de los microorganismos.

Lactobacillus

Lactobacillus es el género más grande dentro de las BAL, de acuerdo con LPSN (List of prokaryotic names) marzo 2020, hay registradas 300 especies pertenecientes a este género; algunas especies como *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus brevis*, entre otras.

El género *Lactobacillus* pertenece al Filo Firmicutes, clase Bacilli, orden II Lactobacillales y familia Lactobacillaceae (Calasso y Gobbetti, 2011).

Presentan morfología bacilar, se pueden observar bacilos largos y delgados o bacilos cortos y curvos, son heterofermentativos, facultativos.

Se emplean en la fabricación de productos lácteos fermentados, masa madre, carne y alimentos vegetales; en algunos de ellos se ha demostrado su potencial como probióticos.

- *Lactobacillus plantarum*

Es una de las bacterias lácticas más importantes, se usa ampliamente en la industria alimentaria y generalmente se considera segura (GRAS) (Donghui, *et al.*, 2020). Es un lactobacilo heterofermentativo facultativo, crece a valores de pH bajos, es tolerante a altas concentraciones de sales biliares y ha mostrado actividad inhibitoria contra patógenos que pueden causar graves problemas al huésped (Tzu-Hsing y MingPan, 2019; Kavitha *et al.*, 2020).

Lactobacillus plantarum está ampliamente distribuida y es muy versátil, forma parte de la microbiota de muchos alimentos, incluidos lácteos, carne, pescado, productos fermentados vegetales (por ejemplo, mosto, chucrut, verduras en escabeche, masa madre) y ensilados; también es un habitante natural de la mucosa humana y animal (Corsetti, *et al.*, 2018).

Se ha reportado que *L. plantarum* se puede adaptar a diferentes ambientes debido a su habilidad de fermentar un amplio rango de carbohidratos.

Se han descrito una gran cantidad de bacteriocinas producidas por diferentes cepas de *L. plantarum* (Zapata, 2009), como la plantaricina 423 producida por *L. plantarum* cepa 423. Esta bacteriocina pudo inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en la carne de salami de avestruz. También, una nueva bacteriocina con potencial como conservador de alimentos, plantariciclina A, una bacteriocina circular, a partir de una cepa aislada del olivo (da Silva Sabo, *et al.*, 2014).

Lactococcus

El género *Lactococcus* pertenece al Filo Firmicutes, clase Bacilli, familia Streptococcaceae. Con morfología de cocos se pueden encontrar solos, en pares (diplococos) o en cadenas. Son homofermentativos, es decir, producen un solo producto, ácido láctico, como el principal o único producto de la fermentación de glucosa (Lorenzo, *et al.*, 2018).

De acuerdo con LPSN (List of prokaryotic names) marzo 2020, son 17 las especies registradas de este género, por ejemplo, *Lactococcus kimchii*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus laudensis* y *Lactococcus garvieae*.

- *Lactococcus lactis*

Es una bacteria anaerobia facultativa, homofermentativa. Se puede encontrar en la naturaleza, como en las plantas y dentro del tracto digestivo de las vacas (Song, *et al.*, 2017). Son catalasa negativa, anaerobios facultativos, no móvil y no formadora de esporas. Pueden crecer a 10 ° C, pero no a 45 ° C (Mills, *et. al*, 2011).

Se distinguen principalmente dos subespecies *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*, que es muy apreciado por el sabor que les da a ciertos quesos.

L. lactis es el componente principal de los cultivos iniciadores utilizados mundialmente en productos lácteos fermentados, como el queso de origen artesanal y comercial, leches fermentadas y crema agria (Cavanagh, *et al.*, 2015).

Al fermentar la leche, le dan al producto terminado características organolépticas particulares (sabor, aroma y textura). Estas características se deben a la producción de ácido láctico y la coagulación de las proteínas de la leche.

Producción de nisina

La nisina es la única bacteriocina que obtuvo la aprobación de la FDA para su aplicación como conservador de alimentos en 1988, es producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Su estructura cristalina explica que, sus propiedades antimicrobianas se deben a la unión del NH₂ terminal a la molécula de lípido II que inhibe la síntesis de peptidoglucano formando poros en la membrana celular bacteriana, provocando la lisis celular.

Está compuesta por una cadena de polipéptidos cíclicos largos de 34 aminoácidos con una masa molecular de 3500 Da. Existen dos variantes, la variante A contiene histidina en la posición 27 y la variante Z tiene asparagina (Juturu y ChuanWu, 2018). Se utiliza principalmente para la conservación de carnes y productos cárnicos, mariscos y vegetales enlatados.

Bacteriocinas

Son sintetizadas ribosómicamente, son péptidos cortos liberados extracelularmente o proteínas con actividad bactericida o bacteriostática, frente a células sensibles, presentes en el mismo ecosistema que compiten por los nutrientes. Han despertado un gran interés en términos de inocuidad alimentaria debido a su capacidad para prevenir el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos.

La mayoría de las bacteriocinas son catiónicas y contienen de 30 a 70 residuos de aminoácidos, y su modo de inhibición es a través de la permeabilización de la membrana de las células sensibles (Ingolf, *et al.*, 2013).

Contienen residuos de aminoácidos tales como lisina, arginina e histidina, los cuales les confieren un carácter catiónico (pH neutro), y también contienen residuos de alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina y triptófano, lo que les proporciona su naturaleza hidrofóbica; además, las bacteriocinas también son de carácter anfipático (Heredia-Castro, *et al.*, 2017)

Se consideran bacteriocinas de espectro estrecho si inhiben a bacterias que pertenecen a la misma especie. Por el contrario, si inhiben bacterias pertenecientes a otros géneros, se consideran bacteriocinas de amplio espectro (Juturu y ChuanWu, 2018).

Las células bacterianas que producen bacteriocinas son resistentes a su (s) propio (s) péptido (s) antimicrobiano, que está mediado por las proteínas de inmunidad específicas producidas por las células huésped. Esta protección se logra mediante mecanismos específicos que bloquean la acción de las bacteriocinas. Por ejemplo, la inmunidad para las bacteriocinas formadoras de poros está dada por proteínas de membrana que neutralizan la bacteriocina por una interacción directa, o por una interacción con proteínas necesarias para la inserción de la bacteriocina en la membrana (Cotter, *et al.*, 2005; Preciado, *et al.*, 2013; Juturu y ChuanWu, 2018).

Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas producidas por BAL, Gram positivas, fueron clasificadas por Klaenhammer por primera vez en 1993, agrupándolas en tres clases principalmente y subclases considerando la base de la estructura química, peso molecular y estabilidad térmica (Martínez, 2018). Sin embargo, la clasificación ha sufrido modificaciones continuas, vinculadas a estudios sobre su estructura, secuencia de aminoácidos y

mecanismo reconocido de acción (Karpin´ski y Szkaradkiewicz, 2016), por lo que actualmente se proponen cuatro clases de bacteriocinas; en la **Figura 3** se muestra dicha clasificación.

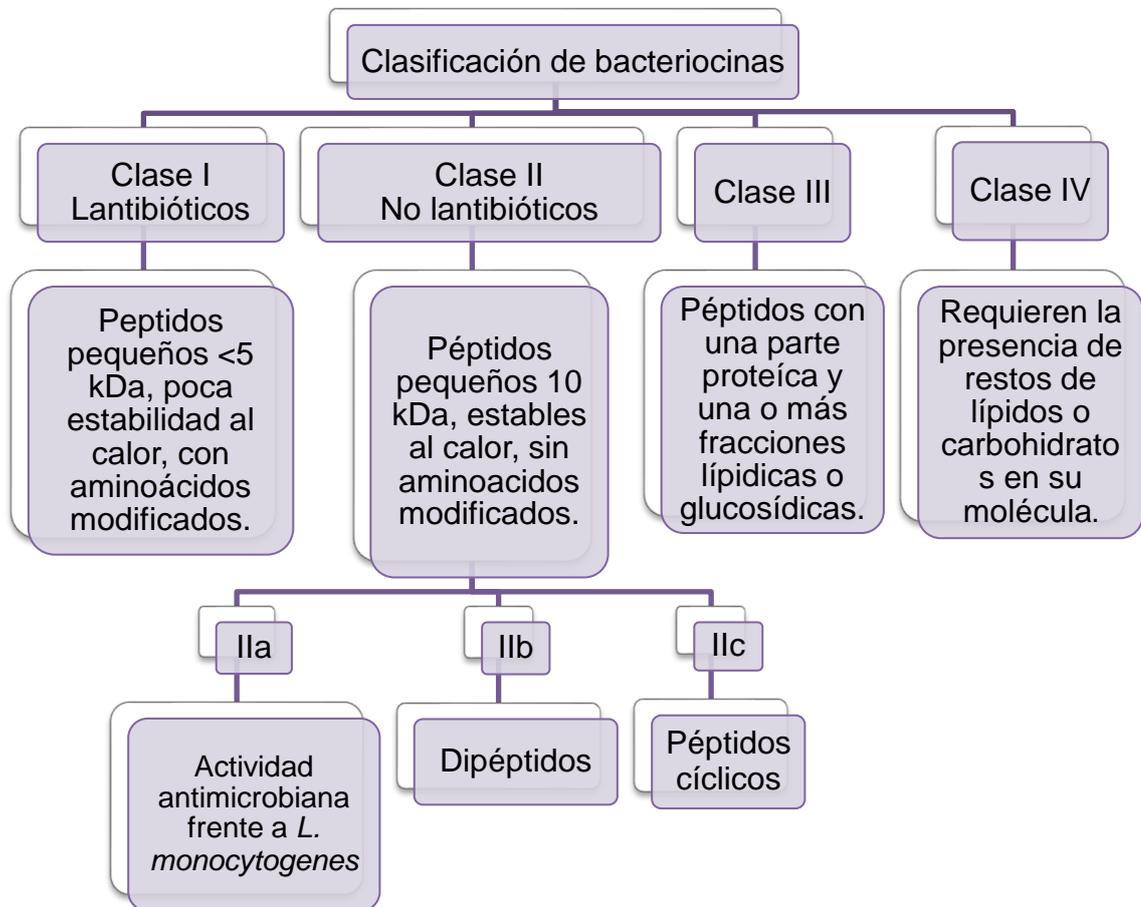


Figura 3. Clasificación de bacteriocinas adaptado de Karpin´ski y Szkaradkiewicz, 2016.

A continuación, se detalla cada una de ellas (O´Bryan, *et al.*, 2015; Verma, *et al.*, 2014):

- **Clase I** también conocidos como **lantibióticos**: Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana, con poca estabilidad al calor, péptidos policíclicos 21–38 aminoácidos, (< 15 KDa) con aminoácidos modificados (lantionina y 3-metil lantionina). Un ejemplo de estas bacteriocinas es la nisina.

Son sintetizadas a través de la modificación de los péptidos después de que la proteína ha sido traducida mediante el retículo endoplasmático (O´Bryan, *et al.*, 2015).

- **Clase II (No lantibióticos):** bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente (péptidos con aminoácidos no modificados). Son péptidos pequeños 30–60 aminoácidos, (<15 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. El representante más característico de este grupo es la pediocina PA1.

A su vez este grupo se divide en 3 subgrupos

1. Ila. bacteriocinas más termoestables, con 37-48 aminoácidos y poseen una alta actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*.
 2. Ilb. comprende bacteriocinas de dos péptidos e incluye las enterocinas y péptidos de lactocina G; inhiben el crecimiento de *Enterococcus* spp. y algunas otras bacterias Gram-positivas,
 3. Ilc. Contiene péptidos circulares en los que los extremos N y C están unidos covalentemente, y la molécula circular es resistente a varias proteasas y peptidasas
- **Clase III (bacteriolisinas):** bacteriocinas complejas. Son péptidos (>30 kDa) con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucosídicas necesarias para su actividad biológica. Se consideran como glicoproteínas (lactocina S).
 - **Clase IV:** incluye bacteriocinas, que para su actividad completa requieren la presencia de restos de lípidos o carbohidratos en su molécula y son estables al calor.

Mecanismos de acción

La membrana celular es el principal sitio de acción para las bacteriocinas, en las cuales los lípidos aniónicos de la membrana citoplasmática son los receptores principales para las bacteriocinas de BAL para el inicio de la formación de poros (Verma, *et al.*, 2014).

El modo de acción de las bacteriocinas puede ser bactericida o bacteriostático, determinando la muerte o extensión de la fase logarítmica, respectivamente. Se distinguen cuatro tipos de actividad antibacteriana de bacteriocinas (Karpin´ski y Szkaradkiewicz, 2016):

1. Actividad bactericida debido a la formación de poros en la membrana celular,
2. Inhibición de la biosíntesis de componentes de la pared celular,
3. Efecto sobre la actividad de las enzimas autolíticas,
4. Inhibición del desarrollo de esporas bacterianas.

En la **Figura 4** se muestran los mecanismos de acción de bacteriocinas clase I, clase II y clase III (bacteriolisinas):

- Bacteriocinas de clase I: Forman un complejo con el precursor lipídico de la pared celular bacteriana II (lípidos II), inhibiendo así la biosíntesis de la pared celular, la inhibición de la pared celular aumenta la permeabilidad de la membrana, por lo que el complejo se agrega, incorpora péptidos adicionales y forma un poro real a través de la membrana bacteriana (Cotter, *et al.*, 2005; O'Bryan, *et al.*, 2015). Esto se acompaña de un flujo pasivo de moléculas pequeñas, como iones de potasio, magnesio y fósforo, aminoácidos y ATP. De esta manera, se desarrolla una alteración en el potencial de membrana y el gradiente de pH y se inhibe la función de la bomba de protones. El bajo nivel de ATP y el déficit de iones en la célula da como resultado la inhibición del ADN, síntesis de ARN, proteínas y polisacáridos. Esto finalmente lleva a la muerte de la célula bacteriana.
- Clase II: Crean poros en forma de barril o un mecanismo de alfombra, por el cual los péptidos se orientan paralelos a la superficie de la membrana e interfieren con la estructura de la membrana, generalmente tienen una estructura helicoidal anfifílica que permite que se inserten en la membrana (Cotter, *et al.*, 2005; Verma, *et al.*, 2014).
 - IIa: Estas bacteriocinas permeabilizan la membrana celular de las células sensibles, y se ha indicado que el objetivo de éstas es una proteína manosa permeasa en la superficie celular.
 - IIb: Actúan como toxinas formadoras de poros que crean canales en la membrana celular a través de un mecanismo de barril, iniciando así un desequilibrio iónico en la célula objetivo.

- Ilc Estas bacteriocinas tienen varios modos de acción, incluida la permeabilización de la membrana, la inhibición específica de la formación del tabique y la actividad de feromonas.
- Clase III (bacteriolisinas): Actúan directamente sobre la pared celular. La región C-terminal de las bacteriolisinas se encarga de reconocer la pared de la célula blanco, mientras que la región N-terminal presenta una homología con una endopeptidasa; produciéndose la lisis de la pared (Beristain-Bazua, *et al.*, 2012).

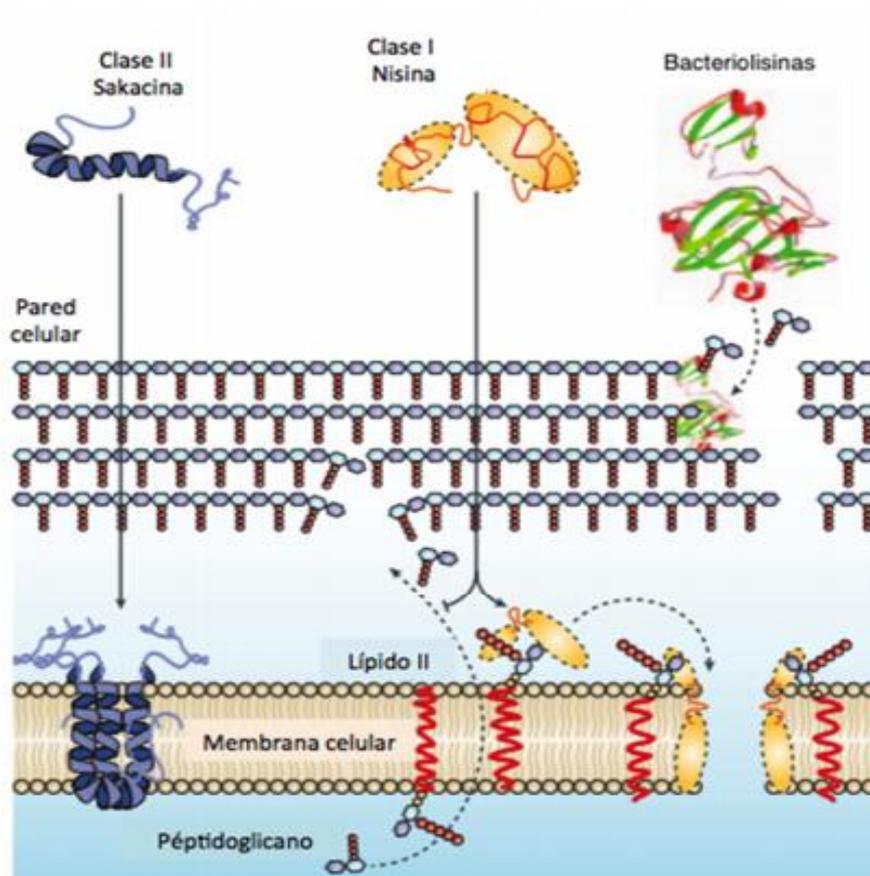


Figura 4. Mecanismos de acción de las diferentes clases de bacteriocinas (Tomada de Beristain-Bazua, *et al.*, 2012).

En la **Tabla 2** se muestran algunos ejemplos de bacteriocinas de cada grupo antes mencionado, así como la actividad antimicrobiana que se ha reportado.

Tabla 2. Bacteriocinas reportadas en la literatura (Tomado de Karpin´ski y Szkaradkiewicz 2016).

Clase Bacteriocina	Bacteriocina	Bacteria productora	Actividad antimicrobiana contra
Clase I	Nisina A	<i>L. lactis subsp. lactis</i>	<i>Enterococcus spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Lactococcus spp.</i> , <i>Leuconostoc spp.</i> , <i>Listeria spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Micrococcus spp.</i> , <i>Pediococcus spp.</i> , <i>Mycobacterium spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i>
	Mutacina B-Ny266	<i>Streptococcus mutans</i>	Bacterias Gram positivas
	Salivaricina A	<i>Streptococcus salivarius</i>	
Clase II	Enterocina L50A	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Clostridium spp.</i> , <i>Propionibacterium spp.</i> , <i>Listeria spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Pediococcus spp.</i>
Clase III	Helveticina J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i>
Clase IV	Glycocina F	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i>

Bacteriocinas en alimentos

Las bacteriocinas producidas por BAL son de gran interés en la industria alimentaria, ya que son producto GRAS y pueden ser usadas como bioconservadores. Se consideran una herramienta atractiva para mejorar la seguridad de los alimentos, así como, de reducir enfermedades transmitidas por alimentos.

Cuando se analiza una bacteriocina con posible aplicación en alimentos se deben considerar varios aspectos, tal como (Cotter, *et al.*, 2005):

1. El microorganismo productor preferentemente debe considerarse GRAS,
2. La bacteriocina debe tener un amplio espectro de inhibición que incluya patógenos, o tener actividad contra un patógeno particular,

3. La bacteriocina debe ser estable al calor,
4. Su inclusión en los productos debe conducir a efectos beneficiosos, como una mayor seguridad, calidad y sabor.

Las bacteriocinas en alimentos se pueden aplicar a través de (Behera, *et al.*, 2018; Leroy y De Vuyst, 2004; Preciado, *et al.*, 2013):

1. Un cultivo iniciador, es decir, una preparación microbiana de al menos un microorganismo que se agregan a una materia prima para producir un alimento fermentado al acelerar y dirigir su proceso de fermentación. Causan una rápida acidificación de la materia prima a través de la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. Además, su producción de bacteriocinas, exopolisacáridos, varias enzimas, entre otros ayudan a la conservación del alimento, seguridad microbiana, además de mejorar la textura y contribuir al perfil sensorial del producto final.
2. Aplicación directa de la bacteriocina purificada o semi purificada en el alimento.
3. Uso de un producto previamente fermentado con la producción de la bacteriocina como un ingrediente en un alimento procesado.

Se ha demostrado que las bacteriocinas tienen potencial en la bioconservación de carne, productos lácteos, alimentos enlatados, pescado, bebidas alcohólicas, ensaladas, productos de panadería de alta humedad y vegetales fermentados.

Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen un problema sanitario de importancia a nivel mundial. Se producen por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos, parásitos o bien las sustancias tóxicas que ellos producen.

Se dividen en tres (Ray, 2005):

1. **Infecciones:** resultan de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos perjudiciales vivos, es decir, es necesario que las células de las bacterias y virus enteropatógenos permanezcan vivas en los alimentos o el agua durante el consumo. Las células, incluso si están presentes en pequeñas cantidades, tienen

el potencial de establecerse y multiplicarse en el tracto digestivo para causar la enfermedad. Tal es el caso de *Salmonella*, *Listeria*, virus hepatitis tipo A y *Toxoplasma gondii*.

2. **Intoxicaciones:** ocurren cuando los microorganismos han crecido y producido toxinas, es decir, las toxinas de bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido. Contrario a una infección, no es necesario que haya células viables durante el consumo de los alimentos para que ocurra la enfermedad, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*.
3. **Toxi-infección:** La enfermedad se produce al ingerir una gran cantidad de células viables de algunas bacterias patógenas a través de alimentos y agua contaminados. En general, las células bacterianas esporulan o mueren y liberan toxinas para producir los síntomas, como: *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*.

De acuerdo con el reporte de la OMS (2015) “Carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria”, una ETA afecta a una de cada diez personas siendo enfermedades diarreicas las más frecuentes. Los principales agentes son norovirus, *Campylobacter*, *E. coli* y *Salmonella* no invasivas.

En México, las bacterias generalmente implicadas en ETA corresponden a los géneros *Salmonella*, *Shigella*, especies como *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* y parásitos como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* (Hernández, et al., 2011; Boletín epidemiológico, 2019).

Patógenos de importancia alimentaria

***Salmonella* Typhimurium**

Son bacilos cortos, Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, móviles por medio de flagelos peritricos, pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Es capaz de adaptarse a condiciones extremas; la temperatura óptima de crecimiento es entre 35-40°C (mesófilo) y pH óptimo 6.5-7.5 (Bailey, et al., 2010).

Los seres humanos pueden adquirir la bacteria a través de alimentos contaminados como carne de res, carne de cerdo, pollo, huevos, frutas, verduras e incluso en alimentos procesados (Bell y Kyriakides, 2009).

Salmonella spp. causa infección, se multiplican en el intestino delgado, colonizando y posteriormente invadiendo los tejidos intestinales, produciendo una enterotoxina y provocando una reacción inflamatoria y diarrea. Los organismos pueden ingresar al torrente sanguíneo y/o al sistema linfático y causar enfermedades más graves. Aunque la mayoría de las personas son vulnerables a salmonelosis, ciertos grupos son más vulnerables a la infección; niños pequeños, adultos mayores y aquellos con enfermedad crónica subyacente o inmunocomprometidos (Bell y Kyriakides, 2009).

La CDC (Centers for Disease Control and Prevention) en 2018 señaló que, en los Estados Unidos, la segunda infección más frecuente transmitida por alimentos fue por *Salmonella* siendo Enteritidis, Newport y Typhimurium los serotipos más comunes (CDC & FoodNet, 2018). Se estima que cada año 1.35 millones de personas se infectan, de las cuales 26,500 requieren hospitalización y 420 personas mueren (food safety CDC, 2020).

En México, hasta el 23 de mayo 2020, se han reportado a lo largo de las 32 entidades federativas, 18772 casos de salmonelosis, 7695 casos de fiebre tifoidea y 2367 casos de fiebre paratifoidea. En el estado de Tabasco, se han reportado 1709 casos de salmonelosis lo que representa el 9% de los casos totales (Boletín epidemiológico, 2020).

Crecimiento en alimentos

En alimentos el Aw debe ser mayor o igual a 0.93 para que pueda crecer y generalmente es inhibida en concentraciones de 3-4% de NaCl (Lofstrom, *et al.*, 2016). Es sensible a valores de pH bajos (Ray, 2005).

Recientemente, las infecciones por *Salmonella* se han relacionado con coco deshidratado, coco rallado congelado, pepinos contaminados, melón precortado, pollo, huevos, pistaches, carne de res molida (food safety CDC, 2019).

Listeria monocytogenes

L. monocytogenes es un bacilo corto, Gram positivo, no esporulado, pertenece a la familia *Listeriaceae*. La temperatura óptima de crecimiento es 30-37°C; sin embargo, puede crecer a 0-45°C y puede sobrevivir por períodos prolongados en congelación. El rango de pH óptimo es 6-8, pero se ha observado crecimiento entre 4.4 y 9.6 (Porto-Fett, *et al.*, 2010). Puede crecer en presencia de 10-12% de NaCl (Doyle, *et al.*, 2019).

Es el agente causante de la listeriosis, es una infección bacteriana capaz de originar cuadros clínicos muy diversos entre sí. La listeriosis puede presentarse en dos formas clínicas, **listeriosis no invasiva o leve** (gastrointestinal), la cual es la más habitual que va desde una fiebre esporádica acompañada de problemas gastrointestinales (diarreas acuosas, náuseas y vómitos) o **como listeriosis invasiva o severa**; en la cual existe compromiso neurológico, afecta el cerebro y la médula espinal causando abscesos cerebrales, meningoencefalitis o meningitis (Batt, 2014; Granda, 2018). La multiplicación intracelular y la transmisión célula a célula de la bacteria parece estar mediada por proteínas como la internalina y la hemolisina listeriolisina O (Prescott, 2004).

Afecta principalmente a recién nacidos, mujeres embarazadas, adultos mayores y pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades autoinmunes. Las mujeres embarazadas pueden ser afectadas en el tercer trimestre de gestación, puede ser asintomático o con la aparición de síntomas pseudogripales (fiebre, escalofríos, artralgias, cefaleas, mareos o síntomas gastrointestinales), los cuales con un tratamiento oportuno no presentan complicaciones de lo contrario, las complicaciones más frecuentes son la infección del líquido amniótico (amnionitis) que terminan en aborto, muerte fetal intraútero o muerte neonatal (Granda, 2018).

Es ubicuo en la naturaleza y puede contaminar los entornos de procesamiento de alimentos formando biopelículas, que actúan como defensa frente a limpieza y desinfección, lo que representa una amenaza para la cadena alimentaria. Esto es particularmente importante para los alimentos listos para el consumo ya que no hay tratamiento térmico u otro paso antimicrobiano entre la producción y el consumo (Jordan y McAuliffe, 2018).

Crecimiento en alimentos

La sobrevivencia y crecimiento en alimentos depende de factores intrínsecos como pH, A_w y factores extrínsecos como la humedad relativa, la temperatura de almacenamiento y/o el material de empaque. Se considera que alimentos con $\text{pH} \leq 4.4$ y $A_w \leq 0.92$ o con una combinación de $\text{pH} \leq 5$ y $A_w \leq 0.94$ no permiten el crecimiento (Ray, 2005).

La CDC estima que en EUA 1600 personas contraen listeriosis al año y 260 personas mueren a causa de ésta. En 2014 en EUA se reportaron 675 casos de listeriosis. Si bien la incidencia de listeriosis es baja en comparación con la salmonelosis, la gravedad de la enfermedad en grupos de población susceptibles como niños, personas mayores, mujeres embarazadas, personas con sistema inmunocomprometido, causa del 20 al 30% de las muertes asociadas con patógenos transmitidos por los alimentos en los Estados Unidos (Doyle, *et al.*, 2019; Muñoz, *et al.*, 2019)

Se ha encontrado en alimentos listos para comer, en alimentos refrigerados que se consumen sin calentar, este tipo de alimentos provee el ambiente idóneo para su desarrollo ya que puede crecer a bajas temperaturas en comparación con otros competidores, también en alimentos crudos, como la leche no pasteurizada, frutas y verduras.

Los investigadores han rastreado brotes recientes de quesos blandos, apio, germinados, melón, pescado y mariscos ahumados y helado (food safety CDC, 2020).

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen un problema sanitario y económico de relevancia mundial. Millones de personas enferman y muchas mueren por consumir alimentos insalubres (Ruíz, 2017).

Por lo que, el uso de conservadores es muy importante en la industria alimentaria para prevenir el deterioro o la contaminación bacteriana patógena, sin embargo, en los últimos años, la demanda de productos "naturales" ha aumentado, los consumidores prefieren este tipo de productos a aquellos con conservadores químicos añadidos (Pei, *et al.*, 2020).

Como consecuencia existe una gran demanda de alternativas naturales y seguras; lo que lleva a las bacterias ácido lácticas, bacterias predominantes en muchos alimentos fermentados y que son consideradas seguras (GRAS). Se ha demostrado que mediante la producción de ácido láctico y otros metabolitos contrarrestan el crecimiento de bacterias no deseadas (Vásquez, *et al.*, 2009). Dentro de los metabolitos producidos se encuentran las bacteriocinas, proteínas o péptidos antimicrobianos sintetizados en el ribosoma, cuyo principal mecanismo de acción es interviniendo en la membrana celular formando poros.

Por esta razón son sumamente atractivas como herramientas para controlar el crecimiento de patógenos en una gran variedad de alimentos.

Con los resultados del proyecto se podrá establecer el efecto antimicrobiano de dos bacterias ácido lácticas, una perteneciente al género *Lactobacillus* y otra del género *Lactococcus*, involucradas en la fermentación del atole agrio de Villahermosa, Tabasco, frente a bacterias patógenas de interés en alimentos, *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes*. También al conocer el efecto antimicrobiano se podría producir, en un futuro, el atole agrio bajo condiciones controladas.

HIPÓTESIS

Si los cultivos de *Lactobacillus plantarum* cepa 17 y *Lactococcus lactis* cepa X, aisladas del atole agrio, tienen un efecto inhibitorio frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium, los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de ambas BAL, sin tratamiento, con tratamiento de pH y térmico, también presentaran actividad antimicrobiana. De igual modo, el crecimiento de los microorganismos patógenos en éstos se verá afectado.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la actividad antimicrobiana de los cultivos y sobrenadantes de *Lactobacillus plantarum* cepa 17 y de *Lactococcus lactis* cepa X, mediante pruebas de sensibilidad frente a bacterias patógenas de importancia alimentaria.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer las condiciones óptimas de crecimiento, pH y temperatura, en caldo MRS por dos cepas de BAL aisladas del atole agrio.
- Examinar mediante una prueba de reto, el efecto inhibitorio de las BAL en el crecimiento simultáneo con *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* en caldo MRS.
- Observar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes obtenidos de las cepas BAL frente a bacterias patógenas como *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*, a través de la técnica de difusión en agar
- Determinar la sobrevivencia de *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* en los sobrenadantes obtenidos y tratados de los cultivos de BAL en caldo MRS.

DIAGRAMA GENERAL

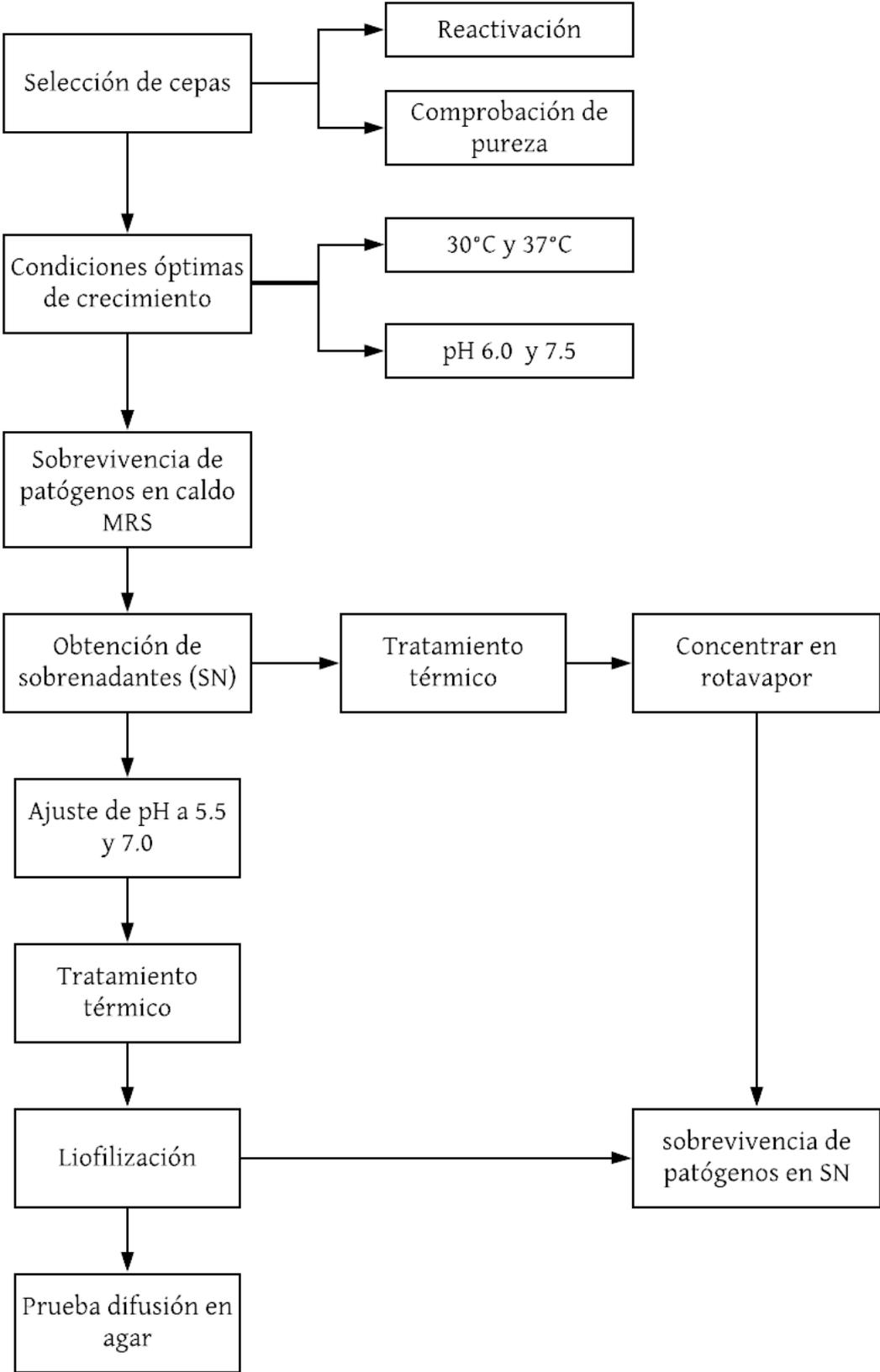


Figura 5. Diagrama de flujo del procedimiento general del proyecto.

METODOLOGÍA

1. Microorganismos empleados

Para la realización del proyecto se partieron de BAL aisladas previamente del atole agrio de Villahermosa, Tabasco (Hernández, 2018).

Tabla 3. Bacterias ácido lácticas seleccionadas para el proyecto.

Cepa	Clave	Clave durante el proyecto
<i>Lactobacillus plantarum</i>	E04H084db2	17
<i>Lactococcus lactis</i>	D12H305a1	X

Las cepas seleccionadas se tomaron de la colección del laboratorio 324 del conjunto E, Facultad de Química, las cuales se conservan a -70°C.

2. Reactivación de cepas

Comenzando con las cepas conservadas en glicerol a -70°C se inocularon 40 µL de cada cepa en 5 ml de caldo MRS estéril y se incubaron a 30°C /24 h, a partir del cultivo reactivado se realizó un segundo pase tomando 40 µL e inoculando en 5 mL de caldo MRS estéril y se incubó bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo.

Se verificó el crecimiento de las bacterias lácticas mediante la turbidez del medio y la formación de un precipitado.

3. Comprobación de pureza de las cepas

Para verificar la pureza de ambas cepas se observaron las características macroscópicas y microscópicas.

Macroscópicas: se realizó, por duplicado, una inoculación en estría por agotamiento en agar MRS y se incubaron a 30°C/ 24 h. Se observó la homogeneidad de las colonias formadas y la morfología.

Microscópicas: a través de un frotis y tinción de Gram, partiendo de una colonia aislada en las cajas con agar MRS, se observó al microscopio 100X.

4. Establecimiento de condiciones óptimas de crecimiento de las cepas BAL a partir de cinéticas de crecimiento a pH y temperatura diferentes.

Se evaluó el crecimiento de ambas cepas de BAL bajo diferentes temperaturas de incubación, así como el pH inicial del medio MRS. En la **Tabla 4** se muestran las condiciones evaluadas.

Tabla 4. Condiciones de temperatura y pH evaluadas para *L. plantarum* (17) y *L. lactis* (X) en cada fermentación en medio MRS.

Fermentación	Temperatura de incubación	pH inicial del medio*
1	30°C	6.0-6.5
2	30°C	7.5
3	37°C	6.0-6.5
4	37°C	7.5

*El ajuste de pH del medio MRS hasta 7.5 se realizó con NaOH 1 M.

Se inició con la reactivación de las cepas como se explicó en el punto 2. Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces con 250 ml de caldo MRS, a partir de la cepa reactivada se inoculó al 1% v/v del caldo.

Se realizó el seguimiento de las 4 fermentaciones a los tiempos 0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 9, 10.5, 12 y 24 horas. Para cada uno de ellos se evaluó el crecimiento del microorganismo por densidad óptica midiendo la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis) y el descenso del pH empleando un potenciómetro (Orion 410A+) por duplicado.

A su vez, se evaluó el crecimiento a través de la técnica cuenta en placa, en agar MRS. Se tomó 0.5 mL de la muestra de cultivo y se diluyó en 4.5 mL de solución salina 0.8% estéril, se homogenizó y se realizaron diluciones seriadas (**Anexo B**). De las diluciones seleccionadas se tomaron 100 µL, se depositaron en placas de agar MRS estériles, se extendió el inóculo en la superficie con una varilla de metal y se incubaron a 37°C/24h.

Transcurrido el tiempo de incubación se hizo el conteo de las colonias, considerando un rango estadístico de 25-250 colonias características de las BAL (Camacho, *et al.*, 2009), colonias pequeñas, blancas, circulares, convexas (**Anexo D.I**, Figura 1).

5. Supervivencia de patógenos en caldo MRS frente a *Lactobacillus plantarum* (17) y *Lactococcus lactis* (X).

Las BAL se reactivaron como ya se ha descrito en el punto 2. En la **Tabla 5** se indican los microorganismos patógenos monitoreados:

Tabla 5. Microorganismos patógenos seleccionados para prueba de supervivencia en caldo MRS

Microorganismo	Clave
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028
<i>Listeria monocytogenes</i>	CFQ-103, cepario FQ

Éstos se reactivaron en caldo BHI incubando a 37°C/24 h, a partir del cultivo reactivado se agregaron 40 µL en 5 mL de caldo BHI, los cultivos se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y tiempo.

Tanto las BAL como los microorganismos patógenos se inocularon en 100 mL de caldo MRS al 1% del volumen del caldo a inocular. El ensayo se realizó por duplicado.

En la **Tabla 6** se muestran los controles utilizados y en la **Figura 6**, la metodología para el seguimiento del ensayo, mismo que se realizó a las 0, 6, 12 y 24 horas.

Tabla 6. Controles y diluciones utilizadas para el ensayo de supervivencia de bacterias patógenas en caldo MRS frente a las BAL.

Matraz	Microorganismo	Dilución empleada
Control positivo BAL	<i>L. plantarum</i> o <i>L. lactis</i>	10 ⁻¹
Control positivo (patógeno)	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻¹
Control positivo (patógeno)	<i>Salmonella</i> Typhimurium	10 ⁻²
Cultivo mixto 1	BAL + <i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻¹ + 10 ⁻¹
Cultivo mixto 2	BAL + <i>Salmonella</i> Typhimurium	10 ⁻¹ + 10 ⁻²

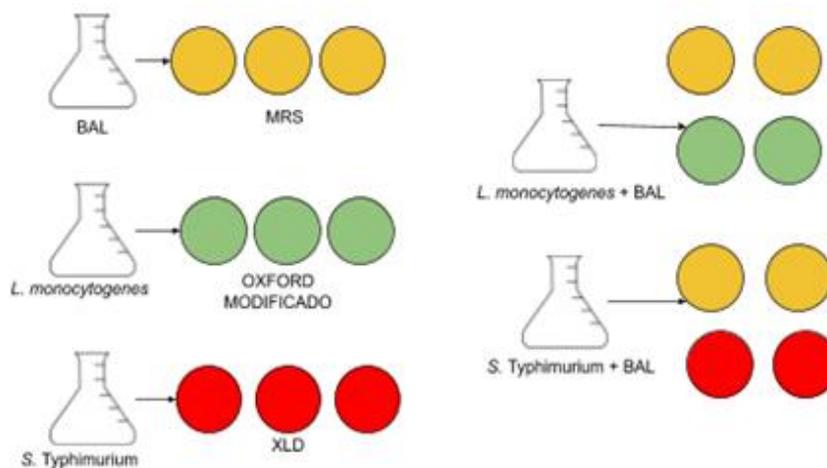


Figura 6. Ensayo de sobrevivencia de bacterias patógenas en caldo MRS frente a BAL.

Todos los matraces se incubaron bajo las mismas condiciones, 37°C/24 h.

Para el conteo en placa, se consideró un rango de 15-150 colonias características del microorganismo.

- Para BAL en agar MRS, el conteo de colonias características se describió en el punto 4.
- Para *L. monocytogenes* en agar selectivo Oxford, colonias pequeñas café oscuro con bordes redondos y halo café (**Anexo D**, Figura 2).
- Para *Salmonella* Typhimurium en agar XLD, colonias pequeñas transparentes con centro color negro con bordes redondos (**Anexo D**, Figura 3).

6. Obtención de sobrenadantes liofilizados de *L. plantarum* (17) y *L. lactis* (X).

Se reactivaron las cepas siguiendo el mismo procedimiento indicado en el punto 2, se incubó a 37°C/24 h. A partir del cultivo reactivado se inocularon 500 µL en 50 ml de caldo MRS ajustado a pH 7.5 con NaOH 1 M. Se incubó en las mismas condiciones de reactivación.

Bajo condiciones asépticas, se transfirió el cultivo obtenido a tubos para centrifuga de 50 ml (ajustando el volumen en cada uno) y se centrifugaron (centrífuga Beckman J2-21 M/E) a 10000 RPM a 4°C por 10 min. Se descartaron las células y a los sobrenadantes obtenidos se les aplicó un tratamiento, el cual se indica en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Tratamientos aplicados a sobrenadantes de los cultivos de BAL antes de liofilizar.

Sobrenadante	Tratamiento
1	Sin tratamiento
2	Tratamiento térmico (TT) 90°C/10 min
3	Ajustar a pH 7
4	Ajustar a pH 5.5
5*	TT y pH 7
6*	TT y pH 5.5

* El ajuste de pH se realizó con NaOH 1 M antes del tratamiento térmico.

Posteriormente, los sobrenadantes tratados se congelaron a -70°C/24 h en recipientes de plástico para después liofilizar a -59°C por 24 horas (liofilizadora Labconco de 12 puertos). Los sobrenadantes tratados y liofilizados se conservaron en congelación hasta su uso.

6. 1. Efecto antimicrobiano en sobrenadantes de cultivos de BAL. Prueba difusión en agar.

Se evaluó el efecto antimicrobiano de las sustancias presentes en los sobrenadantes de los cultivos liofilizados de BAL, a través de la prueba de difusión en agar. Éstos se resuspendieron en la décima parte del volumen total, es decir, el volumen liofilizado fue de 25 mL por lo que se resuspendió en 2.5 mL de agua destilada.

Microorganismos indicadores

La prueba se realizó, por duplicado, en medio BHI tamponado y no tamponado, el procedimiento de preparación se muestra en la Tabla 1 del **Anexo C**; utilizando como indicadores a los microorganismos señalados en la **Tabla 8** y se reactivaron como se describió en el punto 5.

Tabla 8. Microorganismos indicadores para prueba de difusión en agar, tiempo de incubación previo a la prueba y dilución empleada.

Microorganismo	Clave	Tiempo de incubación (h)	Dilución empleada*
<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 14028	24	10 ⁻³
<i>Listeria monocytogenes</i>	CFQ-103, cepario FQ	6	10 ⁻¹
<i>Listeria innocua</i>	Cepa 2, cepario FQ	6	10 ⁻¹

*A partir del segundo pase de reactivación.

En la **Tabla 8** también se muestra el tiempo de incubación necesario para que el microorganismo alcance su fase exponencial, es decir, alcance la máxima velocidad de crecimiento, para poder realizar el ensayo, así como la dilución utilizada para inocular en las sobrecapas.

Prueba de difusión en agar

Se siguió el procedimiento descrito por Tavera (2010). Se colocaron 4 torres de vidrio en cada placa; en la sobrecapa fundida previamente se inocularon 40 µL de la dilución establecida para cada microorganismo (Tabla 8), cuidando tener la temperatura adecuada para hacerlo, ésta se vació en la placa y se dejó solidificar, posteriormente, con pinzas estériles se retiraron las torres de vidrio. En cada pozo se agregaron 80 µL de los sobrenadantes sin tratamiento y con tratamiento, indicado en la Tabla 7, control positivo y negativo como se muestra en la **Figura 7**. Finalmente, se incubó a 37°C/24 h y se reportó la formación de halos de inhibición, diámetro en cm.

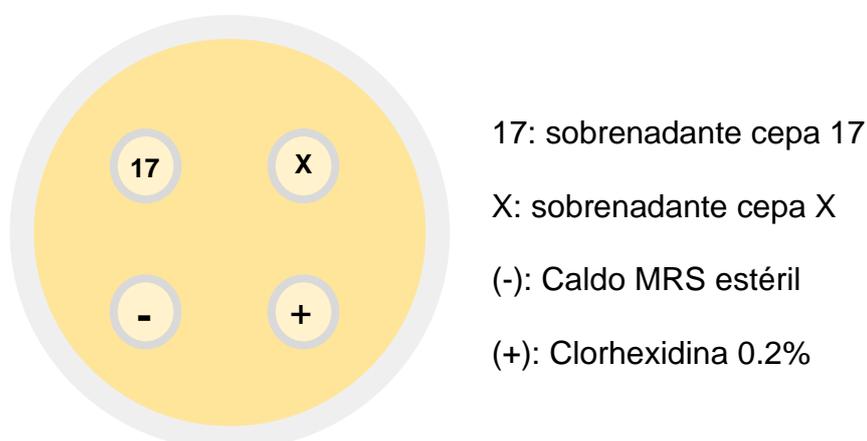


Figura 7. Distribución de las muestras evaluadas. Ensayo de difusión en agar.

7. Sobrevivencia de bacterias patógenas en los sobrenadantes liofilizados de cultivos de BAL.

Se determinó la supervivencia de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium en los sobrenadantes tratados de los cultivos de BAL. Los ensayos de supervivencia se realizaron por duplicado.

Las cepas patógenas se reactivaron en caldo BHI como se indicó en el punto 5. Para ajustar la concentración inicial de los patógenos (10^4 - 10^5 UFC/mL aproximadamente), se realizó una dilución, 0.5 ml del cultivo reactivado en 4.5 mL de solución salina 0.8%, para después inocular 40 μ L de la dilución correspondiente en los sobrenadantes de los cultivos BAL previamente resuspendidos. Para el seguimiento, se realizó una cuenta en placa, cada 3 horas, en agar BHI para *Listeria monocytogenes* y Agar selectivo XLD para *Salmonella* Typhimurium. Ambas se incubaron a 37°C/24 h. El rango de colonias considerado, así como las características de las colonias de *Salmonella* Typhimurium en agar XLD es el señalado en el punto 5.

- Para el conteo de *L. monocytogenes* en agar BHI, se tomaron en cuenta colonias pequeñas blancas o crema con bordes redondos (**Anexo D**, Figura 4).

8. Obtención de sobrenadantes de cultivos de BAL y concentración en rotavapor.

Se reactivaron las cepas de BAL siguiendo el mismo procedimiento indicado en el punto 2, se incubó a 37°C/24 h. Del cultivo reactivado se inocularon 1000 μ L en 100 ml de caldo MRS ajustado a pH 7.5. Se incubó en las mismas condiciones de reactivación.

Los cultivos obtenidos se centrifugaron utilizando las mismas condiciones del punto 6. Se descartaron las células y a los sobrenadantes se les aplicó únicamente el tratamiento térmico señalado en la **Tabla 7**. Además, se realizó el mismo procedimiento a 100 mL de caldo MRS estéril, el cual se utilizó como control.

Con el rotavapor (rotavapor IKA RV 10 digital) se concentró al 50% de su volumen con las condiciones de 72 mbar de presión, indicado para agua, y baño de agua caliente a 50°C. Después de concentrar, los sobrenadantes tratados de BAL y el medio control se guardaron en refrigeración hasta su uso.

8.1 Sobrevivencia de *L. monocytogenes* en los sobrenadantes de cultivos de BAL concentrados en rotavapor.

Se determinó la sobrevivencia de *L. monocytogenes*; la cepa se reactivó en caldo BHI como en el punto 5.

EL ensayo se realizó por duplicado; en 50 ml del sobrenadante tratado en rotavapor se inocularon 500 μL de la dilución 10^{-2} del cultivo de *L. monocytogenes* en solución salina 0.8%. De esta manera, la concentración inicial del microorganismo se ajustó a 10^3 UFC/mL. El seguimiento de *L. monocytogenes* en el sobrenadante tratado se realizó a las 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas, mediante un conteo en placa en agar BHI, como se describió previamente.

RESULTADOS

1. Selección de BAL aisladas del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.

El criterio de selección de las cepas BAL fue la presencia de actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium determinada a través de la prueba difusión en agar en medio BHI tamponado y no tamponado (Moya, 2018). Las cepas seleccionadas fueron *Lactobacillus plantarum* (clave 17) y *Lactococcus lactis* (clave X).

2. Reactivación de cepas

La viabilidad de *L. plantarum* 17 y *L. lactis* X se verificó con la observación de turbidez, formación de precipitado blanco y generación de gas, después de incubarlas en caldo MRS por 24 h a 37°C (**Figura 8**). Estos tres factores indicaron la viabilidad de las cepas, por lo tanto, se siguió con la metodología planteada.

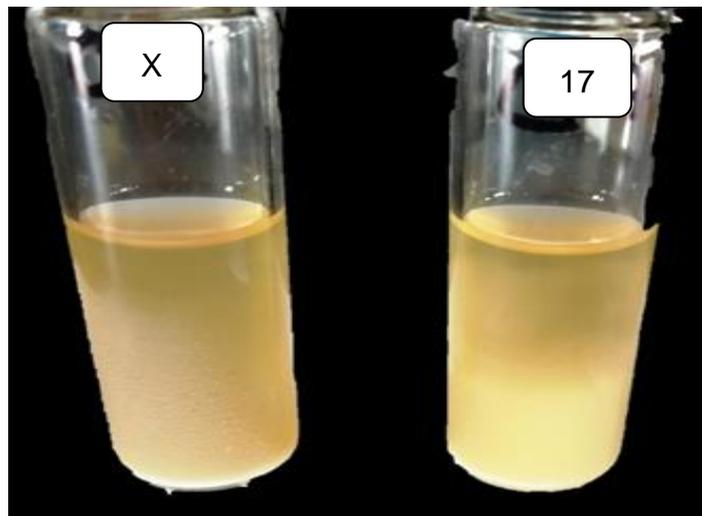


Figura 8. Crecimiento de cepas BAL, 17 y X, en caldo MRS incubado por 24 h.

3. Comprobación de pureza de las cepas

Después de 24 horas de incubación de las cepas BAL en agar MRS se realizó la observación macroscópica y microscópica de las colonias indicada en el punto 3. En la **Tabla 9** se muestran los resultados de dichas observaciones.

Tabla 9. Descripción macroscópica, en agar MRS, y microscópica a través de Tinción de Gram de *L. plantarum* (17) y *L. lactis* (X).

BAL	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
17	Colonias pequeñas, beige, bordes redondos, convexas.	Gram positivos, bacilos cortos con bordes rectos, delgados en su mayoría agrupados en cadena .
X	Colonias pequeñas, blancas-beige, brillantes, redondas, convexas.	Gram positivos, coco-bacilos cortos con bordes anchos, agrupados en cocos, diplococos, cadenas cortas .

Las características fenotípicas que nos ayudan a identificar a las BAL son colonias de tamaño grande, cremosas-brillantes, blanquecinas o beige, circulares con bordes lisos, convexas y de un tamaño que puede variar desde puntiforme hasta 2-3 mm de diámetro en agar MRS (Drider y Rivera, 2016; Ramírez, *et al.*, 2009; Zapata 2009). A través de la descripción macroscópica en agar MRS se observaron colonias con características similares a las antes mencionadas, éstas fueron homogéneas en cuanto a tamaño, color y bordes para ambas bacterias, 17 y X (**Figuras 9 y 10**).

A partir de la tinción de Gram se observó homogeneidad en el Gram para ambas bacterias, Gram positivo, esto corresponde a lo reportado en la literatura, las bacterias ácido lácticas son Gram positivas (Doyle, *et al.*, 2019; Mozzi, 2016).

Respecto a la morfología *L. plantarum* es bacilar, largos o cortos, con extremos redondeados pueden estar agrupados en pares, cadenas cortas e incluso individualmente (Ücok y Sert, 2020; Moya, 2018); *L. plantarum* 17, presentó características morfológicas similares, bacilo con bordes redondeados agrupados en cadenas (**Figura 11**). Mientras que *L. lactis* presenta morfología de coco, es decir, células ovoides, pueden agruparse en pares, o cadenas cortas (Wonyong, 2014). *L. lactis* X presentó una morfología homogénea de cocos agrupados en diplococos o cadenas cortas (**Figura 12**).

Al tener características homogéneas en la observación microscópica para cada bacteria y homogeneidad en las colonias en agar MRS, ambos cultivos se consideran puros y adecuados para los ensayos.

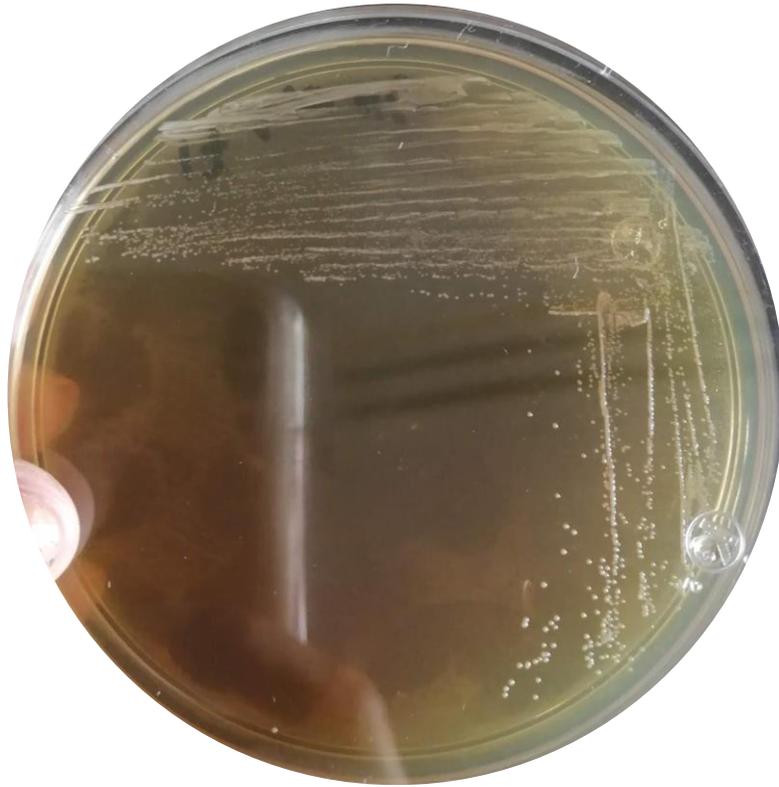


Figura 9. Colonias de *L. plantarum* 17 en agar MRS mediante técnica de estría por agotamiento.

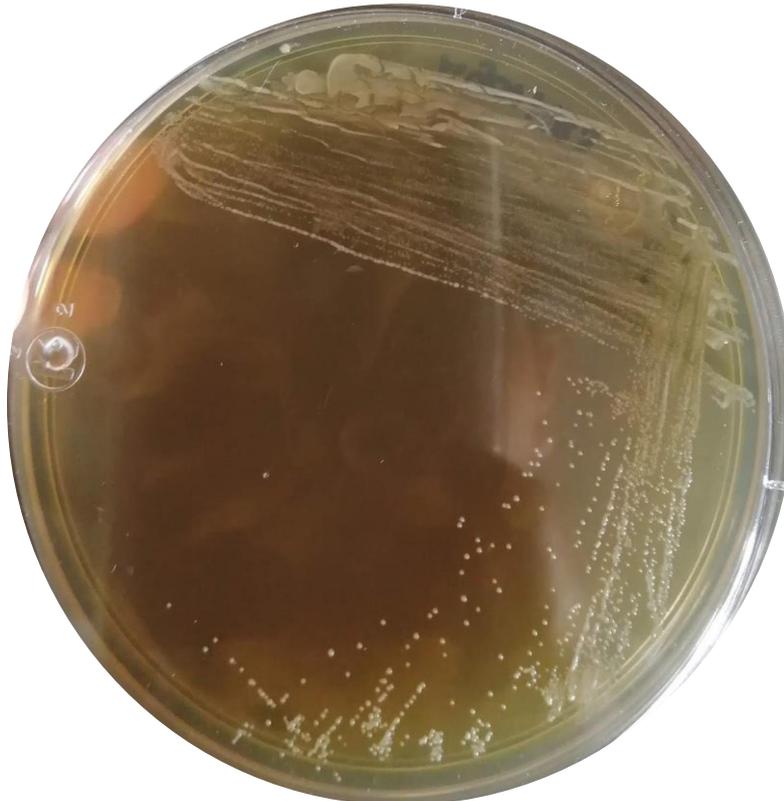


Figura 10. Colonias de *L. lactis* X en agar MRS mediante técnica de estría por agotamiento.

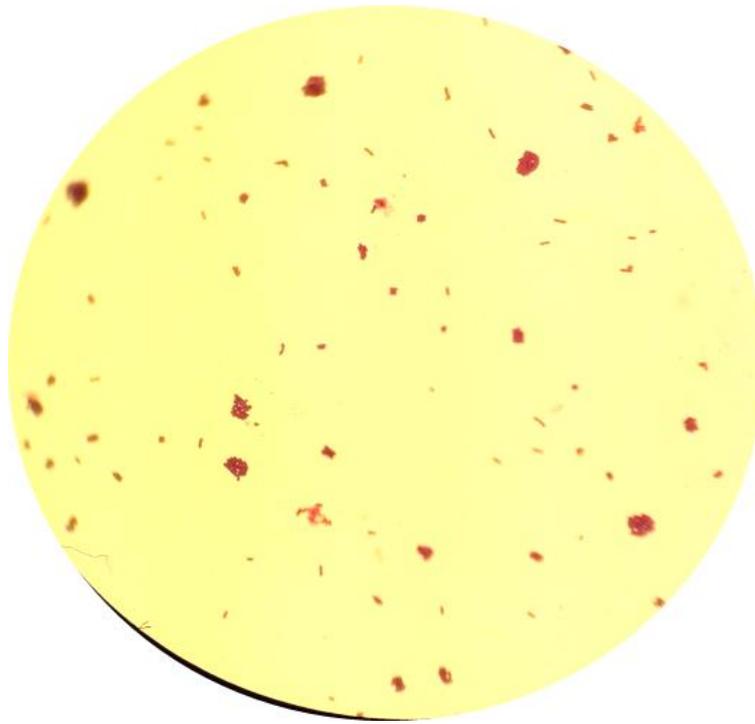


Figura 11. Observación microscópica 1000X de *L. plantarum*, 17

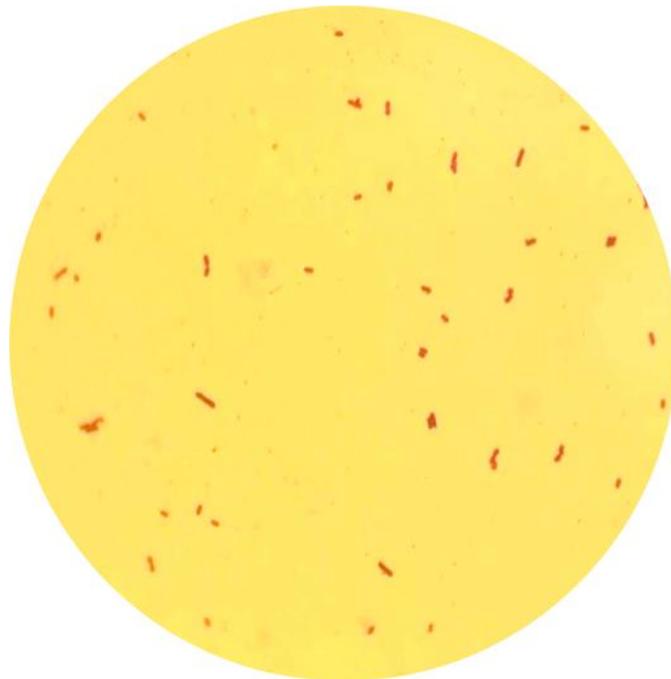


Figura 12. Observación microscópica 1000X de *L. lactis*, X.

4. Cinéticas de crecimiento a pH y temperatura diferentes.

Las BAL son bastante exigentes en cuanto a requerimientos nutricionales, un medio rico es extremadamente necesario para un buen crecimiento, la fuente de carbono es uno de los principales factores que afectan su desarrollo (Mataragas, *et al.*, 2003; Yang, *et al.*, 2018). Sosa (2019) evaluó el crecimiento de *L. lactis* cepa 115 (aislada del atole agrio de Villahermosa, Tabasco) empleando diferentes carbohidratos, glucosa, lactosa y maltosa; obteniendo un mejor crecimiento con glucosa como fuente de carbono. Además, Abbasiliasi (2017) también señala para algunas especies de BAL como *L. lactis* y *L. plantarum*, a la glucosa como fuente de carbono ya que permite su mayor crecimiento. De forma que, las fermentaciones se realizaron en medio MRS, que originalmente contiene glucosa y es apropiado para bacterias ácido lácticas, en especial el género *Lactobacillus*.

Para establecer las condiciones de crecimiento se consideró la relación directa que se ha reportado entre la producción de metabolitos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana (bacteriocinas) y el crecimiento de la bacteria (aumento de la biomasa); para *L. plantarum* y *L. lactis* se ha reportado que la producción de bacteriocinas ocurre durante la fase exponencial (Guerra y Pastrana, 2003; Londoño, 2015; Todorov y Dicks, 2005), por lo que las condiciones de crecimiento establecidas para *L. plantarum* cepa 17 y *L. lactis* cepa X fueron en función del aumento de la biomasa.

En las figuras sucesivas se muestran los resultados de crecimiento y disminución de pH de las cepas BAL en medio MRS bajo las condiciones indicadas en la **Tabla 4**.

***L. plantarum* 17**

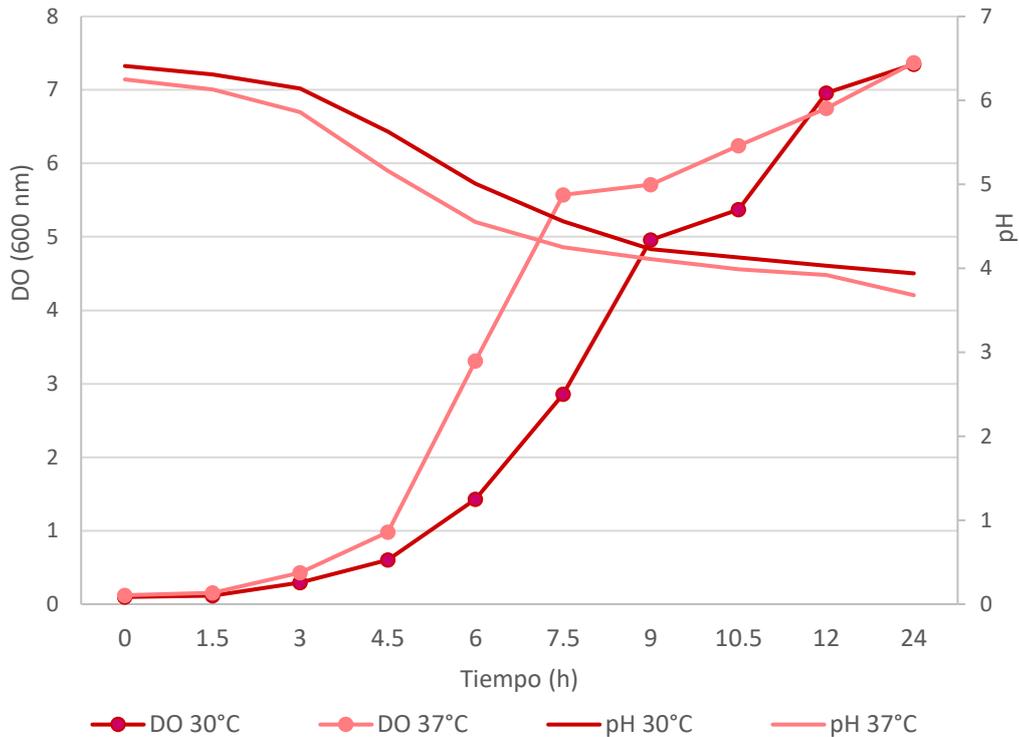


Figura 13. Efecto de la temperatura y pH en el crecimiento de *L. plantarum* (17) en caldo MRS con pH inicial 6.0. Las determinaciones se realizaron por duplicado por lo que los valores considerados son los promedios. Desviación estándar para DO 30°C (0.00-0.10); DO 37°C (0.00-0.11); pH 30° (0.00-0.10); pH 37°C (0.00-0.10).

A partir de la **Figura 13** se observó que la densidad óptica (DO) de *L. plantarum*, en medio MRS con pH inicial 6, después de 24 horas fue similar bajo las dos temperaturas ensayadas 30°C y 37°C; siendo 7.35 y 7.37, respectivamente. Sin embargo, a 30°C tomó más tiempo alcanzar esa DO, esto fue más claro después de 7.5 h, en el cultivo a 37°C la DO fue de 5.57 mientras que a 30°C fue de 2.86. Esto puede asociarse al incremento en la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas teniendo a su vez un aumento en el crecimiento (Martínez, *et al.*, 2009).

Durante la fermentación de la glucosa las bacterias ácido lácticas producen ácido láctico, entre otros metabolitos, lo que se refleja en la caída del pH del medio, es decir, la acidificación del medio. También en la **Figura 13** se aprecia el descenso en el valor del pH del medio después de 24 h, tanto el cultivo incubado a 30°C como a 37°C el pH disminuyó a valores similares; 3.94 y 3.68, respectivamente, pero el descenso del

pH fue ligeramente más rápido a mayor temperatura. Como se mencionó, el crecimiento es más acelerado a mayor temperatura por lo que al tener mayor concentración de bacteria ácido láctica la producción de ácido láctico también aumenta reflejándose directamente en un pH menor.

Generalmente, las bacterias ácido lácticas reducen el pH a valores cercanos a 4 (Da Silva Sabo, *et al.*, 2014). En diferentes ensayos en medio MRS para *L. plantarum* aislados de diferentes alimentos se ha reportado valores de pH finales entre 3.7 y 3.9 (Todorov, *et al.*, 2000; Todorov y Dicks, 2005; Todorov y Dicks, 2006). Con las dos temperaturas evaluadas *L. plantarum* 17 acidificó el medio a valores cercanos. Al tener mayor crecimiento a 37°C la acidificación ocurrió más rápido; después de 6 horas el pH a 37°C fue de 4.55 mientras que a 30°C de 5.01.

Se estableció que la temperatura óptima para *L. plantarum* 17 en medio MRS con pH inicial de 6 fue 37°C, ya que la DO durante la fase exponencial fue mayor a partir de 4.5 h y como consecuencia la acidificación del medio fue más rápida.

Considerando esta temperatura se comparó el crecimiento con un cultivo con pH inicial ajustado a 7.5, para determinar si a pH mayor del medio, *L. plantarum* podía crecer mejor ya que, el pH inicial del medio influye notablemente en la biomasa producida, así como de bacteriocina (Barman, *et al.*, 2018; De Vuyst y Leroy, 2007; Guerra y Pastrana, 2003). En la **Figura 14** se muestra la cinética de crecimiento obtenida.

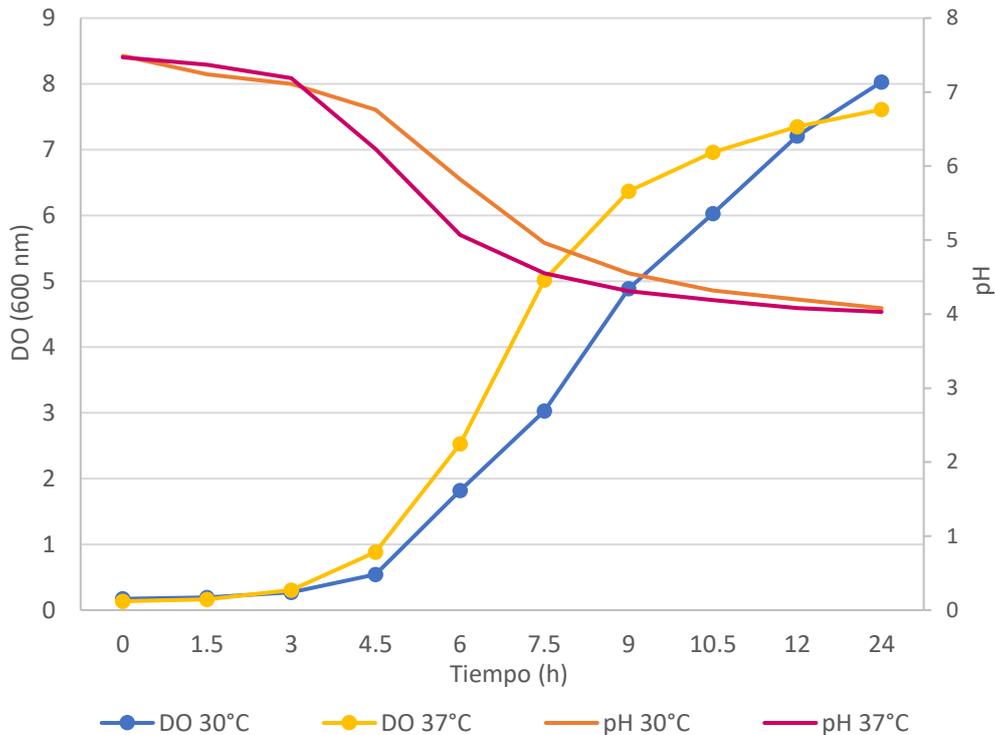


Figura 14. Efecto de la temperatura y pH en el crecimiento de *L. plantarum* (17) en caldo MRS con pH inicial 7.5. Las determinaciones se realizaron por duplicado por lo que los valores considerados son los promedios. Desviación estándar para DO 30°C (0.00-0.10); DO 37°C (0.00-0.11); pH 30°C (0.00-0.10); pH 37° (0.00-0.10).

A través de las dos cinéticas de crecimiento obtenidas, pH inicial 6.0 y 7.5, (**Figuras 13 y 14**) se observó que la fase exponencial de *L. plantarum* 17 inició a partir de 4.5 h de incubación bajo las dos condiciones de temperatura evaluada.

A partir de la **Figura 14** se observó también que a mayor temperatura el crecimiento fue mayor; y que la fase exponencial se mantuvo por más tiempo, por ejemplo, después de 10.5 h de incubación en el medio con pH inicial ajustado a 7.5 se registró una DO de 6.96 mientras que en el medio con pH sin ajustar fue de 6.24.

La acidificación del medio incubado a 37°C fue de 4.03, es decir, la acidificación del medio fue buena, en 24 h logró un valor de pH similar al del medio con pH de 6; el crecimiento de *L. plantarum* 17 fue adecuado, por ende, la acidificación del medio. La disminución de pH es relevante debido a que está asociada con la inhibición de enterobacterias (Väkeväinen, *et al.*, 2020).

Considerando que el rápido crecimiento de un cultivo iniciador durante la fermentación a menudo inhibe el crecimiento de patógenos transmitidos por alimentos (Doyle, *et al.*, 2019), se estableció que para *L. plantarum* 17 las condiciones óptimas de crecimiento fueron 37°C y pH 7.5, porque mantuvo la fase exponencial de crecimiento por más tiempo, alcanzó una DO de 7.61 después de 24 h y la disminución de pH a 4.03.

Resultados similares fueron reportados por Yang (2018), quien estableció que el pH óptimo para el crecimiento de dos BAL pertenecientes a la familia Lactobacillaceae, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus paracasei*, en medio MRS fue pH 7.4. Mientras que la temperatura que permitió mayor crecimiento fue 37°C; la combinación de un pH inicial más alto y mayor temperatura de incubación en el medio da como resultado un mejor crecimiento (mayores valores de DO) y mayores recuentos de células viables.

L. lactis X

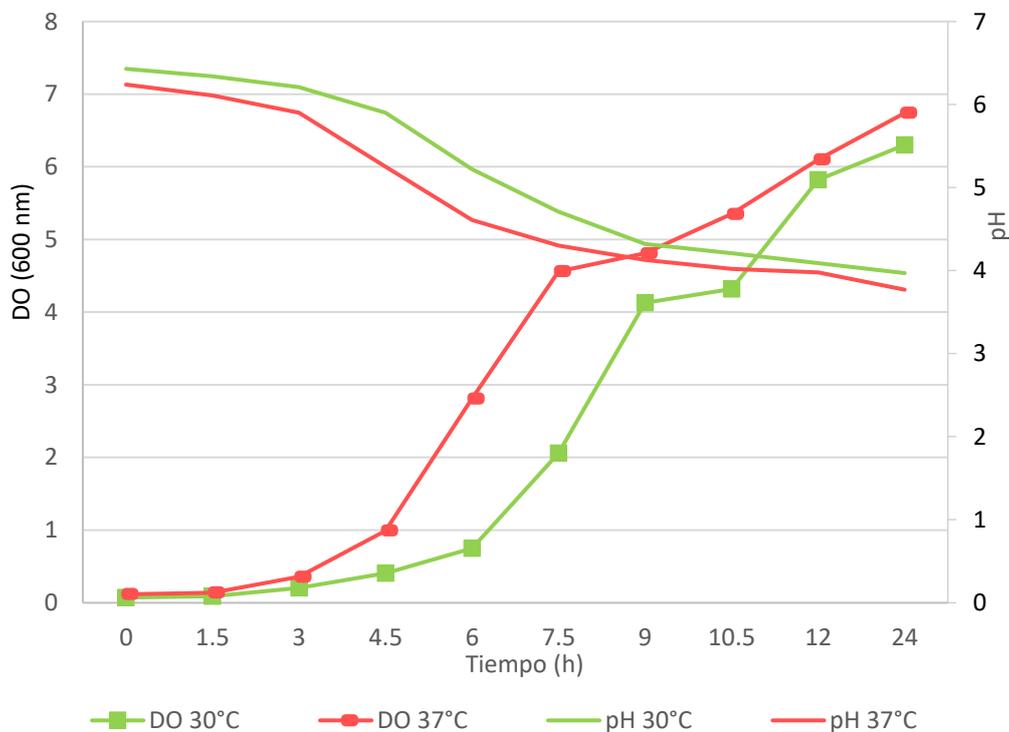


Figura 15. Efecto de la temperatura y pH en el crecimiento de *L. lactis* (X) en caldo MRS con pH inicial 6.0. Las determinaciones se realizaron por duplicado por lo que los valores considerados son los promedios. Desviación estándar para DO 30°C (0.00-0.11); DO 37°C (0.00-0.11); pH 30°C (0.00-0.10); pH 37° (0.00-0.10).

Al comparar el crecimiento de *L. lactis X* (**Figura 15**) entre 37°C y 30°C conservando el pH de 6 en el medio, se observó que la DO final fue similar con ambas temperaturas, a 37°C fue de 6.74 y a 30°C de 6.30. Sin embargo, a 37°C el crecimiento fue más rápido, al tiempo 7.5 h, a 37°C se registró una DO de 4.56 mientras que a 30°C de 2.06.

Al igual que para *L. plantarum* 17, la temperatura que permitió un mejor crecimiento de *L. lactis X* fue 37°C. Considerando que las bacterias ácido lácticas reducen el pH a valores cercanos a 4 (Da Silva Sabo, *et al.*, 2014), *L. lactis X* acidificó el medio de 6 a 3.77 después de 24 h.

Finalmente, se evaluó el crecimiento con pH inicial del medio MRS a 7.5, mediante la **Figura 16**, se aprecia ligeramente un mayor crecimiento a 37°C, después de 24 horas la DO fue de 7.54 mientras que a 30°C de 7.84, pero a 37°C el crecimiento fue más rápido, después de 6 horas la DO fue de 2.17 mientras que a 30°C de 0.87.

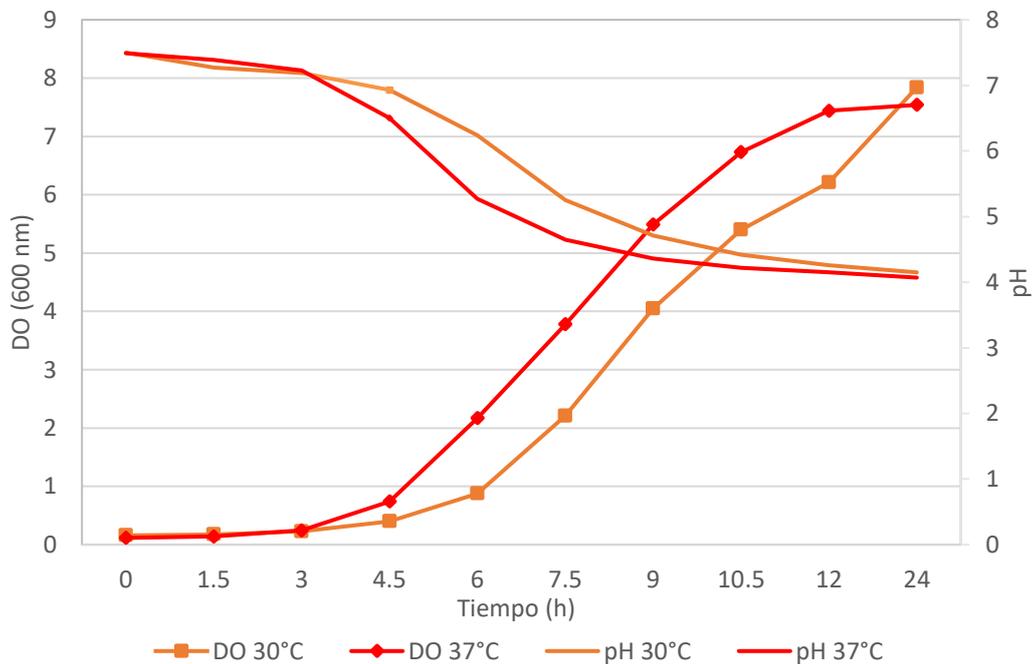


Figura 16. Efecto de la temperatura y pH en el crecimiento de *L. lactis X* en caldo MRS con pH inicial 7.5. Las determinaciones se realizaron por duplicado por lo que los valores considerados son los promedios. Desviación estándar para DO 30°C (0.00-0.10); DO 37°C (0.00-0.11); pH 30°C (0.00-0.10); pH 37°C (0.00-0.10).

Además, al tener mayor DO la acidificación del medio es más notoria en el lapso de 3 h a 4.5 h, a 37°C el valor de pH disminuyó de 7.23 a 6.5; mientras que a 30°C fue de 7.19 a 6.93 en el mismo tiempo.

Por lo que, se estableció que las condiciones óptimas de crecimiento en medio MRS para *L. lactis* X, también fueron 37°C y pH 7.5.

En la bibliografía se han reportado resultados similares en medio MRS, *L. lactis* puede crecer adecuadamente en un rango de temperatura de 30-37°C (Souza, *et al.*, 2017), mientras que Sosa (2018) reportó para una cepa de *L. lactis* cepa 115 aislado del atole agrio de Villahermosa, Tabasco un pH óptimo de 7.5 y 30°C. Mientras que Barman (2018) reportó para tres cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* aisladas de leche fermentada (buttermilk) un intervalo de pH óptimo para su crecimiento de 5-7 y 28°C; Akbar (2019) para *L. lactis* subsp. *lactis* aislado de leches fermentadas reportó un mejor crecimiento a pH 7 y temperatura 37°C.

El crecimiento de ambas BAL también se evaluó mediante cuenta en placa (**Anexo B**, Figuras 1 y 2). Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados anteriormente, a través de la medición de la DO a 600 nm. De forma que se corroboró que las condiciones óptimas de crecimiento fueron 37°C y pH 7.5.

5. Sobrevivencia de patógenos en caldo MRS

La sobrevivencia en caldo MRS se llevó a cabo con el objetivo de determinar si las BAL son capaces de inhibir a los microorganismos patógenos durante su crecimiento simultáneo en el mismo medio, MRS.

5.1 Frente a *L. plantarum* (17)

En la **Figura 17**, se presenta el crecimiento simultáneo de *Listeria monocytogenes* y *L. plantarum*, cultivo mixto, así como individualmente, controles. Se inocularon en medio MRS con pH inicial de 7.5, debido a las condiciones óptimas de crecimiento para *L. plantarum* 17, en una concentración inicial de 10⁵-10⁶ UFC/mL. Se puede observar que, a partir de 12 horas, *L. plantarum* 17 tuvo un efecto inhibitorio frente a *L. monocytogenes*, la concentración fue de 6.93 Log UFC/mL mientras que en el

control (curva verde) fue de 8.46 Log UFC/mL. Después de 24 horas hubo una inhibición total de *L. monocytogenes* (curva azul), en la gráfica se reportó como cero.

Por ende, cuando *Listeria monocytogenes* y *L. plantarum* 17 están presentes en el mismo medio sí hay un descenso en su concentración incluso una inhibición total del microorganismo patógeno después de 24 h mientras que la BAL no es afectada, el crecimiento fue similar al del control (curva naranja).

El efecto inhibitorio sobre el microorganismo patógeno puede atribuirse a la posible producción de bacteriocinas. Teniendo en cuenta que diferentes estudios han identificado distintas bacteriocinas producidas por *L. plantarum* generalmente llamadas plantaricinas, varias de ellas muestran un efecto inhibitorio frente a bacterias Gram positivas como *L. monocytogenes*, además de bacterias pertenecientes al mismo género (Choi, *et al.*, 2000; Chen, *et al.*, 2014; Londoño, *et al.*, 2015). Al mismo tiempo de la producción de otros metabolitos como ácidos orgánicos y H₂O₂.

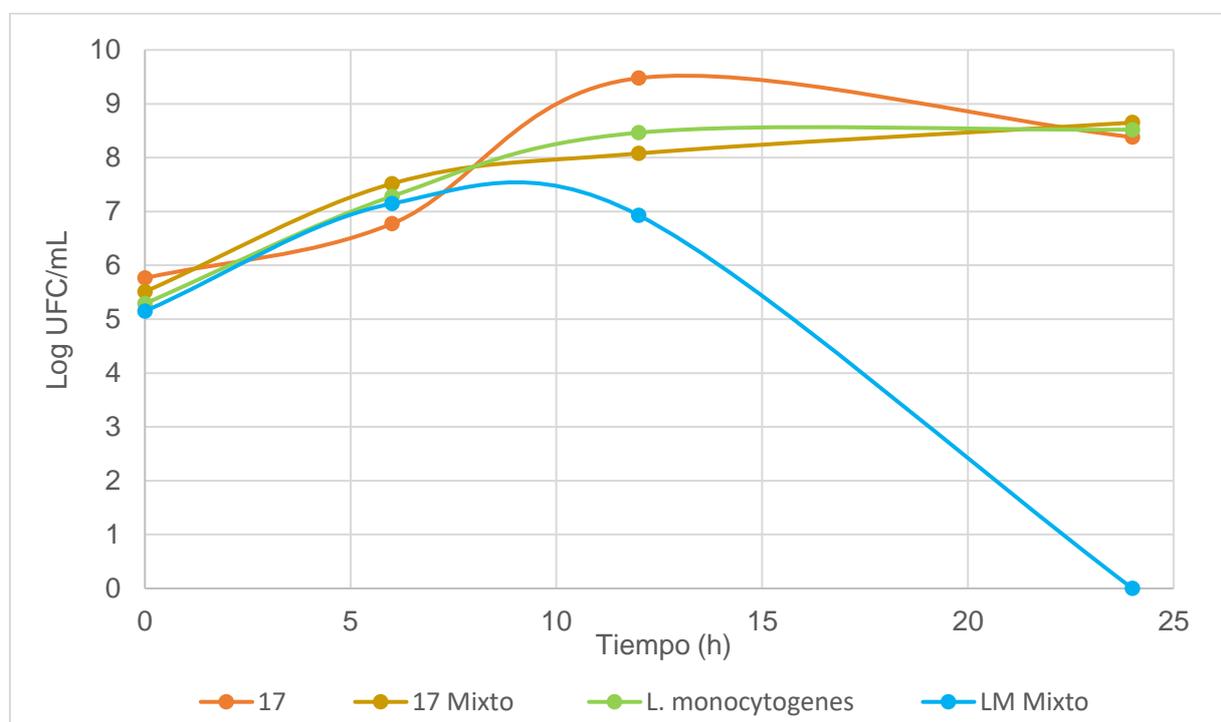


Figura 17. Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en caldo MRS frente a *L. plantarum* (17) a 37°C, pH inicial del medio 7.5. El ensayo se realizó por duplicado por lo que los valores considerados son los promedios de Log UFC/mL para cada tiempo. Desviación estándar para 17 (0.0-0.25); 17 Mixto (0.0-0.19); *L. monocytogenes* (0.0-0.30); LM Mixto (0.0-0.78).

El pH óptimo para *L. monocytogenes* es de 6-8 aunque puede adaptarse a pH de 4.4 (Bell y Kyriakides, 2009; Doyle, *et al.*, 2019; Porto-Fett, *et al.*, 2010), en la **Figura 14** se mostró la disminución del pH, en medio MRS a 37°C por parte de *L. plantarum*, a 4.08 transcurridas 12 h, esto pudo ser otro factor que inhibió el desarrollo de *L. monocytogenes* ya que el medio no fue el óptimo. De ahí que, en el ensayo de sobrevivencia, **Figura 17**; después de 12 h se advirtiera una disminución en la concentración de *L. monocytogenes*.

De manera que, *L. plantarum* cepa 17, sí tuvo un efecto antimicrobiano frente a *L. monocytogenes* después de 24 horas en medio MRS.

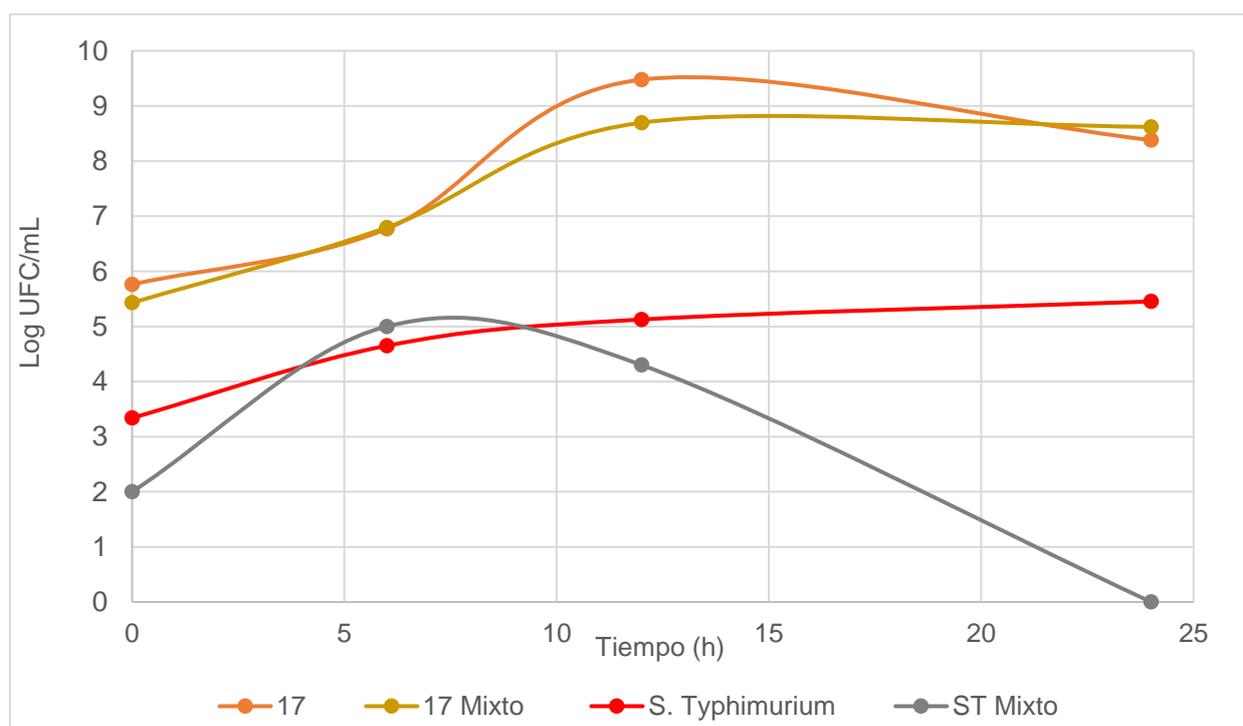


Figura 18. Sobrevivencia de *S. Typhimurium* en caldo MRS frente a *L. plantarum* (17) a 37°C, pH inicial del medio 7.5. El ensayo se realizó por duplicado por lo que los valores considerados son los promedios de Log UFC/mL para cada tiempo. Desviación estándar para 17 (0.0-0.25); 17 Mixto (0.0-0.19); *S. Typhimurium* (0.0-0.57); ST Mixto (0.0-0.35).

En ambos ensayos, **Figuras 17 y 18**, el control de *L. plantarum* (17) mostró un crecimiento exponencial y alcanzó la mayor concentración a las 12 h. En cambio, en los cultivos mixtos en el mismo tiempo la concentración de la BAL fue menor, esto se

puede asociar a la competencia por los nutrientes del medio lo que se reflejaría en un crecimiento lento.

En la **Figura 18** se observa el crecimiento de *L. plantarum* 17 con concentración inicial de 10^5 - 10^6 y *S. Typhimurium* (10^2 - 10^4). *L. plantarum* 17 también ejerció un efecto antimicrobiano frente a *S. Typhimurium* a partir de 12 h (curva gris) y después de 24 h *S. Typhimurium* no presentó crecimiento en el medio selectivo XLD por lo que se consideró como cero en la curva. En cambio, en el control (curva roja) se tuvo una concentración final de 5.45 Log UFC/mL.

De manera que, sí hubo inhibición del crecimiento de *S. Typhimurium* frente a *L. plantarum* 17 en caldo MRS después de 24 horas.

El pH óptimo para *Salmonella* es de 6.5-7.5 (Bailey, *et al.*, 2010; Bell y Kyriakides, 2009) y como se indicó *L. plantarum* 17 disminuye el valor de pH a 4.08 después de 12 h (**Figura 14**); lo que facilitaría el efecto antagonista de *L. plantarum* 17 frente a *S. Typhimurium* al interrumpir la conservación del potencial de la membrana celular (Kavitha, *et al.*, 2020). Se ha visto que el ácido acético, propiónico, butírico y láctico tienen un mayor poder bacteriostático y pueden impedir el crecimiento de *Salmonella* a pH inferiores a 5 a diferencia de ácidos inorgánicos como el HCl que permiten el crecimiento hasta valores de pH cercanos a 4 (Esquivel, 2016).

Así que, el efecto inhibitorio pudo basarse en la producción de posibles bacteriocinas, así como, por el ambiente ácido inducido por la BAL durante la fermentación de glucosa.

Tavera (2010) reportó una prueba de reto de una BAL aislada del pozol que previamente se demostró, a través de una prueba de difusión en agar, su efecto antimicrobiano frente a *S. Typhimurium*. Esta cepa identificada como 77g, al estar presente en el cultivo MRS frente a *S. Typhimurium* mostró un descenso en la concentración del microorganismo patógeno registrando una inhibición completa en el medio después de 12 horas de incubación a 37°C; mientras que en el control de *S. Typhimurium* hubo crecimiento durante todas las etapas del seguimiento.

Además, Barman (2018) señala que dentro de las BAL los *Lactobacillus* especialmente *L. plantarum* tiene un buen poder bacteriocinogénico y es activo frente

a bacterias Gram negativas, ya que mostró un efecto inhibitorio frente a *Salmonella* spp. en productos lácteos y frutas.

5.2 Frente a *Lactococcus lactis* X.

En la **Figura 19** se muestra el crecimiento de *L. lactis* frente a *L. monocytogenes*, se inocularon en medio MRS pH 7.5, condiciones óptimas de crecimiento para *L. lactis* establecidas en el punto 4. La concentración inicial de los dos microorganismos se ajustó entre 10^4 - 10^6 UFC/mL.

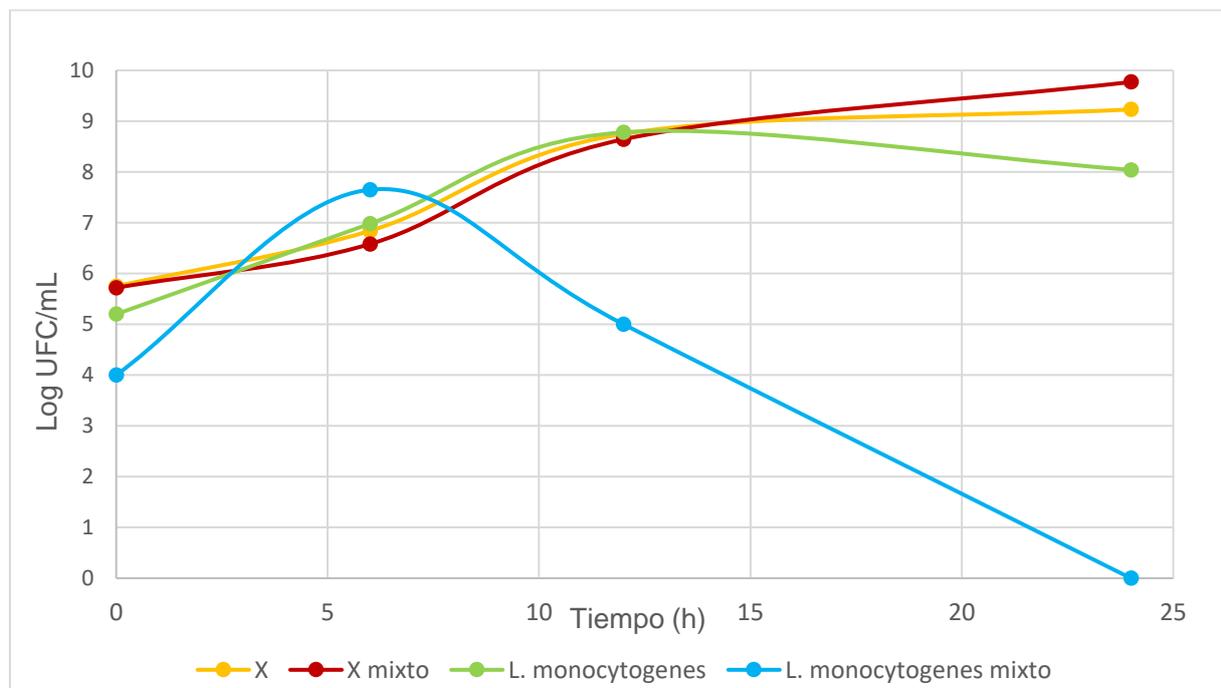


Figura 19. Sobrevivencia de *L. monocytogenes* en caldo MRS frente a *L. lactis* (X) a 37°C pH inicial del medio 7.5. (El ensayo se realizó por duplicado por lo que los valores considerados son los promedios de Log UFC/mL para cada tiempo). Desviación estándar para X (0.0-0.55); X Mixto (0.0-0.55); *L. monocytogenes* (0.0-0.54); LM Mixto (0.0-0.35).

Se observó que a partir de 12 h *L. lactis* (X) también tuvo un efecto inhibitorio frente a *L. monocytogenes* (curva azul), la concentración fue de 5.0 Log UFC/mL, mientras que en el control (curva verde) de 8.78 Log UFC/mL. Después de 24 horas hubo una inhibición total de *L. monocytogenes* (curva azul), es decir, no hubo crecimiento en el medio selectivo Oxford, lo cual se reportó como cero.

En el cultivo control de *L. lactis* (X) (curva amarilla) hubo crecimiento adecuado durante las 24 horas, así como en el cultivo mixto (curva café), no se vio afectado por la presencia del microorganismo patógeno.

De modo que, cuando *Listeria monocytogenes* y *L. Lactis* X están presentes en el mismo medio sí hay un descenso en su concentración incluso una inhibición total del microorganismo patógeno después de 24 h.

Maldonado (2016) mostró para dos cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*, aisladas del atole agrio de Villahermosa, Tabasco, cepas 115 y 103, a través de una prueba de reto en medio MRS frente a *L. monocytogenes* el efecto antimicrobiano, en el cultivo mixto a las 12 h de incubación ambas cepas lograron la inhibición total del microorganismo patógeno mientras que en el control de *L. monocytogenes* a las 12 h se alcanzó el mayor crecimiento (10 Log UFC/mL).

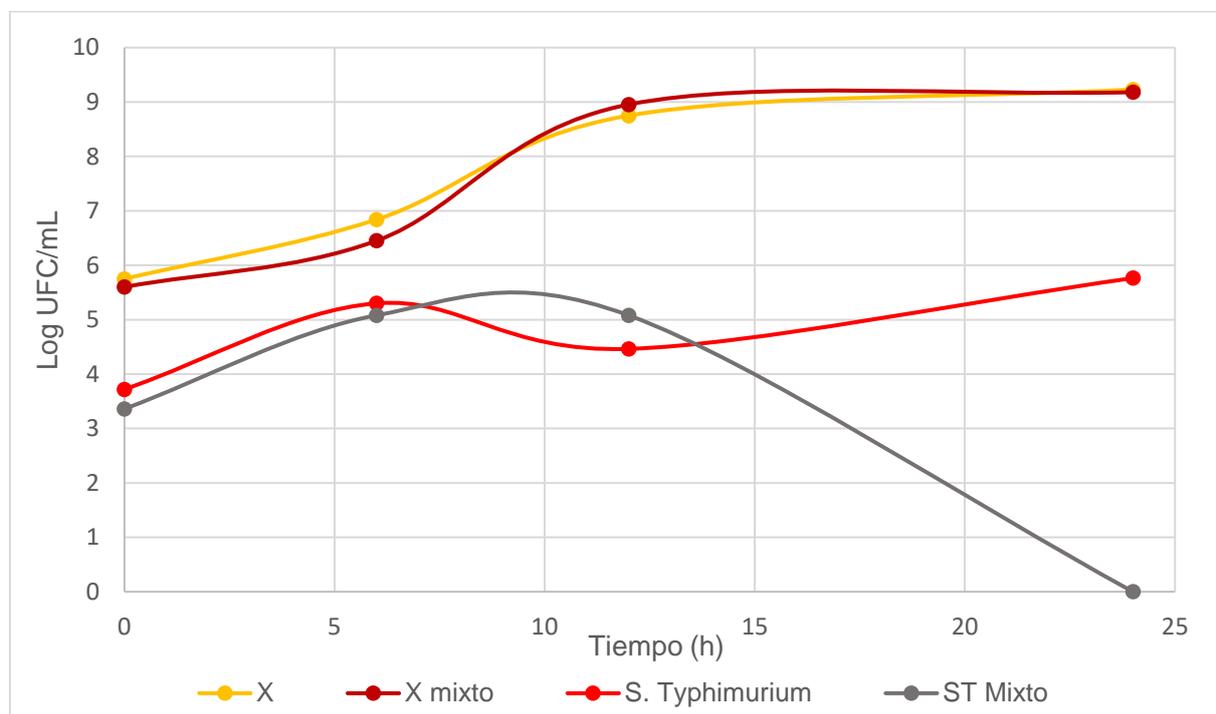


Figura 20. Sobrevivencia de *S. Typhimurium* en caldo MRS frente a *L. lactis* (X) a 37°C pH inicial del medio 7.5. El ensayo se realizó por duplicado por lo que los valores considerados son los promedios de Log UFC/mL para cada tiempo. Desviación estándar para X (0.0-0.55); X Mixto (0.0-0.55); *S. Typhimurium* (0.0-0.33); ST Mixto (0.0-0.35).

Finalmente, en la **Figura 20** se presenta el crecimiento mixto de *S. Typhimurium* y *L. lactis* X, así como los controles. La concentración inicial del microorganismo patógeno fue de 10^3 - 10^4 UFC/mL, mientras que para *L. lactis* X fue de 10^5 - 10^6 UFC/mL.

En el cultivo mixto también hubo una inhibición de *S. Typhimurium* por *L. lactis* después de 24 h de incubación. Al igual que para *L. plantarum* 17, el efecto antimicrobiano se puede asociar a la acidificación del medio y por posibles bacteriocinas. En la **Figura 16** se observó que *L. lactis* a 37°C acidificó el medio a 4.07 después de 24 h, el efecto antimicrobiano también pudo ser influenciado por el valor de pH del medio porque tanto *L. plantarum* 17 como *L. lactis* X fermentan a la glucosa produciendo ácido láctico causando un descenso en el pH del medio, lo que pudo afectar la membrana exterior de *S. Typhimurium*. Por ejemplo, se ha reportado que altas concentraciones de ácido láctico sensibilizan a las bacterias Gram negativas y permite la acción de la nisina (Alakomi, *et al.*, 2000), es decir, la capacidad de permeabilización del ácido láctico puede potenciar la actividad antimicrobiana de otros componentes contra las bacterias Gram negativas.

Resumiendo, *L. plantarum* 17 y *L. lactis* X sí tuvieron un efecto bacteriostático frente a *S. Typhimurium* (Gram negativa) y *L. monocytogenes* (Gram positiva) a partir de las 12 h, siendo inhibidas totalmente en 24 h.

6. Efecto antimicrobiano. Prueba difusión en agar.

En la **Tabla 10** se muestran los resultados del efecto antimicrobiano de los sobrenadantes liofilizados (SN) de los cultivos de cepas 17 y X frente a bacterias patógenas presentes en alimentos, *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* además de *Listeria innocua*. La prueba se realizó por duplicado, se indican los valores promedio de los halos de inhibición en cm para ambas cepas.

Tabla 10. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes liofilizados de cultivos de cepas BAL, **sin** tratamiento térmico y **sin** ajuste de pH, frente a bacterias patógenas presentes en alimentos.

Cepa	<i>Salmonella</i> Typhimurium		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Listeria innocua</i>	
	BHI tamponado	BHI no tamponado	BHI tamponado	BHI no tamponado	BHI tamponado	BHI no tamponado
17	1.6 ± 0.05	1.8 ± 0.0	1.6 ± 0.1	2.3 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.7 ± 0.25
X	1.5 ± 0.0	1.7 ± 0.05	1.5 ± 0.05	2.4 ± 0.05	1.7 ± 0.1	2.8 ± 0.15
(+) *	1.8 ± 0.0	1.7 ± 0.1	2.6 ± 0.0	2.3 ± 0.0	2.7 ± 0.15	2.4 ± 0.05

*Control positivo, clorhexidina 0.2%.

Como parte de la segunda etapa, se obtuvieron los sobrenadantes de los cultivos de BAL por centrifugación, bajo las condiciones de mejor crecimiento.

Para la prueba se utilizó como control positivo clorhexidina 0.2%, ya que posee una gran actividad bactericida frente a bacterias Gram positivas y negativas, además entra en acción rápidamente (Bilbao, 2009). Mientras que el caldo MRS estéril fue el control negativo ya que éste tiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos a evaluar.

De acuerdo con los resultados de la **Tabla 10**, los sobrenadantes obtenidos del cultivo de las cepas 17 y X sin tratamiento mostraron actividad antimicrobiana frente a los tres microorganismos evaluados; siendo mayor en el medio no tamponado. Esto puede deberse a que las BAL además de producir bacteriocinas producen otros metabolitos como ácidos orgánicos, etanol, diacetilo (Donghui, *et al.*, 2020; Fuentes, 2017), como se mencionó anteriormente, y al no adicionar sales de fosfato (medio no tamponado) como amortiguador de pH, hay mayor acidificación del medio, por ácidos orgánicos y como consecuencia mayor efecto antimicrobiano ya que la reducción en el pH es un factor importante para la inhibición del crecimiento de microorganismos no deseados. El bajo pH hace que los ácidos orgánicos sean liposolubles, lo que les permite atravesar la membrana celular y alcanzar el citoplasma de los patógenos, además, de la capacidad de permeabilización del ácido láctico en bacterias Gram

negativas que permitiría la acción de posibles bacteriocinas (Fernández, *et al.*, 2014; Özcelik, *et al.*, 2016).

En la **Figura 21** se muestran los halos de inhibición frente a *Listeria monocytogenes*, se observaron halos opacos, lo que indicó un efecto bacteriostático, es decir, evitó el crecimiento y multiplicación de las bacterias (Prescott, 2004), mientras que en el control positivo fue un halo translucido, es decir, un efecto bactericida ocasionó la muerte de *L. monocytogenes*. En medio tamponado hubo también un efecto bacteriostático pero los halos de inhibición tanto de *L. plantarum* 17 como *L. lactis* X fueron menores, aproximadamente 1 cm, comparado con el control, 2.6 cm; y los halos en medio no tamponado.



Figura 21. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de cepas BAL, sin tratamiento térmico, frente a *Listeria monocytogenes* en medio no tamponado NT (izquierda) y tamponado (derecha). (+) control positivo clorhexidina 0.2%; (-) control negativo caldo MRS estéril.

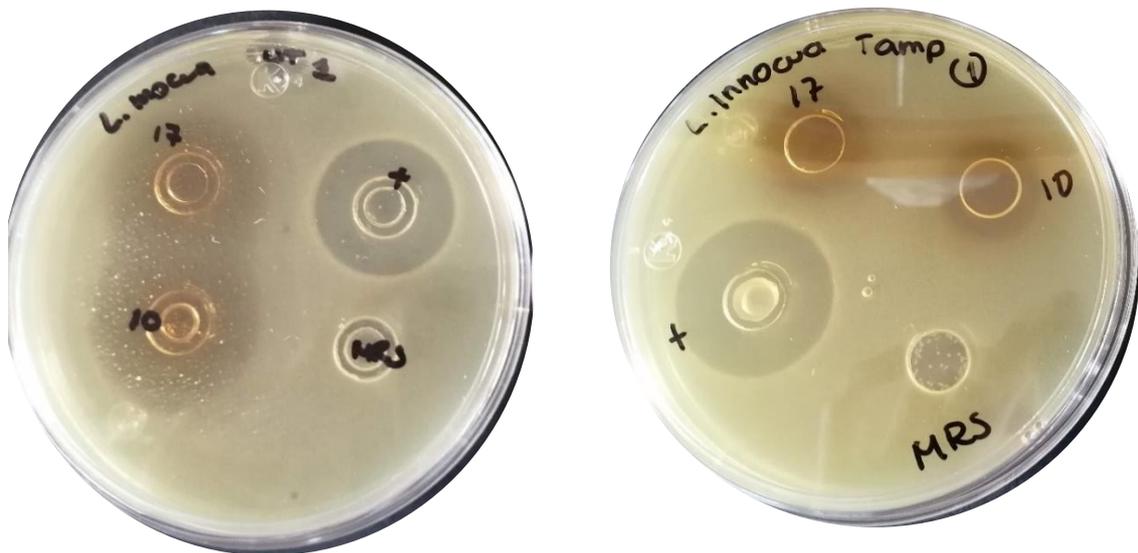


Figura 22. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de cepas BAL, sin tratamiento térmico, frente a *Listeria innocua* en medio no tamponado NT (izquierda) y tamponado (derecha). (+) control positivo clorhexidina 0.2%; (-) control negativo caldo MRS estéril.

El ensayo se realizó frente a *Listeria innocua* (Figura 22) que, aunque no tiene carácter patógeno es una bacteria muy sensible a diversas bacteriocinas y su presencia en plantas procesadoras de alimentos puede indicar la probable presencia de patógenos como *L. monocytogenes* (microbewiki, 2019). Tanto *L. plantarum* 17 y *L. lactis* X tuvieron un efecto bacteriostático frente a *L. innocua*.



Figura 23. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de cepas BAL, sin tratamiento térmico, frente a *Salmonella* Typhimurium en medio no tamponado NT (izquierda) y tamponado (derecha). (+) control positivo clorhexidina 0.2%; (-) control negativo caldo MRS estéril

Para *S. Typhimurium* (**Figura 23**) los halos fueron translúcidos lo que indica un efecto bactericida (provoca la muerte del microorganismo) por parte de *L. plantarum* (17) y *L. lactis* (X); el halo de inhibición en medio tamponado fue igual para las dos BAL, 1.5 cm, cercano al control, 1.8 cm, mientras que en el medio NO tamponado (NT) fue ligeramente mayor, *L. plantarum* (17) 1.8 cm y *L. lactis* (X) 1.7 cm, similar al control en este medio, que fue de 1.8 cm.

Por lo tanto, los sobrenadantes sin tratamiento térmico y sin ajuste de pH obtenidos de los cultivos de las cepas de BAL, *L. plantarum* (17) y *L. lactis* (X), sí tuvieron efecto antimicrobiano frente *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *S. Typhimurium*.

Moya (2018) mostró resultados similares de los sobrenadantes de *L. plantarum* (17) y *L. lactis* (X), el efecto antimicrobiano fue mayor en medio NO tamponado frente a los dos patógenos. De modo que, se constató el efecto antimicrobiano de las dos BAL, aisladas del atole agrio, frente a estos dos patógenos de importancia alimentaria.

Además, Choi (2000) mostró a través de una prueba de difusión en agar que el sobrenadante sin tratamiento térmico de *L. lactis*, aislada del kimchi, tuvo un efecto antimicrobiano frente *L. monocytogenes* y también frente bacterias Gram negativas como *S. Typhi*.

En segundo lugar, se evaluó la actividad antimicrobiana con los sobrenadantes ajustados a pH 5.5 sin tratamiento térmico. El efecto antimicrobiano se perdió totalmente frente a los tres microorganismos indicadores, únicamente hubo halo de inhibición en el control positivo **Figura 24**.

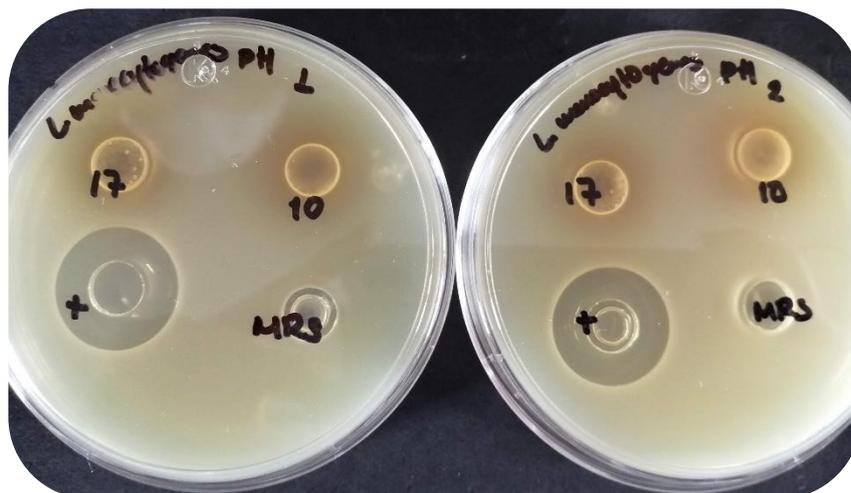
Väkeväinen (2018) reportó para los sobrenadantes sin tratamiento térmico de dos cepas de *L. plantarum* (IL411 y A1MM10) y dos cepas de *L. lactis* (IL511 y A1MS3) aislados del atole agrio de Villahermosa, Tabasco, con pH 4, actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* y otras bacterias Gram negativas mientras que a pH 7 dicha actividad se perdió. A su vez, Esquivel (2016) mostró que los sobrenadantes de *L. plantarum* y *L. lactis*, aisladas durante la fermentación también del atole agrio, tuvieron una mayor inhibición frente a *L. monocytogenes* a pH 4, en comparación con los sobrenadantes ajustados a pH 7. Lo mismo sucedió para la bacteria Gram negativa, *Salmonella infantis*.

Luego, Zapata (2009) indicó que la actividad antimicrobiana del sobrenadante de *L. plantarum* (LPBM10) aislado de leche fermentada se mantuvo activo a pH de 3.6-5.4 con un máximo a pH 4.2; con actividad reducida encima de pH 6.0, frente a *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*. Considerando la presencia de la bacteriocina LPBM10 en el sobrenadante, la dependencia del pH sobre la actividad antimicrobiana puede ser reflejo de la protonación de un aminoácido titulable, como se observa en algunos lantibióticos.

Para otras bacteriocinas producidas por *L. lactis*, sustancias similares a la nisina, se ha visto que la actividad antimicrobiana se reduce e incluso desaparece a valores de pH por arriba de 3.0, la efectividad de ésta disminuye a medida que el pH aumenta (De Almeida, *et al.*, 2020; Tavera, 2010; Thomas y Delves-Broughton, 2005; Yu, *et al.*, 2020).

Por consiguiente, el efecto antimicrobiano de los compuestos en los sobrenadantes está en función del pH; para los sobrenadantes de *L. plantarum* (17) y *L. lactis* (X) un ajuste en el valor de pH a 5.5 no permite la actividad antimicrobiana.

a)



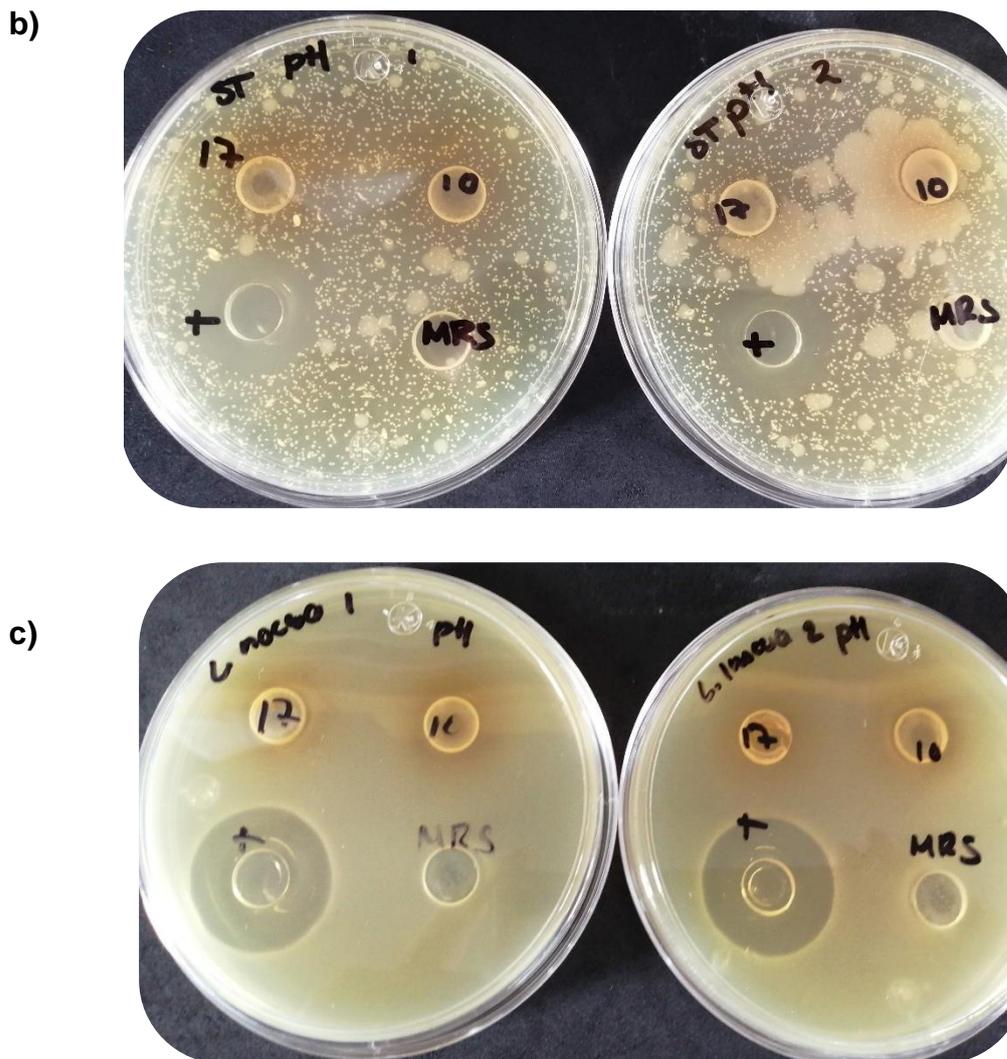


Figura 24. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de cultivos de cepas BAL con pH 5.5. **a)** *Listeria monocytogenes* **b)** *Salmonella* Typhimurium **c)** *Listeria innocua*, en medio no tamponado NT (izquierda) y tamponado (derecha).

A su vez, se evaluó el efecto antimicrobiano de los sobrenadantes obtenidos de cultivos de las cepas BAL, sin ajuste de pH, con pH 7.0 y posterior tratamiento térmico para ambos casos porque se sabe que la estabilidad térmica es una propiedad común en las bacteriocinas de BAL, pero la resistencia también está influenciada por el pH en el que se encuentran (Tavera, 2010; Zapata, 2009). En la **Tabla 11** se muestran los resultados promedio para dichos sobrenadantes.

Tabla 11. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes liofilizados de cultivos de cepas BAL, **con** tratamiento térmico, sin ajuste de pH frente a bacterias patógenas presentes en alimentos.

Cepa	<i>Salmonella Typhimurium</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Listeria innocua</i>	
	BHI tamponado	BHI no tamponado	BHI tamponado	BHI no tamponado	BHI tamponado	BHI no tamponado
17	1.4 ± 0.1	2.0 ± 0.0	1.5 ± 0.0	2.2 ± 0.15	1.6 ± 0.0	2.5 ± 0.1
X	1.2 ± 0.6	1.8 ± 0.15	1.5 ± 0.05	1.8 ± 0.2	1.4 ± 0.0	2.0 ± 0.05
(+)	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.05	2.4 ± 0.0	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.0	2.5 ± 0.0

*Control positivo, clorhexidina 0.2%.

De acuerdo con los resultados de la **Tabla 11**, se puede decir que el efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de las cepas BAL se mantuvo después del tratamiento térmico 90°C/10 min, (**Figuras 25, 26 y 27**). El efecto también es ligeramente mayor en el medio no tamponado sobredicho, el bajo pH, la presencia de ácido láctico y de otros ácidos orgánicos, así como posibles bacteriocinas, crean un ambiente desfavorable para el crecimiento de microorganismos patógenos.

Para *L. plantarum* 17, no se observaron diferencias relevantes del efecto antimicrobiano frente a los tres microorganismos indicadores con los sobrenadantes con tratamiento térmico de los sobrenadantes sin dicho tratamiento. Sin embargo, para *L. lactis* X, se observó una disminución del halo en medio NO tamponado frente a *L. monocytogenes* y *L. innocua* (**Figuras 25 y 26**), 1.8 cm y 2.0 cm, respectivamente, en tanto que, con los sobrenadantes sin ningún tratamiento también en medio NO tamponado, fue de 2.4 cm para *L. monocytogenes* y 2.8 cm para *L. innocua*. Inclusive, el halo fue menor respecto al obtenido con el sobrenadante de *L. plantarum* 17 con tratamiento térmico, de forma que, la estabilidad térmica del compuesto antimicrobiano de *L. lactis* X es menor que la del compuesto de *L. plantarum* 17, sin embargo, se tendrán que realizar otros ensayos para conocer mejor su comportamiento a diferentes temperaturas.

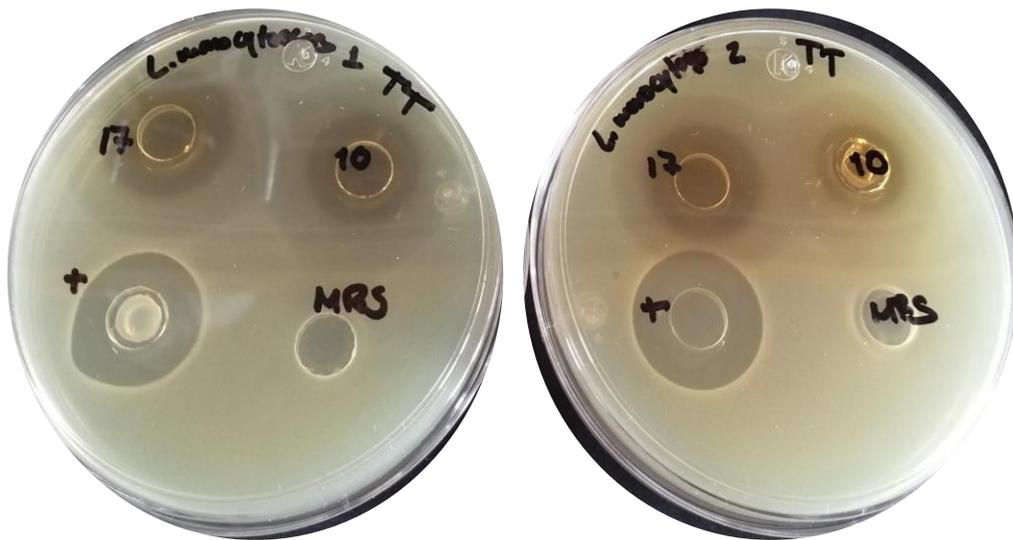


Figura 25. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de cepas BAL, con tratamiento térmico, sin ajuste de pH frente a *Listeria monocytogenes* en medio no tamponado NT (izquierda) y tamponado (derecha). (+) control positivo clorhexidina 0.2%;(-) control negativo caldo MRS estéril.

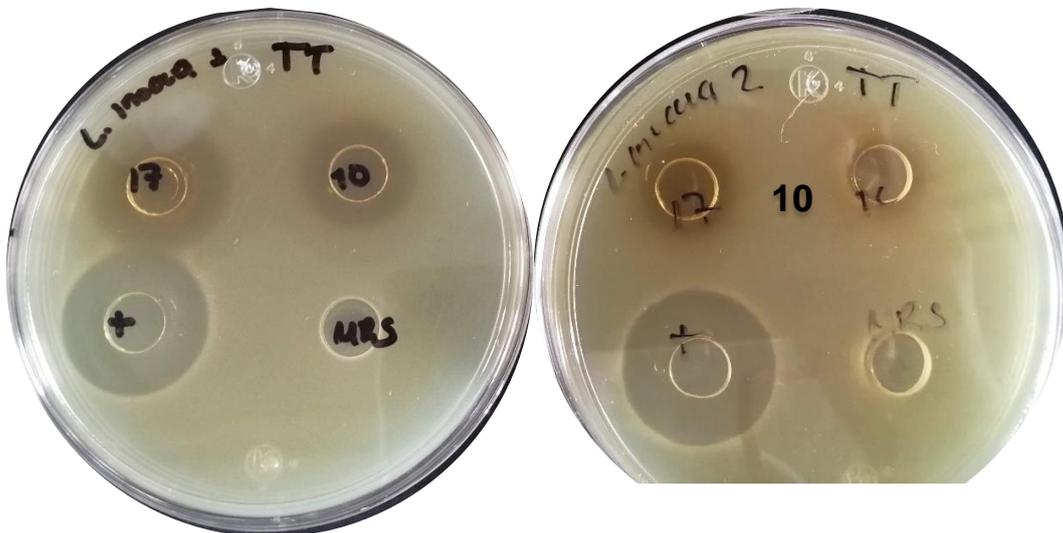


Figura 26. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de cepas BAL, con tratamiento térmico, sin ajuste de pH frente a *Listeria innocua* en medio no tamponado NT (izquierda) y tamponado (derecha). (+) control positivo clorhexidina 0.2%;(-) control negativo caldo MRS estéril.

Para *S. Typhimurium* el efecto bactericida también se mantuvo después del tratamiento térmico siendo mayor en el medio no tamponado (NT), los halos fueron de diámetro similar entre las dos BAL, **Figura 27.**

Esta termo estabilidad se puede asociar con bacteriocinas de clase I y II; y puede deberse a que son estructuras globulares pequeñas, que tienen enlaces entrecruzados y regiones fuertemente hidrofóbicas (Berman, *et al.*, 2018; Londoño *et al.*, 2015; Tavera, 2010). Considerando que las sustancias producidas por varias cepas de *L. lactis* se han asociado con características de bacteriocinas clase I, la termorresistencia puede ser resultado de la abundancia de compuestos termoestables inusuales como lantionina y β -metil-lantionina, derivados de la combinación de dos aminoácidos unidos por un puente disulfuro (Cotter, *et al.*, 2005; Nagao, 2009).



Figura 27. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de cepas BAL, con tratamiento térmico, sin ajuste de pH frente a *Salmonella* Typhimurium en medio no tamponado NT; (+) control positivo clorhexidina 0.2%;(-) control negativo caldo MRS estéril.

Por otro lado, se observó que en los sobrenadantes con pH 7 seguido del tratamiento térmico, la actividad antimicrobiana se perdió frente a los tres microorganismos y no presentó halo de inhibición, datos no mostrados (Figuras en **anexo D.II**). Lo que significa que la resistencia al calor sí está en función del pH en el que se encuentran, en un rango de pH 3-4 (sin ajuste) los compuestos en los sobrenadantes son más estables que a pH neutro o alcalino.

Este comportamiento de los compuestos en los sobrenadantes se ha reportado por varios autores, han observado que algunas bacteriocinas de bacterias de géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* son termoestables solo en pH bajos mientras que a pH alcalinos pierden la actividad.

Por ejemplo, se ha observado que la nisina, es activa a pH ácidos, pero pierde su actividad antimicrobiana con pH 7, es termoestable en condiciones ácidas (Deegan, *et al.*, 2006; Verma, *et al.*, 2014). Otros autores han reportado resultados similares tal como, Choi (2000) para *L. lactis*, aislado del kimchi, el efecto antimicrobiano del sobrenadante con pH 3.0 se mantuvo después del tratamiento térmico, a diferencia del sobrenadante con pH 7.0 y tratamiento térmico.

Luego, Zapata (2009) indicó que el sobrenadante de *L. plantarum* (bacteriocina LPBM10) aislado de leche fermentada, fue altamente termoestable a pH entre 3-5 (94°C durante 2 h) y la actividad antimicrobiana se mantuvo frente a *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*.

Por otro lado, Lin y Pan (2019) reportó para *L. plantarum* NTU 102, aislada de encurtidos de col, que los efectos de pH en la actividad antibacteriana se mantienen dentro del rango de valores de pH 1-4 mientras que, a valores de pH de 5-11 hubo una pérdida completa de actividad antimicrobiana. Además, el efecto antimicrobiano se mantiene después de tratamientos térmicos a 30, 50, 70, 100°C por 15 minutos.

En síntesis, los sobrenadantes de las cepas BAL ensayadas sin ajuste de pH en un rango de 3-4 y tratamiento térmico mantienen su actividad antimicrobiana, mientras que a pH 7.0 y con tratamiento térmico se perdió el efecto, tal como se describió previamente. De forma que el efecto antimicrobiano está influenciado por el pH de los sobrenadantes, incluso a pH 5.5 sin tratamiento térmico el efecto antimicrobiano ya no estuvo presente.

Como los sobrenadantes de *L. plantarum* (17) y *L. lactis* (X) conservaron el efecto antimicrobiano después del tratamiento térmico, sin ajuste de pH se concluye que las posibles bacteriocinas en los sobrenadantes son termoestables a pH ácidos. La resistencia térmica de los sobrenadantes de las BAL es relevante ya que se podrían utilizar en alimentos que son sometidos a calentamiento; y el efecto antimicrobiano fue contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, lo cual es importante ya que generalmente, las BAL no tienen un efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram negativas (Heredia-Castro, *et al.*, 2015).

Entonces, los sobrenadantes libres de células actúan también como agentes antimicrobianos apropiados frente a los dos microorganismos patógenos, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* y frente a *L. innocua*.

7. Supervivencia de patógenos en los sobrenadantes liofilizados.

Considerando los resultados de las pruebas de difusión en agar, se evaluó la supervivencia de los dos microorganismos patógenos, *Listeria monocytogenes* y *S. Typhimurium*, en los sobrenadantes liofilizados de cultivos de BAL sin ajuste de pH y tratamiento térmico previo.

Una vez resuspendidos los sobrenadantes liofilizados de las cepas BAL, como se indicó en el punto 6.1; se inoculó a *L. monocytogenes* en una concentración inicial de 10^4 - 10^5 UFC/mL.

En la **Figura 28** se muestra la supervivencia de *L. monocytogenes*, se observó una probable inhibición por ambos sobrenadantes, SN17 y SNX, después de 3 h de incubación, es decir, únicamente hubo crecimiento en el tiempo cero, sin embargo, en el control el crecimiento no fue exponencial sino decreciente; la concentración inicial en éste (Log UFC/mL) fue de 4.59 transcurridas 24 h fue de 3.93. De manera que, el tratamiento de liofilización pudo afectar el medio y como consecuencia el desarrollo de la bacteria reflejándose en la disminución de la concentración de *L. monocytogenes* aún en el control.

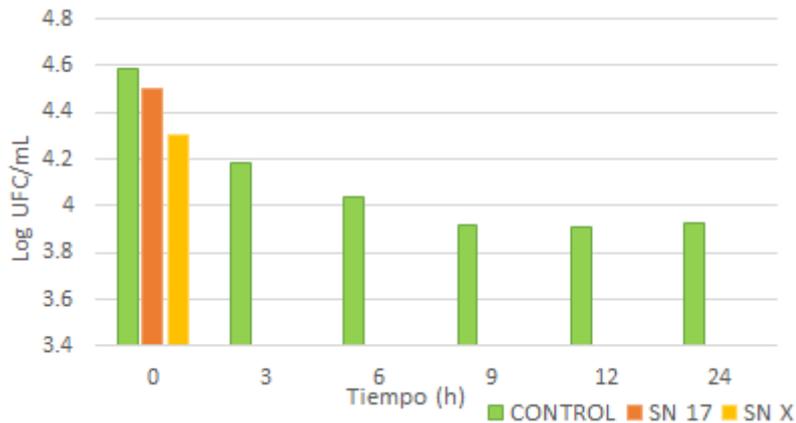


Figura 28. Ensayo de sobrevivencia de *L. monocytogenes* en sobrenadantes de cultivos de cepas BAL tratados térmicamente (SN) y liofilizados de *L. plantarum* (SN17) y *L. lactis* (SNX); incubados a 37°C. El ensayo se realizó por duplicado por lo que los valores considerados son los promedios de Log UFC/mL para cada tiempo. Desviación estándar control (0.00-0.50); SN17 (0.00-0.06); SNX (0.00-0.15).

Varios autores han indicado el efecto bacteriostático de *L. plantarum* y de otras especies del género *Lactobacillus* aisladas de alimentos sobre *L. monocytogenes* al utilizar sobrenadantes libres de células directamente en el cultivo del microorganismo patógeno (Leroy, *et al.*, 2005; Todorov, *et al.*, 2011; Hartmann, *et al.*, 2011), por ejemplo, Todorov (2016) mostro el efecto antagonista del sobrenadante de una cepa de *L. plantarum* después de 3 h de incubación a 37°C sobre *L. monocytogenes*, durante 12 h se monitoreo el crecimiento de éste y no se obtuvo crecimiento. Mientras que Ramírez (2005) quien trabajó con dos cepas nativas de bacteria ácido láctica del género *Lactobacillus*, sobrenadantes de *Lactobacillus plantarum* y *L. brevis*, aisladas de productos fermentados, con ambos sobrenadantes hubo actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes*.

Aunque sí se podría asociar un efecto antimicrobiano sobre *L. monocytogenes* por bacteriocinas se decidió utilizar otro proceso de concentración de los sobrenadantes de forma que no afecte el crecimiento del microorganismo en el control.

Para *S. Typhimurium* en ambos sobrenadantes y en el control (caldo MRS liofilizado) se obtuvo crecimiento únicamente en el tiempo cero, pero por debajo del rango de 15-200 colonias, de forma que la concentración inicial se reportó como la sensibilidad

del método, < 10 UFC/mL, (gráfica no mostrada) posteriormente no se obtuvo crecimiento en placas de medio XLD.

Este efecto puede ser consecuencia de bacteriocinas, así como por estrés, debido al pH, causado a *S. Typhimurium*, Doyle (2019) menciona que el estrés por ácido para *Salmonella* spp. por ácidos orgánicos débiles es particularmente dañino para la célula, ya que su forma no disociada puede difundirse fácilmente a través de la membrana. Además, el ácido láctico tiene un mayor poder bacteriostático y pueden impedir el crecimiento de *Salmonella* a pH inferiores a 5 (Esquivel, 2016).

Sin embargo, no se puede concluir que haya actividad antimicrobiana de los sobrenadantes sobre *S. Typhimurium* debido a que en el control no se pudo observar un adecuado desarrollo del microorganismo.

El tratamiento de liofilización se hizo con el propósito de concentrar las posibles bacteriocinas producidas por las BAL, eliminando el agua presente en las muestras, así como, poder almacenarlas por más tiempo. Además, el peróxido de hidrógeno y los metabolitos de oxígeno pierden su actividad antimicrobiana por este proceso, de esta manera la asociación de las propiedades antimicrobianas de los sobrenadantes con el peróxido de hidrógeno se eliminó por completo (Moradi, *et al.*, 2019). No obstante, durante el proceso pueden ocurrir daños que inicialmente no se detectan, pero se hacen evidentes cuando la muestra se rehidrata. Se podría pensar que el reducir el contenido de agua de los sobrenadantes y del caldo MRS ocasionó la desestabilidad de algún nutriente del medio que impidió el crecimiento de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*; ya que, la presencia de agua disponible y nutrientes esenciales (por ejemplo, fuentes de carbono y nitrógeno, factores de crecimiento y micronutrientes) influyen en el crecimiento microbiano (Doyle, *et al.*, 2019). Otro factor que pudo afectar fue el tiempo requerido para lograr concentrar la muestra, pudo reducir la estabilidad de biomateriales sensibles por un secado excesivo (Day y Stacey, 2007).

8. Supervivencia de bacterias patógenas en sobrenadantes de cultivos de cepas BAL tratados térmicamente y concentrados en rotavapor.

La obtención de sobrenadantes se realizó como se indicó en el punto 6 de la metodología, seguido del tratamiento térmico y posterior concentración al 50% del volumen total en rotavapor. La concentración inicial de *L. monocytogenes* en el sobrenadante y en el control (caldo MRS estéril sometido al mismo tratamiento que los sobrenadantes) fue de 10^4 UFC/mL.

En la **Figura 29** se observa la supervivencia de *L. monocytogenes* en el sobrenadante de *L. plantarum* 17 (SN17), en el control se tuvo crecimiento del microorganismo patógeno durante todas las etapas del monitoreo (0, 3, 6, 9, 12 y 24 h), iniciando con una concentración (log UFC/ml) de 4.0 y después de 24 horas de 8.87. De modo que, al reducir la cantidad de agua al 50% sí se tuvo un mejor desarrollo del microorganismo patógeno (**Anexo D. III**, Figuras 6 y 7). Los microorganismos necesitan la presencia de agua, en una forma disponible, para crecer y llevar a cabo sus funciones metabólicas (Doyle, *et al.*, 2019).

Se observó una disminución en la concentración de *L. monocytogenes* en tres ciclos logarítmicos, de 4.2 a 1.2 Log UFC/mL después de 3 h de incubación, es decir, hubo un efecto bacteriostático. Al tiempo 6 h, la inhibición fue completa, no hubo crecimiento en el agar BHI.

El efecto bacteriostático como ya se ha mencionado puede asociarse a posibles bacteriocinas producidas por *L. plantarum* 17, así como por el pH del sobrenadante que se encuentra en un rango de 3-4; *Listeria monocytogenes* puede sobrevivir a valores de pH por debajo de 4.3 pero no puede multiplicarse (Doyle, *et al.*, 2019); además algunas bacteriocinas de *L. plantarum* tienen mayor efecto a pH ácidos.

En consecuencia, el sobrenadante de *L. plantarum* SN17 tuvo un efecto bacteriostático frente a *L. monocytogenes* en 6 horas.

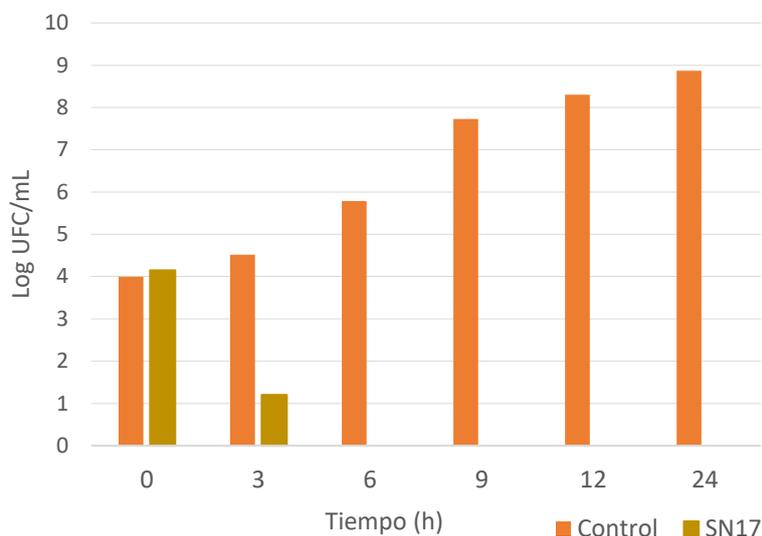


Figura 29. Sobrevivencia de *L. monocytogenes* en los sobrenadantes de *L. plantarum* 17 (SN17), concentrados con rotavapor e incubados a 37°C. El ensayo se realizó por duplicado por lo que los valores considerados son los promedios de Log UFC/mL para cada tiempo. Desviación estándar para el control (0.0-0.29); SN17 (0.0-0.02).

Todorov (2011) describió una bacteriocina producida por *L. plantarum*, ST16Pa, aislada de papaya, *Carica papaya*, con actividad bacteriostática frente a *L. innocua*. A través de un ensayo de sobrevivencia, se observó que a partir de 3 h de incubación a 37°C *L. innocua* no creció en el agar MRS mientras que en el control tuvo una DO de 1 después de 10 h.

Para el sobrenadante de *L. lactis* X (SNX), el efecto antimicrobiano fue similar al de *L. plantarum*, **Figura 30**; al tiempo 3 hubo una disminución en un ciclo logarítmico, de 4.1 a 3 Log UFC/mL, y después de 6 h de incubación el microorganismo patógeno fue inhibido totalmente. Contrario al control, en éste hubo crecimiento en todos los tiempos evaluados, después de 24 h se tuvo 9.03 Log UFC/mL.

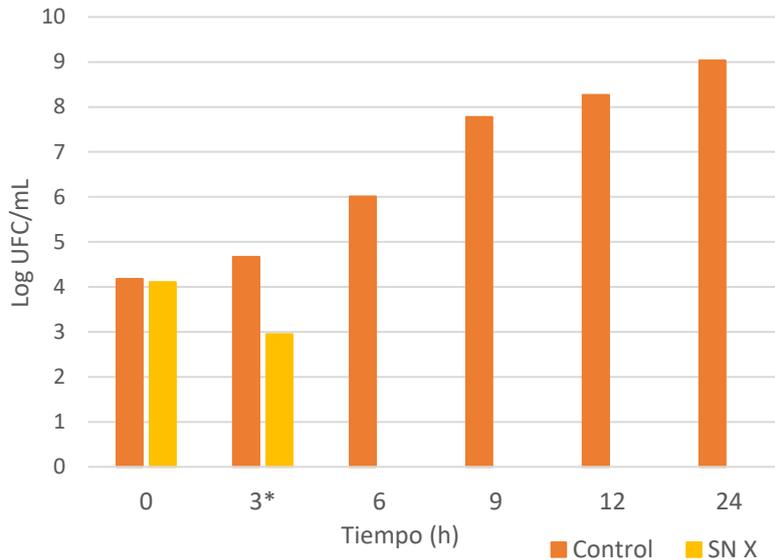


Figura 30. Sobrevivencia de *L. monocytogenes* en los sobrenadantes de *L. lactis* X (SN X), concentrados con rotavapor incubados a 37°C. El ensayo se realizó por duplicado por lo que los valores considerados son los promedios de Log UFC/mL para cada tiempo. *VE, valor estimado para el SN X.

Al comparar la concentración de *L. monocytogenes* en los sobrenadantes 17 y X al tiempo 3 h, *L. plantarum* (17) logró disminuirlo en 3 ciclos logarítmicos mientras que *L. lactis* (X) en uno. Esto también se observó en la prueba de difusión en agar (**punto 6**) después del tratamiento térmico, el efecto antimicrobiano de *L. plantarum* 17 fue mayor que el de *L. lactis* X, lo que podría relacionarse con la termorresistencia de los metabolitos de origen proteico.

Maldonado (2016) en un ensayo de supervivencia similar al realizado en el presente trabajo, expuso resultados para dos sobrenadantes de cultivos de dos cepas de *Lactococcus lactis* aislados del atole agrio, observó un efecto bacteriostático frente a *L. monocytogenes* a partir de 3 h de incubación a 37°C, las dos cepas redujeron la concentración del microorganismo patógeno en un ciclo logarítmico de 6 a 5 Log UFC/mL.

De modo que, el efecto bacteriostático de *L. plantarum* (SN17) y *L. lactis* (SNX) sobre *L. monocytogenes* ocurre en un lapso de incubación de 6 h a 37°C

En el punto 5 se determinó la sobrevivencia simultánea de *L. monocytogenes* (**Figuras 17 y 19**) frente a cada BAL directamente en caldo MRS, se observó un efecto antimicrobiano después de 12 horas y ausencia de crecimiento luego de 24 h de incubación a 37°C. Mientras que en los sobrenadantes concentrados por rotavapor de cepas BAL no hubo crecimiento transcurridas 6 horas/37°C. Por consiguiente, al obtener sobrenadantes en las condiciones de mejor crecimiento en caldo MRS para *L. plantarum* 17 y *L. lactis* X y concentrando al 50%, el efecto inhibitorio ocurre en menor tiempo.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los parámetros evaluados, temperatura y pH inicial del medio, se estableció que las condiciones óptimas de crecimiento en medio MRS para *L. plantarum* cepa 17 y *L. lactis* cepa X, fueron 37°C y pH inicial del medio de 7.5.

Con base en la prueba de reto en caldo MRS se observó que tanto *L. plantarum* 17 como *L. lactis* X, sí tuvieron un efecto antimicrobiano frente a *Salmonella* Typhimurium (Gram negativa) y *Listeria monocytogenes* (Gram positiva). A partir de 12 h hubo una disminución en la concentración de ambos microorganismos patógenos y a las 24 h ya no se registró crecimiento en las placas de agar.

La actividad antimicrobiana de *L. plantarum* 17 y *L. lactis* X frente a *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *Listeria innocua* (Gram positiva) se observó en los sobrenadantes sin ajuste de pH y sin tratamiento térmico; obteniéndose halos de mayor diámetro frente a las bacterias Gram positivas en medio no tamponado.

De igual modo, en los sobrenadantes a los que únicamente se aplicó el tratamiento térmico, se mantuvo dicha actividad, aunque para *L. lactis* X sí hubo una disminución en el diámetro de los halos de inhibición en medio no tamponado.

Por otro lado, la actividad antimicrobiana se perdió en los sobrenadantes con pH de 5.5 sin tratamiento térmico y en los sobrenadantes con pH 7 y tratamiento térmico.

En las pruebas de sobrevivencia en los sobrenadantes se registró, para *L. monocytogenes*, un mejor crecimiento en los sobrenadantes concentrados al 50% en rotavapor, en comparación con los sobrenadantes liofilizados. *L. plantarum* 17 disminuyó la concentración de *L. monocytogenes* en tres ciclos logarítmicos transcurridas 3 h mientras que, después de 6 h ya no registró crecimiento. En tanto, *L. lactis* X también presentó efecto bacteriostático a partir de 3 h, disminuyendo la concentración en un ciclo logarítmico y después de 6 h no se registró crecimiento.

Para *S. Typhimurium*, en los sobrenadantes liofilizados, se reportó crecimiento únicamente en el tiempo cero

PERSPECTIVAS

Realizar las pruebas de sobrevivencia también en sobrenadantes concentrados al 50% para *S. Typhimurium*. A su vez, hacer pruebas de sobrevivencia en masa inoculada con los sobrenadantes de cultivo de las BAL y los microorganismos patógenos con el objetivo de observar el efecto bacteriostático en la matriz alimentaria.

Determinar la posible naturaleza proteica de las sustancias con actividad antimicrobiana producidas por *L. plantarum* cepa 17 y *L. lactis* cepa X mediante el tratamiento con diferentes enzimas.

Realizar la purificación de las posibles bacteriocinas con actividad antimicrobiana mediante la precipitación con sulfato de amonio o con el método de adsorción/desorción.

Realizar un perfil proteico y estimar el peso molecular de los compuestos.

REFERENCIAS

- Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Ibrahim, T. A. T., Bashokouh, F., Ramakrishnan, N. R., Mustafa, S., & Ariff, A. B. (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *Rsc Advances*, 7(47), 29395-29420.
- Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 2001–2005. <https://doi.org/10.1128/aem.66.5.2001-2005.2000>.
- Akbar, A., Sadiq, M. B., Imran, A., Anwar, M., Niaz, M., Javed, M., & Ahmad, S. (2019). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislada de productos lácteos fermentados y su potencial antimicrobiano. *CyTA: Journal of food*, 17(1), 214-220.
- Arendt, E. K., & Zannini, E. (2013). *Cereal grains for the food and beverage industries*. Woodhead publishing, 248, 67-113.
- Bailey, S., Richardson, J., Cox, N. A. & Cosby, D. E. (2010). Salmonella. En Juneja, V. K., Sofos, J. N. (Eds.), *Pathogens and toxins in foods. Challenges and interventions*. Washington: ASM press. 108-110.
- Barman, S., Ghosh, R., & Mandal, N. C. (2018). Production optimization of broad spectrum bacteriocin of three strains of *Lactococcus lactis* isolated from homemade buttermilk. *Annals of Agrarian Science*, 16(3), 286-296. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.05.004>.
- Batt, C. A. (2014). LISTERIA | Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 466-469. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00186-5>.
- Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *BioMed Research International*, 2018, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>.

Bell, C., & Kyriakides, A. (2009). Salmonella. En W Blackburn, C., & McClure, P. J. (Eds.), *Foodborne Pathogens*, (627-674): Woodhead Publishing <https://doi.org/10.1533/9781845696337.2.627>.

Beristain-Bazua, SC., Palou, E., Lopez-Malo, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos, *Temas selectos de ingeniería en alimentos*, 6 (2), 64-78.

Bilbao, N. (2009). Antisépticos y desinfectantes: revisión. *Farmacia profesional*, 23(4), 37-39.

Blandino, A., Al-Aseeria, M. E., Pandiellaa, S. S., Canterob, D. & Webba, C. (2003). Review, Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International* 36, 527–543.

Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información. (2020, 17 mayo). Recuperado 25 de mayo de 2020, de <https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-231750>.

Calasso, M., & Gobbetti, M. (2011). Lactic Acid Bacteria | Lactobacillus spp.: Other Species. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 125-131. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00265-x>

Castillo, M. M., Wachter, R. C., & Hernández, S. H. (2005). Preliminary studies on chorote—a traditional Mexican fermented product. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(3), 293-296.

Cavanagh, D., Fitzgerald, G. F. y McAuliffe, O. (2015). From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology*, 47, 45-61.

Ciani, M., Comitini, F. & Mannazzu, I. (2013). Fermentation. En Fath, B. (Ed), *Encyclopedia of ecology*, 2, 310-321. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.00693-X>.

Chen, Y., Wang, Y., Chow, Y., Yanagida, F., Liao, C., & Chiu, C. (2014). Purification and characterization of plantaricin Y, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 510. *Archives of Microbiology*, 196(3), 193-199. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0958-2>.

Choi, H. J., Cheigh, C. I., Kim, S. B., & Pyun, Y. R. (2000). Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *Journal of Applied Microbiology*, 88(4), 563-571.

Corsetti, A., Prete, R., & Garcia-Gonzalez, N. (2018). Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*.

Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-788.

Da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., & de Souza Oliveira, R. P. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 527-536.

Day, G. J. & Stacey, N.G. (Eds.) (2007). Cryopreservation and freeze-Drying protocols (2a Ed): Humana Press. 15-38, 59-72. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-1-59745-362-2>.

De Almeida, G. M., Mendonça, C. M. N., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2020). Kinetic and thermodynamic parameters of nisin thermoinactivation. *Journal of Food Engineering*, 280, 109986. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.109986>.

Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International dairy journal*, 16(9), 1058-1071.

De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 13(4), 194-199.

Donghui, M., Jiang, Y., Ahmed, S., Quin, W. & Liu, Y. (2020). Antilesterial and physical properties of polysaccharide-collagen films embedded with cell-free supernatant of lactococcus lactis, *International Journal of biological macromolecules*, 145(febrero), 1031-1038.

Doyle, M. P., Diez-Gonzalez, F. & Hill, C. (2019). Food Microbiology: Fundamentals And Frontiers (5a Ed). Washinton, DC: ASM Press. Recuperado de: <https://onlinelibrary-wileycom.pbidi.unam.mx:2443/doi/book/10.1128/9781555819972>

Drider, D., & Rivera, V. M. (2016). *Bacterias ácido lácticas*. Ciudad de México, México: Alfaomega. 6-15,56-59.

Esquivel, A. (2016). Presencia y sobrevivencia de bacterias patógenas en el atole agrio de Villahermosa, Tabasco. (Tesis de maestría). UNAM, Ciudad de México.

Fernández, K. J., Chanci, I.C., Wilches, L. y Cardona, J.A. (2014). Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibitor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura, 2008-2012. *Revista Biosalud*, 13 (1), 45-61.

Food Safety: CDC, Centers for disease control and prevention. *Listeria monocytogenes*, prevención. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/spanish/listeria/prevention.html>. Consulta 1 Marzo 2020.

Food Safety: CDC, Centers for disease control and prevention. *Listeria* annual summary, 2014. Disponible: <https://www.cdc.gov/national-surveillance/pdfs/listeria-annual-summary-2014-508.pdf>. Consulta 11 marzo 2020.

Fournier, P., & Barrios, L. M. (2012). Las bebidas mexicanas, pulque, mezcal y tesgüino. *Arqueología mexicana*, 19(114), 52-59.

García, C., Rendueles, M. & Díaz, M. (2019). Liquid-phase food fermentations with microbial consortia involving lactic acid bacteria: A review. *Food Research International*, 119, 207–220.

Granda, F. (2018). *Listeria monocytogenes*: transmisión, formas y tratamientos efectivos. *Revista AEMPPI ESPOCH*, Julio.

Hartmann, H. A., Wilke, T., & Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), 192-199.

Heredia-Castro. P. Y., Hernández-Mendoza, A. González-Córdova, A. F. y Vallejo-Cordoba, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, (42) 6, 340-346.

Heredia-Castro, P. Y., Méndez-Romero, J. I., Hernández-Mendoza, A., Acedo-Félix, E., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2015). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. *Journal of dairy science*, 98(12), 8285-8293.

Hernández, C., Aguilera, A. M., y Castro, E. G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades infecciosas y microbiología*, 31(4), 137.

Hernández, F. A. (2018). Aislamiento y caracterización de microorganismos con potencial probiótico de la fermentación del maíz de elote y dobla. (Tesis de maestría). Universidad Juárez Autónoma.

Ingolf, F. N., Dag A, B. & Dzung B, D. (2013). Class II Non-Lantibiotic Bacteriocins. En Abba, J. K (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides* (cap 16, 85-92): Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00016-6>.

Jordan, K., & McAuliffe, O. (2018). *Listeria monocytogenes* in Foods. En R.-L. David (Ed.), *Biological Emerging Risks in Foods* (Vol. 86, pp. 181-213): Academic Press.

Juturu, V. & ChuanWu, J. (2018). Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnology Advances*, 36 (8), 2187-2200.

Karpinski, T.M. & Szkaradkiewicz A. K. (2016) Bacteriocins. *Encyclopedia of Food and Health*, 312- 319.

Kavitha, S., Harikrishnan, A., & Jeevaratnam, K. (2020). Characterization and evaluation of antibacterial efficacy of a novel antibiotic-type compound from a probiotic strain *Lactobacillus plantarum* KJB23 against food-borne pathogens. *LWT*, 118, 1-8.

Lacerda, R. C. & Freitas, S. R. (2019). Ethnic Fermented Foods of America. En *Sankaranarayanan, A., Amaresan, N. & Dhanasekaran, D. (Eds.), Fermented Food Products* (cap 3, 41-54). <https://doi-org.pbbidi.unam.mx:2443/10.1201/9780429274787>.

Lactobacillus, species. [en línea]. Disponible: <https://psn.dsmz.de/search?word=lactobacillus>. [último acceso 11 marzo 2020].

Lactococcus. [en línea]. Disponible: <https://psn.dsmz.de/search?word=lactococcus>. [último acceso 27 marzo 2020].

Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>.

Leroy, F., Lievens, K., & De Vuyst, L. (2005). Modeling Bacteriocin Resistance and Inactivation of *Listeria innocua* LMG 13568 by *Lactobacillus sakei* CTC 494 under Sausage Fermentation Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7567-7570. <https://doi.org/10.1128/aem.71.11.7567-7570.2005>.

Lin, T.-H., & Pan, T.-M. (2019). Characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus plantarum* NTU 102. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 52(3), 409-417. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.08.003>.

Listeria innocua. [en línea]. Disponible: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Listeria_innocua. [último acceso 18 noviembre 2019].

Londoño, N. A., Taborda, M. T., López, C. A., & Acosta, L. V. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Alimentos hoy*, 23(36), 186-205.

Lorenzo, J. M., Munekata, P.E., Dominguez, R., Peteiro, M., Saraiva, J. A. & Franco, D. (2018). Main Groups of Microorganisms of Relevance for Food Safety and Stability: General Aspects and Overall Description. En Barba, F. J., Orlieen, V., Sant´Ana, A, S. & Koubaa, M. (Eds.), *Innovative Technologies for Food Preservation: Inactivation of Spoilage and Pathogenic Microorganisms* (cap 3, 53-107): Academic press.

Löfström, C., Hansen, T., Maurischat, S., & Malorny, B. (2015). Salmonella: Salmonellosis. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 701–705). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00607-3>

Maldonado, B. C. (2016). Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactococcus* aisladas de alimentos fermentados tradicionales. (tesis de licenciatura). UNAM. Ciudad de México.

Martínez, C. F. (2018). Estudio de la actividad antimicrobiana de bacterias lácticas aisladas del pulque y aguamiel (tesis de licenciatura). UNAM. Ciudad de México.

Martínez, F., Yulan, C., Villafañe, R., Cardozo, M., Vasek, O. (2009). Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *comunicación científica y tecnológica*.

Mataragas, M., Drosinos, E. H., & Metaxopoulos, J. (2003). Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2 C. *Food microbiology*, 20(2), 259-265.

Mills, S., Ross, R. P. & Coffey, A. (2011). Lactic Acid Bacteria. *Lactococcus lactis*. En Fuquay, J. W., Fox, P. F. & McSweeney, P, L (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol 3, 132-137). London: Academic Press.

Moradi, M., Mardani, K. & Tajik, H. (2019). Characterization and application of postbiotics of *Lactobacillus* spp. on *Listeria monocytogenes* in vitro and in food models. *LWT-food science and technology*, 111(2019), 457-464.

Moya, V. E. (2018). Caracterización de bacterias ácido lácticas aislados de alimentos de Villahermosa, Tabasco. (tesis de licenciatura). UNAM. Ciudad de México.

Mozzi, F. (2016). Lactic Acid Bacteria. *Encyclopedia of Food and Health*, 501-508. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00414-1>

Muñoz, N., Sonar, C. R., Bhunia, K., Tang, J., Barbosa-Cánovas, G. V., & Sablani, S. S. (2019). Use of protective culture to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in ready-to-eat cook-chill products. *Food Control*, 102, 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.03.009>.

Nagao, J. (2009). Properties and applications of lantibiotics, a class of bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Journal of Oral Biosciences*, 51 (3): 158-164.

O'Bryan, C. A., Crandall, P.G., Ricke, S. C. & Ndahetuye, J.B. (2015). Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: Types and mechanisms of action. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, 2015, 117-136.

Organización mundial de la salud. Carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria 2015. Disponible: https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/fergonepager_es.pdf?ua=1. Consulta 25 de Marzo 2020.

Özcelik, S., Kuley, E. & Özogul, F. (2016). Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT-food science and technology*, 73(noviembre), 536-542.

Pei, J., Jin, W., Abd El-Aty, A.M., Baranenko, D.A., Gou, X., Zhang, H., Geng, J., Jiang, L., Chen, D., Yue, T. (2020). Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by *Lactobacillus plantarum* found in conventional kombucha. *Food control*, 110: 1-8.

Pérez-Cataluña, A., Elizaquível, P., Carrasco, P., Espinosa, J., Reyes, D., Wachter, C., & Aznar, R. (2018). Diversity and dynamics of lactic acid bacteria in Atole agrio, a traditional maize-based fermented beverage from South-Eastern Mexico, analysed by high throughput sequencing and culturing. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111(3), 385-399.

Porto-Fett, A. C., Call, J. E., Muriana, P. M., Freier, T. A. & Luchansky, J. B. (2010). *Listeria monocytogenes*. En Juneja, V. K., Sofos, J. N. (Eds.), *Pathogens and toxins in foods. Challenges and interventions*. Washington: ASM press. 95-107.

Preciado, G. M., EscalanteMinakata, P., Castro, J. A. O., Junquera, V. I., Chávez, J. A. M., González, C. N. A., & Herrera, R. R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59), 64-70.

Prescott, L. M., Harley, J. P. y Klein, D. A. (2004). *Microbiología* (5a Ed). España: McGraw-Hill. 1060.

Ramírez, B., Cansino, G., Hernández, M. (2009). Morfología y Diferenciación de Colonias de Tres Tipos de Bacterias Lácticas. *Revista Agraria Nueva Epoca*. 6 (1): 14-18.

Ramírez, L. A. G., Campuzano, O. I. M., & Villadiego, O. S. R. (2005). Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento in vitro de *E. coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 36.

Ray, B. (2005). *Fundamental Food Microbiology, Third Edition* (3.^a ed.). Washintong, DC: CRC Press. 327-330.

Ruiz, J. M., Colello, R., Padola, L. N. & Echeverría, I. A. (2017). Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. *Revista argentina de microbiología* 49 (2): 174 -177.

Salmonella and food. (2020). [En línea]. Disponible: <https://www.cdc.gov/features/salmonella-food/>. [ultimo acceso 14 mayo 2020].

Salvucci, E., LeBlanc, J.G & Pérez, G. (2016). Technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. *Food science and Technology*, 70, 185-191.

Sangwan S., Kumar S., Goyal S. (2014) Maize Utilisation in Food Bioprocessing: An Overview. In: Chaudhary D., Kumar S., Langyan S. (eds) *Maize: Nutrition Dynamics and Novel Uses*. Springer, New Delhi

Song AA-L, In, LLA., Lim, S., Rahim, R, A. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: From food to factory. *Microb cell factories*, 16 (55).

Stanbury, P. F., Whitaker, A. & Hall, S.J., (2016). Principles of Fermentation Technology (3a ed). Amsterdam: Butterworth-Heinemann. 1-20. Recuperado de la base de datos Science direct, <https://doi.org/10.1016/C2013-0-00186-7>.

Sosa, A. C. (2019). Producción y estudio de sustancias antimicrobianas de origen proteico de *Lactococcus lactis* cepa 115 aislada de atole agrio. (Tesis de licenciatura). UNAM. Ciudad de México.

Souza, E. C., Azevedo, P. O. de S. de, Domínguez, J. M., Converti, A., & Oliveira, R. P. de S. (2017). Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. *CyTA-Journal of Food*, 15(4), 525-530. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1306806>.

Tamang, J. P. (Ed.). (2015). *Health benefits of fermented foods and beverages*. CRC press. 18-21.

Tamang, J.P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology* 7 (377), 1-28.

Tavera, M.F. (2010). Producción de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol para la inhibición de bacterias patógenas. (tesis de licenciatura). UNAM. Ciudad de México.

Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2005). Bacteriocin Production by *L. plantarum* ST194BZ, a Strain Isolated from Boza. *Food Technology Biotechnology*. 43 (2) 165–173.

Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2006). Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbiological Research*, 161(2), 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.06.006>.

Todorov, S., Gotcheva, B., Dousset, X., Onno, B., & Ivanova, I. (2000). Influence of Growth Medium on Bacteriocin Production in *Lactobacillus Plantarum* ST31. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 14(1), 50-55. <https://doi.org/10.1080/13102818.2000.10819062>.

Todorov, S.D., Holzapfel, W. & Nero, L.A. (2016). Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH and some aspects of its mode of action. *Ann Microbiol* 66, 949–962. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1180-4>

Todorov, S. D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J. G., & Franco, B. D. (2011). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*). From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Research International*, 44(5), 1351-1363.

Tzu-Hising, L. & MingPan, T. (2019). Characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus plantarum* NTU 102. *Journal of microbiology, immunology and infection*, 52 (3): 409-417.

Ulloa, S. C., & Ulloa, M. (1973). Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y otros países latinoamericanos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 34, 423.

Üçok, G., & Sert, D. (2020). Growth kinetics and biomass characteristics of *Lactobacillus plantarum* L14 isolated from sourdough: Effect of fermentation time on dough machinability. *LWT*, 129, 109516. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109516>.

Vásquez, S, M., Suárez, H, M. & Zapata, B, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición*, 36 (1), 64-71.

VÄkevÄinen, K., Valderrama, A., Espinosa, J., Centurión, D., Rizo, J., Reyes-Duarte, D., Díaz, R, G., Wright, A, V., Elizaquível, P., Esquivel, K., Simontaival, I., Aznar, R., Wachter, R. C. & Plumed-Ferrer, C. (2018). Characterization of lactic acid bacteria recovered from *atole agrio*, a traditional Mexican fermented beverage. *LWT - Food Science and Technology*, 88 (2018): 109-118.

VÄkevÄinen, K., Hernández, J., Simontaivala, A.I., Severiano, P. P., Ruiz, D. G., Wright, A.V., Wacher, R. C. & Plumed-Ferrer, C. (2020). Effect of different starter cultures on the sensory properties and microbiological quality of Atole agrio, a fermented maize product. *Food control*, 109(2020).

Verma, A. K., Banerjee, R., Dwivedi, H. P. & Juneja, V. K. (2014). Bacteriocins, potencial in food preservation. En Batt & Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of food microbiology* (180-186): Elsevier.

Wacher, R. C. (2002). Alimentos y bebidas fermentados tradicionales, en Mariano García-Garibay, Rodolfo Quintero y Agustín López-Munguía (coords.), *Biotechnología alimentaria*, Limusa, México, pp. 313-349.

Wacher R. C. (2014). La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. *Revista digital universitaria*, 15(8).

Wacher, R. C., Canas, A., Cook, P. E., Barzana, E., & Owens, J. D. (1993). Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(2), 269-274.

Wonyong, K. (2014). The genus *Lactococcus*. En W. H. Holzapfel & J. B. Wood (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (cap 26, pp. 429-443). <https://doi.org/10.1002/9781118655252>.

Yang, E., Lihua, F. Jinping, Y. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express Journal* 8(10).

Yu, X., Lu, N., Wang, J., Chen, Z., Chen, C., Regenstein, J. M., & Zhou, P. (2020). Effect of N-terminal modification on the antimicrobial activity of nisin. *Food Control*, 114, 107227. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107227>.

Zapata, S., Muñoz, J., Ruiz, O., Montoya, O. & Gutiérrez, P. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Revista Facultad de química farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín*.16 (1): 75-82.

ANEXOS

Anexo A. Preparación de medios de cultivos utilizados durante el proyecto

Todos los medios líquidos y sólidos esterilizados se someten a prueba de esterilidad por 24 horas.

Caldo MRS	Disolver 55 g del medio en 1 L de agua destilada caliente, disolver y esterilizar a 121°C/ 15 min.
Caldo BHI	Disolver 37 g del medio en 1 L de agua destilada caliente, disolver y esterilizar a 121°C/ 15 min.
Agar MRS	Disolver 70 g del medio en 1 L de agua destilada caliente, disolver y esterilizar a 121°C/ 15 min. Enfriar y vaciar en cajas petri estériles, aproximadamente 25 mL en cada una.
Agar BHI	Disolver 52 g del medio en 1 L de agua destilada caliente, disolver y esterilizar a 121°C/ 15 min. Enfriar y vaciar en cajas petri estériles, aproximadamente 25 mL en cada una.
Agar XLD	Disolver 55 g del medio en 1 L de agua destilada caliente, disolver y calentar en parrilla hasta ebullición. Enfriar y vaciar en cajas petri estériles, aproximadamente 25 mL en cada una.
Agar Oxford	Disolver 57.5 g del medio en 1 L de agua destilada caliente, disolver y esterilizar a 121°C/ 15 min. Agregar al medio temperado los antibióticos propios del medio, seguir indicaciones del proveedor. Vaciar en cajas petri estériles, aproximadamente 25 mL en cada una.

Anexo B. Diluciones utilizadas en las fermentaciones para ambas BAL.

Tabla 1. Diluciones realizadas para la fermentación en medio MRS para ambas cepas a 30°C y 37°C

Tabla 1.1 pH inicial 6.

Tiempo (h)	Diluciones evaluadas
0	10^{-6} - 10^{-8}
3	10^{-6} - 10^{-8}
6	10^{-7} - 10^{-9}
9	10^{-8} - 10^{-10}
12	10^{-8} - 10^{-10}
24	10^{-8} - 10^{-10}

Tabla 1.2 pH inicial 7.5.

Tiempo (h)	Diluciones evaluadas	
	30°C	37°C
0	10^{-5} - 10^{-7}	10^{-5} - 10^{-7}
3	10^{-5} - 10^{-7}	10^{-5} - 10^{-7}
6	10^{-6} - 10^{-8}	10^{-6} - 10^{-8}
9	10^{-7} - 10^{-9}	10^{-7} - 10^{-9}
12	10^{-9} - 10^{-11}	10^{-8} - 10^{-10}
24	10^{-7} - 10^{-9}	10^{-8} - 10^{-10}

Anexo B.I. Cinéticas de crecimiento DO vs Log UFC/mL para *L. plantarum* 17 y *L. lactis* X en caldo MRS.

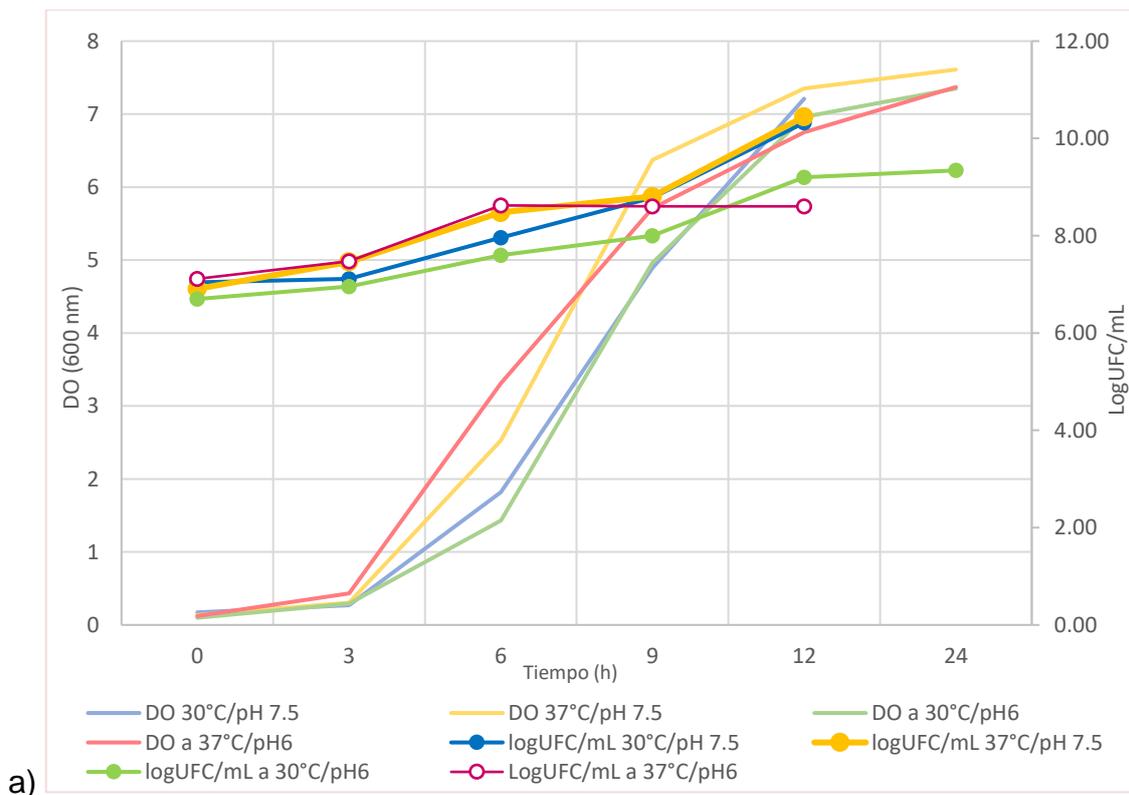


Figura 1. Efecto de la temperatura y pH en el crecimiento de *L. plantarum* 17 en medio MRS.

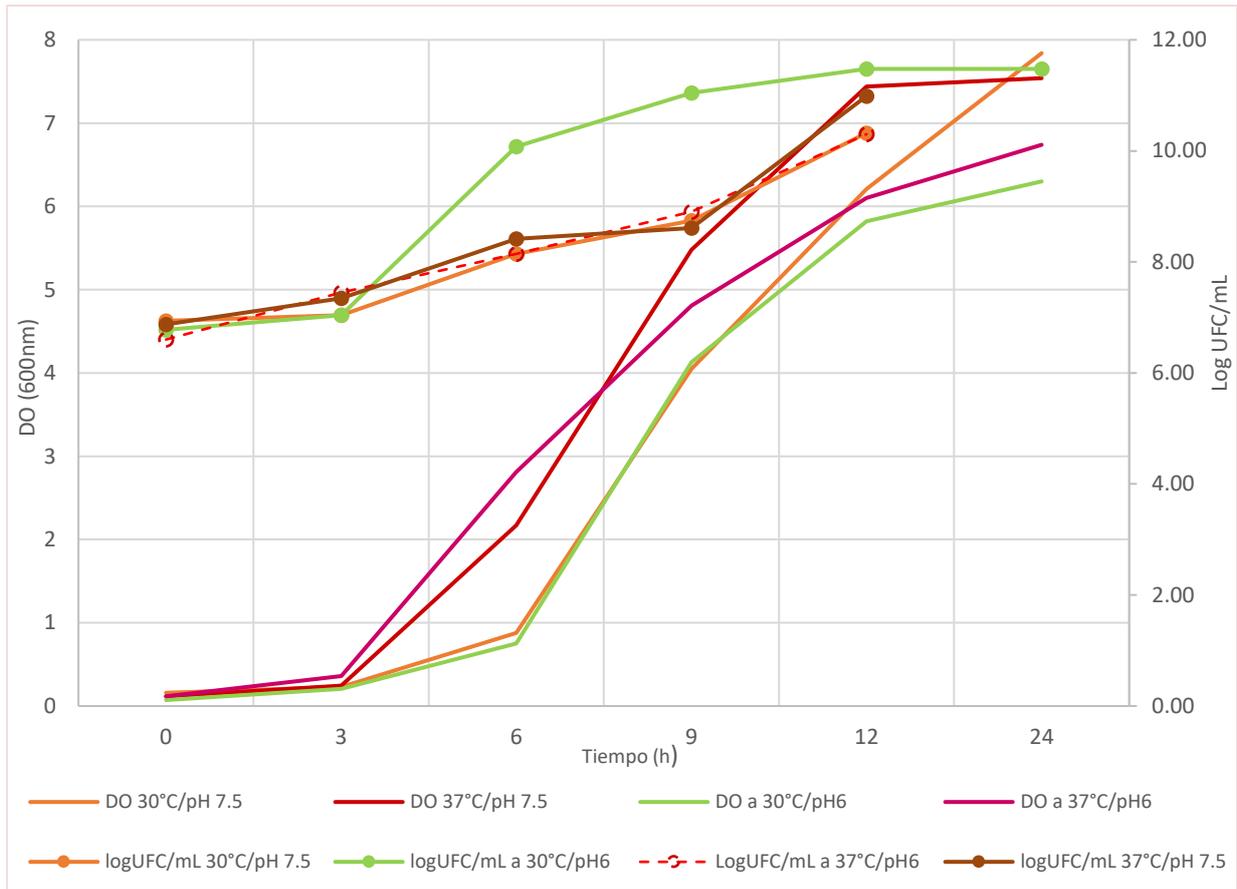


Figura 2. Efecto de la temperatura y pH en el crecimiento de *L. lactis X* en medio MRS.

Anexo C. Preparación de medios tamponados y no tamponados para la prueba de difusión en agar

Se considera para un volumen de 1000 mL. Para la prueba de difusión en agar no tamponado, no agregar fosfatos.

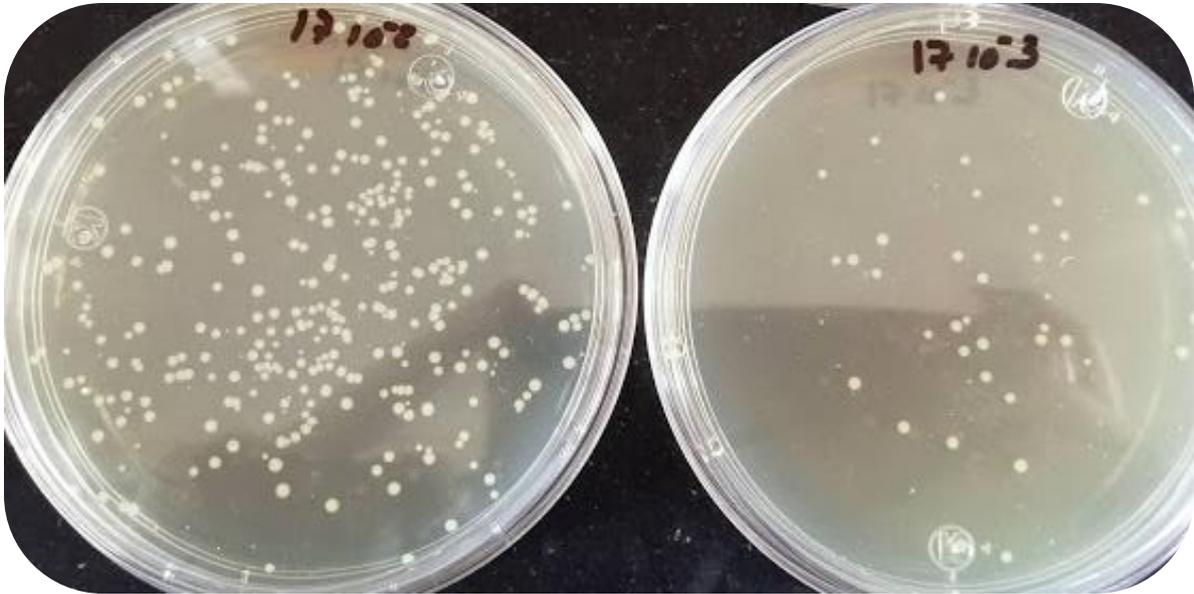
Tabla 1. Formulación para preparación de medios tamponados.

Capa tamponada		
Caldo BHI	37 g	Esterilizar a 121°C/15 min. Enfriar y vaciar aproximadamente 20 mL en la caja petri en condiciones estériles.
Agar	17 g	
Fosfato monobásico de sodio	4.3 g	
Fosfato disódico	10 g	
Sobrecapa tamponada		
Caldo BHI	15 g	Calentar en parrilla con agitación hasta la completa disolución de los fosfatos y el agar.
Agar	8 g	
Fosfato monobásico de sodio	4 g	Vaciar 10 mL en tubos de ensaye con tapa y esterilizar. Enfriar y refrigerar hasta su uso.
Fosfato disódico	10 g	

ANEXO D. Imágenes durante algunas etapas del proyecto.

Anexo D.I. Colonias características de *L. plantarum* 17 y *L. lactis* X en agar MRS.

a)



b)



Figura 1. Colonias características de a) *L. plantarum* 17 y b) *L. lactis* X en agar MRS, después de 24 h de incubación a 37°C.

Anexo D. II. Colonias características de *L. monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium, para el ensayo de sobrevivencia en caldo MRS.

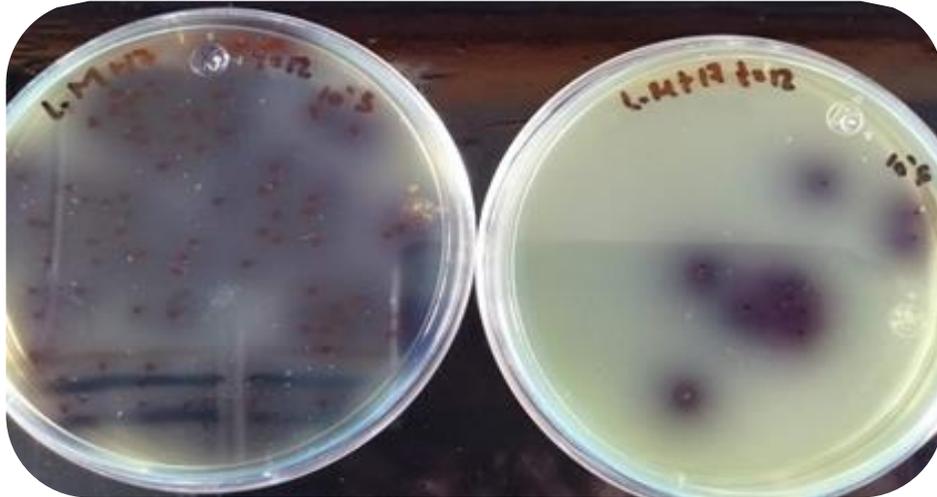


Figura 2. Colonias características de *L. monocytogenes* en medio selectivo OXFORD modificado, pequeñas, cafés rodeados con halo oscuro.

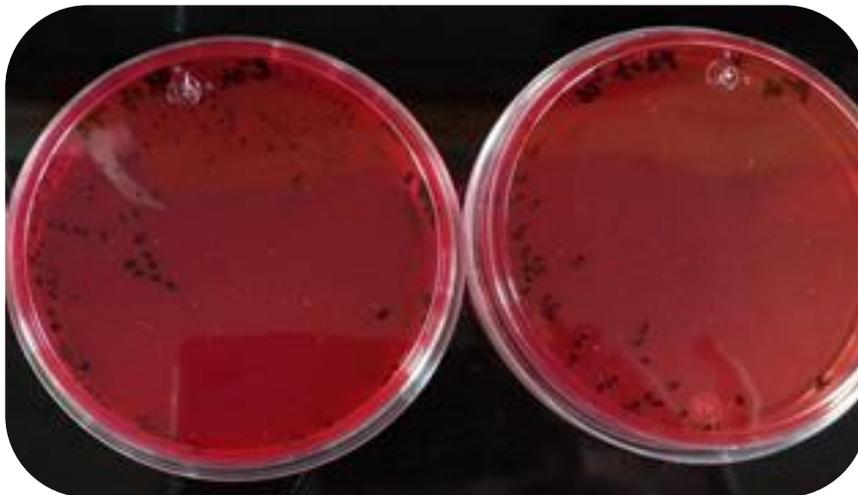


Figura 3. Colonias características de *Salmonella* Typhimurium en medio selectivo XLD (xilosa, lisina, desoxicolato), pequeñas, transparentes con centro negro.

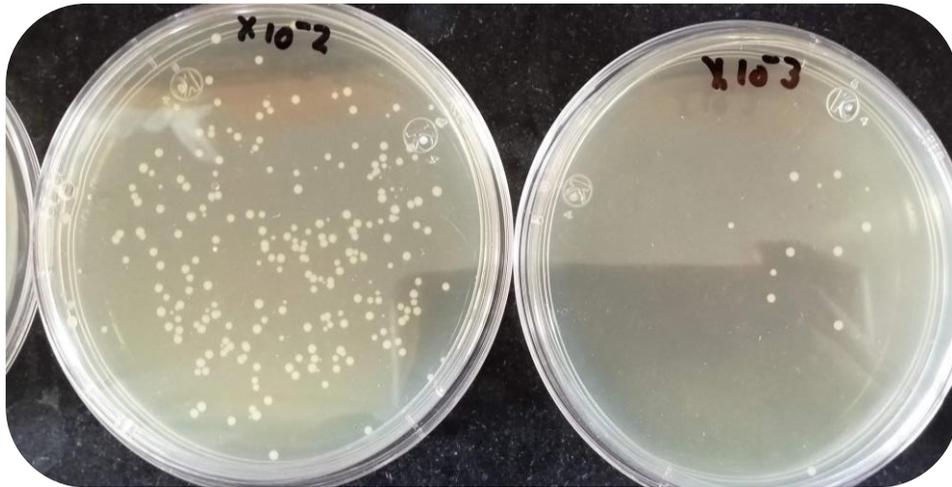
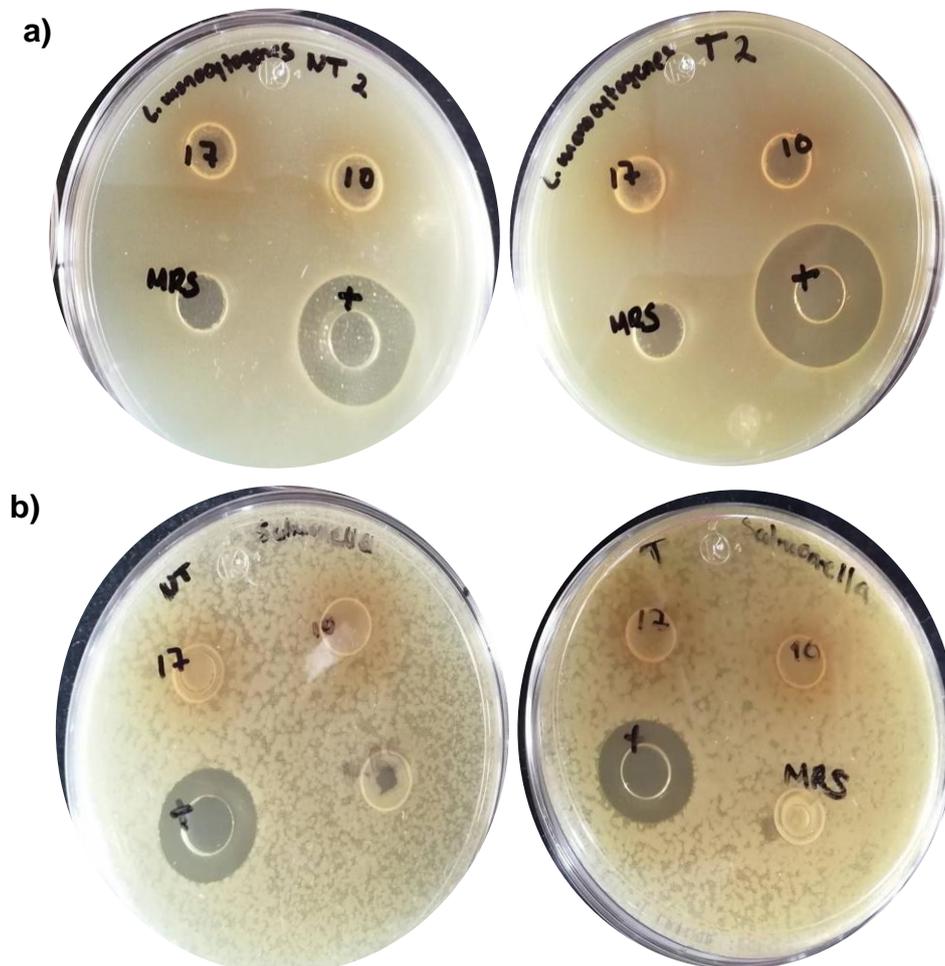


Figura 4. Colonias características de *L. monocytogenes* en medio BHI, pequeñas, color crema.

Anexo D.II. Prueba de difusión en agar de cultivos de *L. plantarum* 17 y *L. lactis* X con tratamiento térmico y pH 7.



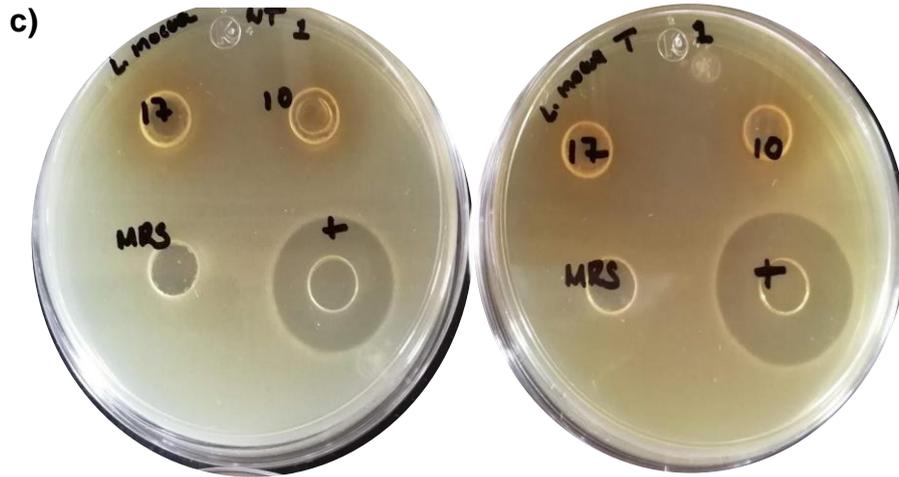


Figura 5. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de cultivos de cepas BAL con tratamiento térmico y pH 7. **a)** *Listeria monocytogenes* **b)** *Salmonella* Typhimurium **c)** *Listeria innocua*, en medio no tamponado NT (izquierda) y tamponado (derecha).

Solo se observó halo de inhibición en el control positivo, clorhexidina 0.2%, un halo translucido en comparación de los sobrenadantes de BAL con pH 7.0 y tratamiento térmico, no se observó efecto antimicrobiano para ninguno de los tres microorganismos.

Anexo D.III. Prueba de sobrevivencia en sobrenadantes de *L. plantarum* 17 concentrados 50% en rotavapor.



Figura 6. Prueba de sobrevivencia de *L. monocytogenes* en sobrenadante de *L. plantarum* (17) concentrado 50% en rotavapor, tiempo cero, concentración inicial 10^2 UFC/mL del microorganismo sensible, temperatura de incubación 37°C . control (izquierda), SN17 (derecha). El color del sobrenadante en ambos era similar, café, translucidos, sin precipitado.



Figura 7. Prueba de sobrevivencia de *L. monocytogenes* en sobrenadantes de *L. plantarum* (17) concentrados en rotavapor, tiempo de incubación 24 h.

En el último monitoreo se observó un cambio en el color del sobrenadante, en el control (izquierda) el color es café- amarillento debido al crecimiento del microorganismo sensible, con precipitado blanco, en comparación con el del sobrenadante 17 (derecha), en éste el color es similar al del tiempo cero, café translucido, no se observó precipitado blanco. Lo cual coincide con el poco crecimiento de *L. monocytogenes*; únicamente se registró crecimiento en el agar BHI durante el tiempo cero y 3 h.