

27
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

DETECCION DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS
POR BACTERIAS LACTICAS AISLADAS DE POZOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A N :
ERIKA MANUELA PEREYRA CASTILLO
EDITH TREJO HIDALGO



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

271539

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente Profesor Aguilar Caballero Raúl.

Vocal Profesora Wachter Rodarte Ma. Del Carmen.

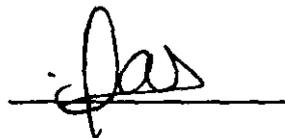
Secretario Profesora Cañas Urbina Ana Olivia.

Primer suplente Profesor Baez Fernández Marcos Francisco.

Segundo suplente Profesora Giles Gómez Martha.

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 321 del edificio E del Depto. de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM.

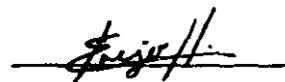
Asesor del tema: Dra. Cañas Urbina Ana Olivia



Sustentantes: Pereyra Castillo Erika Manuela



Trejo Hidalgo Edith



El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México y en el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro; con el apoyo del CONACYT a través del proyecto I26893-B

AGRADECIMIENTOS.

Por la oportunidad que nos brindó para participar con ella dándonos con gran esmero su apoyo al realizar este trabajo, gracias Dra. Ana Cañas.

A la M. en C. Blanca García por su interés y ayuda brindados para obtener un mejor trabajo, gracias por aportar esas ideas tan valiosas en el transcurso de la elaboración de éste.

Dr. Eduardo Bárzana le agradecemos su apoyo para llevar a cabo la investigación experimental de la tesis; así como a usted Dra. Carmen Wachter por facilitarnos alguna vez material imprescindible para ésta.

También agradecemos sinceramente la colaboración a todas aquellas personas que de una u otra manera estuvieron involucradas en este trabajo para su realización: Rocío Santillán, Gloria Díaz, Sandra Pérez, Sandra Naranjo, Dra. Amelia Farrés, Manuel Flores, Julieta Guillén, Lilia Escalante, Dr. Carlos Regalado, Dr. Francisco Díez, José Luis Roque, Adelfo Escalante, Norberto Catalán, Idalia Flores y Juan Guzmán.

Doy gracias al Señor porque él es mi fortaleza y mi escudo; en él confié mi corazón y fui ayudado.

(Salmo 28-31)

A mi Padre porque donde quiera que te encuentres sé que has estado a mi lado y me has permitido culminar mis estudios, mil gracias.....
Te extraño

A mi Madre, es tanto lo que tengo que agradecerte, gracias por ser tú y darme la oportunidad de compartir esta dicha contigo.....
Te amo

A mis hermanos, Mónica y Víctor por dejarme crecer a su lado interesándose por mi bienestar; y por su apoyoGracias.

A esa gran persona que ha estado a mi lado incondicionalmente dándome su apoyo, su comprensión y su amor, le doy las gracias por todo. Te quiero Manuel.

A mis amigos: Heidi, Rosalba, Antonio, José Luis, Javier por su cariño y apoyo incondicional; y a ustedes: Eduardo, Jorge, Antonieta, Alejandra, José, Edith, Adriana, Luis, Corina, Selene y Laura, por su amistad .

Erika P.

Porque Dios nos da la Facultad de tener sueños y también la oportunidad para realizarlos, gracias por mi oportunidad de existir.

Miles de gracias a mis padres; Martha y Enrique porque por su cariño y apoyo inmensos he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida, terminar mis estudios profesionales, que constituyen un gran legado.

Gracias a mi hermana Elizabeth por su ejemplo de superación, por su amor y apoyo.

A mis abuelitos Elisa y Vicente porque han estado conmigo desde cualquier lugar donde se encuentren; y a mis abuelitos Aurora y Refugio, a ambos gracias por su cariño

A mis amigas Margarita, Yolanda, Adriana R., Ma. del Pilar, Erika, Rosa, Adriana J. y Rosario A.; gracias por su amistad.

Por lo que ha sido y será.Gracias

Edith T.

CONTENIDO.

RESUMEN	1
I. INTRODUCCION.	4
II. GENERALIDADES.	6
2.1 Microorganismos patógenos	6
2.1.1 <i>Bacillus cereus</i>	6
2.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.1.3 <i>Clostridium perfringens</i>	7
2.1.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	8
2.1.5 <i>Escherichia coli</i>	9
2.1.6 <i>Vibrio cholerae</i>	10
2.2 Conservadores	10
2.2.1 Definición	10
2.2.2 Aplicaciones	11
2.3 Bacteriocinas	13
2.3.1 Clasificación	14
2.3.2 Mecanismos de acción	17
2.3.3 Métodos de detección	18

2.3.3.1	Control de peróxido de hidrógeno	20
2.3.3.2	Control de la formación de ácido	23
2.3.3.3	Control de bacteriófagos	23
2.3.3.4	Naturaleza protéica	23
2.3.4	Aplicaciones	24
2.4	Bacterias ácido lácticas	26
2.5	Alimentos fermentados	27
III.	OBJETIVOS.	29
3.1	Objetivo general	29
3.2	Objetivos particulares	29
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.	30
4.1	Microorganismos	30
4.1.1	Bacterias ácido lácticas	30
4.1.2	Microorganismos indicadores	30
4.2	Medios de cultivo y soluciones	30
4.2.1	Medios de cultivo	30
4.2.2	Soluciones	32
4.3	Conservación y cultivos de trabajo de las cepas	32
4.3.1	Conservación de bacterias ácido lácticas	32
4.3.2	Cultivos de trabajo de bacterias ácido lácticas	32

4.3.3	Conservación de microorganismos indicadores	34
4.3.4	Cultivos de trabajo de microorganismos indicadores	34
4.4	Preparación de inóculos	34
4.4.1	Bacterias ácido lácticas	34
4.4.2	Microorganismos indicadores	36
4.5	Prueba de antagonismo	36
4.5.1	Controles de inhibición	37
4.5.1.1	Inhibición por ácido	37
4.5.1.2	Inhibición por peróxido de hidrógeno	38
4.6	Pruebas para corroborar la naturaleza bacteriocinogénica de los extractos	38
4.6.1	Inhibición por fagos	38
4.6.2	Sensibilidad a enzimas proteolíticas	38
4.7	Espectro de inhibición	39
4.8	Determinación de actividad	40
4.8.1	Preparación del extracto bacteriocinogénico	40
4.8.2	Preparación del inóculo del microorganismo indicador para determinar actividad	40
4.8.3	Preparación de placas	42
4.8.4	Cálculo para determinar la actividad (UA)	42
4.9	Efecto de temperatura y pH	42

V.	RESULTADOS.	44
	5.1 Antagonismo de bacterias ácido lácticas	44
	5.2 Naturaleza bacteriocinogénica	44
	5.3 Espectro de inhibición	48
	5.4 Determinación de actividad	48
	5.4.1 Bacteriocinas activas sobre <i>Micrococcus luteus</i> NCIB8166	48
	5.4.2 Bacteriocinas no activas sobre <i>Micrococcus luteus</i> NCIB8166	48
	5.5 Efecto de la temperatura en la actividad	51
VI.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	52
	6.1 Detección de bacteriocinas.	52
	6.2 Clasificación con base en la naturaleza bacteriocinogénica.	53
	6.3 Clasificación con base en el espectro de inhibición.	54
	6.4 Actividad	55
	6.4.1 Bacteriocinas activas sobre <i>Micrococcus luteus</i>	56
	6.4.2 Bacteriocinas no activas sobre <i>Micrococcus luteus</i>	56
	6.5 Estabilidad térmica	58
	6.6 Selección de una cepa	59
VII.	CONCLUSIONES.	60

RECOMENDACIONES PARA POSTERIORES ESTUDIOS	62
APENDICE 1	63
Bacterias lácticas utilizadas	63
APENDICE 2	64
a. Actividad de las bacteriocinas en medio líquido sobre <i>Micrococcus luteus</i> a pH 6.2-6.8	64
b. Actividad de las bacteriocinas en medio líquido sobre <i>Micrococcus luteus</i> a pH 4.3-4.6	65
VIII. BIBLIOGRAFIA.	66

RESUMEN.

En el presente trabajo se llevó a cabo un escrutinio para detectar la producción de bacteriocinas (conservadores naturales) en 90 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de pozol; una bebida fermentada de maíz.

El antagonismo de las BAL se llevó a cabo aplicando el método de botón utilizando como indicadores cuatro microorganismos Gram (+); *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua* y tres microorganismos Gram (-); *Escherichia coli* 0157:H7, *Vibrio cholerae* 01 y *Vibrio cholerae* no 01. Se descartó la inhibición por producción de ácido, usando un medio sin carbohidratos fermentables. La inhibición por peróxido de hidrógeno se descartó incubando en anaerobiosis, usando jarras de anaerobiosis con gas pack e indicador. Fueron detectados compuestos inhibitorios en ocho de las noventa cepas estudiadas (3 cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, 3 cepas de *Lactococcus lactis lactis*, una cepa de *Lactobacillus crispatus* y una cepa de *Lb. acidophilus*). Dichos compuestos fueron de naturaleza protéica y se comprobó la ausencia de fagos, estableciéndose que los ocho compuestos inhibitorios encontrados son bacteriocinas.

Se realizó un espectro de actividad de las ocho cepas productoras de bacteriocinas usando 12 microorganismos Gram (+): *Bacillus cereus*, *Clostridium sporogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, ocho cepas de bacterias lácticas aisladas de pozol y 2 cepas Gram (-): *Escherichia coli* ECET y ECEP. Todas las cepas tuvieron efecto inhibitorio sobre microorganismos Gram (+), pero no presentaron efecto sobre ellas

mismas ni sobre microorganismos Gram (-); seis presentaron actividad contra *Listeria monocytogenes*.

La actividad antimicrobiana de 4 de las 8 bacteriocinas producidas por BAL, fue evaluada usando el método de difusión en agar (Bhunja et al., 1988: BS 4020:1974), en el que se utilizó *Micrococcus luteus* NCIB8166 como microorganismo indicador. La actividad fue definida en unidades arbitrarias por mililitro (UA/ml).

La actividad de las cuatro bacteriocinas restantes no se evaluó por este método, debido a que no presentaron actividad contra *Micrococcus luteus*. Estas cepas se probaron con tres microorganismos indicadores; *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* y *Leuconostoc mesenteroides* en dos medios de cultivo: Brain Heart Infusion (BHI) y medio Assay. Ninguna combinación de medios y los tres microorganismos indicadores produjo el tamaño de halos obtenido con *Micrococcus luteus* NCIB8166 en medio Assay.

Con base en el espectro de actividad, la sensibilidad a proteasas y la estabilidad al calor a diferentes valores de pH, se sugiere que de las 8 BAL productoras de bacteriocinas detectadas, dos de ellas: 59 y 60, producidas por cepas de *Leuconostoc mesenteroides* posiblemente se ubiquen dentro del grupo II. La bacteriocina producida por la cepa 19 (*Lactococcus lactis lactis*) se puede considerar en el grupo III. Las bacteriocinas de las cepas 12 (*Lactococcus lactis lactis*), 66 (*Leuconostoc mesenteroides*), 87 (*Lactobacillus crispatus*) y 88 (*Lactobacillus acidophilus*), no pueden ser estrictamente definidas dentro de un grupo, por la variabilidad de sus propiedades. La bacteriocina producida por la cepa 14 por sus características mostradas, se ubica dentro del grupo IIa.

Finalmente se observa que las bacteriocinas producidas por BAL aisladas de pozol son un grupo de compuestos antimicrobianos que son producidos por diversos géneros

bacterianos, difieren en su espectro de actividad y posiblemente en sus propiedades bioquímicas. Estas propiedades bioquímicas sólo podrán establecerse mediante la purificación de estos péptidos antimicrobianos y de esta forma poder contribuir significativamente a alcanzar un mejor entendimiento de su naturaleza, mecanismo de acción y uso posterior en los alimentos.

I. INTRODUCCION

Las enfermedades gastrointestinales (salmonelosis, tifoidea, cólera, listeriosis, shigelosis, tuberculosis, yersiniosis, difteria y hepatitis infecciosa) están asociadas al consumo de alimentos contaminados con microorganismos patógenos o sus toxinas, que al ser ingeridos por el ser humano subsisten en el tracto intestinal y pueden iniciar un proceso infeccioso (Doyle, 1997; Frazier y Westhoff, 1993; Barrel y Rowland, 1979).

Los microorganismos patógenos más comunes en alimentos son: *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei*, *Bacillus cereus* y *Vibrio cholerae* (Carminati et al., 1989; Spelhaug y Harlander, 1989; Cox, 1989).

Para prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos se requiere del uso de métodos de conservación tales como: refrigeración, tratamiento térmico, congelación y conservadores químicos. El tratamiento térmico y la congelación alteran las características fisicoquímicas del alimento. La refrigeración por sí sola garantiza una corta vida de anaquel, además que microorganismos como *Listeria monocytogenes* que son psicrótrofos pueden crecer a temperaturas de refrigeración comercial (4°C). La alternativa ha sido por mucho tiempo el uso de conservadores químicos como: dióxido de sulfuro, sulfitos, parabenos, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido benzóico, ácido sórbico, nitritos, nitratos (Lloydand Drake, 1975; Stiles, 1996; Goud, 1992).

En la actualidad el mercado demanda productos libres de conservadores químicos y mínimamente tratados, de manera que no se modifiquen las características fisicoquímicas

del alimento. Una alternativa para la solución de este problema es el uso de **bacteriocinas** (Vuyst y Vandamme, 1994; Stiles, 1996). Las bacteriocinas son proteínas antimicrobianas producidas por algunas cepas de bacterias ácido lácticas, que actúan a nivel de membrana (Doyle et al., 1997). Hasta el momento, la única bacteriocina permitida para uso en alimentos en más de 45 países es la nisina (Stiles, 1996) por lo que la búsqueda de nuevas bacteriocinas ha constituido un campo extenso de investigación en los últimos años.

El pozol es un alimento fermentado tradicional que se consume en el sureste de México (Ulloa y Herrera, 1986). La microbiología de este producto comprende principalmente BAL (Nuraida, 1988) que pueden tener potencial de producir bacteriocinas, además de otros grupos microbianos como: *Escherichia coli*, *Geotrichum candidum*, *Agrobacterium azotophilum*. Hasta el momento no existen reportes sobre bacteriocinas aisladas de bacterias ácido lácticas del pozol ni de ningún otro alimento fermentado tradicional.

II. GENERALIDADES.

2.1 Microorganismos patógenos.

Las bacterias patógenas se definen como microorganismos capaces de causar una enfermedad (Pelczar, 1993). La patogenicidad representa una forma de versatilidad y especialización que permite a ciertos microorganismos penetrar y replicarse dentro de animales específicos y dañar a células huésped, produciéndole cambios fisiológicos y anatómicos, como la enfermedad. La capacidad de un organismo para producir enfermedad puede fluctuar considerablemente (Pelczar, 1993).

Algunos microorganismos producen sustancias venenosas conocidas con el nombre de toxinas. La capacidad microbiana de producir toxinas, con su efecto perjudicial sobre el hospedero, junto con la potencia de la toxina, son factores importantes de su poder patogénico. Las toxinas microbianas pueden excretarse al medio exterior (exotoxinas) o quedar retenidas dentro de la célula (endotoxina) como parte de ella (Pelczar, 1991).

2.1.1 *Bacillus cereus*.

Es un microorganismo Gram (+), esporulado, móvil, psicrótrofo y aerobio (pero puede crecer bien en condiciones de anaerobiosis), que causa dos tipos de enfermedades asociadas a alimentos: el tipo diarréico y el tipo emético. La enfermedad de tipo diarréico es causada por una enterotoxina producida durante el crecimiento vegetativo de *Bacillus cereus* en el intestino, los síntomas presentados por esta enfermedad son: dolor abdominal, diarrea acuosa acompañada por espasmos rectales y náusea. En tanto que la toxina emética es producida por células que se desarrollan por algunos componentes presentes en el alimento a través de degradaciones enzimáticas y/o modificaciones, además es estable a

121 °C. Aunque en muchas ocasiones el alimento es tratado con calor, las esporas resisten, siendo así un foco de enfermedad, ya que dentro del intestino pueden germinar y provocar así la producción de la toxina, la enfermedad provocada por esta toxina se caracteriza por presentar náusea, vómito y ocasionalmente diarrea. *Bacillus cereus* es fácilmente diseminado en varios tipos de alimentos, especialmente en cereales y vegetales, pero también es frecuentemente aislado de carnes, huevos y productos lácteos (Granum, 1994; Doyle et al., 1997; Koneman et al., 1992).

2.1.2 *Staphylococcus aureus*.

Es un coco Gram (+), catalasa (+), osmotolcrante y soporta una actividad acuosa (aw) baja (Koneman, et al., 1992). *Staphylococcus aureus* produce una enterotoxina que ha sido implicada como causante del síndrome de choque tóxico y envenenamiento en alimentos. Esta enterotoxina no es destruida a 100°C por 30 minutos. La diseminación de *Staphylococcus aureus* en los alimentos se lleva a cabo por humanos, por contacto directo o indirectamente a través de la respiración. La producción de la toxina se propicia por refrigeración inadecuada, escasa higiene del personal, calentamiento inadecuado o un uso prolongado de bajo calentamiento y la podemos encontrar en carnes, utensilios almacenados, leche contaminada y productos diversos que han sido manipulados por el hombre (Bryan, 1976; Doyle et al., 1997).

2.1.3 *Clostridium perfringens*.

Es un microorganismo Gram (+), catalasa (-), encapsulado, anaeróbico y no móvil. Produce dos tipos de toxina: enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE) y β -toxina, que son activas en el tracto gastrointestinal del humano (Labbe, 1989; McDonel, 1986; Koneman, et al., 1992). Las células vegetativas pueden duplicarse hasta en 10 minutos,

permitiendo que el microorganismo se multiplique rápidamente en el alimento; produce esporas que son altamente resistentes a condiciones tales como: radiación, desecación y calor (Labbe, 1989). Una de las enfermedades causada por este microorganismo es la gangrena gaseosa, sin embargo, es más común que provoque una intoxicación alimentaria. El alimento en el que se disemina fácilmente es la carne y se han encontrado esporas de este microorganismo en la mayoría de los alimentos crudos analizados (Doyle et al., 1997; Frazier y Westhoff, 1993).

2.1.4 *Listeria monocytogenes*.

Es un bacilo corto, Gram (+), catalasa (+), móvil; resiste condiciones de bajo pH, alta concentración de NaCl (30%) y concentraciones de nitritos permitidas (200 ppm) en alimentos. Tiene la habilidad de crecer a bajas temperaturas (psicrótrofo) y no soporta la temperatura de pasteurización (72°C/15 seg.) (Cox L., 1989; Frazier y Westhoff, 1993; Koneman, et al., 1992). Se ha indicado que la apropiada pasteurización de la leche destruye a este microorganismo, sin embargo, se han reportado casos de leche contaminada por este microorganismo, por lo que se cree que la contaminación de la leche es un problema posterior a su pasteurización (Bradshaw, 1985; Donnelly y Briggs, 1986).

Listeria monocytogenes es el agente causante de listeriosis, cuya incidencia es esporádica, pero con un grado de mortandad de aproximadamente 30%, afectando principalmente a mujeres embarazadas. La infección puede ser asintomática o caracterizada por una gripa con fiebre, migraña o dolor de cabeza. Las consecuencias para el feto son más serias, incluyendo el aborto espontáneo, muerte fetal, parto prematuro, septicemia neonatal severa y meningitis (Cox, 1989; Bula et al., 1995). En adultos la enfermedad se caracteriza por síntomas de septicemia, meningitis o meningoencefalitis.

Alrededor de 1 a 5 % de los humanos son portadores intestinales asintomáticos de *Listeria monocytogenes* (Frazier y Westhoff, 1993; Koneman et al., 1992).

Listeria monocytogenes se presenta en una gran variedad de alimentos crudos y procesados, en su mayoría: leche y productos lácteos, carne y productos cármicos y vegetales (Doyle et al., 1997; Cox L., 1989; Koneman et al., 1992).

2.1.5 *Escherichia coli*.

Es un microorganismo Gram (-), no esporulado, tiene la habilidad de invadir la mucosa intestinal. Las cepas patogénicas de *E. coli* están agrupadas en 6 categorías: Enterotoxigénica (ECET), enteroinvasora (ECEI), enteropatógena (ECEP), enterohemorrágica (ECEH), enteroagregativa (ECEAgg) y enteroadherente-difusa (ECEAD); cada categoría tiene distintos niveles de virulencia, formas patogénicas específicas, así como síndromes clínicos y patrones epidemiológicos diferentes (Doyle et al., 1997). Las últimas dos categorías de *E. coli* mencionadas se relacionan con brotes esporádicos de diarrea.

Escherichia coli enteroinvasora no produce enterotoxinas mientras que *E. coli* enterohemorrágica que es representada por *E. coli* 0157:H7 produce dos toxinas básicas y ambas cepas se encuentran asociadas a brotes de origen alimentario. *E. coli* enteropatógena generalmente no produce enterotoxinas, aunque puede causar diarrea; produce un factor de adherencia mediado por plásmidos que se puede poner de manifiesto mediante el efecto de adherencia-separación y en algunas cepas se ha señalado la existencia de una toxina dilatadora citoletal. Los brotes que han sido originados por *Escherichia coli*, están asociados al consumo de alimentos altamente ácidos incluyendo: sidra de manzana y salami fermentado (Doyle et al., 1997).

En México la cepa de mayor incidencia es ECET 078 (Eslava, comunicación personal). La cepa de mayor preocupación en el mundo es la 0157:H7, aunque en México no se ha aislado este serotipo.

2.1.6 *Vibrio cholerae* .

Es un microorganismo Gram (-), catalasa (+), no esporulado, con forma de bastón curvo caracterizado por la presencia de un flagelo polar (Koneman et al., 1992; Mintz et al., 1994). Los humanos son su único hospedero. El principal vehículo de este microorganismo es el agua, por lo que es frecuente encontrarlo en productos marinos, especialmente en las ostras; también es posible encontrarlo en alimentos que hayan sido preparados con aguas contaminadas, por ejemplo el arroz y carne (Mintz et al., 1994). Los alimentos contaminados con *Vibrio cholerae* se caracterizan por un pH neutro o cercano a la neutralidad (Kaysner y Hill, 1994). *Vibrio cholerae* es un microorganismo sensible al calor y al frío y es el causante del cólera, que se caracteriza por causar una diarrea acuosa que provoca una mayor pérdida de fluidos a comparación de otras infecciones gastrointestinales, lo cual es inducido por la enterotoxina del cólera (Doyle et al., 1997).

2.2 Conservadores.

2.2.1. Definición.

Un conservador es toda sustancia que inhiba, retrase o detenga el crecimiento de los microorganismos patogénicos o deterioradores, cuando es añadida a un alimento (Board, 1988).

2.2.2. Aplicaciones.

Los conservadores usados en alimentos pueden ser de naturaleza orgánica e inorgánica.

Muchos ácidos orgánicos son usados como aditivos alimentarios, pero no todos tienen actividad antimicrobiana. Los ácidos más activos son: acético, láctico, propiónico, sórbico y benzóico; su espectro inhibitorio es dependiente del ácido a usar. Los ácidos cítricos, caprílico, málico, fumárico y otros tienen actividad limitada y además son usados para impartir sabor. La actividad de los ácidos orgánicos es altamente dependiente del pH, pKa y concentración. Hay evidencia de que los ácidos orgánicos y ésteres influyen en la síntesis de la pared celular de procariontes o interfieren en la síntesis de proteínas y mecanismos genéticos. La bacteria mantiene su pH interno cerca de la neutralidad para prevenir cambios conformacionales de las estructuras protéicas de la célula, enzimas, ácidos nucleicos y fosfolípidos. Una vez que el ácido entra a la célula se disocia, ya que el interior de la célula tiene un pH más alto que el exterior. (Doyle et al., 1996). El uso de los ácidos orgánicos en la industria alimentaria es amplio; ácido benzóico y sus sales (en productos ácidos que contienen azúcar), ácido sórbico y sus sales (panificación, quesos y algunos productos de confitería) (Board, 1988).

Otros aditivos alimentarios son los alquil éster parabenos, que son derivados fenólicos; la actividad antimicrobiana de estos compuestos es, en general, directamente proporcional al tamaño del componente alquilo y son más activos contra hongos y levaduras que contra bacterias. Contra bacterias, los parabenos son más activos contra géneros Gram (+). El mecanismo de acción de los alquil éster parabenos no ha sido determinado aún, sin embargo, se han reportado varias investigaciones, en su mayoría

referidas a un efecto sobre la membrana celular (Degré y Sylvestre, 1983; Eklund, 1983, 1985).

Los nitritos de sodio y potasio tienen un uso especializado en productos cárnicos curados, que además de ser agentes antimicrobiales contribuyen al sabor y color, y sirven como un antioxidante. El uso primario del nitrito de sodio como un antimicrobiano es la inhibición del crecimiento y producción de toxinas de *Clostridium botulinum* en carnes curadas. Su efecto antimicrobial depende de la concentración. Woods et al. (1981) demostraron que el nitrito causa una reducción del ATP intracelular y la excreción de piruvato a las células de *Cl. sporogenes*.

El cloruro de sodio es usado en altas concentraciones para conservar carnes crudas y productos marinos. En general las bacterias patógenas asociadas a alimentos son inhibidas por una actividad de agua (a_w) de 0.92 o menor (equivalente a una concentración de cloruro de sodio de 13% p/v). *S. aureus* y *L. monocytogenes* son la excepción ya que el primero tiene una actividad de agua mínima para crecer de 0.83 a 0.86 y el segundo es relativamente halotolerante y puede sobrevivir en soluciones salinas saturadas a bajas temperaturas. Su acción se basa en la disminución del a_w y crea condiciones desfavorables para el crecimiento microbiano.

Los sulfitos como sustancias antimicrobiales se aplican en frutas y productos vegetales para el control de 3 grupos de microorganismos: esporulados, levaduras y hongos. Estos componentes son agentes reductores.

La conservación se enfoca a extender la vida de anaquel y aumentar la seguridad de los alimentos, haciendo uso de bacterias ácido lácticas o sus productos metabólicos (Stiles, 1996). La bioconservación de los alimentos se refiere a extender la vida de

almacenamiento y aumentar la seguridad de los alimentos, usando como tal la microflora natural y/o sus productos antibacteriales. Las bacterias lácticas tienen mayor potencial para uso en la biopreservación porque tienen status GRAS, generalmente reconocidas como seguras para el consumo, y durante el almacenamiento de los alimentos puede dominar la microflora natural.

2.3 Bacteriocinas.

En 1925 en Bélgica se descubrió que los filtrados de una cepa de *E. coli* inhibían el crecimiento de otras cepas de la misma especie. Más tarde se demostró que la sustancia inhibidora era letal y se denominó *colicina*. Desde entonces se han aislado agentes similares de cepas de varios géneros microbianos: *Pseudomonas pyocyaneus* (piocinas), *Bacillus megaterium* (megacinas) y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (nisina A y Z); cada una actúa sólo sobre los organismos taxonómicamente relacionados con el que las produce; el grupo, en conjunto, se denomina actualmente *bacteriocinas* (Freeman, 1989; Jay, 1992; Pelczar, 1991).

Las bacteriocinas difieren de los antibióticos, ya que, además de ser principalmente de naturaleza protéica, sólo inhiben a especies taxonómicamente relacionadas o a diferentes cepas de la misma especie; además de que no tienen uso terapéutico ni en humanos ni en animales (Jay, 1992). Ciertas colicinas al ser añadidas a un exceso de bacterias sensibles, destruyen un número de ellas directamente proporcional a la cantidad de colicina añadida, lo que demuestra que una molécula de colicina es suficiente para destruir una bacteria (Freeman, 1989).

Las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas ejercen principalmente un efecto antibacterial contra microorganismos específicos o relacionados taxonómicamente, cubriendo un extenso rango de bacterias Gram (+) (Doyle et al., 1997). Las bacterias Gram (-) son susceptibles sólo cuando han sido tratadas con agentes quelantes como el EDTA, alta presión hidrostática o alguna otra lesión que destruya la pared celular y permita el acceso a las bacteriocinas a la membrana periplasmática (Stevens et al., 1991; Kalchayanand et al., 1994).

2.3.1 Clasificación.

Las bacteriocinas difieren en su espectro de actividad, modo de acción, características bioquímicas y determinantes genéticos. En general una serie de propiedades bioquímicas comunes, son: sensibilidad a la acción de enzimas proteolíticas, tolerancia a elevadas temperaturas y estabilidad a bajo pH (Doyle et al., 1997; Stiles, 1996; Lloyd y Drake, 1975; Piard y Desmazeaud, 1992).

Las bacteriocinas se clasifican en cuatro grupos (Tabla 2.1):

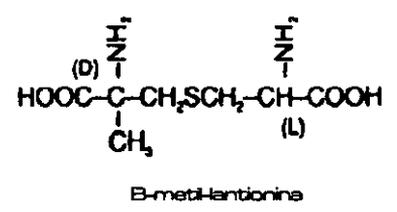
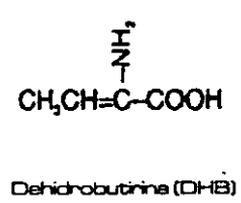
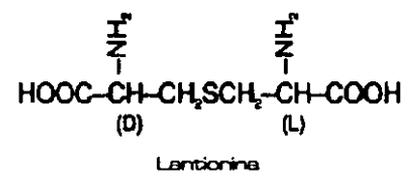
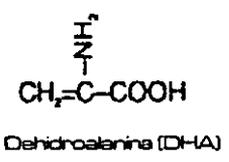
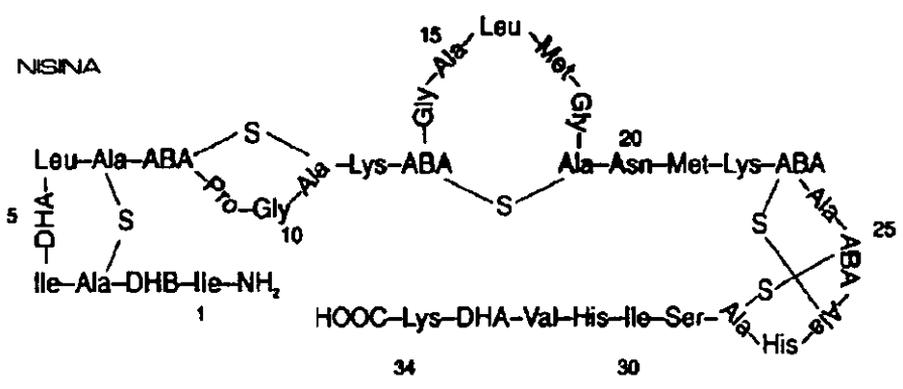
- Grupo I. Dentro de este grupo se encuentran las bacteriocinas que contienen anillos de lantionina, comúnmente conocidas como lantibióticos; la bacteriocina láctica mejor caracterizada hasta el momento dentro de este grupo, es la nisina, que tiene 2 formas: nisina A, que contiene una histidina en la posición 27 y nisina Z, que contiene una asparagina en la misma posición (figura 2.1). La subtilina, producida por *Bacillus subtilis* también contiene 5 anillos de lantionina y una conformación similar a nisina, ésta tiene otras sustituciones incluyendo dos aminoácidos en el carboxilo terminal más cortos que los de nisina.

- Grupo II. Se subdivide en tres grupos:

Tabla 2.1. Clasificación de bacteriocinas.

Clase	Características
I	Lantibióticas <5KDa; contienen aminoácidos raros o atípicos, como la dehidroalanina, dehidrobutirina, lantionina y β -metillantionina.
II	proteínas termoestables no lantibióticas de cadena corta <10KDa
III	proteínas termolábiles de peso molecular superior a 30KDa
IV	estructura compleja, termolábiles y mayores de 30KDa.

Figura 2.1 Estructura molecular de la nisina



IIa) Bacteriocinas activas contra *Listeria monocytogenes*, como la pediocina PA-1, sakacinas A y P, leucocina A, bavaricina MN y curvacina A.

IIb) Contiene bacteriocinas tales como: lactococcina G y M y lactacina F, las cuales requieren de dos péptidos diferentes para su actividad (Allison et al., 1994).

IIc) Bacteriocinas que requieren de cisteinas reducidas para su actividad, tal como lactacina B.

•Grupo III. Pertenecen bacteriocinas como: helveticinas J y V-1829, acidofilucina A, caseicina 80 y lactacinas A y B.

•Grupo IV. Bacteriocinas que contienen lípidos y carbohidratos, cuya función aún es desconocida pero necesaria para su actividad biológica. Ejemplos: leucocina S, plantaricina S, pediocina SJ-1 y lactocina 27; (Klaenhammer, 1993). Se han descrito bacteriocinas sensibles a enzimas no proteolíticas, como la plantaricina B que se inactiva por una lipasa y por una α -amilasa (West y Warner, 1988); la plantaricina S que se inactiva por enzimas glicolíticas, lipolíticas y fosfolipolíticas (Jiménez-Díaz et al., 1990) y la leucocina S que se inactiva por una amilasa (Lewus et al., 1992). Estas observaciones indican que la zona activa de estas bacteriocinas presentan una composición heterogénea (Klaenhammer, 1993).

2.3.2 Mecanismos de acción.

Las bacteriocinas actúan sobre la membrana celular del microorganismo sensible; rompiendo la permeabilidad de la membrana citoplasmática, incrementando la permeabilidad de pequeños compuestos (K^+ , Na^+ , Cl^-) y haciendo que las células sean incapaces de proteger al citoplasma del medio ambiente. Esto induce a inhibición celular y

posiblemente a muerte. La adición de bacteriocinas a células vegetativas da como resultado un flujo inespecífico de iones aminoácidos y en algunos casos pero no en todos de moléculas de ATP (Chen y Montville, 1995; Maftah et al., 1993; Winkowski et al., 1994).

Se conocen 2 tipos de mecanismos de acción:

1.- Por formación de poros (figura 2.2a); en el cual los monómeros de bacteriocina enlazados se insertan y oligomerizan en la membrana citoplasmática para formar un poro con los residuos hidrofílicos en la cara interior y los hidrofóbicos en la cara exterior (Klaenhammer, 1993; Abee, 1994; Chikindas et al., 1993).

2.- Efecto detergente (figura 2.2b); en el que las bacteriocinas hacen más permeable a la membrana, aumentando la interacción de ésta con el medio ambiente permitiendo la liberación de pequeñas moléculas de iones, enzimas e inclusive ATP (Sahl et al., 1985; Chikindas et al., 1993).

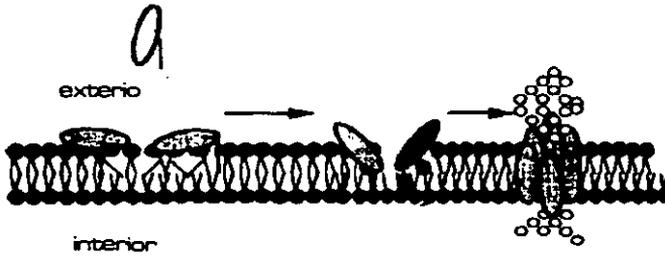
2.3.3 Métodos de detección.

Para detectar la producción de bacteriocinas de bacterias ácido lácticas se utilizan métodos directos o métodos indirectos.

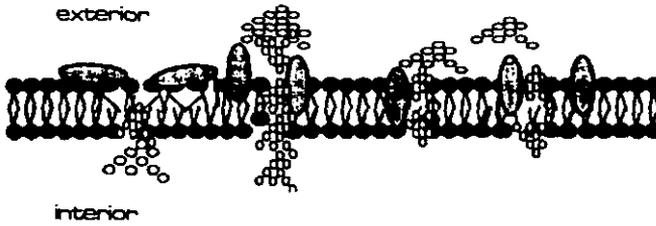
Métodos directos	Métodos indirectos
Método de pozos	Método de botón
	Método de rotación

Figura 2.2 Mecanismos de acción de bacteriocinas

2.2a Formación de poro



2.2b Efecto detergente



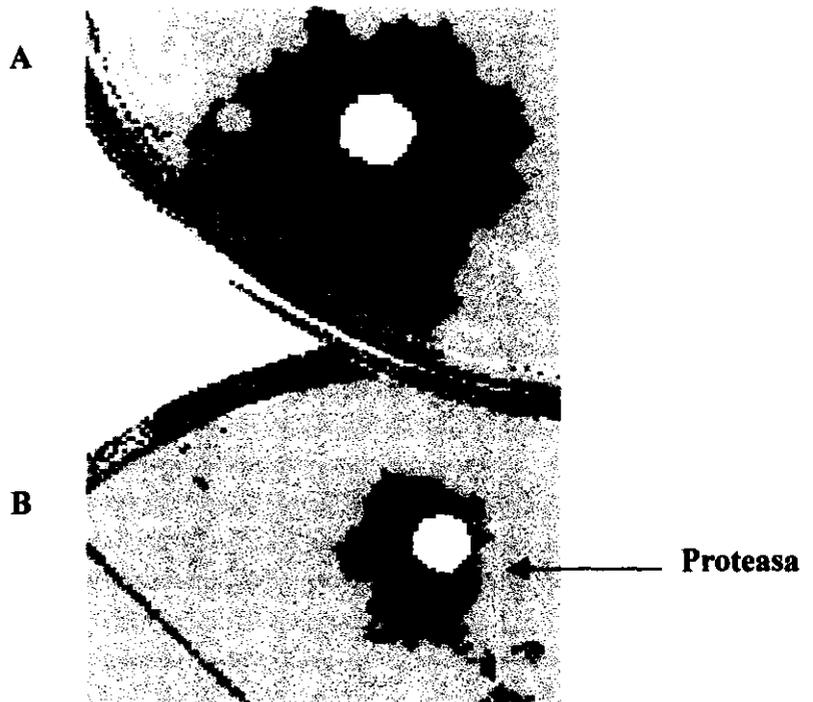
El método de rotación se basa en sembrar sobre una placa de agar la cepa productora de bacteriocina, voltear boca abajo la placa de agar con crecimiento y perpendicularmente a la cepa productora de bacteriocina sembrar el microorganismo sensible.

El método de botón es el más común para demostrar la detección de la producción de bacteriocinas. Consiste en inocular sobre una placa de agar puntos del cultivo que contienen a la bacteria productora de bacteriocina, posteriormente se adiciona una sobrecapa de agar que contiene al microorganismo sensible. Zonas de inhibición en forma de halos en el contorno del crecimiento de la bacteria son evidencia presuntiva de la producción de bacteriocinas (figura 2.3). Tales zonas pueden también ser producidas por ácidos, bacteriófagos, peróxido de hidrógeno u otros inhibidores no específicos. Por lo que es necesario confirmar que estos otros factores pueden controlarse (Lewus et al., 1992).

2.3.3.1 Control de peróxido de hidrógeno.

Durante la fermentación láctica en ausencia de oxígeno el NAD^+ se regenera a partir del NADH mediante la reducción del piruvato a lactato (figura 2.4). En presencia de oxígeno, éste funge como aceptor de electrones (figura 2.4), con la consecuente producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que es un compuesto inhibitorio (Lehninger et al., 1993). Para descartar la formación de halos por producción de peróxido de hidrógeno las bacterias ácido lácticas se cultivan en condiciones anaerobias con la ayuda de una jarra de anaerobiosis usando gas pack e indicador(Lewus et al., 1992).

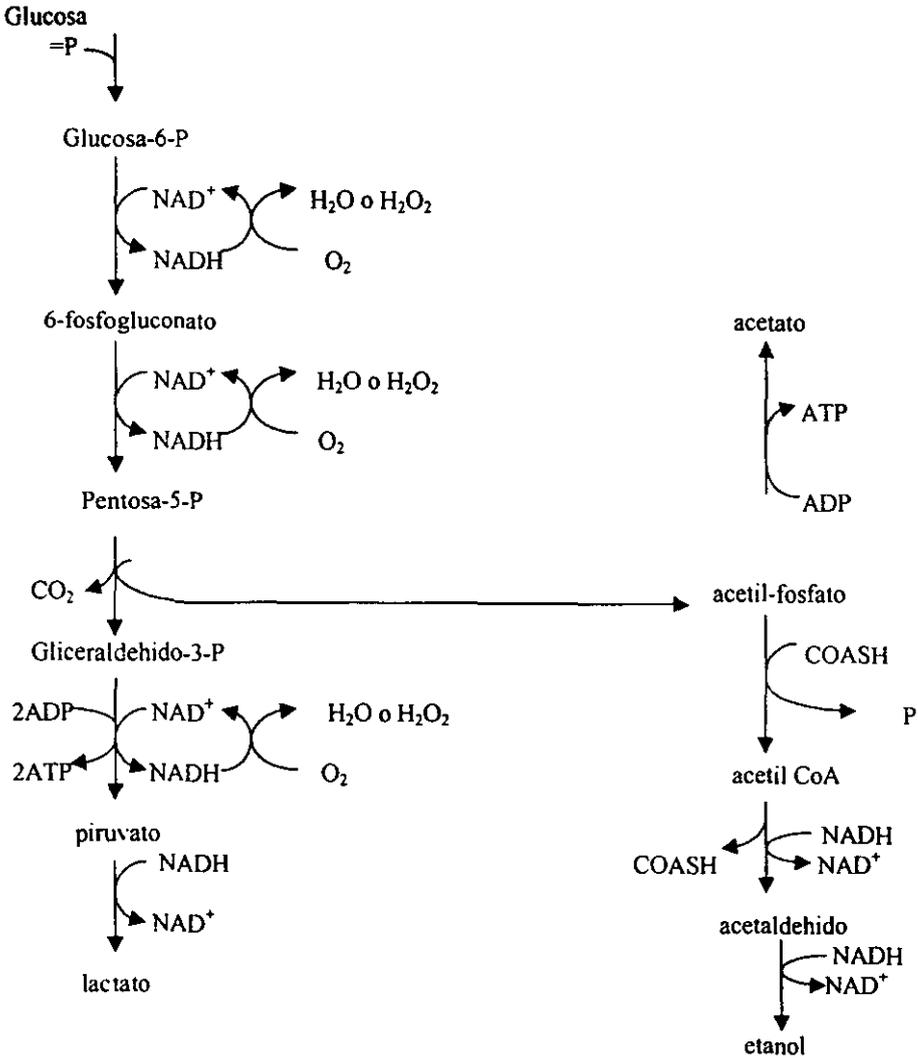
Figura 2.3 Evidencia presuntiva de la producción de bacteriocinas



Evidencia presentada con el método de botón.

- A. Inhibición producida por una bacteriocina (ausencia de proteasa).
- B. Halo de inhibición modificado por la presencia de proteasa.

Fig. 2.4 Asimilación de la glucosa por bacterias lácticas en presencia de oxígeno.



Cordon, 1987.

2.3.3.2 Control de la formación de ácido.

Para dar lugar a la formación mínima de ácidos orgánicos se utiliza un medio con carbohidratos no disponibles para la producción de éste, como el agar soya tripticasa con extracto de levadura en vez de un medio rico en glucosa (Lewus et al., 1992).

2.3.3.3 Control de bacteriófagos.

Los bacteriófagos (o simplemente fagos) son virus que infectan a bacterias, son las entidades biológicas más pequeñas y más sencillas que se conocen y son capaces de autorreplicarse (de hacer copias de sí mismas). Los fagos existen en la mayoría, si no en la totalidad de las bacterias (Pelczar, 1991). El bajo nivel de bacteriocinas que se encuentra generalmente en los cultivos es probablemente producido por una pequeña porción de células, de forma parecida a como ocurre con los fagos libres en un cultivo. Además las células de ciertas cepas productoras de bacteriocinas pueden ser inducidas para formar bacteriocina utilizando los mismos agentes que inducen a ciertas cepas lisogénicas a formar fagos infectantes. Para descartar la inhibición por fagos se expone una muestra del halo de inhibición en un medio con microorganismos sensibles, si se observa crecimiento indica la presencia de bacteriocinas (Lewus et al., 1992).

2.3.3.4 Naturaleza protéica.

Dado que las bacteriocinas son de naturaleza protéica se utilizan proteasas para asegurar que el halo de inhibición es debido a bacteriocinas; la inhibición del halo por proteasas (figura 2.3) indica la naturaleza protéica de la sustancia inhibitoria (Doyle et al., 1997; Lewus et al., 1992; Lewus y Montville, 1991; Lloyd y Drake, 1975).

2.3.4 Aplicaciones.

Debido a su naturaleza proteica, todas las bacteriocinas se inactivan por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático y algunas de origen gástrico, como la pepsina. Esta característica es bastante interesante con respecto a la utilización de éstas en productos alimentarios, puesto que serian inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidas como compuestos activos y sin causar, por tanto, los riesgos relacionados como el uso de antibióticos y otros conservadores que se acumulan en el organismo humano (Lloyd y Drake, 1975).

La nisina, producida por *Lactococcus lactis ssp. lactis* obtuvo su status GRAS en 1988 (Generally Recognized as Safe), generalmente reconocido como seguro. En USA el status GRAS es conferido por la FDA (Food and Drug Administration) (Stiles, 1996). Actualmente la nisina es la única bacteriocina disponible comercialmente para ser añadida en forma pura (Stiles, 1996; Sears, et al., 1992). La nisina se usa como conservador en varios alimentos como: productos lácteos (leche y queso), productos cárnicos, en alimentos en conserva, mayonesa y productos para bebé entre otros (Hurst, 1981; Lipinska, 1977); la nisina se utiliza principalmente para evitar el crecimiento de *Clostridium botulinum* en alimentos (Rogers y Montville, 1994). La forma Z es más efectiva que la forma A, debido a una mayor solubilidad a pH mayor de 3, lo cual diversifica su uso, y se ha demostrado que la forma Z extiende la vida de anaquel de 10 días para una muestra de camarón sin nisina a 31 días para la muestra preservada con nisina (Einarsson y Lauzon, 1995).

Las pediocinas, producidas por *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus cerevisiae* (Stiles, 1996; Doyle et al., 1997) inhiben a las células vegetativas de *Listeria monocytogenes*, por lo que pueden ser usadas como agentes antilistéricos en alimentos tales

como: crema, queso cottage, carnes y ensaladas (Pucci et al., 1988; Vanderbergh et al., 1989). Según Nielsen et al., (1990) la pediocina PA-1 es más efectiva que la nisina en carne y productos lácteos contra *Listeria monocytogenes*. Otros estudios (Degnan et al., 1992-1993) revelaron que la pediocina Ach reduce la actividad de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos, siendo más efectiva a 4°C que a 25°C.

En alimentos con alta cantidad de grasa la actividad de pediocina y nisina en contra de *Listeria monocytogenes* se ve afectada, la actividad de pediocina aumenta, en tanto que la actividad de nisina disminuye, esto se ha evitado utilizando agentes emulsificantes no iónicos como el Tween 80 (Degnan et al., 1992; Jung et al., 1992).

Otras bacteriocinas ampliamente estudiadas son: mesenteriocina producida por *Leuconostoc mesenteroides* (Hécharde et al., 1992); leuconocina S por *Leuconostoc paramesenteroides* (Lewus et al., 1992); leucocina A por *L. gelidum* (Harding y Shaw, 1990); curvacina A por *Lactobacillus curvatus* (Hastings et al., 1991); sakacina A por *L. sake* (Schilinger y Lucke, 1989; Holck et al., 1992); sakacina P por *L. sake* (Tichaczek et al., 1992). A estas bacteriocinas no se les ha conferido el status GRAS aún (Requena y Peláez, 1995).

Desafortunadamente, sólo algunas bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas han sido purificadas y más pocas han sido caracterizadas genéticamente (Klaenhammer, 1988, 1993; Schillinger, 1990; Piard y Desmazeud, 1992).

2.4 Bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen un gran potencial como bioconservadores de alimentos porque su consumo no implica riesgos para el humano, éstas tienen status GRAS para su uso en alimentos, tales como la producción de alimentos fermentados (Marrug, 1991; Stiles, 1996). Las bacterias ácido lácticas son microorganismos Gram (+), microaerofílicos no esporulados, cuyo producto de fermentación es principalmente lactato a partir de carbohidratos. Las bacterias ácido lácticas producen una serie de sustancias antimicrobianas responsables de la estabilidad de los alimentos fermentados. La capacidad de las bacterias ácido lácticas para producir ácidos orgánicos, con el consiguiente descenso de pH, es el principal factor de inhibición en los productos fermentados. Otros componentes del metabolismo de bacterias ácido lácticas son: el peróxido de hidrógeno, diacetilo, reuterina y las bacteriocinas (Tagg et al., 1976).

Los alimentos asociados con bacterias ácido lácticas son: leche y productos lácteos (queso cottage, otros quesos, mantequilla y yogurt); carnes crudas, semiconservadas y fermentadas y vegetales fermentados (Stiles, 1996).

Las principales bacterias ácido lácticas reportadas como productoras de bacteriocinas son: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Pediococcus* y *Lactococcus* (Lewus et al., 1991; Mckay, 1983, 1985).

No ha sido muy difícil aislar las bacterias productoras de bacteriocinas a partir de alimentos. Se ha reportado el efecto inhibitorio de bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas de carne y productos cárnicos contra *Staphylococcus aureus* (Lewus et al., 1991), *Listeria monocytogenes* (Yousef et al., 1991; Lewus et al., 1991; Berry et al., 1990-1991; Van der Vossen et al., 1994; Hugas et al., 1995), *Brochothrix thermosphacta*

(Gardner, 1981; Van der Vossen et al., 1994), *Clostridium sporogenes* (Van der Vossen et al., 1994), *Carnobacterium* (Siragusa y Nettles Cutter, 1993), *Enterococcus* (Siragusa y Nettles Cutter, 1993), *Kurthia* (Siragusa y Nettles Cutter, 1993), *Clostridium botulinum* (Hutton et al., 1991); en leche y productos lácteos se ha encontrado efecto inhibitorio contra *Clostridium botulinum* (Somers y Taylor, 1987), *Clostridium sporogenes* (Zottola et al., 1994), *Listeria monocytogenes* (Maisnier-Patin et al., 1992; Giraffa et al., 1995; Muriana, 1996). Es generalmente reconocido que las bacteriocinas no tienen efecto inhibitorio contra microorganismos Gram (-) debido a la presencia de la membrana que tiene mayor cantidad de LPS (lipopolisacáridos) (Siragusa y Nettles Cutter, 1993), sin embargo, Simonetta et al. (1997) reportaron un efecto inhibitorio de *Enterococcus* aislados de leche y productos lácteos argentinos contra *Vibrio cholerae* 01 y *Vibrio cholerae* no-01.

2.5 Alimentos fermentados.

La fermentación se refiere al metabolismo de compuestos orgánicos mediante procesos de oxidación-reducción por diversos microorganismos (Voet, 1995).

Las bacterias productoras de ácido láctico son las causantes principales de la fermentación en algunos alimentos, por ejemplo: col, pepinillos, aceitunas verdes, salsas, etc.; y los microorganismos que producen los cambios deseados son los de la flora natural del material por fermentar o cepas que se agregan como cultivos iniciadores.

Se ha encontrado que los microorganismos patógenos que provocan diarrea y otras enfermedades no sobreviven por largos periodos de tiempo en alimentos fermentados.

El pozol es un alimento fermentado tradicional que se consume como bebida refrescante en el sureste de México. El pozol es una fuente rica en bacterias ácido lácticas

que incluye cepas de: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus confusus*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis*. (Nuraida et al., 1995). Además de su consumo como bebida refrescante tiene un uso empírico para combatir ciertos trastornos gastrointestinales y algunas infecciones de la piel o heridas; existen también algunos reportes de que el pozol ha sido utilizado por los mayas desde tiempos prehispánicos con propósitos similares (Herrera y Ulloa, 1975).

Actualmente el consumidor desea un alimento más natural e inocuo, además de que promueva la salud (Goud, 1992).

La producción de bacteriocinas por las bacterias ácido lácticas no es un fenómeno aislado. En los productos fermentados es posible que los diversos géneros de bacterias ácido lácticas usen este mecanismo de producción de antimicrobianos para asegurar que durante la competencia puedan dominar la microflora de estos alimentos.

III. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

Realizar un escrutinio para detectar la producción de bacteriocinas con alto potencial para uso en alimentos en 90 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de pozol y determinar su efecto inhibitorio contra los siguientes microorganismos patógenos: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*.

3.2 Objetivos particulares.

- 3.2.1 Detectar sustancias inhibitorias (bacteriocinas) de las 90 cepas de BAL mediante la técnica de botón usando microorganismos indicadores incluyendo cepas de microorganismos patógenos.
- 3.2.2 Comprobar la naturaleza protéica de las sustancias inhibitorias.
- 3.2.3 Determinar la actividad y estabilidad térmica de los compuestos bacteriocinogénicos.
- 3.2.4 Ubicar a las bacteriocinas dentro de la clasificación de Klaenhammer como antecedente para posteriores estudios

IV. MATERIALES Y METODOS.

4.1 Microorganismos.

4.1.1 Bacterias ácido lácticas.

Se utilizaron 90 cepas de bacterias ácido lácticas pertenecientes a una colección de bacterias aisladas de pozol. Las cepas fueron aisladas en estudios anteriores (Nuraida, 1988 y Cañas, 1991) de diferentes muestras de pozol del estado de Chiapas e identificadas taxonómicamente mediante el uso de pruebas bioquímicas miniaturizadas API 50 CHL y el uso de un programa APILAB (BioMérieux) por Flores (1996) (apéndice 1).

4.1.2 Microorganismos indicadores.

Se utilizaron 13 microorganismos indicadores enlistados en la tabla 4.1.

4.2 Medios de cultivo y soluciones.

4.2.1 Medios de cultivo.

Los medios utilizados fueron los siguientes: caldo APT (Ail Purpose with Tween) (Difco 0655-017-9); medio APT semisólido [caldo APT adicionado con 0.2% de agar bacteriológico (Oxoid C150-1) con una punta de espátula de CaCO_3]; caldo MRS (Seg. De Man, Rogosa y Sharpe) (Oxoid CM 359); Agar ST (Soya Trypticase) sin glucosa (Oxoid CM131) adicionado con 0.5% de extracto de levadura (Difco 0127-17-4); Caldo soya tripticase (CST) (Bioxon C111-1); Caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid CM225); Agar BHI 1.5 (caldo BHI adicionado con 1.5% de agar bacteriológico); Agar BHI 0.8 (caldo BHI adicionado con 0.8% de agar bacteriológico); Agar nutritivo (Bioxon 103-1); Caldo tioglicolato (Difco 0256-17-2) Medio Assay caldo (g/l: peptona bacteriológica 10, extracto

Tabla 4.1. Microorganismos indicadores.

Especie	Cepa y origen
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778 ^b
<i>Bacillus cereus</i>	B3-13, cepario de la Facultad de Química de la UNAM
<i>Clostridium sporogenes</i>	PA3679 ^c
<i>Clostridium perfringens</i>	C22, Cepario de la Facultad de Química, UNAM.
<i>Escherichia coli</i> 078:H11	H10407
<i>Escherichia coli</i> 088:H25	FQ/pozol 1 M48-4 ^e
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	ATCC 43895 ^a
<i>Listeria innocua</i>	BA1 ^b
<i>Listeria monocytogenes</i>	Scott A ^b
<i>Micrococcus luteus</i>	NCIB 8166 ^b
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 259223 ^c
<i>Vibrio cholerae</i> 01	FMU 087286 ^d
<i>Vibrio cholerae</i> no 01	FMU 087247 ^d

^a donada por F. Diaz, Dept. of Food Science, Cornell University, Nueva York.

^b donada por B. Garcia, Posgrado de Alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro.

^c donada por T. J. Montville, Dept. of Food Science, Rutgers University, New Jersey.

^d cepa clínica donada por A. Navarro, laboratorio de Salud Pública, División de Posgrado, Facultad de medicina, UNAM.

^e donada por C. Wachter, Depto. De Alimentos y Biotecnología, UNAM.

de carne 3, NaCl 3, extracto de levadura 1.5 y azúcar mascabada 1); Medio Assay sólido 1.5: la formulación anterior adicionada con 1.5% de agar bacteriológico; Medio Assay sólido 0.8: la formulación anterior con 0.8% de agar bacteriológico.

4.2.2 Soluciones.

Solución Ringer (g/l: NaCl 9, KCl 0.42, CaCl₂·2H₂O 0.24 y NaHCO₃ 0.20).

Solución Ringer ¼: Una parte de la solución Ringer se adicionó a 3 partes de agua destilada.

Tween 20 (Research organics 3061T) diluido 1:1 (v/v) con agua.

4.3 Conservación y cultivos de trabajo de las cepas.

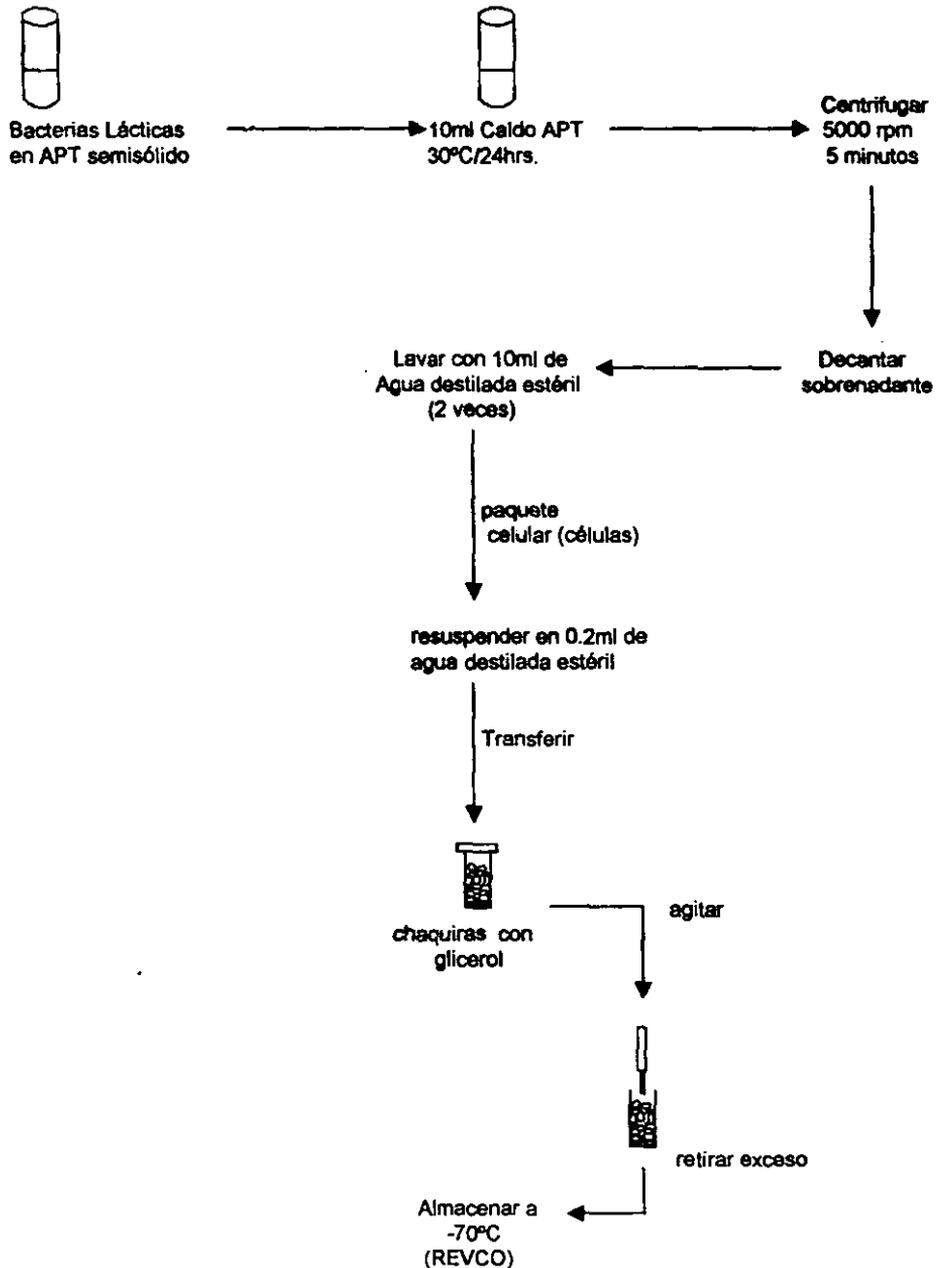
4.3.1 Conservación de bacterias ácido lácticas.

Las 90 bacterias ácido lácticas utilizadas en este trabajo provienen de la colección UNAM mantenida a -70°C (REVCO). Las cepas con actividad bacteriocinogénica se almacenaron en ultracongelación de acuerdo al diagrama mostrado en la figura 4.1.

4.3.2 Cultivos de trabajo de bacterias ácido lácticas.

Los cultivos de trabajo de las BAL se elaboraron de la siguiente manera: se inocularon 3 ml de caldo APT con una chaquirá que contenía células de la cepa deseada incubando por 24 horas a 30°C. Se transfirió una asada a 3 ml de medio APT semisólido, se incubó por 24 horas a 30°C y se conservó a 4°C resembrando bimestralmente.

Figura 4.1 Preparación de bacterias ácido lácticas para su conservación por ultracongelación.



4.3.3 Conservación de Microorganismos indicadores.

Los microorganismos indicadores fueron conservados como se describe en la tabla 4.2; en la cual se menciona el método de conservación, así como, el medio de cultivo para su crecimiento.

Listeria monocytogenes no fue trabajada en este departamento, su almacenamiento y los experimentos realizados con ella se llevaron a cabo en la División de Estudios de Posgrado en Alimentos DIPA. Fac. Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

4.3.4 Cultivos de trabajo de Microorganismos indicadores.

Los cultivos de trabajo de los microorganismos indicadores se realizaron como se indica en la tabla 4.2.

4.4 Preparación de inóculos.

4.4.1 Bacterias ácido lácticas.

a) Inóculo para la detección de bacteriocinas por el método de botón: Del cultivo de trabajo se transfirió una asada a 3ml de caldo APT, incubándolo por 24 horas a 30°C. Se resembró en 1.5 ml de caldo MRS y se dejó incubar por 24 horas a 30°C.

b) Inóculo para la determinación de actividad de las bacteriocinas: Del cultivo de trabajo se transfirió una asada a 3ml de caldo APT o caldo ST dejándose incubar por 24 horas a 30°C. Posteriormente se resembró en 3ml de caldo MRS (inóculo MRS) o caldo ST (inóculo ST), respectivamente, y se dejaron incubar por 24 horas a 30°C.

Tabla 4.2. Conservación y cultivos de trabajo de microorganismos indicadores.

Microorganismo indicador	Conservación	Cultivo de trabajo
<i>Bacillus cereus</i> B3-13	A 4°C en tubo inclinado de agar soya tripticasa	Caldo soya tripticasa
<i>Bacillus cereus</i> ATCC H-778	Ultracongelación en caldo nutritivo con glicerol	Caldo soya tripticasa
* <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679	A 4°C en suspensión de esporas	Caldo tioglicolato
<i>Clostridium perfringens</i> C22	A 4°C en caldo tioglicolato	Caldo tioglicolato
<i>Escherichia coli</i> 078:H8	A 4°C en agar inclinado BHI	Agar nutritivo
<i>Escherichia coli</i> 088:H25	A 4°C en caldo BHI	Agar nutritivo
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	A 4°C en agar inclinado BHI	Agar nutritivo
<i>Listeria innocua</i> BAI	A 4°C en agar inclinado de soya tripticaseina	Caldo soya tripticasa
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	Ultracongelación en caldo nutritivo con glicerol	Caldo soya tripticasa
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	A 4°C en agar inclinado de soya tripticaseina	Caldo soya tripticasa
<i>Vibrio cholerae</i> 01 FMU 087286	A 4°C Agar inclinado nutritivo adicionado con 1% de NaCl	Agar inclinado nutritivo adicionado con 1% de NaCl
<i>Vibrio cholerae</i> no 01 FMU 087247	A 4°C Agar inclinado nutritivo adicionado con 1% de NaCl	Agar inclinado nutritivo adicionado con 1% de NaCl
<i>Micrococcus luteus</i> NCIB 8166	Ultracongelación en caldo nutritivo con glicerol	Agar assay inclinado

*Las esporas fueron activadas por calentamiento a 65°C por 10 minutos en agua destilada estéril y posteriormente inoculadas en caldo tioglicolato incubándolas a 35°C por 24 horas.

4.4.2 Microorganismos indicadores.

Listeria monocytogenes Scott A, *Listeria innocua* BA1, *Vibrio cholerae* 01 FMU 087286 y *Vibrio cholerae* no 01 FMU 087247 fueron transferidos del cultivo de trabajo a 5 ml de caldo BHI e incubados a 37°C por 24 horas dos veces consecutivas.

Bacillus cereus B3-13, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* 088:H25, *Escherichia coli* 078:H11, *Escherichia coli* 0157:H7 fueron transferidos a caldo Soya Trypticase e incubados a 37°C por 24 horas por dos veces consecutivas, a excepción de las cepas de *Bacillus cereus*, que fueron incubadas a 30°C por 24 horas.

Clostridium perfringens C22 y *Clostridium sporogenes* PA3679 fueron transferidos a caldo Tioglicolato e incubados a 37°C por 24 horas dos veces consecutivas.

Para determinar la sensibilidad de *Micrococcus luteus* NCIB 8166 se preparó el inóculo transfiriendo una asada del cultivo de trabajo a caldo de Medio Assay incubándolo a 30°C por 48 horas.

4.5 Prueba de antagonismo.

Para detectar el antagonismo se probaron las 90 cepas de bacterias ácido lácticas contra 7 microorganismos indicadores:

Bacillus cereus B3-13

Clostridium perfringens C22

Escherichia coli 0157:H7

Listeria innocua BA1

Staphylococcus aureus ATCC25923

Vibrio cholerae 01 FMU 087286

Vibrio cholerae no 01 FMU 087247

La detección se efectuó mediante el método de botón (Lewus y Montville, 1991): se prepararon placas de agar soya tripticasa adicionado con 0.5% de extracto de levadura, sobre estas placas se colocaron tres puntos de 2µl cada uno de los inóculos de la bacteria ácido láctica deseada y se incubaron en jarras de anaerobiosis (Oxoid) con un sistema de gas pack (Oxoid) para crear un ambiente anaeróbico, por 24 horas a 30°C. A estas placas con puntos (botones) se les agregó una sobrecapa de 10 ml de agar BHI 1.5 y 4 µl de inóculo del microorganismo indicador. Las placas con la sobrecapa se incubaron en jarras de anaerobiosis (Oxoid) con un sistema de gas pack (Oxoid) para crear un ambiente anaeróbico por 24 horas a 30°C *Bacillus cereus* y a 37°C el resto de los microorganismos. La presencia de una zona de aclaramiento (halo) alrededor del punto de la bacteria láctica fue indicativa de inhibición (figura 2.3) dichas zonas pudieron haber sido producidas por ácido, peróxido de hidrógeno o bacteriófagos, por lo que se realizaron los controles de inhibición.

4.5.1 Controles de inhibición.

Las cepas productoras de bacteriocinas fueron sometidas a las siguientes pruebas:

4.5.1.1 Inhibición por ácido.

Para descartar la inhibición por la producción de ácido de la bacteria ácido láctica, se utilizó un medio sin glucosa: agar soya tripticasa con extracto de levadura, reduciendo así la presencia de carbohidratos disponibles. Además se adicionó el indicador rojo de fenol para detectar vire de color del medio (agar soya tripticasa) por presencia de ácido.

4.5.1.2 Inhibición por peróxido de hidrógeno.

Para descartar la inhibición por H_2O_2 , las BAL se cultivaron en un ambiente anaeróbico en jarras de anaerobiosis (Oxoid) con un sistema de gas-pack (Oxoid) e indicadores (Oxoid).

4.6 Pruebas para corroborar la naturaleza bacteriocinogénica de los extractos.

4.6.1 Inhibición por fagos.

Para descartar la presencia de fagos en los cultivos, se utilizó el método de plaqueo (Lewus, et al 1991): se maceró un trozo del halo de inhibición en 5 ml de caldo BHI, se colocaron 100 μ l de esta mezcla paralelamente con 4 μ l del microorganismo indicador (*Bacillus cereus* B3-13 o *Listeria innocua* BA1) en 8 ml de agar BHI 0.8 agitándolo suavemente hasta su total incorporación y vertiéndolo posteriormente sobre una placa de agar BHI 1.5. Se incubó por 24 horas a 30 o 37°C respectivamente. La presencia de crecimiento bacteriano indicó la ausencia de fagos.

4.6.2 Sensibilidad a enzimas proteolíticas.

Las bacteriocinas, por definición, son sustancias de naturaleza protéica, de manera que la sensibilidad a proteasas es un criterio definitivo para la caracterización de un inhibidor como bacteriocina. Se probó la sensibilidad a diferentes enzimas, como son: pronasa, tripsina, α -quimiotripsina, catalasa de *Rhizopus* (Boehringer 106836), catalasa de *Candida* (SIGMA EC11116), lipasa (SIGMA L6876) y α -amilasa (Boehringer C3515), usando el método de botón: se colocó un punto de 2 μ l de la bacteria ácido láctica sobre

placas de agar soya tripticasa, incubando en condiciones de anaerobiosis con ayuda de jarras de anaerobiosis (Oxoid) con un sistema de gas pack (Oxoid) por 24 horas a 30°C ; posteriormente se colocaron 2µl de cada una de las proteasas (10mg/ml en buffer de fosfatos 1N, pH= 6.7) adyacente al punto del inóculo de la bacteria ácido láctica, se dejó absorber por una hora en una estufa a 30°C y posteriormente se virió la sobrecapa que contenía al microorganismo indicador (*Bacillus cereus* B3-13 o *Listeria innocua* BA1) incubando por 24 horas a 30 ó 37°C respectivamente en jarras de anaerobiosis (Oxoid) con un sistema de gas pack (Oxoid) para crear un ambiente anaeróbico. La interferencia en el halo de inhibición fue indicativo de sensibilidad a la proteasa.

4.7 Espectro de inhibición.

Para determinar el espectro de actividad de las cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de pozol productoras de bacteriocinas, se utilizó el método de botón usando los siguientes microorganismos indicadore

1. *Bacillus cereus* ATCC 11778
2. *Clostridium sporogenes* PA3679
3. *Escherichia coli* 078:H8
4. *Escherichia coli* 088:H25
5. *Listeria monocytogenes* Scott A
6. *Micrococcus luteus* NCIB 8166

4.8 Determinación de actividad.

La actividad de las bacteriocinas fue cuantificada basado en el estándar británico 4020:1974 por el método de fosas, utilizando *Micrococcus luteus* NCIB 8166 como microorganismo indicador. Para determinar la actividad de las cepas que no tuvieron efecto inhibitorio contra *Micrococcus luteus* NCIB 8166 se usaron *Listeria innocua* Ba1, *Listeria monocytogenes* Scott A y *Leuconostoc mesenteroides* 59 como microorganismos indicadores en Medio Assay y BHI.

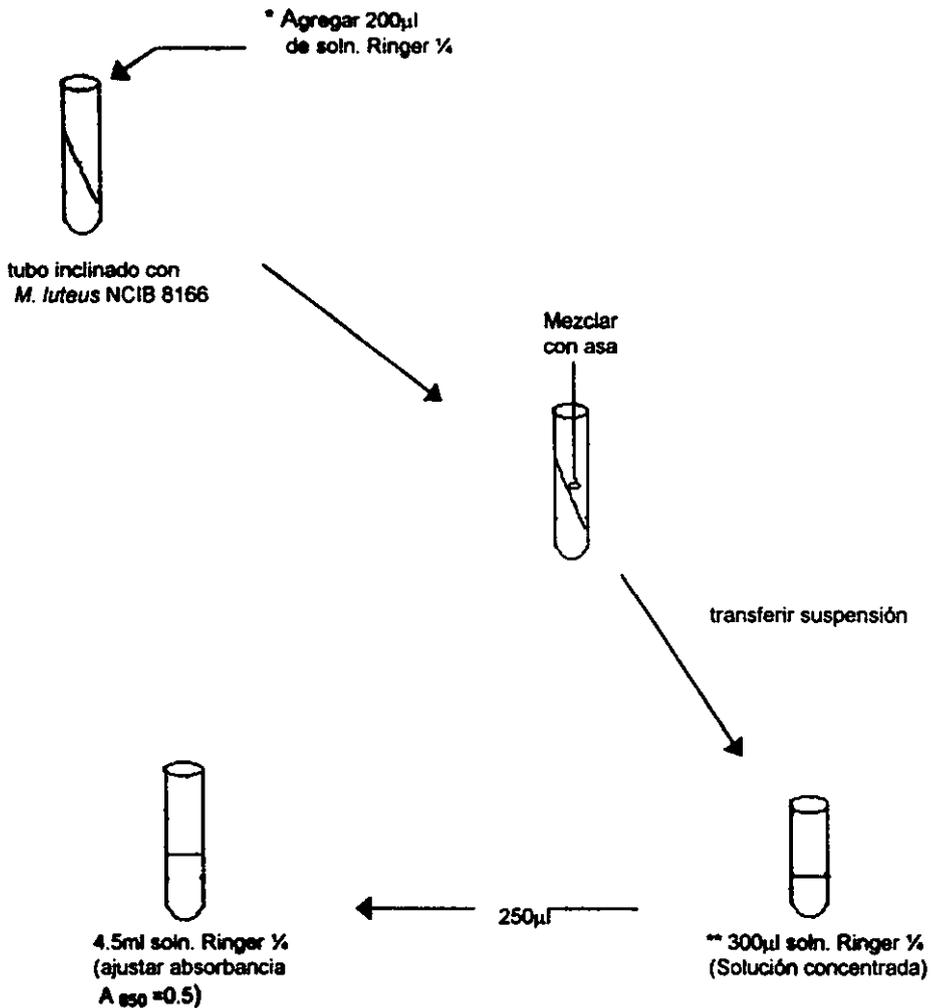
4.8.1 Preparación del extracto bacteriocinogénico.

Se preparó un cultivo del inóculo descrito en el punto 4.4.1b en medio MRS o ST incubándolo a 30°C por 24 horas. Este cultivo se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se separó el sobrenadante conteniendo la bacteriocina. Se determinó el pH del sobrenadante y se ajustó a un valor de 6.5 a 7.0 adicionando NaOH 4 M. Posteriormente, el sobrenadante se esterilizó por filtración (Nylon Acrodisc 4 No. 0.45µm) para obtener el extracto bacteriocinogénico. A partir de este extracto se realizaron diluciones seriadas de dos en dos.

4.8.2 Preparación del inóculo del microorganismo indicador para determinar actividad.

Para la detección de actividad el inóculo se obtuvo transfiriendo una asada del cultivo de trabajo de *Micrococcus luteus* NCIB 8166 a un tubo de agar inclinado de Medio Assay 1.5 y se incubó durante 48 horas a 30°C posteriormente se realizó una suspensión celular como se muestra en la figura 4.2.

Figura 4.2 Preparación del inóculo de *Micrococcus luteus* NCIB 8166 para la determinación de la actividad.



* en el método original son 100µl. Se adicionaron 200µl. para obtener una mejor suspensión (arrastrar bien el crecimiento celular).

**en el método original son 400µl, se adicionaron 300µl para compensar la variación anterior.

4.8.3 Preparación de las placas.

Se prepararon placas con 10ml de Medio Assay 1.5 o BHI 1.5, vertiéndose sobre éstas una sobrecapa de 8 ml de Medio Assay 0.8 o BHI 0.8 adicionada con 20 μ l del inóculo del microorganismo indicador y 2% de Tween 20 diluido 1:1 (v/v). Las placas fueron refrigeradas a 4°C por una hora. Después de este tiempo, en cada placa se perforaron 3 series de fosas con un oradador estéril de 5mm de diámetro, como se indica en la figura 4.3. En cada fosa se colocaron 20 μ l del extracto bacteriocinogénico, por triplicado. Las placas se dejaron secar por 30 minutos a temperatura ambiente y se incubaron a 30°C por 12 horas.

4.8.4 Cálculo para determinar la actividad (UA).

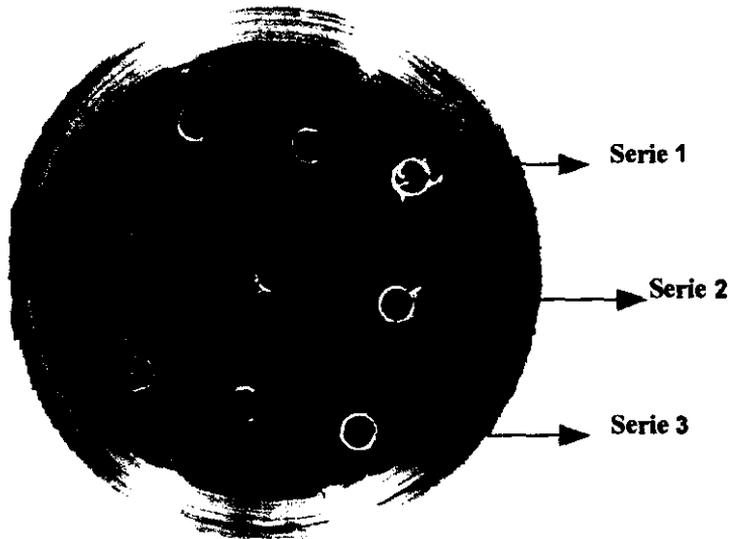
La actividad se determinó a partir del recíproco de la última dilución que presentó halo de inhibición de al menos 1 mm por el volumen del extracto bacteriocinogénico empleado para obtener UA de actividad por ml de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{UA/ml} = (\text{recíproco dilución}/20\mu\text{l}) (1000\mu\text{l}/1\text{ml})$$

4.9 Estabilidad de los extractos a la temperatura y al pH.

La estabilidad térmica del extracto bacteriocinogénico se estudió en un cultivo del inóculo descrito en el punto 4.4.1b en medio MRS o ST dejándose incubar por 24 horas a 30°C. Este cultivo se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se separó el sobrenadante conteniendo la bacteriocina, se sometieron a dos tratamientos térmicos (60 y 100°C) por 30 minutos, se determinó el pH y se ajustó a un valor de 6.5 a 7.0 adicionando NaOH 4M y esterilizando por filtración (Nylon Acrodisc No. 0.45 μ m). A partir de éste se realizaron las mismas diluciones que en el punto 4.8.1.

Figura 4.3 Serie de fosas para la determinación de actividad de las bacteriocinas.



V. RESULTADOS.

5.1 Antagonismo de bacterias ácido lácticas.

De las 90 cepas probadas contra 7 microorganismos indicadores ninguna tuvo efecto contra microorganismos Gram (-): *Escherichia coli* 0157:H7, *Vibrio cholerae* 01 FMU087286 y *Vibrio cholerae* no 01 FMU 087247, ni contra *Clostridium perfringens* C22. Ocho de las noventa cepas presentaron actividad antimicrobiana contra *Bacillus cereus* B3-B13, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria innocua* BA1, como se muestra en la tabla 5.1, dando 8.8% como índice de detección de cepas productoras de bacteriocinas.

Las 90 cepas de bacterias ácido lácticas fueron identificadas mediante el sistema API 50 CH. En la tabla 5.2 se listan los resultados obtenidos para las 8 cepas productoras de bacteriocinas (Flores, 1996).

5.2 Naturaleza bacteriocinogénica.

No se observó vire en las placas de agar soya tripticasa adicionadas con rojo de fenol en ninguna de las 8 cepas y tampoco se detectó la presencia de fagos en ninguna de ellas.

La naturaleza protéica de los compuestos inhibitorios quedó comprobada por la sensibilidad a diferentes enzimas proteolíticas como se muestra en la tabla 5.3.

Tabla 5.1 Antagonismo de bacterias ácido lácticas aisladas de pozol contra microorganismos indicadores Gram +.

Nº. DE CEPA	NOMBRE DEL TAXÓN	MICROORGANISMO INDICADOR															
		<i>Bacillus cereus</i> B3-13	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Listeria innocua</i> BA-1	<i>Clostridium perfringens</i> C22	<i>Listeria monocytogenes</i> SCOTT A	<i>Bacillus cereus</i> ATCCH-778	<i>Clostridium sporogenes</i> PA3679	<i>Micrococcus luteus</i> NCTB8166	59 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	19 <i>Lactococcus lactis lactis</i>	14 <i>Lactococcus lactis lactis</i>	60 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	12 <i>Lactococcus lactis lactis</i>	66 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	87 <i>Lactobacillus crispatus</i>	88 <i>Lactobacillus acidophilus</i>
1. 59	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
		(14)	(11)	(11)			(14)	(16)						(7)	(8)	(9)	(12)
2. 60	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
		(14)	(8)	(11)			(14)	(12)						(7)	(6)	(8)	(13)
3. 66	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
		(11)		(11)		(12)	(11)	(d)		(11)	(11)	(11)	(11)			(8)	(11)
4. 19	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
		(13)	(9)				(13)	(14)						(7)	(6)	(9)	(10)
5. 14	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
		(14)	(10)				(14)	(13)						(7)	(8)	(9)	(14)
6. 12	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
		(14)		(18)		(15)	(14)	(14)		(15)	(17)	(14)	(14)			(11)	(17)
7. 87	<i>Lactobacillus crispatus</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
				(19)		(11)						(7)	(6)				(8)
8. 88	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				(18)		(8)											

+ positivo - negativo () Tamaño del halo en mm.
 El tamaño del halo incluye el punto de la bacteria láctica (5mm aprox.)
 d halo deforme no medible

Tabla 5.2 Identificación taxonómica de las bacterias lácticas aisladas de pozol productoras de bacteriocinas, realizada por Flores (1996) mediante el sistema API 50 CH.

Nº. DE CEPA	NOMBRE DEL TAXON	CALIDAD DE IDENTIFICACION	PORCENTAJE DE IDENTIFICACION
59	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	dudosa	86.1
60	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	dudosa	87.0
66	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	muy buena	91.8
19	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	muy buena	99.6
14	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	dudosa	64.2
12	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	baja discriminación	72.4
87	<i>Lactobacillus crispatus</i>	dudosa	98.0
88	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	aceptable	88.0

Tabla 5.3 Sensibilidad de los compuestos inhibitorios a diferentes enzimas.

Nº. DE CEPA	NOMBRE DEL TAXON	ENZIMA								
		Pronasa	Tripsina	α -quimi tripsina	Proteinasa K	Lisozima	Catalasa	Lipasa de Rhizopus	Lipasa de Candida	Amilasa
59	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
60	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
66	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+
19	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
14	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+
87	<i>Lactobacillus crispatus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+
88	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+

- + ausencia de halo en donde se aplicó la enzima (fig. 2.5). Bacteriocina sensible.
 - halo completo (fig. 2.5). Bacteriocina no sensible.

5.3 Espectro de inhibición.

Las 8 cepas de BAL productoras de bacteriocinas fueron analizadas contra ellas mismas y contra otros 6 microorganismos indicadores (*Escherichia coli* 088:H25, *Escherichia coli* 078:H11, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Clostridium sporogenes* PA 3679 y *Micrococcus luteus* NCIB 8166). Ninguna de las 8 cepas presentó actividad contra las cepas de *Escherichia coli* y 6 cepas presentaron actividad contra *Listeria monocytogenes*; el antagonismo de estas bacterias ácido lácticas se muestra en la tabla 5.1.

5.4 Determinación de actividad.

5.4.1 Bacteriocinas activas sobre *Micrococcus luteus* NCIB8166.

La actividad de las bacteriocinas producidas por las cepas 19 (*Lactococcus lactis lactis*) y 59 (*Leuconostoc mesenteroides*) fue más alta (102,400 UA/ml) a un valor de pH de 6.2-6.8, que al valor de pH 4.3-4.6 (51200 UA/ml); mientras que las bacteriocinas producidas por las cepas 14 (*Lactococcus lactis lactis*) y 60 (*Leuconostoc mesenteroides*) presentaron un efecto contrario, datos que se muestran en la tabla 5.4 y 5.5.

En el apéndice 2 se detalla el tamaño de halos de inhibición producidos por las bacteriocinas de las cepas 14, 19, 59 y 60.

5.4.2 Bacteriocinas no activas sobre *Micrococcus luteus* NCIB8166.

La actividad de las bacteriocinas producidas por las cepas 12 (*Lactococcus lactis lactis*) y 66 (*Leuconostoc mesenteroides*) en Medio Assay 1.5 fue mayor que en medio BHI, mientras que las bacteriocinas producidas por las cepas 87 (*Lactobacillus crispatus*) y 88 (*Lactobacillus acidophilus*) presentaron un efecto contrario (tabla 5.6). Las bacteriocinas

Tabla 5.4 Actividad y efecto del tratamiento térmico a pH de 6.2-6.8.

N° Cepa	Actividad (UA/ml)	Tratamiento térmico		Pérdida de actividad (%)	
		60°C	100°C	60°C	100°C
14	51200	51200	25600	0	50
19	>102400	6400	0	93.75	100
59	>102400	25600	0	75	100
60	51200	25600	12800	50	75

Resultados unicamente para bacteriocinas que actúan contra *Micrococcus luteus*.

Tabla 5.5 Actividad y efecto del tratamiento térmico a pH 4.3-4.6.

N° Cepa	Actividad (UA/ml)	Tratamiento térmico		Pérdida de actividad (%)	
		60°C	100°C	60°C	100°C
14	>102400	>102400	51200	0	50
19	51200	25600	25600	50	50
59	51200	51200	25600	0	50
60	>102400	>102400	25600	0	75

Resultados unicamente para bacteriocinas que actúan contra *Micrococcus luteus*.

Tabla 5.6 Efecto del medio de cultivo en la detección de actividad usando a *L. monocytogenes* como microorganismo indicador a pH 6.2-6.8.

N° Cepa	Actividad (UA/ml)	
	Medio Assay	Medio BHI
12	200	100
66	200	50
87	50	1600
88	100	200

Nd no determinado

Tabla 5.7 Efecto del microorganismo indicador en la detección de actividad a pH 6.2-6.8 en Medio Assay.

N° Cepa	Microorganismo indicador Actividad (UA/ml)		
	<i>Listeria innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
12	200	200	200
66	100	200	400
87	1600	50	>1600
88	1600	100	>1600

de las cepas 12, 66, 87 y 88, tuvieron un efecto mayor contra *Leuconostoc mesenteroides* que contra las cepas de *Listeria*.

5.5 Efecto de la temperatura en la actividad.

Las tablas 5.4 y 5.5 muestran que a un valor de pH de 6.2-6.8 la bacteriocina producida por la cepa 14 es la única que mantuvo su estabilidad a 60°C por 30 minutos, mientras que el resto perdió el 50% o más de su actividad. A un valor de pH de 4.3-4.6 a las mismas condiciones térmicas, las bacteriocinas producidas por las cepas: 14, 59 y 60 no perdieron actividad, mientras que la bacteriocina de la cepa 19 disminuyó en un 50%. Al someterlas a una temperatura de 100°C a ambos valores de pH por el mismo tiempo, la actividad de todas las bacteriocinas fue afectada.

VI. DISCUSION DE RESULTADOS.

6.1 Detección de bacteriocinas.

El índice de detección de 90 bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas aisladas de pozol fue de 8.8%, cuyo valor es alto comparado con valores reportados en la literatura; Coventry, et al. (1997) detectaron un 0.2% de bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas aisladas de diferentes alimentos; datos semejantes fueron encontrados por Garver y Muriana (1993) de cepas aisladas de carne y productos lácteos; Ryser et al. (1994) detectaron <0.1% de cepas productoras de bacteriocinas provenientes de queso. Sin embargo, la metodología empleada en cada uno de los trabajos anteriores es variable. Se ha reportado que la composición del medio de cultivo, pH, tiempo y temperatura de incubación afectan la producción de bacteriocinas, y en algunos casos pueden anular su producción (Ingolf et al., 1996; Klaenhammer, 1993). Por lo que consideramos que el pozol es un medio muy propicio para la producción de bacteriocinas, lo cual es atribuido a la flora microbiana que contiene éste provocando un efecto antagónico de las bacterias ácido lácticas para su defensa. Además de que el método empleado para la detección (Lewus y Montville, 1991) fue el adecuado.

El hecho de que las cepas detectadas como productoras de bacteriocinas solo presentaran efecto inhibitorio contra microorganismos Gram (+) (Tabla 5.1) coincide con la mayoría de los estudios reportados (Cail et al., 1997; Lewus et al., 1991; Itoh et al., 1995; Coventry et al., 1997) en los que se ha observado un efecto inhibitorio de bacteriocinas principalmente contra microorganismos Gram (+). Sin embargo, existen algunos reportes de actividad (mencionado anteriormente) contra microorganismos Gram

(-); en 1997 Simonetta et al. reportaron que cepas de enterococos aislados de leches y productos lácteos de Santa Fe (Argentina) presentaron actividad antibacteriana por compuestos de naturaleza protéica contra *Vibrio cholerae* 01 y no 01. Por otro lado, Zuñiga y Mota (1998) reportaron que bacteriocinas producidas por cepas de *Lactobacillus* y *Streptococcus* inhibieron el crecimiento de una cepa de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

Las cepas de bacterias ácido lácticas que se utilizaron en este estudio han sido caracterizadas unicamente por métodos bioquímicos (Flores, 1996). Hasta ahora no se ha realizado una caracterización molecular de las cepas productoras de bacteriocinas, la cual nos podría ayudar a aseverar respecto a la identidad de las cepas; sobre todo porque se ha observado que en los estudios donde se reporta identificación bioquímica y genética (Coventry et al., 1997; Cai et al., 1997) la identificación de las cepas generalmente no es concordante.

6.2 Clasificación con base en la naturaleza bacteriocinogénica.

Se pueden definir a los agentes inhibitorios producidos por las 8 bacterias ácido lácticas examinadas en este trabajo como bacteriocinas debido a que se excluyó la inhibición producida por ácido, peróxido de hidrógeno y bacteriófagos y además, la naturaleza protéica de dichas sustancias fue confirmada mediante su sensibilidad a proteasas (Tabla 5.2).

Generalmente, la sensibilidad a proteasas sirve como base para definir el grupo al que pertenecen las bacteriocinas. Las bacteriocinas producidas por las cepas 14, 19, 59 y 60, fueron sensibles unicamente a pronasa (Tabla 5.2), por lo que estas bacteriocinas no

pueden ser clasificadas en un grupo determinado, tal suceso puede ser atribuido a que los sitios activos de estas sustancias no son afectados por las enzimas probadas. Casos similares de sensibilidad unicamente a pronasa han sido reportados por Lewus et al. (1991).

Las bacteriocinas producidas por las cepas 12, 66, 87 y 88 fueron sensibles a α -amilasa, por lo que es posible clasificarse dentro del grupo IV. Sin embargo, para su clasificación se discutirán otros factores en los siguientes incisos.

6.3 Clasificación con base en el espectro de inhibición.

El espectro de acción de las bacterias ácido lácticas detectadas como productoras de bacteriocinas se muestra en la tabla 5.1.

Se comprobó que las bacteriocinas no actúan sobre el microorganismo que las produce y si contra microorganismos relacionados taxonómicamente (Hoover y Steenson, 1993; Doyle et al., 1997; Ingolf et al., 1996).

Las cepas 59 y 60 presentaron similitud en su espectro de actividad (Tabla 5.1), sensibilidad a proteasas (Tabla 5.2) y su porcentaje de identificación bioquímica (Flores, 1996) fue de 86.1% para la cepa 59 y de 87% para la cepa 60 (con una calidad de identificación dudosa), siendo identificadas ambas como *Leuconostoc mesenteroides*, por lo que se sugiere que se trate de la misma bacteriocina y/o la misma cepa.

Las cepas 14 y 19 mostraron igualmente el mismo espectro de acción (Tabla 5.1) y sensibilidad a proteasas (Tabla 5.2), lo que nos indica que es posible que sea la misma bacteriocina y/o cepa. Ambas fueron indentificadas como *Lactococcus lactis lactis* con un porcentaje de identificación de 99.6% para la cepa 19 y de 64.2% para la cepa 14 y una calidad de identificación muy buena y dudosa, respectivamente.

Las bacteriocinas de las cepas 12 y 66 presentaron el mismo espectro de actividad (Tabla 5.1) y además su sensibilidad a proteasas fue similar (Tabla 5.2), sin embargo, Flores (1996) identificó a la primera como *Lactococcus lactis lactis* y a la segunda como *Leuconostoc mesenteroides*, con una calidad de identificación de baja discriminación para la cepa 12 y de muy buena para la cepa 66, con un porcentaje de identificación de 72.4% y 91.6%, respectivamente, lo que podría sugerir que se trata de la misma bacteriocina, pero no de la misma cepa. Esto se podría esclarecer con el apoyo de una caracterización molecular de dichas cepas.

Con base en el espectro de inhibición las bacteriocinas de las cepas 12, 14, 19, 66, 87 y 88 pueden ser clasificadas dentro del grupo IIa (antilistéricas). De estas seis bacteriocinas cuatro (12, 66, 87 y 88) fueron sensibles a α -amilasa, por lo que pueden pertenecer a la clase IV, quedando en la clase II únicamente las bacteriocinas producidas por las cepas 14 y 19. Las bacteriocinas 59 y 60 no pueden ser clasificadas en base a su espectro de acción, sólo se descarta su posibilidad de pertenecer al grupo IIa .

6.4 Actividad.

Existen dos tipos de unidades para definir la actividad de las bacteriocinas: Unidades Internacionales (UI) y Unidades Arbitrarias (UA). Las Unidades Internacionales se usan únicamente para la nisina (se ha definido que 25 mg de nisina pura equivalen a 10^6 UI de actividad). La actividad de la nisina es medida por el ensayo de fosas de Tramer y Fowler (1964), usando *Micrococcus luteus* ATCC 10240 como microorganismo indicador, algunos investigadores usan cepas indicadoras más sensibles que esta cepa (Doyle et al., 1997).

Las Unidades Arbitrarias se utilizan para todas las demás bacteriocinas y varían dependiendo del medio, el indicador, cantidad de muestra, etc. (Doyle et al., 1997), por lo que generalmente no son comparables. Con objeto de obtener un punto de comparación con la nisina, en este trabajo se utilizó el método estándar para la determinación de actividad de nisina (estándar británico 4020:1974) para medir la actividad de las bacteriocinas del pozol. Sin embargo, dicho estándar utiliza a *Micrococcus luteus* como microorganismo indicador, y sólo 4 de las 8 cepas productoras de bacteriocinas presentaron actividad contra dicho indicador, por lo que se siguió el método estándar para determinar la actividad de dichas bacteriocinas producidas por las cepas 14, 19, 59 y 60. Se buscaron indicadores y medios alternativos para determinar la actividad de las cuatro bacteriocinas restantes producidas por las cepas 12, 66, 87 y 88.

6.4.1 Bacteriocinas activas sobre *Micrococcus luteus*.

Micrococcus luteus NCIB8166 fue sensible a las bacteriocinas producidas por las cepas 14, 19, 59 y 60. Los halos presentados por estas cepas (apéndice 2a y 2b) fueron de gran tamaño, lo que indicó que la difusión de las bacteriocinas fue buena y la actividad de estas bacteriocinas definida en UA/ml fueron valores muy altos (51200–102400) comparados con los reportados en la literatura (550 a 5000 UA/ml) (Doyle et al., 1997; Kazuo et al., 1995; Nielsen et al., 1990)

6.4.2 Bacteriocinas no activas sobre *Micrococcus luteus*.

Para determinar la actividad de las 4 bacteriocinas que no inhibían el crecimiento de *Micrococcus luteus* (de las cepas 12, 66, 87 y 88) fueron utilizados los medios Assay y BHI, utilizando a *Listeria monocytogenes* como microorganismo indicador. Al usar el Medio Assay se pretendió realizar una comparación de la actividad de las ocho

bacteriocinas detectadas, en el mismo medio aunque con distintos indicadores. Esta comparación no se logró debido a que la actividad era extremadamente diferente, teniendo un valor de 50 a 200 UA/ml para las bacteriocinas no activas sobre *Micrococcus luteus* (Tabla 5.6) y de 51200 a 102400 UA/ml para las activas contra el mismo indicador (Tabla 5.4).

Con *Listeria monocytogenes* como indicador, las bacteriocinas producidas por las cepas 12 y 66 (Tabla 5.6) tuvieron mayor difusión en Medio Assay que en medio BHI, caso contrario ocurrió con las bacteriocinas de las cepas 87 y 88. Así mismo, para todos los casos se observó que *Listeria monocytogenes* presentó un crecimiento más abundante en medio BHI que en Medio Assay. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, para las bacteriocinas producidas por las cepas 87 y 88 la difusión fue menor en Medio Assay; esto es, no se encontró una relación directa entre difusión y medio de crecimiento.

La baja actividad (50-200 UA/ml) de las bacteriocinas producidas por las cepas 12, 66, 87 y 88 sobre *Listeria monocytogenes* implicó la consideración de otros dos microorganismos indicadores: *Listeria innocua* y *Leuconostoc mesenteroides*. Con *Leuconostoc mesenteroides*, en Medio Assay las bacteriocinas presentaron los valores de actividad más altos (200->1600 UA/ml) (Tabla 5.7). Estos valores son mayores que los encontrados con *Listeria monocytogenes* en Medio Assay (50-200 UA/ml), sin embargo, siguen estando muy alejados de los valores de actividad obtenidos con *Micrococcus luteus* en el mismo medio (51200-102400 UA/ml).

Estos resultados no son insatisfactorios, ya que las Unidades Arbitrarias reportadas en la literatura, oscilan entre 550 UA/ml y 5000 UA/ml , como se mencionó anteriormente.

6.5 Estabilidad térmica.

Se realizaron pruebas para determinar la estabilidad de las bacteriocinas producidas por las cepas 14, 19, 59 y 60 (activas sobre *Micrococcus luteus*) a diferentes valores de pH. Estas pruebas se llevaron a cabo sometiendo el extracto bacteriocinogénico a diferentes temperaturas (60 y 100 °C). Como podemos ver en las tablas 5.4 y 5.5 a los valores de pH aplicados la bacteriocina producida por la cepa 19 fue la menos estable al ser sometida a tratamientos térmicos de 60 y 100°C por 30 minutos, por lo que podría pertenecer al grupo III, donde se incluyen aquellas bacteriocinas termolábiles (Klaenhammer, 1993; Doyle et al., 1997).

Las bacteriocinas de las cepas 14, 59 y 60 resistieron un tratamiento térmico de 60°C a un pH de 4.3–4.6 y no fueron sensibles a α -amilasa, sin embargo, la bacteriocina de la cepa 14 tuvo actividad antilistérica, por lo que puede pertenecer al grupo IIa y las bacteriocinas de las cepas 59 y 60 al no tener esta propiedad, se establecen dentro de los grupos IIb o IIc.

Los resultados obtenidos en este apartado no fueron reproducibles en términos del grado de estabilidad (Tabla 5.4 y 5.5), esto es, que las que eran afectadas presentaban diferente susceptibilidad (\pm 2 diluciones). Esto puede ser debido a variaciones en la técnica que están fuera de la perspectiva de este trabajo.

6.6 Selección de una cepa.

Con base a los resultados obtenidos en este estudio se propone que la bacteriocina producida por la cepa 14 (*Lactococcus lactis lactis*) se utilice para trabajos futuros de purificación y caracterización, dado que es una bacteriocina termoestable y antilisteria, teniendo así un particular potencial para su aplicación en alimentos.

VII. CONCLUSIONES.

- El índice de detección de las bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas del pozol fue alto (8.8%).
- La naturaleza protéica de las bacteriocinas detectadas fue comprobada, ya que las bacteriocinas fueron inactivadas por una enzima proteolítica (pronasa).
- El espectro de acción de las bacteriocinas encontradas incluye: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium sporogenes*, *Micrococcus luteus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis lactis*, *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus acidophilus*.
- No se detectaron bacteriocinas con efecto sobre microorganismos Gram (-).
- De las ocho cepas detectadas como productoras de bacteriocinas, seis tuvieron actividad antilistérica, de las cuales la cepa 14 (*Lactococcus lactis lactis*) aparentemente puede pertenecer al grupo IIa porque también es estable al calor; tales características hacen de ella una bacteriocina con mucho potencial para uso en alimentos.
- Las bacteriocinas de las cepas 59 (*Leuconostoc mesenteroides*) y 60 (*Leuconostoc mesenteroides*) no mostraron actividad sobre *Listeria monocytogenes* ni fueron sensibles a α -amilasa, sin embargo, una característica que las hace pertenecientes al grupo II (b o c) es que fueron termoestables.
- Las bacteriocinas de las cepas 12 (*Lactococcus lactis lactis*), 66 (*Leuconostoc mesenteroides*), 87 (*Lactobacillus crispatus*) y 88 (*Lactobacillus acidophilus*) no

pueden ser definidas estrictamente dentro de un grupo, ya que tienen propiedades antilísticas (característica del grupo IIa) y también fueron sensibles a α -amilasa (característica del grupo IV).

- La bacteriocina producida por la cepa 19 (*Lactococcus lactis lactis*), puede incluirse dentro del grupo III, dado que no fue termoestable ni sensible a α -amilasa

RECOMENDACIONES PARA POSTERIORES ESTUDIOS.

- Se recomienda realizar la caracterización genética de las bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas encontradas en este estudio.
- Se sugiere ampliar el número de especies de cada cepa indicadora.
- Es necesario definir el rango de pH óptimo para la acción de cada bacteriocina.
- Se recomienda hacer la inactivación por proteasas de las bacteriocinas en medio líquido.
- Se requiere detectar el factor que delimitó la técnica de actividad para obtener resultados reproducibles.
- Se recomienda purificar y secuenciar la bacteriocina producida por la cepa 14 (*Lactococcus lactis lactis*).

Apéndice I. Bacterias lácticas utilizadas

No. de cepa	Nombre del taxón
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
2	<i>Leuconostoc citreum</i>
3	<i>Lactobacillus plantarum</i>
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>
5	<i>Lactobacillus plantarum</i>
6	<i>Lactobacillus plantarum</i>
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>
9	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
10	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
11	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
12	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
13	<i>Lactobacillus plantarum</i>
14	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
15	<i>Lactobacillus plantarum</i>
16	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
17	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
18	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
19	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
20	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
21	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
22	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
23	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
24	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
25	<i>Lactobacillus plantarum</i>
26	<i>Lactobacillus plantarum</i>
27	<i>Lactobacillus plantarum</i>
28	<i>Lactobacillus plantarum</i>
29	<i>Lactobacillus plantarum</i>
30	<i>Lactobacillus plantarum</i>
31	<i>Lactobacillus plantarum</i>
32	<i>Lactobacillus plantarum</i>
33	<i>Lactobacillus plantarum</i>
34	<i>Lactobacillus plantarum</i>
35	<i>Lactobacillus plantarum</i>
36	<i>Lactobacillus plantarum</i>
37	<i>Lactobacillus plantarum</i>
38	<i>Lactobacillus coprophilus</i>
39	<i>Lactobacillus pentosus</i>
40	<i>Lactobacillus pentosus</i>
41	<i>Lactobacillus pentosus</i>
42	<i>Lactobacillus pentosus</i>
43	<i>Lactobacillus pentosus</i>
44	<i>Lactobacillus coprophilus</i>
45	<i>Lactobacillus plantarum</i>

No. de cepa	Nombre del taxón
46	<i>Lactobacillus pentosus</i>
47	<i>Lactobacillus pentosus</i>
48	<i>Lactobacillus pentosus</i>
49	<i>Lactobacillus pentosus</i>
50	<i>Lactobacillus pentosus</i>
51	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
52	<i>Lactobacillus fermentum</i>
53	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
54	<i>Lactobacillus brevis</i>
55	<i>Lactobacillus pentosus</i>
56	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
57	<i>Lactobacillus pentosus</i>
58	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
59	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
60	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
61	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
62	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
63	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
64	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
65	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
66	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
67	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
68	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
69	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
70	<i>Leuconostoc citreum</i>
71	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
72	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
73	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
74	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
75	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
76	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
77	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
78	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
79	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
80	<i>Lactobacillus curvatus</i>
81	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
82	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
83	<i>Lactobacillus plantarum</i>
84	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
85	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
86	<i>Leuconostoc citreum</i>
87	<i>Lactobacillus crispatus</i>
88	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
89	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
90	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Apéndice 2a. Actividad de las bacteriocinas en medio líquido sobre *Micrococcus luteus*, a pH 6.2 -6.8 en placas de Medio Assay.

No. de cepa	Diluciones											
	Conc.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Sin tratamiento												
14	24	22	20	20	18.5	17	15	14	12	11.5	9	0
19	nm	nm	nm	19	18.5	18.5	17	17	17	16.5	15.5	15
59	19	18.5	18.5	18	17	16	16	15	14	14	13.5	12
60	19	17.5	17	16.5	16.5	16.5	15.5	14.5	14.5	14.5	13	12.5
60°C												
14	20	18.5	16.5	15	14	13	12	10	8	0	0	0
19	19.1	18.3	16.4	15.2	13	11.7	10.1	7.1	0	0	0	0
59	21	17.1	16.1	14.3	13.5	12.7	11.3	9.7	8	7.1	0	0
60	18.5	16.5	16	15	13	12	11	10.5	8	7.5	0	0
100°C												
14	20	17.5	15.5	14.5	12.5	11	10	9	8	7	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	17.5	16.5	15.5	15	13.5	11.5	11	10	7.5	0	0	0

nd No determinado

nm Halo deforme No medible

El tamaño del halo está dado en milímetros incluyendo el diámetro del pozo (aproximadamente mm)

Apéndice 2b. Actividad de bacteriocinas en medio líquido (usando como indicador : *Micrococcus luteus*).
a pH de 4.3-4.6

No. de cepa	Diluciones											
	Coac.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Sin tratamiento												
59	23	21	20	19	18	15	13	11	8	7	7	0
19	23	22	21	18	17	15	13	11	10	9	7	0
14	23	21	19	18	16	14	13.5	12	10	8	8	8
60	23	21	19	17	16	14	13	12	9	8	7	6.5
60°C												
59	23	22	20	19	17	14	12	10	9	9	7	0
19	23	21.5	20	18	16	13	12.5	10.5	9	7.5	0	0
14	23	22	20	17	16	15	13	11	10	8.5	8.5	7
60	23	21.5	19	18	16	15	13	11	10	10	9	8
100°C												
59	23	20	17	17	15	13	11	10	9	8	0	0
19	22	20.5	19	17	14	12.5	11.5	9.5	8	7	0	0
14	23	21	19	17	16	14.5	13	11	9	8	7	0
60	23	21	19.5	17	16	14	13	11	9	8	0	0

El tamaño del halo está dado en milímetros incluyendo el diámetro del pozo (5 mm aproximadamente).

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Abee T., Rombouts F. M., Hugenholtz J., Guihard G. and Letellier L. (1994) Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Applied and Environ. Microbiol.* 60:1962-1968.
2. Allison G., Fremaux C., Ahn C. and Klaenhammer T. R. (1994) Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* 176:2235-2241.
3. Barefoot S. F. and Klaenhammer T. R. (1983) Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1808-1815.
4. Barrel R. A. E. and Rowland M. G. M. (1979) Infant foods as a potential source of diarrhoeal illness in rural West Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 73:85-90.
5. Board R. G. (1988) *Introducción a la microbiología moderna de los alimentos*. Ed. Acribia S. A. p. 672-677.
6. Boyd Robert F. *General Microbiology*. Ed. American Society for Microbiology p. 639-648.
7. Bryan F. L. (1976). *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects*. In M. P. DeFigueiredo and D. F. Splittstoesser (Ed.), AVI, Westport, Conn. p.12-128.
8. Cai Y., Ng L.-K. and Farber. (1997) Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean-sprouts. *Journal of Applied Microbiology.* 83:499-507.
9. Carminati D., Giraffa G. and Bossi M. G. (1989) Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 52:614-617.
10. Cañas U., Bárzana E., Owens J. D. and Wachter C. (1993) La elaboración del pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia.* 44:219-229.
11. Centers For Disease Control: *Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese-California*. *MMWR* 34:357-359. (1985).
12. Condon S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 46:269-280.
13. Chambers Judith A. (1995) *Creating New Partnerships in global biotechnology*. *Food Technology.* :94-99.
14. Chen Y. and Montville T. J. (1995) Efflux of ions and ATP depletion induced by pediocin PA-1 are concomitant with cell death in *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Appl. Bacterio.* 79:684-690.
15. Chikindas M. L., Garcia-Garcera M. J., Driesseh A. J. M., Ledebner A. M., Nissen-Meyer J., Nes I. F., Abbe T., Konings W. N. and Venema G. (1993) Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PACI.0 forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. and Environ. Microbiol.* 59:3577-3584.
16. Coventry M. J., Gordon J. B. Wilcock A., Harmark K., Davidson B. E., Hickey M. W., Hillier A.J. and Wan J. (1997) Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. *J. Appl. Microbiol.* 83:248-258.

17. Cox Lynton J. (1989) A perspective on LISTERIOSIS. Food Technology. p. 52-58.
18. Degreé R. and Sylvestre M. (1983). Effect of butylated hydroxyanisole on the cytoplasmic membrane of *Staphylococcus aureus*. J. Food Prot. 46:206-209.
19. Degnan A. J., Buyong N., and Luchansky J. B. (1993). Antilisterial activity of pediocin AcH in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. Int. J. Food Microbiol. 18:127-138.
20. Degnan A. J., Yousef A. E. and Luchansky B. (1992). Use of *Pediococcus acidilactici* to control *Listeria monocytogenes* in temperature-abused vacuum-packaged wieners. J. Food Prot. 55:98-103.
21. Delves-Broughton J.(1990). Nisin and its uses as a food preservative. Food Technology 44(11):100-117.
22. Doyle M. P., Michael P., Beuchat L. R. and Montville T. J. (1997) Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Ed. American Society for Microbiology. p.: 327-329, 353, 362-364, 557-572.
23. Eklund T. (1983). The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. Appl. Bacteriol. 54:383-389.
24. Einarsson H. and Lauzon H. L. (1995) Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 61:669-676.
25. Flores E. T. 1996. Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol. Tesis. Facultad de Química. UNAM.
26. Frazier W. C. and Westhoff D. C. (1993). Microbiología de los Alimentos. 4ª.ed., Ed. Acribia S. A., Zaragoza (España).
27. Freeman, Bob A., (1989) Tratado de Microbiología de Burrows. 22ª ed. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. D.F. México. Pág. 653, 654.
28. Gardner G. A. (1981). *Brochothrix thermosphacta* in the spoilage of meats: a review. In: Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity. (Roberts T.A., Hobbs G., Cristian J. H. B. and Skovgaard N, Eds.). Ed. Academic Press, New York. p.139-173.
29. Garver K. I. and Muriana P. M. (1993) Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. International Journal of Food Microbiology. 19:241-258.
30. Giraffa G., Piccioni N., Neviani E. and Carminati D. (1995). Production and stability of an *Enterococcus faecium* bacteriocin during Taleggio cheesemaking and ripening. Food Microbiol. 12:301-307
31. Gould G. W. (1992). Ecosystem approach to food preservation. J. Appl. Bacteriol. Supplement. 73:58S-68S.
32. Granum P.E. (1994) *Bacillus cereus* and its toxins. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement. 76:61S-66S.
33. Hastings J.W., Stiles M. E. and Holy A. (1994) Bacteriocins of *Leuconostocs* isolated from meat. International J. Food Microbiol. 24:75-81.

34. Herrera T. and Ulloa M. (1975) Antagonismo del pezol y de *Agrobacterium azotophilum* sobre diversas especies de bacterias y hongos, algunas patógenas del hombre. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 17:143-147.
35. Hoover, D.G. and K.L. R. Steenson, (1993) *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Academic Press, Inc., San Diego CA.
36. Hugas M., Carriga M., Aymerich M. T. and Monfort J. M. (1995). Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenics *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Bacteriol.* 79:322-330.
- Hurst A (1981). *Nisim*. *Adv. Appl. Microbiol.* 27:85-123.
37. Itho T., Fujimoto Y., Kawai Y., Toba T. and Saito T. (1995) Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. *Letters in Applied Microbiology*. 21:137-141.
38. Jay J. M. (1992) *Microbiología moderna de los alimentos*. 3ª ed. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza (España). p. 671-677
39. Joerger, M.C. and Klaenhamer, T. R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* 167: 439-446.
40. Jung D. S., Bodyfelt F. W. and Daeschel M. A. (1992). Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibition *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *J. Dairy Sci.* 75:387-393.
41. Kalchayanand, Sikes N. T., Dunne C. P. and Ray B. (1994). Hydrostatic pressure and electroporation have increased bacterial efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4174-4177.
42. Kanatani K., Oshimura M. and Sano K. (1995) Isolation and Characterization of acidocin A and Cloning of The Bacteriocin Gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ. Microbiol. Mar.* p. 1061-1067.
43. Klaenhammer T. R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12:39-86.
44. Klaenhammer T. R. (1988). *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. *Biochimie*. 70:337-349.
45. Lewus C.B., Sun S. and Montville T. J. (1992). Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:143-149.
46. Lewus C. B. and Montville T. J. (1991) Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 13:145-150.
47. Lewus C. B., Kaiser A. and Montville T.J. (1991) Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 1683-1688.
48. Lipinska E. (1997). *Nisim and its applications, Antibiotics and Antibiosis in Agriculture*. In M. Woodbine (ed.). Ed. Butterworths, London. p. 103-130.
49. Lloyd A. G. and Drake J. J. P. (1975). Problems posed by essential food preservatives. *Br. Med. Bull.* 31:214-219.
50. Maisnier-Patin S., Deschamps N., Tatini S. R. and Richard J. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait* 72:249-263.

51. Marrug J. D. (1991) Bacteriocins, their role in developing natural products. Food Biotechnology. 5:305-312.
52. McKay L.L. (1983). Functional properties of plasmids in lactic *Streptococcus* Antonie van Leeuwenhoek. 49:259-274.
53. McKay L. L. (1985). Roles of plasmids in starter cultures. In Bacterial Starter Cultures for Foods, Ed. S. E. Gilliland. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p. 159-174.
54. Maftah A., Renault D., Vignoles C., Hechard Y., Bressollier P., Ratinaud M. H., Cenatiempo Y. and Julien R. (1993) Membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes* and mitochondria by the bacteriocin mesentericin Y105. Journal Bacteriology 175:3232-3235.
55. Mensah P. A., Tomkins A. M., Drasar B. S. and Harrison T. J. (1988) Effect of fermentation of Ghanaian maize dough on the survival and proliferation of 4 strains of *Shigella flexneri*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 82:635-636.
56. Muriana P. M. (1996). Bacteriocins for control of *Listeria spp.* in food. J. Food Prot. Suppl. 54-63.
57. Nes I.F., Diep D.B., Havarstein L. S., Brurberg M. B., Eijsink V. and Holo H. (1996) Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 70:113-128.
58. Nielsen J. W., Dickson J. S. and Crouse J. D. (1990). Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. Appl. Environ. Microbiol. 56:2142-2145.
59. Nuraida L., Wachter M. C. and Owens J. D. (1995) Microbiology of pozol, a mexican fermented maize dough. World J. Appl. Bacteriol. 73:37-40.
60. Pelczar. (1993). Elementos de microbiología. Editorial Mc Graw-Hill. México D. F. (Traducido de la primera edición en inglés de Elements of Microbiology). p. 747.
61. Piard J. C. and Desmazeaud M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substances. Lait. 72:113-142.
62. Pucci M. J., Vedamuthu E. R., Kunka B. S. and Vandenberg D. A. (1988). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. Appl. Environ. Microbiol. 54:2349-2353.
63. Requena T. and Peláez C. (1995) Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos 35:19-44.
64. Rogers A. M. and Montville T. J. (1994) Quantification of factors influencing nisin's inhibition of *Clostridium botulinum* 56A in a model food system. Journal Food Sciens. 59:663-668, 686.
65. ROHM and HAS Company. Amberlite ion exchange resins laboratory guide. Filadelfia, PA 19105. Septiembre 1979. p. 4,5,10,11.
66. ROHM and HAS Company. Ion Exchange and Polymeric Adsorption Technology in Medicine, nutrition and the pharmaceutical industry. Filadelfia, PA 19105. Agosto 1981. p. 1-3.
67. Ryser E. T., Maisnier-Patin S., Gratadoux J. J. and Richard J. A. (1994) Isolation and identification of cheese-smear bacteria inhibitory to *Listeria spp.* International Journal of Food Microbiology. 21:237-246.

68. Sahl H. G., Grossgarten M., Widger W. R., Cramer W. A. and Brandis H. (1985) **Structural similarities of the staphylococcin-like peptide Pep 5 to the antibiotic nisin.** *Antimicrob. Agents Chemoter.* 27:836-840.
69. Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) **Molecular cloning. A laboratory manual 3.** Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
70. Schillinger U. (1990) **Bacteriocins of lactic acid bacteria.** In *Biotechnology and Food Safety*, ed. D. D. Bills and S. D. Kung. Butterworth-Heinemann, Boston. P.55-74.
71. Sears P. M., Smith B. S., Stewart W. K., Gonzalez R., Rubino S. O., Gusik S. A., Kulisek E. S., Projan S. J. and Blackburn. (1992). **Evaluation of a nisin-based germicidal formulation on teat skin of live cows.** *J. Dairy Sci.* 75:3185-3190.
72. Simango C. and Rukure Brace (1992) **Survival of bacterial enteric pathogens in traditional fermented foods.** *J. Appl. Bacteriol.* 73:37-40.
73. Simonetta A. C., Moragues de Velasco L. G. and Frisón L.N. (1997) **Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*.** *Letters in Applied Microbiology.* 24:139-143.
74. Siragusa G. R. and Nettles Cutter C. (1993). **Brochocin-C, a new bacteriocin produced by *Brochothrix campestris*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2326-2328.
75. Somers E. B. and Taylor S. L. (1987). **Antibotulinal effectiveness of nisin in pasteurized process cheese spreads.** *J. Food Prot.* 50:842-848.
76. Stevens D. A., Sheldon B. W., Klapes N. A. and Klaenhammer T. R. (1991). **Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria.** *Appl. Environ. Microbio.* 57:3613-3615.
77. Spelhaug S. R. y Harlander S. K. (1989) **Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*.** *Journal Food Prot.* 52:856-862.
78. Stiles M. E. (1996) **Biopreservation by lactic acid bacteria.** Kluwer Academic Publishers. 70:331-345.
79. Sven E. and Walter J. (1990) **Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations.** *FEMS Microbiology Reviews.* 87:149-164.
80. Tagg J. R., Dajani A. S. and Wannamaker L. W. (1976). **Bacteriocins of gram-positive bacteria.** *Bacteriol. Rev.* 40:722-756.
81. Ulloa M. and Herrera T. (1986). **Fermented corn products of Mexico.** In *Indigenous Fermented Food of Non-Western Origin*. Hesseltine, C. W. and Wang, H. L. (Eds). p.151-167. Berlin.Cramer.
82. Valdes-Stauber N., Gotz H. and Busse M. (1991) **Antagonistic effect of coryneform bacteria from red smear cheese against *Listeria* species.** *International Journal of Food Microbiology.* 13:119-130.
83. Vandenbergh Peter A. (1993). **Lactic acid bacteria , their metabolic products and interference with microbial growth.** *FEMS Microbiology Reviews* 12:221-238.
84. Vandenbergh P.A., Pucci M. J., Kunk B. S. and Vedamuthu E. R. (January 1989) **Method for inhibiting *Listeria monocytogenes* using a bacteriocin.** European Patent Application 89101126 6.

85. Van der Vossen J.M.B.M., van Herwijnen M.H.M., Leer R. J., Ten Brink B., Pouwels P. H. and Huis in't Veld J.H.J. (1994). Production of acidocin B, a bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* M46 is a plasmid-encoded trait: Plasmid curing, genetic marking by in vivo plasmid integration, and gene transfer. FEMS Microbiol. Lett. 116:333-340.
86. Vaughan E. E., Caplice E., Looney R., O'Rourke N., Coveney H., Daly C. and Fitzgerald G. F. (1994) Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. Journal of Applied Bacteriology. 76:118-123.
87. Viniegra-González, G. and Gómez, J. (1984). << Lactic acid production by pure and mixed bacterial cultures, fuels and organic chemicals from biomass >>. (Compilado por D. Wise) CRD Press, Boca Ratón, Florida (USA). p. 17.
- 88.- Voet Donald and Voet Judith G. (1995). Biochemistry. 2^o ed. Ed. John Wiley and Sons, Inc. p. 05.
89. Vuyst Luc de, and Vandamme Erick J. (1994). Bacteriocins of lactic acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications. 1^o ed., Ed. Blackie Academic and Professional.
90. Webmaster netsalud. s.a. cr..
91. Winkwski K., Bruno M. E. C. and Montville T. J. (1994) Correlation of bioenergetic parameters with cell death in *Listeria monocytogenes* cells exposed to nisin. Applied and Environmental Microbiology. 60:4186-4187.
92. Woods L. F., Wood J. M. and Gibbs P.A. (1981). The involvement of nitric oxide in the inhibition of the phosphoroclastic system in *Clostridium sporogenes* by sodium nitrite. J. Gen. Microbiol. 125:399-406.
93. Yousef A. E., Luchansky J. B., Degnan A. J. and Doyle M. P. (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* in winer exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or pediocin AcH during storage at 4 or 25° C. Appl. Environ. Microbiol. 57:1461-1467.
94. Zottola E. A., Yezzi T. L., Ajao D. B. and Roberts R. F. (1994). Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. Int. J. Food Microbiol. 24:227-238.