

10529
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

INTERACCION ENTRE *Lactobacillus ssp* y
Aspergillus flavus

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

ANGELICA SANCHEZ NIETO

ASESOR: M. en C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE

COASESOR: M. en C. CAROLINA MORENO RAMOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO,

2002

A



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

INTERACCION ENTRE Lactobacillus ssp y Aspergillus flavus

que presenta 1a pasante: Angélica Sánchez Nieto
con número de cuenta: 9009939-5 para obtener el título de:
Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 3 de Julio de 2002

PRESIDENTE

M. en C. Clara Ines Alvarez Mancique

Clara Ines Alvarez Mancique

VOCAL

C.E.T. Leticia Zúñiga Ramirez

Leticia Zuniga Ramirez

SECRETARIO

M. en C. Adriana Llorente Bousquets

Adriana Llorente Bousquets

PRIMER SUPLENTE

I.A. Laura Cortezar Figueroa

Laura Cortezar Figueroa

SEGUNDO SUPLENTE

I.A. Julieta González Sánchez

Julieta Gonzalez Sanchez

3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Soy el que llena
de alegría y luz el universo,
y estoy en todas partes,
en todas las regiones
y en todos los parajes.

Me encuentro en los rayos del sol
y el cintilar lejano de los astros
En la gota de agua y en el mar,
en las flores, los frutos y la hierba;
en la tierra y en el cielo.

Estoy en cada instante de lo eterno
y estoy también en medio de tu pecho
y al fondo de tu alma
allí me encontrarás, si con amor me buscas.

Yo soy la luz del mundo,
si me sigues,
no andarás entre sombras ni extravíos,
pues todo aquel que busca consuelo en mi palabra,
un faro encontrará que alumbré su camino
y que lo guíe,
en el mar, en la tierra o en el aire;
y un manto venturoso y acariciante que lo cubra
y proteja,
en las noches más oscuras y heladas de invierno.

¡ Gracias a ti Señor! por sostenerme de tu mano, por estar conmigo a cada instante y por todos aquellos a quienes amo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*A mi Padre: por tu apoyo incondicional y tu amor de padre, por alentarme a cada instante y por ese ser humano maravilloso que eres.
¡Gracias por todo Papá!*

A mi Madre: cuyo espíritu de lucha me impulsó a seguir adelante y vencer los obstáculos. Por ser la "vela mayor" que mantuvo a flote y unida a nuestra familia. ¡Gracias por tu amor y por ser mi madre!

A mis hermanas: Mary, Elizabeth, Claudia y Rocío, por su apoyo, por creer en mí y por ser mis hermanas. ¡las quiero mucho!

*A mis sobrinos: Daniela, Emmanuel, Israel, Ana Karen y Humberto, por enriquecer mi vida con su existencia, con la luz de mi alma.
Espero que siempre luchen por lograr lo que quieren en la vida.*

A mis primas: son ejemplo a seguir, su camino no ha sido fácil pero siempre han salido adelante, cada vez más fuertes y seguras. Diana, Lulú, Marisol y Ana Laura. ¡Gracias por ser como son, las quiero!

A Sofi: Eres una gran amiga, por ser tan optimista, por que tus palabras siempre me animaron a seguir cuando todo parecía estar en contra; eres el ejemplo de la verdadera amistad. El Señor me dio un maravilloso regalo con tu amistad.

A Julia : donde quiera que te encuentres.

A Gabriela Sosa (QFB): por su amistad y cariño.

A la Maestra Clarita: ¡Infinitamente gracias! Por su entrega para la realización de este trabajo. Sobre todo por su amistad, sus consejos y la confianza que demostró hacia mí, mostrándome el camino. Es un ser lleno de luz. Doy gracias a Dios por ponerme en su camino

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis tías: Dolores y Ana Mariá, por su apoyo, ejemplo e interés. ¡Gracias!

A la M. en C. Carolina Moreno : por su tiempo y asesoramiento para la realización de este trabajo.

Al Rulmico Porfirio García: por su dedicación y apoyo para este trabajo.

Al Señor Juan Ignacio: por compartir sus conocimientos conmigo, por su tiempo y ayuda

A la Universidad: en la cual me he formado como profesionalista y que me ha llenado de tantas cosas maravillosas.

A todos los que me brindaron su amistad e hicieron el camino más fácil y alegraron todos los momentos difíciles: Adriana, Emilio, Eliut, Edeimi, Vianney, Gloria, Esteban, Pedro Carlos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*A Vicente : Por tu apoyo, tus palabras, por estar conmigo en las altas y en las bajas, por brindarme siempre tu amistad y comprensión. Eres una parte importante en mi vida, y la llenas de luz. Este trabajo también es tuyo. ¡gracias por todo lo que eres y significas para mi!
¡Se Ama!*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

INDICE DE TABLAS	I
INDICE DE GRÁFICAS	II
RESUMEN	III
INTRODUCCIÓN	V
GENERALIDADES	
1. Bacterias Ácido Lácticas (BAL)	1
2. Acción Probiótica de Bacterias Lácticas	2
3. Acción Bioconservadora de Bacterias Lácticas	2
4. Bacteriocinas	3
5. Factores que Afectan la eficacia de las Bacteriocinas en los alimentos	8
6. Aflatoxinas	9
7. Relación de las aflatoxinas con BAL	11
JUSTIFICACIÓN	12
OBJETIVOS	13
DIAGRAMA DE BLOQUES	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
1.1 Material Biológico	15
1.2 Métodos	15
1.2.1 Aislamiento de las cepas lácticas	15
1.2.1.1 identificación Morfológica y Bioquímica de Bacterias	15
1.2.2 Estandarización de la concentración de esporas de <i>A. flavus</i>	16
1.2.2.1 Cultivo de <i>A. flavus</i>	16
1.2.2.2 Cosecha de esporas	16
1.2.2.3 Estandarización de la concentración de esporas	16
1.2.3 Prueba de inhibición del crecimiento de <i>A. flavus</i>	18
1.2.3.1 Cuantificación de <i>Lactobacillus</i> y <i>A. flavus</i>	18
1.2.4 Interacción entre <i>Lactobacillus</i> y <i>A. flavus</i>	19
1.2.5 Detección de Aflatoxina	19
1.2.5.1 Extracción y purificación de Aflatoxina	19
1.2.5.2 Cromatografía en Capa Fina (TLC)	19
1.2.5.3 Cromatografía de Líquidos (HPLC)	20

1.2.6 Prueba de estabilidad del efecto inhibitorio de las cepas de <i>Lactobacillus</i>	21
1.2.6.1 Densidad óptica	21
1.2.7 Recuperación de <i>Lactobacillus</i>	21
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	45
RECOMENDACIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47
APÉNDICE	50
Anexo 1	50
Anexo 2	51
Anexo 3	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de la Prueba Bioquímica	22
Tabla 2. Identificación Bioquímica y Morfológica de las bacterias	22
Tabla 3. Variación del crecimiento fungal por contacto con los <i>Lactobacillus</i>	23
Tabla 4. Influencia de <i>A. flavus</i> sobre la actividad antibacteriana de las Cepas de <i>Lactobacillus</i> .	35

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Comparación del crecimiento de moho <i>A.flavus</i> y <i>Lactobacillus</i> en su medio de crecimiento en tiempo cero.	24
Gráfica 2. Comparación del crecimiento de moho <i>A.flavus</i> y <i>Lactobacillus</i> en su medio de crecimiento en tiempo de 15 días	25
Gráfica 3 y 4. Identificación de Aflatoxina por cromatografía de líquidos	28
Gráfica 5 y 6. Estándar de Aflatoxina y control <i>A.flavus</i>	29
Gráficas 7, 8, 9 y 10. Influencia de la interacción de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>A.flavus</i> en la liberación de toxina.	30
Gráficas 11,12,13 y 14. Influencia de la interacción de <i>Lactobacillus casei pseudoplarum</i> y <i>A.flavus</i> en la liberación de toxina.	31
Gráficas 15,16, 17 y 18. Influencia de la interacción de <i>Lactobacillus casei pseudoplarum</i> y <i>A.flavus</i> en la liberación de toxina.	32
Gráfica 19. Influencia de la interacción de <i>Lactobacillus casei pseudoplarum</i> y <i>A.flavus</i> en la liberación de toxina	33
Gráficas 20 y 21. Influencia de la interacción de <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L.lactis</i> y <i>A.flavus</i> en la liberación de toxina.	34

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la actividad antiflatoxigénica y la inhibición del crecimiento, de 14 bacterias ácidas lácticas sobre el moho *Aspergillus flavus*. Para lo cual se aislaron 13 cepas bacterianas de quesos de cabra. Las cuales se identificaron morfológica y bioquímicamente por medio de una tinción de GRAM y pruebas de oxidasa, catalasa y fermentación de azúcares.

Estas pruebas permitieron identificar 8 cepas de *Lactobacillus casei pseudoplantarum*, 3 cepas de *Lactobacillus bulgaricus*, 1 cepa de *Lactobacillus lactis* y 1 de *Lactobacillus plantarum*, se empleó una cepa ATCC de *Lactobacillus casei*.

Se cultivó la cepa de moho *Aspergillus flavus*, proporcionada por la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) FES-Cuautitlán, en agar Papa-dextrosa y se dejó crecer por 5 días a temperatura ambiente. Se cosecharon las esporas del cultivo y se estandarizó la concentración de esporas por medio de un hemocitómetro para obtener una concentración de 10^8 conidios/ ml.

Las cepas aisladas de los *Lactobacillus* se sembraron en caldo Rogosa modificado (MRS) dejándolas crecer por 72 horas a 32°C. Estos cultivos se inocularon con 1 ml de la suspensión de esporas estandarizadas. Se incubaron por 15 días a temperatura ambiente. Se tomaron muestras al inicio (tiempo cero) y al final de la experimentación (tiempo de 15 días)

Se cuantificaron cada uno de los microorganismos, lactobacilos y moho, por conteo en placa. Los conteos de tiempo cero mostraron que el moho estaba inhibido con la mayoría de las cepas de lactobacilos a excepción de las cepas num. 9, 12 y 14 con las cuales el moho se adaptó y creció. Con la cepa num. 4 hubo inhibición mutua.

En los conteos al final de la interacción (tiempo de 15 días) se observó que en 6 de las cepas de lactobacilos, el bacilo se inhibió completamente frente al moho, en el resto de las cepas de lactobacilos se observó simbiosis entre los *Lactobacillus* y el moho.

Se utilizó cromatografía en capa fina y cromatografía de líquidos para detectar la presencia de aflatoxina en el caldo de cultivo de la mezcla de lactobacilo-moho.

Los resultados obtenidos en cromatografía de capa fina no mostraron presencia alguna de aflatoxina, estos resultados fueron comparados con el control (cultivo de *A.flavus* puro en caldo Rogosa), y un estándar de aflatoxina, no se obtuvieron resultados de la presencia de aflatoxina en el control, el estándar de aflatoxina fluoresció bajo la luz ultravioleta.

La cromatografía de líquidos reveló la presencia de aflatoxina en todos los cultivos de lactobacilos inoculados con esporas de *A.flavus*. Estos resultados mostraron que con algunas cepas de bacilos, el *A.flavus* liberó más toxina que con otras. También mostró que con las cepas num.3, 7 y 4 que resultaron ser *L.bulgaricus*, las dos primeras y *L. casei pseudoplantarum* la tercera, se detectó menor cantidad de aflatoxina.

Se evaluó también el efecto del *A. flavus* al estar en contacto con los lactobacilos sobre la capacidad inhibitoria de crecimiento que poseen estos, frente a bacterias como *E. coli*, por medio de densidad óptica (absorbancia). Esta prueba fue realizada a los lactobacilos antes y después de estar en contacto con el *A. flavus*.

Los resultados obtenidos de esta prueba muestran que los lactobacilos antes de estar en contacto con el moho poseían una capacidad inhibitoria de crecimiento de *E. coli* de un rango del 86% al 96% de inhibición, después de 15 días de contacto con el moho, los lactobacilos disminuyeron su capacidad, algunos hasta en un 44%, sólo en algunas cepas (num. 1 y 12) aumentó ligeramente su capacidad de inhibición al estar en contacto con *A. flavus*.

Los resultados obtenidos con las cepas num. 3, 7 y 4 indican, que podrían ser cepas de estudio para continuar la investigación y ver su efectividad en los alimentos.

INTRODUCCIÓN

El hombre siempre se ha preocupado por proteger sus alimentos, principalmente de microorganismos asociados a la descomposición de estos; para lo cual ha desarrollado métodos físicos, químicos o biológicos que le permitan conservar por más tiempo los alimentos de forma segura para su consumo.

Uno de los problemas a los que se enfrenta es la contaminación de alimentos como granos y semillas. La alimentación humana y animal en gran parte se basa en el consumo de granos, principalmente de maíz, de cereales como trigo, arroz, avena, sorgo y cebada, de frutos secos como nueces, cacahuates y pistaches, y de sus derivados, los que frecuentemente son invadidos por mohos, siendo el *Aspergillus flavus* una de las especies a las que se le ha dado más atención por parte de los investigadores, debido al riesgo que representa el consumir estos alimentos contaminados por este moho. (Moreno y Gil, 1991., Casanova 1995)

El *Aspergillus flavus* produce un metabolito tóxico llamado aflatoxina, el cual es un potente compuesto cancerígeno, teratogénico y mutagénico, que afecta diversos órganos del humano y del animal, principalmente el hígado. (Pérez 1997, Kuiper-Goodman 1999, Bhatnagar y Cleveland, 2000)

A las semillas les reduce su viabilidad y a los granos los afecta en su calidad nutricional y sanitaria.

No sólo se ha detectado contaminación por *Aspergillus flavus* en granos y semillas, sino que también en alimentos que tienen un periodo de maduración como embutidos, algunos tipos de pescado, leche y derivados lácteos (queso, yogurt, etc.). (Gourama y Bullerman, 1997)

Diversas investigaciones se han realizado para obtener más información acerca del moho *A. flavus* y sus metabolitos (aflatoxinas) para poder prevenir o controlar este problema. Actualmente una de las opciones que se han investigado es la utilización de bacterias lácticas y sus metabolitos, las bacteriocinas.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

GENERALIDADES

1. Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las bacterias lácticas son microorganismos Gram-positivos, muy heterogéneos desde un punto de vista filogenético. Hay cuatro grupos principales de bacterias ácido lácticas tradicionales: *Streptococcus* (actualmente subdividido en *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* y *Enterococcus*), *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, a los cuales se han añadido otros como *Weissella*, *Oenococcus*, *Atopobium*, *Alloicoccus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium*. (Schleifer et al., 1995)

Su clasificación se basa en las siguientes características:

- Morfología celular: cocos o bacilos
- Modo de fermentar la glucosa: se distinguen dos vías de fermentación entre las BAL, la fermentación homoláctica, que por la vía glucolítica Embden –Meyerhoff genera casi exclusivamente ácido láctico como producto final, y la fermentación heteroláctica, la que por la vía de las pentosas-fosfato (fosfogluconato-fosfocetolasa) genera otros productos además del ácido láctico, tales como etanol, acetato y CO₂.
- Configuración del ácido Láctico Producido: D, L o ambos.
- Crecimiento a diferentes temperaturas.
- Capacidad para crecer en altas concentraciones de sal.
- Tolerancia a ácido o álcali. (Axelsson. 1993).

Las bacterias lácticas y sus metabolitos han sido consumidos desde tiempos remotos, actualmente tienen gran importancia económica ya que, bien de forma natural o adicionadas, desempeñan un papel importante en la fermentación de una gran variedad de alimentos. En ellos, sus actividades metabólicas no sólo contribuyen al desarrollo de características sensoriales y reológicas deseables sino que, además permiten conservar o aumentar el valor nutritivo. Esto ha contribuido a que hayan sido designadas por la Food Drug Administration (FDA) como ingredientes Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS). (Martínez et al., 2000, A)

2. Acción Probiótica de Bacterias Lácticas

En los últimos años se ha demostrado el efecto terapéutico que tienen estas bacterias sobre los humanos, ya que se han usado en el mejoramiento del sistema inmunológico, digestivo y circulatorio, además en la prevención del cáncer y enfermedades transmitidas por microorganismos como diarrea, vaginitis, infecciones intestinales, etc. Se considera que un alimento o aditivo alimentario es probiótico cuando ayuda a mejorar la salud del hospedador, en este caso se ha visto que los lactobacilos mejoran la digestión del ser humano al consumir productos que los contienen.

Para que los lactobacilos sean utilizados como probióticos, es necesario que las cepas sean capaces de adherirse a las células intestinales y/o al mucus ya que es un prerequisite para la colonización. También deben soportar las barreras potenciales como: el bajo pH del estómago, la baja tensión superficial, la presencia de ácidos biliares y/o las interacciones con otros microorganismos presentes. Otras cualidades importantes de estas cepas deben ser la producción de sustancias antimicrobianas y la resistencia a antibióticos.

Se ha visto que los lactobacilos pueden requerir de complejos de proteínas y/o carbohidratos para adherirse a las células intestinales. En algunas cepas, un material tipo polisacárido facilita la unión, mientras que en otras cepas están involucrados complejos lipídicos y proteínicos. (Fragoso y Fernández, 2000)

3. Acción Bioconservadora de Bacterias Lácticas

Los consumidores consideran a las bacterias lácticas como algo "natural" y "beneficioso para la salud", por lo que su empleo en la conservación de los alimentos tiene gran aceptabilidad. Si por bioconservación se entiende que, es la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad sanitaria de los alimentos mediante la microflora natural o sus metabolitos, entonces las bacterias lácticas son los candidatos ideales para su selección como cultivos bioprotectores, y se ha llegado a definir bioconservación como el empleo de bacterias lácticas, sus productos metabólicos o ambos para mejorar o asegurar la calidad de los alimentos. (Fragoso y Fernández, 2000).

Se encuentran varias opciones para la incorporación de los bioconservantes en los alimentos:

- Uso de cultivos bacteriocinogénicos
- Uso de preparados de bacteriocinas en un producto previamente fermentado
- Uso de bacteriocinas sintéticas, purificadas o semipurificadas.

Por ejemplo, se ha usado como bioconservador en productos lácteos el **lactacín 99** que es una bacteriocina producida por *L. plantarum* 99, que elimina las bacterias ácido lácticas racemasa positiva formadoras de cristales de lactato de calcio sobre la superficie de los quesos cheddar.

La capacidad de producir grandes cantidades de ácidos orgánicos (fundamentalmente ácido láctico) por fermentación de los carbohidratos presentes en los alimentos y el consecuente descenso del pH son los factores primarios en los que se basa la actividad antimicrobiana de estas. En los fenómenos de antibiosis de las bacterias lácticas también participan activamente otros metabolitos. Entre estos compuestos están las bacteriocinas, que han recibido una atención especial, tanto por parte de la comunidad científica como de la industria alimentaria. Esto se debe a que algunas bacteriocinas inhiben bacterias alterantes y patógenas que son resistentes a métodos de conservación tradicionales ya que son compuestos atractivos desde un punto de vista tecnológico (Fragoso y Fernández, 2000)

4. Bacteriocinas

Definición: Las bacteriocinas son compuestos peptídicos antimicrobianos que se sintetizan a nivel ribosómico y que, posteriormente, pueden sufrir modificaciones postraduccionales. Koninsky(1982) las definió como agentes antimicrobianos de naturaleza peptídica que varían en su espectro de actividad, modo de acción, peso molecular, determinantes genéticos y características bioquímicas. En condiciones normales las bacteriocinas son activas únicamente frente a otras bacterias Gram-positivas.

Desde un punto de vista científico, las bacteriocinas de las bacterias lácticas se han clasificado en tres grandes clases.

Clase I:

Lantibióticos, péptidos pequeños (< 5 kDa), termoestables y con aminoácidos modificados, de los que los más comunes son la deshidroalanina (DHA) y la deshidrobutirina (DHB), originados por la deshidratación postraducciona de la serina y la treonina, respectivamente. La condensación de los residuos de DHA y DHB con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas presentes en la molécula origina los aminoácidos lantionina y b-metil-lantionina, respectivamente.

Los lantibióticos de tipo A son péptidos formadores de poros, catiónicos y elongados que en algunos casos, como el de la lactacina 3147, constan de dos componentes. El prototipo de esta clase es la nisina, la bacteriocina de las bacterias lácticas más estudiada hasta la fecha.

Los lantibióticos de tipo B son péptidos globulares inmunológicamente activos que actúan como inhibidores enzimáticos.

Clase II:

Péptidos pequeños (< 10 kDa), termoestables y sin aminoácidos modificados en su estructura primaria. A su vez se pueden clasificar en cuatro subclases.

Las bacteriocinas de la subclase IIa se caracterizan por ser particularmente activas frente a los microorganismos del género *Listeria*. Sus secuencias aminoácidas muestran un elevado grado de homología (38-55%), que es mucho más pronunciado en la parte N-terminal de los péptidos. De hecho todos los miembros de esta subclase comparten la secuencia consenso N-terminal. Esta subclase también se conoce como "familia pediocina", en alusión a la bacteriocina más estudiada de este grupo, la pediocina PA-1.

La subclase IIb contiene bacteriocinas cuya actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos, como la lactococina G. La subclase IIc incluye a las bacteriocinas de la clase II que se transportan utilizando un sistema sec-dependiente, a pesar de que algunas, como la enterocina P muestran ciertas características propias de las bacteriocinas de la subclase IIa.

Por último la subclase II d, engloba a las bacteriocinas de la clase II que, como sucede con la lactococina A, no se pueden clasificar en ninguno de los subgrupos anteriores. Algunos autores han sugerido la creación de otra subclase para las bacteriocinas tiol-activadas, como la lactococina B.

Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que la oxidación del grupo sulfhidrilo no interfiere con su actividad, por lo que se trata de una propiedad sin entidad diferencial suficiente como para que las bacteriocinas que la posean constituyan un subgrupo propio.

Clase III:

Proteínas de más de 30 kDa, termolábiles y sin aminoácidos modificados en su estructura primaria. Estas bacteriocinas son las que poseen un menor interés industrial en la actualidad.

Existen algunas bacteriocinas que no pueden clasificarse en ninguna de las clases mencionadas, como la enterocina AS-48 o las producidas por *Enterococcus faecium* L50.

Las bacteriocinas de las clases I y II (especialmente IIa) son las que han recibido mayor atención científica debido, en parte, a que son las que poseen mayor interés industrial. En general se trata de péptidos catiónicos y anfipáticos compuestos por entre 12 y 45 aminoácidos. Sus moléculas no suelen estar estructuradas en soluciones acuosas, pero poseen una propensión a formar estructuras α -helicales cuando se exponen a solventes como el trifluoroetanol o cuando se mezclan con membranas compuestas por fosfolípidos aniónicos, algunas bacteriocinas poseen ciertas restricciones estructurales debido a la presencia de puentes de disulfuro (por ejemplo pediocina PA-1) o anillos tioéter (nisina) intramoleculares.

Aunque la estructura de diversos antibióticos ha sido elucidada mediante resonancia magnética nuclear, hasta la fecha únicamente se ha resuelto la estructura tridimensional de una bacteriocina de la clase II, la leucocina A. (Jack et al., 1995, Martínez et al., 2000. B)

Algunas bacteriocinas como Lactacin B y F (de 6.3 kDa), Caseicin 80 (40 kDa), Plantaricin A, Plantaricin B y Bacteriocin, entre otras, son producidas por *Lactobacillus acidophilus*, *casei* y *plantarum*, respectivamente. (Hoover y Steenson, 1993)

MODO DE ACCIÓN: La acción antimicrobiana de las bacteriocinas se debe a la desestabilización funcional de las membranas citoplasmáticas de las células sensibles. Las bacteriocinas actúan sobre las membranas, a través de un proceso que consta de tres etapas básicas: unión a la membrana, inserción en la misma y formación de poros, un fenómeno que, en última instancia, conduce a la muerte celular.

Se trata de un mecanismo compartido por la mayoría de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas.

La unión inicial de las bacteriocinas a las membranas está gobernada por interacciones electrostáticas entre los residuos cargados positivamente de los péptidos y los grupos negativos de los fosfolípidos de las membranas.

Las regiones de las bacteriocinas que determinan la especificidad deben reconocer e interactuar de una forma específica con entidades localizadas en las membranas de las células. No obstante, en el caso de las bacteriocinas de amplio espectro, parece más probable que sea un componente determinado de la membrana, y no un receptor como tal, el que reaccione con la región de la bacteriocina que determina la especificidad.

La interacción no sería quiral ya que la especificidad de cepa que muestran las bacteriocinas no depende de interacciones estereo-específicas.

En la actualidad, existen dos grandes modelos que explican el mecanismo por el que las bacteriocinas generan poros en las membranas plasmáticas: el modelo de cuña, aplicable a la nisina y otros antibióticos, y el modelo de duela de barril, aplicable a diversas bacteriocinas de la clase II. (Martínez et al, 2000 B)

En cualquier caso, la formación del complejo de poración en las membranas provoca la disipación de la fuerza protón-motriz (PMF) y, en última instancia, la muerte celular. La PMF es un gradiente electroquímico necesario para que se efectúen gran parte de los procesos metabólicos dependientes de energía que tienen lugar en las células; consta de dos componentes: Un potencial de membrana ($\Delta\psi$) y un gradiente de pH (ΔpH). En los últimos años, el desarrollo de técnicas para estudiar por separado ambos componentes y de sistemas de membranas artificiales ha permitido evaluar el efecto de diversas bacteriocinas sobre la PMF, un parámetro clave para comprender su mecanismo de acción. (Martínez et al., 2000. B)

En general, el colapso de la PMF conduce a una reducción significativa del contenido de ATP intracelular, inhabilita el transporte activo de nutrientes e impide el mantenimiento de concentraciones adecuadas de ciertos iones, como los K^+ y Mg^{2+} . En este sentido, los resultados obtenidos con diversas bacteriocinas, como la nisina, la pediocina PA-1, la lactococina A y la lactococina B, condujeron a autores como Bruno Y Montville (1993), citados por Martínez et al., (2000 B); a la conclusión de que las bacteriocinas compartían un mecanismo de acción común: la disipación de la PMF en las células sensibles.

Últimamente, se ha sugerido que la constitución global de las membranas, y no sólo su composición lipídica, podrían ejercer una marcada influencia en la actividad formadora de poros de una bacteriocina, ya que las proteínas de la membrana podrían intervenir decisivamente en el ordenamiento lipídico de esta estructura.

En este sentido, aunque las bacterias naturalmente resistentes a una bacteriocina no puedan evitar la inserción de monómeros de una bacteriocina, la composición global de sus membranas impediría que se formarán poros de suficiente duración y diámetro como para causar la muerte celular. Una vez que las moléculas de bacteriocina han formado un complejo de poración, la muerte de las células sensibles puede ir acompañada o no de un proceso de lisis celular. (Martínez et al., 2000. B)

Bhunja et al. (1991) sugirieron que la muerte celular puede activar sistemas autolíticos que, a su vez, serían responsables de la lisis en algunas cepas. En este sentido, se ha observado que los lantibióticos nisina y Pep 5 son capaces de liberar y activar enzimas autolíticas normalmente unidas a los ácidos teicoicos, lipoteicoicos y teicurónicos de la pared celular de *Staphylococcus simulans* 22.

A pesar de que muchas bacteriocinas de las bacterias lácticas poseen estructuras primarias similares, su espectro antimicrobiano varía mucho más de lo que se podría esperar de una mera interacción entre un péptido catiónico y los lípidos de la membrana celular. Este hecho sugiere que diferencias muy sutiles en la estructura de los péptidos pueden provocar diferencias notables en su especificidad. El análisis de las relaciones entre la estructura primaria y la especificidad celular podría permitir la identificación de interacciones péptido-célula claves para determinar si una célula es sensible o no a un péptido antimicrobiano. Por este motivo, el establecimiento de las relaciones estructura-función constituye actualmente uno de los grandes retos en el campo de las bacteriocinas. (Martínez et al., 2000. B)

La bacteriocina Plantaricin C, que es producida por *L. plantarum*, comparte el mecanismo de acción mencionado anteriormente; actúa contra células sensibles formando poros en la membrana, disipando la PMF e inhibiendo el transporte de aminoácidos. (González et al., 1996)

Así también la Lactacin F, producida por *L. johnsonii*, induce la pérdida de K^+ de las células de *E. faecalis*, depolariza la membrana citoplasmática, y la hidrólisis interna del ATP; indicando esto que forma poros en la membrana en ausencia de la fuerza protón-motriz (PMF). (Abee et al., 1994).

BIOSÍNTESIS: En general, las bacteriocinas se sintetizan en forma de precursores (prebacteriocinas), en los que la parte que dará lugar a la bacteriocina (probacteriocina) está unida a una secuencia líder N-terminal, de entre 14 y 30 residuos. Las funciones del líder son, por una parte, prevenir que la bacteriocina sea biológicamente activa mientras se encuentra en el interior de la célula productora y, por otra, proporcionar la señal de reconocimiento al sistema de transporte de la bacteriocina. En muchos casos, se trata de un líder del tipo "doble glicina", apelativo referido a los dos residuos conservados de glicina en su extremo C-terminal y, por ende, contiguos al lugar de procesado de la prebacteriocina.

El transporte de las bacteriocinas que poseen este tipo de líderes, y el procesado del líder, se efectúa mediante transportadores del tipo ABC (ATP Binding Cassette) y sus correspondientes proteínas accesorias.

Los determinantes genéticos de la biosíntesis de una bacteriocina se pueden localizar a nivel plasmídico o cromosómico. Además pueden residir en transposones insertados de forma estable en el cromosoma de las células hospedadoras, como sucede en el caso de la nisina. (Jack et al., 1995, Martínez et al., 2000. B)

5. Factores que afectan la eficacia de las bacteriocinas en los alimentos.

A pesar del innegable potencial práctico de las bacteriocinas, no es conveniente extraer conclusiones directas de resultados obtenidos en experimentos "*in vitro*" para predecir la eficacia de las bacteriocinas en sistemas "*in vivo*". Ello se debe a que existe una serie de factores que pueden comprometer la eficacia de las bacteriocinas y/o de las cepas productoras en aplicaciones industriales.

Entre los factores que afectan a las bacterias lácticas bacteriocinogénicas destacan los siguientes:

1. La existencia de un ambiente inadecuado (pH, temperatura, nutrientes, etc.) para la síntesis de bacteriocinas.
2. La pérdida espontánea de la bacteriocinogenicidad, lo cual puede suceder, por ejemplo, cuando los determinantes genéticos para la biosíntesis de las bacteriocinas se encuentran localizados en plásmidos inestables.
3. La existencia de fagos que destruyan o impidan el crecimiento normal de las cepas bacteriocinogénicas.
4. Los fenómenos de antagonismo con otros microorganismos presentes en el alimento.

En cuanto a los factores que pueden influir negativamente en la acción de las bacteriocinas, los principales son:

- La aparición de microorganismos resistentes. Se trata de un problema particularmente preocupante ya que las células que adquieren resistencia frente a una bacteriocina suelen mostrar resistencias cruzadas frente a otras bacteriocinas de la misma clase.
- La existencia en el alimento de condiciones (por ejemplo pH, proteasas, procesos oxidativos, aditivos alimentarios), que alteren la estructura y/o función de las bacteriocinas.
- La posible unión de las bacteriocinas a ciertos componentes alimentarios como grasas o proteínas.
- La dificultad para lograr que la bacteriocina se solubilice o se distribuya uniformemente en la matriz alimentaria, especialmente en alimentos que se elaboran con materias primas sólidas y/o semisólidas. (Martínez et al., 2000 A)

6. Aflatoxinas

Las aflatoxinas son contaminantes de origen fúngico producidas principalmente por algunas especies de *Aspergillus* (*A. flavus*, *parasiticus* y *nominus*). Estos mohos toxigénicos son capaces de desarrollarse en gran variedad de sustratos, pudiendo contaminar los alimentos cuando éstos son cultivados, procesados, transformados o almacenados en condiciones que favorezcan su desarrollo. (Cole, 1981., Moreno, 1988., Burdaspal y Gorostidi, 1989, Burdaspal, et al., 1990, Moreno y Gil, 1991)

El crecimiento de mohos y producción de aflatoxina dependen de muchos factores como el sustrato, la temperatura, el pH, la humedad relativa y la presencia de microflora competidora. (Moreno y Gil, 1991).

Aunque los mohos y por consecuencia la presencia de aflatoxinas pueden encontrarse en muchos productos agrícolas, los mayores niveles de concentración se han encontrado en semillas de algodón y maíz, cacahuates, nueces y avellanas. En cereales como el trigo, arroz, centeno o la cebada, los niveles son generalmente bajos.

Se han identificado 18 tipos de aflatoxinas, de las cuales las más frecuentes en los alimentos son la B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂.

La aflatoxina M₁ es un metabolito hidroxilado de la aflatoxina B₁, secretada en la leche de los animales que consumen alimentos contaminados con B₁.

La cantidad de M₁ secretada es proporcional a la cantidad de B₁ ingerida. La tasa de conversión de B₁ en M₁ oscila entre 0.4 y 3% aceptándose por lo general una tasa media cercana al 1% (Cole, 1981., Moreno y Gil, 1991).

Las aflatoxinas poseen actividad mutagénica y carcinogénica; la más tóxica es la B₁ y en orden decreciente le siguen M₁, G₁, B₂ y G₂. La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) incluye a las aflatoxinas dentro del grupo 1, considerándolas cancerígenas para el hombre. Así mismo el comité mixto de la Organización Mundial para la Salud y la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO/OMS) de expertos en aditivos Alimentarios (Codex alimentario) calificó las aflatoxinas como potentes carcinógenos humanos.

Las concentraciones máximas permitidas de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en alimentos para consumo humano están regulados por el Real Decreto (RD) 475/1998 y son los siguientes: 10 µg/Kg. para la suma de las cuatro aflatoxinas y 5µg/Kg para la aflatoxina B₁. (Holmquist 1983, Burdaspal, et al., 1990)

Se ha encontrado otro grupo de alimentos en el cual también suele ocurrir el crecimiento de mohos productores de aflatoxinas. Éste incluye los alimentos que requieren un período de maduración como quesos, algunos tipos de pescado, embutidos, yogurt, entre otros. (Gourama y Bullerman, 1997)

El nivel de las aflatoxinas en los alimentos puede fluctuar considerablemente de un año a otro, en función de diversos factores como por ejemplo las condiciones adversas que favorecen la invasión por los hongos y la proliferación de éstos ya sea en el campo o durante el almacenamiento. (Moreno y Gil, 1991)

Aunque existen diferencias geográficas y climáticas en la producción e incidencia de aflatoxinas, la exposición a estas sustancias se registra en todo el mundo y muchos de los suministros mundiales de alimentos están contaminados en alguna medida. Por consiguiente las aflatoxinas pueden hacer que nuestros alimentos sean peligrosos. Estas sustancias pueden afectar a numerosos órganos y sistemas, en particular el hígado, los riñones, el sistema nervioso, el sistema endocrino y el sistema inmunitario. (Kuiper-Goodman 1999)

La interacción entre mohos aflatoxigénicos y otros microorganismos es un fenómeno común en la naturaleza. Esta interacción resulta en cambios continuos de la disponibilidad de nutrientes y la producción de productos finales volátiles o no, que pueden estimular, inhibir o no tener influencia en el crecimiento del moho y la producción de aflatoxina. (Gourama y Bullerman, 1997, El-Gendy and Marth, 1981).

7. Relación de las Aflatoxinas con las Bacterias ácido Lácticas

Desde el descubrimiento de la aflatoxina en 1960, se ha llevado a cabo una investigación extensa en el campo de metabolitos tóxicos. Estas han reportado la inhibición del crecimiento del moho y de aflatoxinas por muchos microorganismos incluyendo bacterias, levaduras, mohos y actinomicetos. (Coallier, 1985., Gourama y Bullerman, 1997)

Muchos estudios han demostrado que la interacción de algunos microorganismos con *A.flavus* o *A.parasiticus* puede influir en la producción final de aflatoxina positivamente o negativamente. Se ha visto que *A.nlger* puede inhibir la producción de aflatoxina en cacahuates contaminados con especies aflatoxigénicas. El *Streptococcus lactis* no solamente puede inhibir la biosíntesis de la aflatoxina sino que también la degrada transformándola. (Coallier e Idziak 1985, Moss, 1989)

Algunos investigadores, han encontrado que la levadura *Hypopichia burtonii* y el *Bacillus amyloflavens*, ambos frecuentemente aislados como contaminantes superficiales de semillas de maíz, podían estimular la producción de aflatoxina por *A. flavus* cuando crecían conjuntamente en maíz y arroz previamente esterilizado. (Moss 1989, Gourama y Bullerman, 1997)

Debido a la toxicidad de *A.flavus* y *A.parasiticus*, las investigaciones sobre aflatoxinas y su producción se han intensificado, desarrollando experimentos con los cuales se pueda inhibir o controlar la producción, en el mejor de los casos, de la aflatoxina.

Ahora se conocen diferentes bacterias ácido lácticas que poseen actividad antimicrobiana contra organismos patógenos. Rutzinksi y Marth (citados por Coallier-Ascah, 1985), notificaron los efectos inhibitorios de *Streptococcus lactis* y *S. cremoris* contra *Enterobacter* y *Hafnia* especies, Así como también muchas han sido reportadas por afectar la producción de aflatoxina, como el *Lactobacillus ssp* se ha encontrado que inhibe la biosíntesis de la aflatoxina, sin embargo la adición de *Lactococcus lactis* a cultivo de moho estimula la producción de aflatoxina.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas, representa un riesgo tanto para la salud del hombre como la de los animales, es necesario prevenir o controlar de alguna manera este tipo de contaminación.

Por las investigaciones antes mencionadas, se ha visto que las Bacterias Lácticas pueden ayudar a controlar o inhibir la producción de la aflatoxina de *Aspergillus flavus*.

Con este trabajo se pretende contribuir al conocimiento sobre la interacción Lactobacilo-moho, y sea considerado para estudios posteriores, en relación con el control de la contaminación de los alimentos, por aflatoxina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto de 14 bacterias ácido lácticas sobre la inhibición del crecimiento del moho *Aspergillus flavus* y su actividad aflatoxigénica.

OBJETIVO PARTICULAR 1:

Determinar el efecto de las células de 14 bacterias ácido lácticas, sobre el crecimiento del moho y/o producción de su aflatoxina.

OBJETIVO PARTICULAR 2:

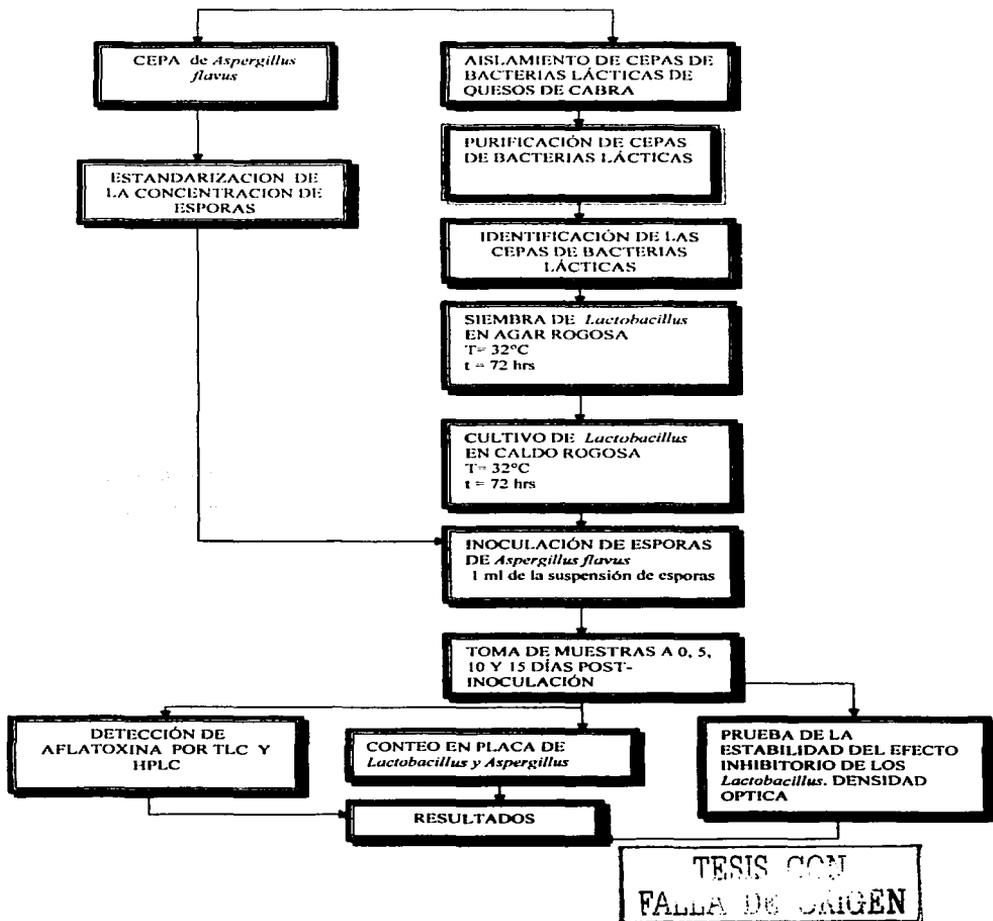
Determinar la presencia de aflatoxina producida por *A. flavus* en la interacción con las bacterias lácticas.

OBJETIVO PARTICULAR 3:

Determinar la influencia que ejerce *A. flavus* sobre las bacterias lácticas en su capacidad de inhibir el crecimiento de *E.coli*.

DIAGRAMA DE BLOQUES

14



MATERIAL Y MÉTODOS

1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- La cepa de *Aspergillus flavus* obtenida de granos de maíz fue proporcionada por la Unidad de Investigación de Granos y Semillas (UNIGRAS) FES-Cuautitlán UNAM.
- Las cepas de bacterias lácticas se obtuvieron de quesos de cabra producidos artesanalmente.

1.2 MÉTODOS

1.2.1 AISLAMIENTO DE LAS CEPAS LÁCTICAS

Para obtener las cepas, se tomó una pequeña muestra de diferentes quesos, la cual se sembró directamente en agar sangre con pH ácido y se incubó a 32°C por 24 horas, después de las cuales se procedió a su purificación e identificación.

1.2.1.1 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE BACTERIAS

La morfología fue determinada a cada una de las cepas mediante la tinción de GRAM, por medio de la coloración de su pared celular. (Speck 1984)

Se purificaron las cepas cuya morfología era de bacilos, ya que son las que tienen interés en este estudio, y mediante la tinción de GRAM se verificó su pureza.

Pruebas Bioquímicas: A cada cepa se le realizaron las siguientes pruebas para su identificación: prueba de oxidasa, catalasa (Alvarez y Mendoza 1994, Anexo 1), y para la fermentación de los azúcares se preparó una base de caldo rojo fenol con 1% de los siguientes carbohidratos: celobiosa, rafinosa, xilosa, trealosa, maltosa, glucosa, manitol, melezitosa, sorbitol, melibiosa, sucrosa, manosa y lactosa, en los cuales se inoculó cada bacilo y fueron incubados a 32°C. Los tubos fueron examinados cada 24 horas para detectar vire del indicador Rojo de fenol por disminución del pH, debido a la fermentación o no del azúcar, esto se realizó hasta un tiempo máximo de 10 días. (según el manual Bergey's, ya que es el más antiguamente reconocido en el área de microbiología; aunque existen diversos criterios para clasificarlos). Los resultados de la prueba se compararon con una tabla de identificación de *Lactobacillus*. Según Bergey's. (Holt, 1979)

1.2.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ESPORAS DE *Aspergillus flavus*

1.2.2.1 CULTIVO DE *Aspergillus flavus*

EL moho *Aspergillus flavus* se cultivo en Agar Papa-Dextrosa el cual se preparó como indica el fabricante, y después se esterilizó a 121°C por 15 min.

Una vez realizado esto se sembró el moho *Aspergillus flavus* dejándolo crecer a una temperatura ambiente de aproximadamente 28°C por 5 días.

1.2.2.2 COSECHA DE ESPORAS

Para poder obtener las esporas del *A.flavus* se preparó una solución estéril de tween 80 al 1%.

Se tomó una de las cajas en las cuales ya había producción de esporas, se colocó dentro de un campo estéril, se abrió la caja cuidadosamente y se le agregó un volumen conocido de tween 80 al 1%, tratando de que la superficie de la caja quedara cubierta totalmente, con un asa se raspó suavemente la superficie hasta que se desprendieron en su totalidad las esporas, una vez terminado esto, el líquido se hizo pasar a través de papel filtro de poro mediano colocado en un embudo y en un matraz para contener la suspensión de esporas, este filtrado se realizó para retener los restos de micelio y agar que se pudieron desprender durante el raspado. El matraz se cerró de manera estéril y se guardó en refrigeración para posteriormente realizar la estandarización de la concentración de esporas. (Gilchrist et al., 1995)

1.2.2.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ESPORAS

La estandarización de la concentración de esporas se realizó mediante el empleo de un hemocitómetro de la siguiente manera: se tomó una gota de la suspensión con una pipeta Pasteur y se colocó en cada extremo del hemocitómetro, enseguida se colocó el cubreobjetos cuidando de que no quedaran burbujas y que la gota no se derramara ni se saliera de los campos de conteo. Esto daría un dato erróneo, ya que el excedente arrastraría las esporas.

El hemocitómetro consta de dos campos de conteo; en cada campo se tienen nueve cuadros, que a su vez están divididos en cuadros más pequeños. (Figura 1)

Tanto los cuadros grandes como los pequeños tienen dimensiones conocidas, de tal modo que por medio de fórmulas se puede obtener el número de esporas por ml.

Con los datos obtenidos, se calculó un valor de la media; éste se multiplica por una constante que depende del hemocitómetro que se utilice, en éste caso el valor de la constante es de 2000. De ese producto se obtuvo la concentración en conidios/ml. Se utilizaron las siguientes fórmulas para obtener una concentración de 10^5 conidios/ml (Gilchrist et al., 1995).

Fórmula para obtener la concentración de esporas:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Donde:

C_1 = concentración inicial (conocida en el conteo)

V_1 = volumen inicial (establecido arbitrariamente al preparar el inóculo)

C_2 = concentración final deseada (según el estudio a realizar)

V_2 = volumen final (desconocido)

Despejando:

$$V_2 = \frac{C_1 V_1}{C_2}$$

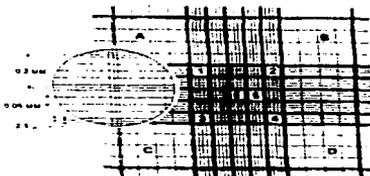


Figura 1: Hemocitómetro, muestra los campos de conteo para la estandarización de la concentración de esporas.

1.2.3 PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *A.flavus*

Las 14 cepas de *Lactobacillus spp.*, se sembraron en tubos con 5ml de caldo Rogosa Modificado (MRS), se incubaron a 37°C por 72 hrs, después se inocularon con 1ml de la suspensión de spora obtenida anteriormente y se dejaron a temperatura ambiente (28-30°C aprox.). Se realizaron observaciones 5, 10 y 15 días post-inoculación anotándose los cambios ocurridos del crecimiento del moho, durante este periodo.

Todo esto se realizó por triplicado.

1.2.3.1 CUANTIFICACIÓN DE *Lactobacillus* y *Aspergillus flavus*

El conteo en placa se realizó usando la técnica de sembrado en superficie para las bacterias, en agar MRS, y conteo en profundidad para el moho en agar Papa-dextrosa. (Speck, 1984)

Para cada conteo se hicieron diluciones decimales de las muestras, hasta 10⁻³. Se tomaron 10µL de las diluciones 10⁻² y 10⁻³ para el conteo bacterial, sembrando por duplicado cada dilución, en agar MRS preparado con anterioridad y se colocó la gota dejando secar, enseguida se incubaron a 37°C por 24 hrs, después se realizó el conteo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para el conteo de moho se tomaron 400 μ L de las mismas diluciones y se colocaron de manera estéril en cajas petri, vaciando en cada una agar Papa-dextrosa estéril y se homogenizó la caja adecuadamente. Cada dilución se realizó por duplicado.

Las cajas se incubaron a temperatura ambiente por 5 días, y después se realizó el conteo.

Todo esto se realizó para cada una de las cepas de lactobacilos y para cada una de las repeticiones hechas.

1.2.4 INTERACCIÓN ENTRE *Lactobacillus* Y *Aspergillus flavus*

Cada cepa de lactobacilo se sembró en tubos de ensaye con tapas de rosca, sin agitación, conteniendo cada tubo 5ml de caldo MRS, se incubaron a 32°C por 72 hrs y después se inocularon con 1ml de la suspensión de spora obtenida anteriormente. Se cerraron parcialmente y se dejaron a temperatura ambiente (28-30° C aprox.). Se tomaron muestras a los 0, 5, 10 y 15 días de inoculación.

Todas las muestras se hicieron por triplicado.

1.2.5 DETECCIÓN DE AFLATOXINA

1.2.5.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE AFLATOXINA

Para la extracción y purificación de la Aflatoxina, de los cultivos de moho-lactobacilo, se empleo el método de Aflatest. (Anexo 2)

1.2.5.2 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)

Para detectar la presencia de la toxina producida por el moho en el medio de cultivo se utilizó el método de cromatografía en capa fina (TLC).

Una muestra de 0.1 ml de caldo fue tomada cada 5, 10 y 15 días para el análisis.

Las toxinas fueron determinadas en el caldo solamente. Un volumen de 3 μ L se aplicó directamente por duplicado en la placa de sílica gel. Siguiendo el método usado por Tsai et al, (1984)

Como disolventes de corrida se emplearon tres mezclas diferentes: Mezcla 1: cloroformo-agua destilada-acetona 12:88:1.5 ; Mezcla 2: xileno-alcohol isopropilico-etanol 7:15:5 estas dos mezclas utilizadas en el método descrito por el AOAC (1990), para la detección de aflatoxinas, y la tercer mezcla tolueno-acetato de etilo 88%-ácido fórmico 60:30:10 usado por Tsai et. al. (1984)

Las muestras (3 μ L) se aplicaron en placas Whatman precubiertas de silica gel fluorescentes de 2x7 cm de tamaño, con base de aluminio de 250 μ m de grosor. Se dejó secar la muestra en la placa y esta se colocó en una cámara con cada una de las diferentes mezclas de disolventes y se desarrolló por cromatografía ascendente. Cuando el frente del disolvente(s) alcanzó una altura de 5cm en la placa, esta se sacó de la cámara y se dejó secar. Se realizó la lectura examinando las placas bajo luz Ultravioleta con longitud de onda de 360 nm.

Se manejaron 3 controles de *A. flavus* los cuales se compararon con un estándar de aflatoxina. Así también todas las muestras fueron comparadas con éste.

1.2.5.3 CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS (HPLC)

Las muestras tomadas para este análisis se centrifugaron a una velocidad de 2500 rpm por 20 minutos, después se decantaron y se filtraron a través de membrana millipore de 0.22 μ m, y se guardaron para su posterior análisis.

Cada una de las muestras se diluyó en metanol grado HPLC, en proporción de 10:90. Se tomaron 50 μ l de esta dilución y se inyectaron en el equipo de HPLC, el cual se estandarizó previamente, al hacer varias inyecciones del disolvente empleado en la fase móvil.

Se empleó una columna de C₁₈ de 4.6 x 150 mm, con las siguientes condiciones de trabajo: velocidad de flujo 0.8 ml/min, fase móvil: metanol 100% grado HPLC, volumen de inyección 50 μ l, longitud de onda: 360nm. (Método de HPLC publicado por el Diario oficial, Junio 2000)

Se tomaron como referencia la lectura de un estándar de aflatoxina B₁ y la del control de *A. flavus* (Anexo 3)

1.2.6 PRUEBA DE ESTABILIDAD DEL EFECTO INHIBITORIO DE LAS CEPAS DE *Lactobacillus* ssp.

Las cepas obtenidas de los quesos se sembraron cada una en caldo MRS por 24 hrs, al mismo tiempo se sembró *E.coli* en caldo nutritivo, dejándolo crecer por el mismo tiempo. Transcurrido este tiempo se centrifugaron los cultivos de lactobacilos a una velocidad de 2500 rpm por 15 minutos, el sobrenadante obtenido se separó por decantación y se guardaron en refrigeración por 24 hrs para utilizarlos posteriormente. Después se tomaron 100µl del cultivo de *E.coli* y se inocularon en caldo nutritivo a temperatura de 37°C en baño María con agitación por 3hrs, esto se realizó para estandarizar el cultivo de *E.coli*. Una vez realizado esto, se inocularon 200µl de *E.coli* estandarizado a 5 ml de cada uno de los sobrenadantes de *Lactobacillus* y se incubaron a 32°C por 24hrs. (Meyer et al., 1992)

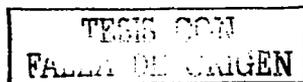
1.2.6.1 DENSIDAD OPTICA

Los sobrenadantes inoculados con *E. coli* estandarizado e incubados a 32° C por 24 horas, se colocaron después en el espectrofotómetro, modelo 390 Turner, el cual se calibró con agua destilada y caldo MRS. Las lecturas se hicieron a una longitud de 590 nm. Al final se realizaron los cálculos con respecto a la lectura obtenida del cultivo de *E.coli* crecido por 24 hrs (tomado como control positivo) y se obtuvo el porcentaje de inhibición. (Meyer et al., 1992)

1.2.7 RECUPERACIÓN DE LACTOBACILOS

Una vez que transcurrió el tiempo en que estuvieron en contacto el moho y cada uno de los lactobacilos, estos se recuperaron de las muestras de 15 días, de las cuales se tomó 1ml y se sembró por estria en agar MRS, se incubaron a 32°C por 24 hrs. Después se tomó una colonia de cada bacilo y se sembró de nuevo. (Speck, 1984)

Los lactobacilos recuperados se sembraron nuevamente en caldo Rogosa, a 32°C por 24 hrs., después se centrifugaron a 2500 rpm/15min y el sobrenadante se separó por decantación, y se les determinó su capacidad de inhibición de crecimiento de *E.coli* como se describió anteriormente.



RESULTADOS

Los resultados que se obtuvieron de la identificación morfológica y bioquímica de las cepas aisladas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Resultados de la Prueba Bioquímica (fermentación de azúcares por las bacterias lácticas)

# Bacilo	arabica	rafinosa	alosa	fructosa	malosa	glucosa	manosa	melitosa	sorbita	melitosa	lucosa	manosa	lactosa
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

# BACILO	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA
1	<i>L. casei pseudoplantarum</i>	Bacilo G ⁺
2	<i>L. casei pseudoplantarum</i>	Bacilo G ⁺
3	<i>L. bulgaricus</i>	Bacilo G ⁺
4	<i>L. casei pseudoplantarum</i>	Bacilo G ⁺
5	<i>L. casei</i>	Bacilo G ⁺
7	<i>L. bulgaricus</i>	Bacilo G ⁺
9	<i>L. casei pseudoplantarum</i>	Bacilo G ⁺
10	<i>L. casei pseudoplantarum</i>	Bacilo G ⁺
11	<i>L. casei pseudoplantarum</i>	Bacilo G ⁺
13	<i>L. casei pseudoplantarum</i>	Bacilo G ⁺

Tabla 2. Identificación bioquímica y morfológica de las bacterias

TRABAJO CON
FALLA DE ORIGEN

Se aislaron 13 cepas de bacterias lácticas, las cuales por su morfología son bacilos GRAM positivos. La identificación bioquímica dio los siguientes resultados: de los 13 bacilos aislados 8 son *Lactobacillus casei pseudoplantarum*, 3 son *Lactobacillus bulgaricus*, 1 *Lactobacillus plantarum* y 1 *Lactobacillus lactis*. Se utilizó una cepa ATCC de *L. casei* (cepa num. 5)

Como se puede ver en la tabla 1 más del 64% de los bacilos aislados son *L. casei pseudoplantarum*.

ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ESPORAS

Con la estandarización de la concentración de esporas se obtuvo una concentración de 10^5 conidios/ml, la cual se inculó a cada bacilo.

CONTEO EN PLACA

Del crecimiento y conteo tanto de bacilos como de moho se muestra lo siguiente:

Tabla 3: Variación del crecimiento fungal por contacto con los *Lactobacillus*

# Lactobacilo	Micelio Blanco	Micelio Blanco	Micelio Verde	Micelio verde	Micelio verde
1	**r		**p		
2	**r				**p
3	**r		**p		
4					
5		**r	**p		
6					
7	**r			**p	
8					
9			*p	**p	
10		**r	**p		
11		**r			**p
12					
13	**r				**p
14					

*= tiempo cero

**= tiempo 15 días

p= papa-dextrosa

r= rogosa

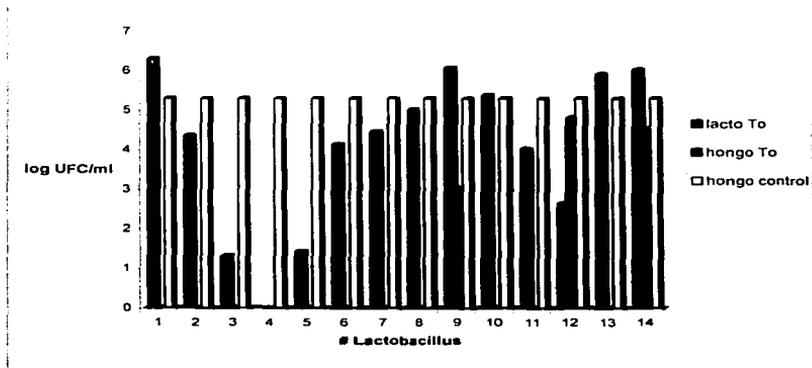
TRISIS CON
FALLA DE ORIGEN

Después de estar en contacto con los lactobacilos el moho mostró estructuras de resistencia, esclerocios, cuando las muestras de tiempo cero y de 15 días post-inoculación del moho fueron sembradas en agar MRS y en agar Papa-dextrosa para el conteo de cada microorganismo, se observó que el moho creció en ambos medios de cultivo y que presentaba acumulación de micelio, llamado esclerocio.

Esto se observó en casi la totalidad de las cepas en el tiempo de 15 días, en donde con agar MRS el micelio permaneció de color blanco, no llegó a la madurez, mostrando esclerocios.

En agar Papa-dextrosa el moho creció hasta la madurez, mostrando el color verde característico, y también presentó esclerocios con las cepas de 2, 11, 13 y 14 a los 15 días post-inoculación. El moho creció bien con las cepas 9, 12 y 14 desde el inicio (tiempo cero). Como se muestra en la tabla 2.

Gráfica 1: Comparación del crecimiento de moho *A.flavus* y *Lactobacillus* en su medio óptimo de crecimiento en tiempo cero



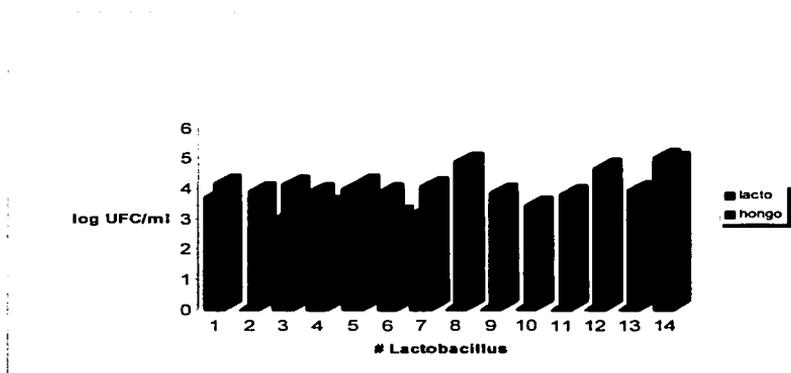
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como se puede observar en la gráfica 1 el crecimiento del hongo está inhibido en la mayoría de las cepas, sólo en las cepas número 9, 12 y 14 se detecta crecimiento del hongo, estas tres cepas son de especie diferente, la 9 es un *L. casei pseudoplantarum*, la 12 es un *L. lactis* y la 14 es un *L. bulgaricus*.

En la cepa 4 tanto el bacilo como el hongo se inhibieron mutuamente, en la cepa 12 el hongo parece estar actuando de alguna manera sobre el bacilo.

En las cepas 9 y 14 se observa simbiosis entre ambos microorganismos, ligeramente con la cepa 9 y marcadamente con la cepa 14.

Gráfica 2. Comparación del crecimiento de *Lactobacillus* y moho *A.flavus* en su medio óptimo en tiempo de 15 días



Al comparar en general, el crecimiento de lactobacilos y de hongo después de haber estado en contacto por 15 días, se puede observar que el crecimiento de lactobacilos esta inhibido en la mitad de las cepas y en la otra mitad el lactobacilo y el hongo aprendieron a sobrevivir mutuamente, dándose una simbiosis, en la cual ambos se beneficiaron, no totalmente ya que la cantidad de bacilos

no es igual a la cantidad de hongo presente, con excepción del bacilo # 14 que al parecer la cantidad de bacilo y de hongo están muy cercanas. 26

Las cepas 1, 4 y 6 que resultaron ser de la misma especie *L. casei pseudopiantarum* al parecer el bacilo estar presente casi en la misma proporción, Al igual que en la cepa 5 que es *L. casei* ATCC, pero no tienen un comportamiento igual, ya que en las cepas 1 y 5 predomina el hongo sobre el bacilo, no así en las cepas 4 y 6 ya que el hongo presente es menor al bacilo, lo que nos puede indicar que de cierta manera el bacilo está actuando sobre el moho ya sea para inhibirlo o ayudarlo.

En las cepas 3, 7 y 14 son *L. bulgaricus* y sucede algo parecido, los bacilos 3 y 7 parecen tener el mismo comportamiento ya que la presencia de bacilos es menor que la del hongo, pero no con el bacilo 14 ya que puede observarse (gráfica 2) que se adaptaron bien ambos microorganismos, y que la simbiosis entre ambos tuvo una tendencia benéfica para el bacilo.

CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Los resultados obtenidos en la cromatografía de capa fina (TLC) de las muestras tomadas a los 5, 10 y 15 días, empleando diferentes disolventes son los siguientes:

Mezcla 1: En este sistema se utilizó como disolventes acetona-cloroformo-agua destilada en proporción de 12:88:1.5, se desarrolló como se describe en el AOAC para determinar aflatoxinas. Se obtuvieron resultados negativos ya que en las placas donde se aplicaron las muestras no se observó fluorescencia alguna.

Mezcla 2: Se utilizaron disolventes como xileno, alcohol isopropílico y metanol en 7:15:5, aunque en este sistema las muestras se hicieron pasar por columnas de inmunoafinidad (Aflatest). Los resultados fueron los mismos que con el primer sistema, no se observó fluorescencia de las muestras.

Con la mezcla 3 donde tolueno-acetato de etilo 88% - ácido fórmico en proporción de 6:3:1 (v/v/v) fueron utilizados para revelar las placas, según Tsai et. al, (1984), tampoco se obtuvo alguna fluorescencia de las muestras ni en los controles del experimento, que fueron comparados con un estándar de aflatoxina, la cual si mostró fluorescencia bajo la luz ultravioleta, con los tres sistemas utilizados.

CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Los resultados obtenidos de las muestras por HPLC se observan en las gráficas (7 a 21). Las gráficas son expresadas en minutos por milivolts. Para identificar el pico que pertenece a la aflatoxina se obtuvo una gráfica del control, y después se adicionaron 10 μ l de una solución de aflatoxina estándar a la muestra control para mostrar el pico correspondiente a esta. (Gráficas 3 y 4)

Cada gráfica se ha agrupado por las cepas de la misma especie. Las graficas (6, 7 y 8) corresponden a las cepas núm. 3, 7 y 14 las cuales son *L.bulgaricus*. La intensidad del pico es relativa a la cantidad del compuesto que se analiza, en este caso la aflatoxina.

De este grupo (*L.bulgaricus*) la cepa 3 es la que, cualitativamente, mostró tener un máximo efecto inhibitorio en la liberación de toxina, en segundo término la cepa 7 su gráfica muestra una intensidad de pico de 0.9 mV, y en la cepa 14 la intensidad del pico de la grafica fue de 4.8 mV aproximadamente.

Cada una de las cepas se comportó muy diferente frente al moho, en la liberación de toxina. Que al compararse con la obtenida con *A.flavus* crecido sólo, en caldo MRS, la liberación de toxina fue baja. Con la cepa 14 el moho aumenta la liberación de toxina con la presencia de este lactobacilo.

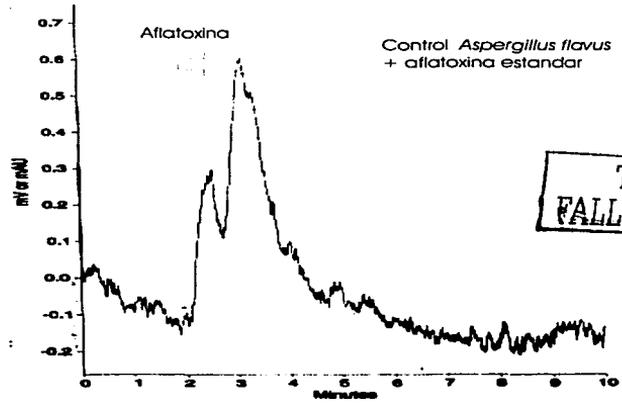
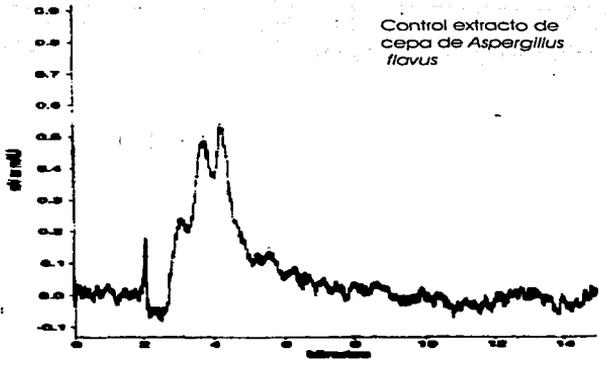
El siguiente grupo de gráficas (11 a 19) pertenece a *L.casei pseudoplarum*, que lo forman las cepas núm. 1, 2, 5, 6, 8, 9, 11 y 13. (Exceptuando la número 14 que pertenece a la cepa 5 que es ATCC.)

En general, también estas cepas mostraron un comportamiento diferente ante el moho, ya que la producción de toxina varió en diferentes niveles. Las cepas 1, 4, y 13 fueron en las que se detectó menor producción de toxina por el moho, de estas tres cepas, la número 4 parece ser que controló mejor el crecimiento del moho y la producción de toxina.

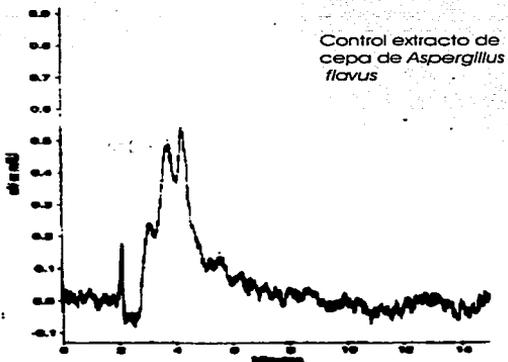
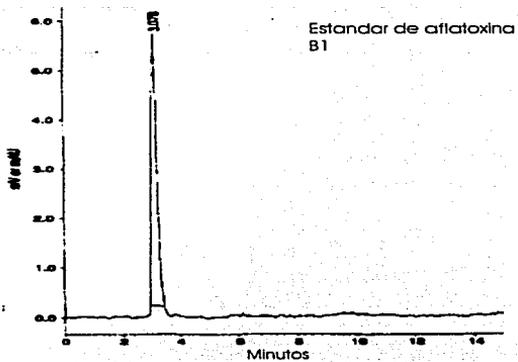
Las cepas 5, 6, 8, 9 y 11 muestran un comportamiento similar entre ambas, en la liberación de toxina por el moho. (Ver gráficas 14 a 18)

En las cepas 10 y 12 (gráficas 20 y 21), que son *L. plantarum* y *L. lactis* respectivamente, por lo que se puede observar, el comportamiento de ambas cepas es parecido, ya que la intensidad del pico de cada una de ellas esta entre 1.5mV y ligeramente arriba de 1.5mV, encontrándose en un porcentaje menor siendo la mayor altura de pico obtenida de todos los resultados la de 4.8mV.

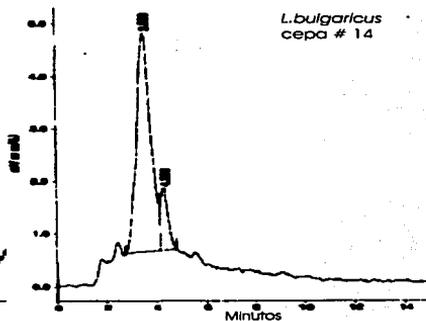
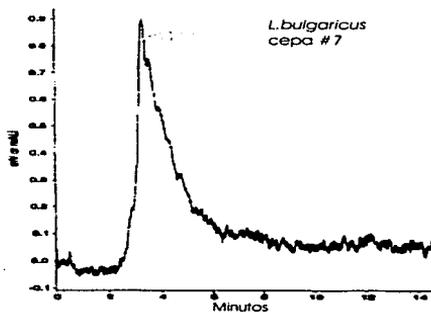
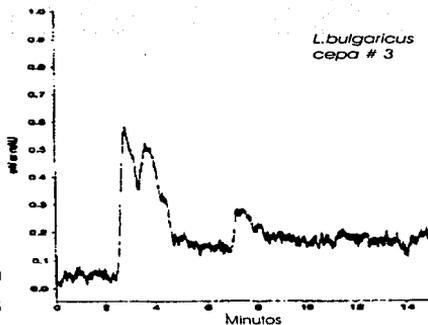
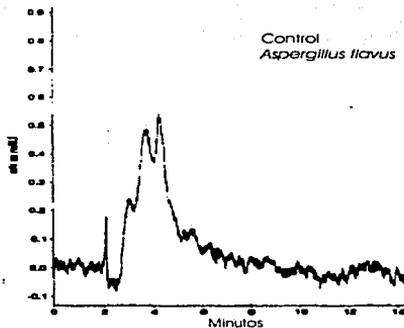
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráficas 3 y 4: Identificación de Aflatoxina por cromatografía de Líquidos

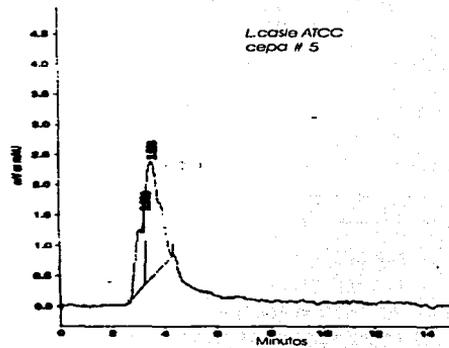
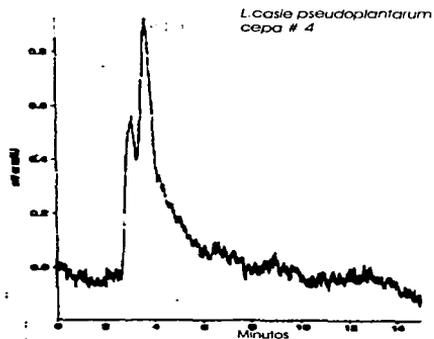
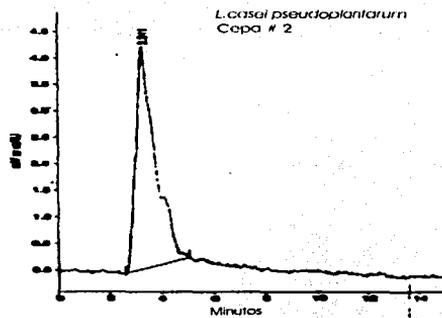
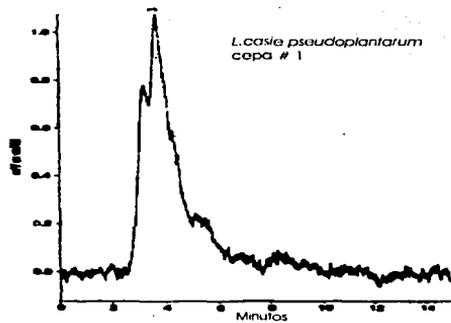


Gráficas 5 y 6: Estándar de Aflatoxina y control *A. flavus*



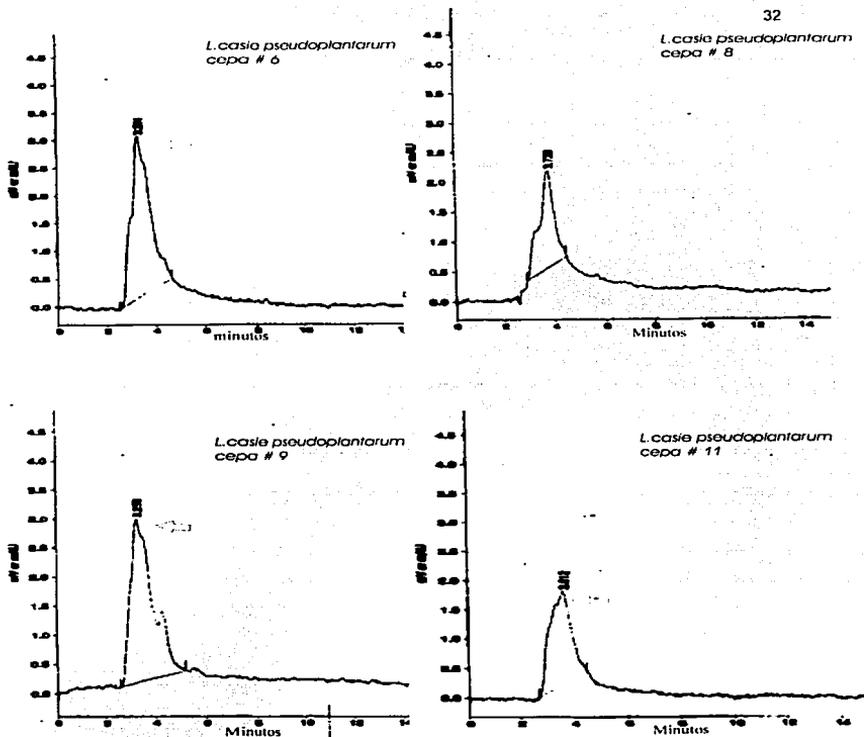
Gráficas 7, 8, 9 y 10: Influencia de la interacción de *Lactobacillus bulgaricus* y *A.flavus* en la liberación de toxina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



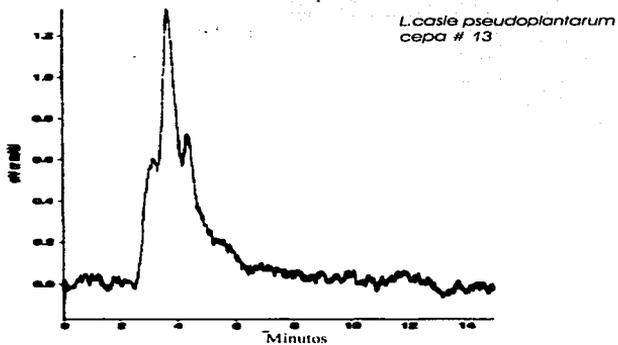
Gráficas 11, 12, 13 y 14: Influencia de la interacción de *Lactobacillus pseudoplatarum* y *A. flavus* en la liberación de toxina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



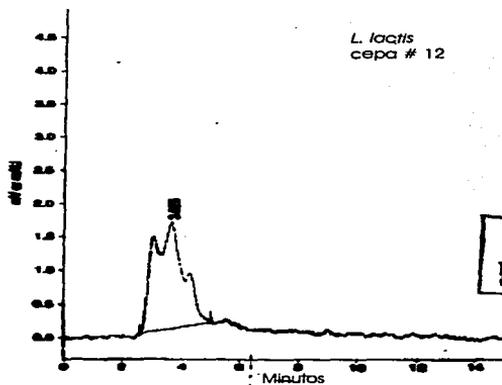
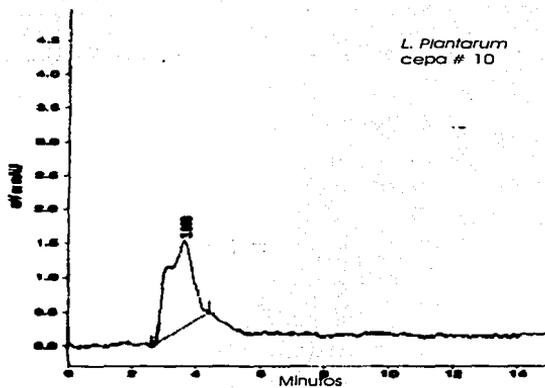
Gráficas 15, 16, 17 y 18: Influencia de la interacción de *Lactobacillus pseudoplatarum* y *A. flavus* en la liberación de toxina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 19: influencia de la interacción de *Lactobacillus pseudoplantarum* y *A. flavus* en la liberación de toxina



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráficas 20 y 21: Influencia de la interacción de *Lactobacillus plantarum*, *L.lactis* y *A.flavus* en la liberación de toxina

PRUEBA DE ESTABILIDAD DEL EFECTO INHIBITORIO DE LAS CEPAS DE *Lactobacillus* frente a *E.coli*.

Los resultados de esta prueba realizada a cada uno de los bacilos antes y después de estar en contacto con el hongo mostraron la siguiente actividad inhibitoria del crecimiento de *E.coli* :

Tabla 4. Influencia del *A.flavus* sobre la actividad antibacteriana de Las cepas de *Lactobacillus*

Lactobacilo	% de inhibición antes	de ser inhibido después
<i>L. casei pseudoplanarum</i> (1)	92.8	97.5
<i>L. casei pseudoplanarum</i> (2)*	86.4	85.8
<i>L. bulgaricus</i> (3)	94.8	93.7
<i>L. casei pseudoplanarum</i> (4)*	86.3	86.3
<i>L. casei</i> (5)	96.6	92.2
<i>L. casei pseudoplanarum</i> (6)	95.9	95.2
<i>L. bulgaricus</i> (7)*	92.1	71.1
<i>L. casei pseudoplanarum</i> (8)	95.1	96.2
<i>L. casei pseudoplanarum</i> (9)	95.1	96.2
<i>L. casei pseudoplanarum</i> (10)	95.1	96.2
<i>L. casei pseudoplanarum</i> (11)*	92.9	44.15
<i>L. casei pseudoplanarum</i> (12)	94.6	93.3
<i>L. casei pseudoplanarum</i> (13)	94.6	93.3

En general todas las cepas mostraron estar en un buen rango de inhibición antes de estar en contacto con el moho, ya que fue arriba del 90%, solamente la cepa 4 tuvo una capacidad del 86.3%.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados obtenidos de densidad óptica después de haber estado en contacto lactobacilos y hongo, se muestran también en la tabla 3.

Los resultados obtenidos después de la interacción con el moho, muestran que algunas cepas disminuyeron notablemente su capacidad de inhibir al *E. coli*, mientras que otras mejoraron ligeramente su actividad frente a *E. coli*.

Las cepas 2, 4, 7, 10 y 11 (tabla 3) mostraron una disminución marcada en su actividad inhibitoria del *E coli*; por ejemplo la 2 de un 96.4% bajo hasta un 85.8% de inhibición, y la cepa 4 de 86.3% hasta un 69% siendo ambas *L. casei pseudopiantarum*. La diferencia más notable fue con la cepa 11 que de un 92.9% bajo hasta un 44.15%, su actividad disminuyó en más del 50%, y también es *L. casei pseudopiantarum*.

Así también las cepas 3, 7 y 14 que son *L.bulgaricus*, y sólo en la cepa 7 se afectó la actividad inhibitoria del bacilo, que disminuyó en un 21%, la 3 y la 14 fueron ligeramente afectadas por el hongo.

La cepa 1 incrementó su actividad para inhibir *E.coli*, y en las cepas 6 y 9 sólo lo hicieron ligeramente, siendo la misma especie, *L.casei pseudopiantarum*.

La cepa número 12 que es un *L. lactis* aumentó ligeramente su capacidad para inhibir a un 98.3%; y el resto de las cepas no alteraron su comportamiento inhibitorio de *E.coli* marcadamente por estar en contacto con el moho.

DISCUSIÓN

La contaminación de los alimentos tanto de consumo humano como animal, con aflatoxinas, ha suscitado la preocupación de las autoridades sanitarias, debido a que han demostrado su peligrosidad como agentes causales de toda una serie de alteraciones y cuadros patológicos que afectan a hombres y animales. Lo cual ha hecho necesario tomar medidas para prevenir este tipo de contaminación en los alimentos, y limitar de alguna manera la exposición de la población a las aflatoxinas. (Blanco 1989)

Con este trabajo se pretende de alguna manera sentar bases que ayuden a encontrar soluciones para este problema, por medio del empleo de bacterias lácticas, las cuales como se ha visto poseen actividad para inhibir bacterias patógenas como *E.coli* y otras especies relacionadas.

Se ha encontrado en diversos trabajos realizados por Gourama y Bullerman 1997, Karunaratne 1990, Holmquist 1983, El-Gendy y Marth 1981, entre otros; que al cultivar ciertas bacterias lácticas con *Aspergillus flavus*, estas actuaban de alguna forma inhibiendo el crecimiento del moho y la liberación de la aflatoxina producida por este.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran diferencias en cuanto a la forma de actuar de las cepas de lactobacilos frente a *Aspergillus flavus*, al parecer de alguna forma el moho utilizó las sustancias presentes en el medio de cultivo, tanto las producidas por algunas de las cepas lácticas como las propias del medio de cultivo, para crecer y producir más toxina, que la generada por sí sólo.

También revelan, que en el inicio de la experimentación (gráfica 1) al estar en contacto los dos microorganismos se inhibieron mutuamente "in vitro", pero a los 15 días de contacto (gráfica 2) el moho mostró haberse adaptado al medio y pudo crecer, aunque el crecimiento del micelio no fue adecuado, ya que no llegó a la madurez totalmente, sólo se observaron pequeñas zonas verdes, que es el color característico del moho e indica producción de esporas, esto se observó con algunas de las cepas de lactobacilos.

Las cepas de *L.casei pseudoplantarum*, *bulgaricus*, *lactis* y *plantarum* aisladas de quesos, dieron resultados muy diferentes, aún siendo de la misma especie. Al parecer ninguna tuvo un efecto drástico sobre el crecimiento del moho y la producción de aflatoxina.

Gourama y Bullerman (1997) encontraron que con *L.casei pseudoplantarum* y *Aspergillus flavus*, el lactobacilo inhibía tanto el crecimiento del moho como la producción de la aflatoxina.

De las 9 cepas de *L.casei pseudoplantarum*, de esta investigación, ninguna inhibió totalmente el crecimiento del moho y la producción de aflatoxina. La cepa num.4 que pertenece a esta especie de lactobacilo, parece que no afectó al hongo en ningún aspecto, ya que la toxina producida por el moho en presencia de este lactobacilo fue casi igual a la cantidad liberada por el moho cuando este creció como cultivo puro en caldo MRS.

Karunaratne et. al. (1997) trabajaron con *L.bulgaricus* y *L.plantarum*, encontraron que con *L.bulgaricus* se reducía el crecimiento del moho y por consecuencia la liberación de toxina.

En contraposición en este trabajo se encontró que con las cepas num. 3, 7 y 14 que son *L.bulgaricus*, el crecimiento del moho no se redujo, mostrado esto por los conteos en placa y las observaciones realizadas durante la interacción de ambos microorganismos, en presencia de las cepas num., 3 y 14 el moho llegó en su crecimiento hasta la madurez, produciendo esporas. Con la cepa 7 el moho creció aunque no llegó a la madurez.

Por medio de cromatografía de líquidos en las tres cepas de *L.bulgaricus* se detectó toxina en el medio de cultivo. En la cepa num.3 se detectó menor cantidad de aflatoxina liberada, en presencia de la cepa num.7 el moho libera toxina en una cantidad más alta que la detectada con la cepa 3, y no hay una disminución significativa de la cantidad de moho.

Por otra parte, con la cepa num.14 el moho creció más rápidamente llegando a la madurez y producción de esporas durante la interacción, que en comparación con las cepas num. 3 y 7, el crecimiento del moho fue mas lento. Con esta cepa de lactobacilo, tampoco se detectó una disminución de la cantidad de moho, y la liberación de toxina fue la más alta que la detectada en las cepas de su misma especie, incluyendo las cepas de las especies de *L.casei pseudoplantarum*, *lactis* y *plantarum*.

Esto sugiere, que la simbiosis dada entre el *A.flavus* y la cepa num.14 de *L.bulgaricus* favoreció el moho, ayudándole tanto a crecer como a producir toxina. El moho no afectó al bacilo ya que en el conteo en placa no mostró una disminución de la cantidad de éste. (Gráfica 2)
Con los resultados obtenidos de estas cepas de *L.bulgaricus* en cuanto a liberación de toxina y crecimiento de moho, se puede decir que no hay una relación directa con la cantidad presente de micelio y la producción de aflatoxinas, como lo mencionan Moreno y Gil. (1991)

En cuanto a lo encontrado por Karunaratne(1990) con *L.plantarum*, reportó que el moho no seguía viable más allá de de 4 días en presencia de este lactobacilo, así como también que el conteo de este moho se reducía.

En este trabajo se encontró que con la cepa num.10 que pertenece a un *L.plantarum*, había una simbiosis ligera con el *A.flavus*, ya que el moho pudo producir toxina, aunque en menor cantidad al parecer por lo reflejado en la gráfica num.20, en comparación con otras cepas donde se detectó una mayor cantidad de toxina.

En presencia de esta cepa el micelio del moho no creció adecuadamente, ni siquiera cubrió la superficie del recipiente que contenía tanto el medio de cultivo y a ambos microorganismos, aún al final de los 15 días de interacción, el micelio permanecía de color blanco, no llegó a la madurez y tampoco se observaron zonas verdes que indicaran alguna producción de esporas. Esta cepa redujo la cantidad de moho presente, de acuerdo con lo obtenido en el conteo después de estar en contacto por 15 días ambos microorganismos. (Gráfica 2)

Esto parece indicar, que el lactobacilo actuó de alguna forma que no permitió que el moho se desarrollara y liberara toxina en cantidad como con otras cepas, así mismo el moho también actuó sobre el bacilo inhibiéndolo bacteriostáticamente, ya que aunque al final no se detecta la presencia de éste en el conteo, pudo recobrase de la mezcla de cultivo moho-lactobacilo al final de la interacción.

Por otra parte con la cepa num.12, identificada en esta experimentación como *L.lactis*, ocurrió que el moho se adaptó muy bien, tal vez por las sustancias producidas por el lactobacilo, creció hasta la madurez produciendo esporas, se detectó aflatoxina también en menor cantidad, similar a la producida en presencia de *L. plantarum*. El *A.flavus* también inhibió a *L.lactis* al final, y la cantidad de moho presente fue mayor que la encontrada con *L.plantarum*.

Con respecto a las especies de *L.casei pseudoplantarum*, en la cepa num.2 se detectó más cantidad de toxina, siendo con esta cepa la más alta que la liberada con el resto de las cepas de la misma especie, hubo mayor crecimiento de micelio en presencia de esta cepa en comparación con la num.4, aunque tampoco llegó a la madurez, a los 15 días de interacción se notaron pequeñas zonas de color verde, las cuales indicaban producción de esporas. Podría esto sugerir que la toxina también es liberada por el micelio como lo menciona Tsai et al. (1984)

Las cepas num. 1 y 13, siendo ambas *L.casei pseudoplantarum*, parecen tener un comportamiento similar en cuanto a la producción de toxina por *A.flavus*, ya que en las dos la cantidad detectada de esta es casi igual, no así en cuanto a su actividad de inhibición de crecimiento de *E.coli*, mientras que el moho afectó de forma ligeramente negativa a la cepa num.13, afectó de forma positiva a la cepa num.1 en forma significativa. (Tabla 3)

En este trabajo se encontró, que cada una de las bacterias lácticas aisladas posea la actividad inhibitoria de crecimiento contra bacterias como *E.coli* (tabla 3). Estas bacterias poseían una actividad de hasta un 96% de inhibición de crecimiento de *E.coli* antes de estar en contacto con el moho, puede decirse por esto, que estas bacterias tenían una buena actividad inhibitoria contra *E.coli*.

Después de estar en contacto con el *A.flavus*, algunas cepas disminuyeron significativamente su actividad para inhibir el crecimiento de *E.coli*, mostrando la disminución más drástica de esta actividad la cepa num.11, la cual disminuyó su actividad hasta un 44% ya que su actividad antes de estar en contacto con el moho era de un 92%.

La cepa num. 1 al parecer mejoró su actividad de inhibición; antes de estar en contacto con *A.flavus* su efectividad contra la bacteria *E.coli* era de un 92%, y después del contacto con el moho su actividad fue de un 97%. Lo anterior sugiere que el moho y/o sus metabolitos influyen positivamente a algunas especies de lactobacilos y negativamente en otras cepas sobre esta actividad en particular de las bacterias lácticas. Aún siendo de la misma especie las cepas num. 1 y 11 el moho las afectó de diferente manera.

De igual forma con las cepas de *L.bulgaricus* (cepas num.3, 7 y 14), aunque el efecto del moho sobre estas no fue tan drástico como con la cepa num.11, ya que sólo la cepa num.7 disminuyó su efectividad contra *E.coli* en un 21%, pasando de un 92% antes de estar en contacto con el moho, a un 71% después de su contacto con el moho.

En la cepa num.14, la simbiosis del moho con ésta fue total, ya que no afectó al bacilo de ninguna forma, ninguno se inhibió desde el momento en que estuvieron en contacto ambos microorganismos.

Con la cepa num.12 que es *L.lactis*, el efecto que tuvo el moho sobre su actividad de inhibición de *E.coli* fue positivo, ya que mejoró en un 6%. Contrariamente a esto con la cepa de *L.plantarum* la influencia del moho sobre este y su metabolito fue negativa, ya que disminuyó en un 6.7%

Algo similar obtuvieron Coallier e Idziak (1985) aludieron que la aflatoxina destruye las células de *Streptococcus lactis*, éste crece elongado en presencia de *A.flavus*, lo que puede indicar un cambio en las funciones metabólicas. Así también Sutic y Banina (1990) reportan que bacterias lácticas homofermentativas cambiaban su comportamiento a heterofermentativas en presencia de aflatoxina.

Los lactobacilos usados en esta experimentación, no se volvieron a clasificar para ver si hubo cambio en la actividad metabólica de degradación de azúcares, pero si mostraron cambio en su actividad para inhibir el crecimiento de *E.coli* en diverso grado, en algunas cepas de lactobacilos parece ser que este cambio fue mas significativo que en otras, aún siendo de la misma especie.

Si la aflatoxina es mutagénica, posiblemente la mínima cantidad liberada por el moho durante esta experimentación, pudo haber causado daño genético y no solo fenotípico en las cepas. Esto sería sujeto de un estudio sobre mutagenicidad para comprobarlo.

Algunos autores como Gourama y Bullerman (1997), Karunaratne et. al. (1990) y Holmquist (1983), mencionan que el bajo pH que se presenta en el medio, ocasionado por la actividad metabólica del lactobacilo, la competencia microbiana y la falta de algún nutriente pueden ser factores que intervengan en la inhibición del crecimiento del moho y la liberación de toxina. Karunaratne (1990) reporta que con pH de 4 no se observó crecimiento del moho.

En este trabajo, el pH medido en los cultivos de moho-lactobacilo fue de entre 4.5 a 5 y no se encontró una inhibición total del crecimiento del moho.

La falta de un nutriente, tampoco pudo haber influido en los resultados obtenidos en este trabajo, ya que al comparar los cultivos de moho-lactobacilo con el control, cultivo de *Aspergillus flavus* puro en caldo rogosa, la producción de toxina fue menor en el control, que cuando se puso en contacto el moho con los lactobacilos, ya que en presencia de estos aumentó su crecimiento, con algunos no llegó a la madurez, pero con otros sí lo logro.

El desarrollo del moho no fue adecuado, no llegó a la madurez por lo que no produjo esporas, cuando este fue crecido por sí sólo en el medio de cultivo y disponía de todos los nutrientes empleados en el cultivo para crecer.

En cuanto a la microflora asociada en el medio de cultivo de *A. flavus*, este se ha clasificado como mal competidor frente a otros microorganismos y se caracteriza mas como un microorganismo saprofito (Moreno y Gil, 1991) el cual no crece si en el medio se encuentran otros microorganismos creciendo bajo las mismas condiciones (temperatura, humedad, nutrientes, etc.) y por lo tanto no produce toxina.

Contrariamente a lo anterior, en esta experimentación el moho creció adecuadamente hasta la madurez, en presencia de algunos de los lactobacilos, como con las cepas num. 14, 3 y 12.

También se ha reportado, que el oxígeno puede ser un factor que afecte la liberación de toxinas y el crecimiento del moho. Tsai et. al. (1984) observó que en los cultivos bien aireados de *A. flavus* se producen mas bajas cantidades de toxina, y que cuando se tienen cultivos con cantidad de oxígeno menor hay una cantidad mayor de toxina.

En contra posición a esto Moreno y Gil (1991), mencionan que las especies de *A. flavus* son aerobias y que a niveles de 1% de oxígeno en el medio ambiente, se detiene el desarrollo de este moho y como consecuencia la producción de aflatoxina.

En el presente trabajo, la mezcla de bacilo-moho, cultivados sin agitación favoreció que el oxígeno presente en el tubo fuera consumido poco a poco por los microorganismos, lo que creó condiciones que pudieron favorecer la liberación de toxina, según lo encontrado por Tsai (1984).

Los resultados obtenidos mostraron, que había una variación con respecto a este comportamiento del moho, ya que los niveles de toxina liberada varían considerablemente, debido probablemente a la interacción con el bacilo, y no por la cantidad de oxígeno presente.

Con esta condición adversa para el moho (nivel reducido de oxígeno), aún creció y produjo toxina; con esto podría sugerirse que el *A. flavus* teniendo otras condiciones favorables para su desarrollo, pueda comportarse como un microorganismo aerobio facultativo y no totalmente aerobio, y que le basten pequeñas cantidades de oxígeno para crecer y producir toxina.

La posible presencia de pequeños péptidos o bacteriocinas de bacterias lácticas podrían estar afectando también la liberación de aflatoxina, como lo reportan Gourama y Bullerman (1997), y también Karunarathne et al. (1990).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En esta investigación, once de las cepas resultaron ser de la misma especie, distribuidas de la siguiente manera: 8 son *L.casei pseudoplantarum* y 3 *L.bulgaricus*. Cada una de estas cepas mostraron diferente comportamiento frente al *A.flavus*, esto sugiere que dependiendo del medio del que provienen, las condiciones a las que hayan sido sometidas, todo esto en conjunto pudo influir de alguna manera en ellas y provocar que reaccionaran en diverso grado frente al moho, y que aún siendo de la misma especie no poseen un metabolismo totalmente idéntico.

Martínez et. al., (2000, B) reportó que diversas cepas de una misma especie pueden producir más de una bacteriocina.

Ahora bien en este trabajo, se contó con diversas cepas de una misma especie, las cuales actuaron diferente contra el mismo moho, bajo iguales condiciones de temperatura, tiempo, humedad, medio de cultivo, etc. Esto sugiere, que los diferentes resultados obtenidos de esta interacción de microorganismos, pudieron ser debidos a las bacteriocinas producidas por los lactobacilos, y que al estar en contacto con el moho no liberaron los mismos metabolitos, afectando así la producción de toxina en diferentes niveles.

Magnusson et. al. (2001) encontraron que con dos cepas de *L.coryniformis* subespecie *coryniformis* obtenían resultados diferentes en su actividad contra especies fungales como *A.fumigatus*.

En general, la interacción de bacterias lácticas en el medio, pueden afectar el comportamiento del *A.flavus* y viceversa. El crecimiento del *A.flavus* y la producción de aflatoxina pueden ser favorecidos, retardados o permanecer sin cambio como el resultado de la presencia de otro microorganismo en el ambiente. El efecto que estas bacterias tengan sobre el moho puede depender de sus características ya sea de su origen, de su "habilidad" para competir, de los metabolitos que liberen, entre otras. (Hom, 1999)

CONCLUSIONES

- La interacción entre *Aspergillus flavus* y *Lactobacillus*, mostró que el moho tuvo un comportamiento diferente en cuanto a su crecimiento y liberación de toxina con cada una de las 14 cepas de *Lactobacillus*, aún cuando algunas de estas cepas eran de la misma especie.
- El *Aspergillus flavus* es considerado más como un microorganismo saprofito y mal competidor. En este trabajo se encontró que lejos de ser mal competidor, al estar en contacto con los lactobacilos, el moho mostró simbiosis con algunas de estas bacterias, lo cual le permitió crecer adecuadamente y liberar toxina en mayor cantidad que cuando este creció por sí sólo.
- Se encontró que las cepas num. 3 y 7 (*L.bulgaricus*) y la cepa num.4 (*L.casei pseudopiantarum*) lograron controlar mejor la liberación de toxina por el *A.flavus*, que el resto de las cepas de bacilos.
- La interacción de las bacterias lácticas con *A.flavus*, fue benéfica con algunas cepas de bacilos para el crecimiento del moho y/o liberación de aflatoxina, y fue nociva para él porque con otras cepas de bacilos su producción de toxina fue menor.
- La falta de crecimiento del moho, así como la liberación en menor proporción de aflatoxina, con algunas de las cepas de bacterias lácticas, pudo ser debida a la actividad de estas y a los metabolitos que liberaron.
- La Aflatoxina no pudo detectarse en Cromatografía de Capa fina, debido a que este metabolito pudo haber perdido su característica de fluorescer.
- La presencia de *A.flavus* en el cultivo de lactobacilos afectó negativamente la actividad de inhibición de crecimiento de *E.coli* que poseen las bacterias lácticas, ya que disminuyó significativamente.
- Las cepas de *L.casei pseudopiantarum* y *L. bulgaricus*, tienen un comportamiento muy variable, aparentemente pueden tanto ayudar al crecimiento del moho como a detenerlo en la producción de toxina, en ambas especies hay extremos.
- Se sugiere que el uso de las cepas. 3, 7 y 4 podría ser una buena opción para controlar la contaminación de alimentos por *Aspergillus flavus*.

TESIS CON
FALTA DE CUBRIR

- ✓ Se concluye que no todas las cepas de *Lactobacillus* tienen el mismo comportamiento antagónico frente al *Aspergillus flavus*.
- ✓ Las condiciones para que un microorganismo se desarrolle dependen de la región, tipo de sustrato y microorganismos asociados, y como consecuencia el efecto de un microorganismo en particular es impredecible.

Recomendaciones

- ✓ Para emplear cepas lácticas con fines antimicrobianos es necesario evaluarlas antes, para seleccionar las de mayor actividad, ya que pueden variar sus características según las condiciones donde vayan a ser empleadas.
- ✓ Se recomienda realizar la investigación directamente en alimentos y ver la variación en el comportamiento de las bacterias lácticas interactuando con el moho.
- ✓ Dado que la información sobre el *A. flavus* y aflatoxinas se ha obtenido en el laboratorio, es necesario realizar las investigaciones en el alimento en particular, para establecer condiciones en cuanto al crecimiento y producción de toxina de *A. flavus*, ya que esto varía dependiendo del tipo de sustrato, humedad y temperatura.
- ✓ Las cepas num. 3, 7 y 4 de lactobacilos requieren de trabajo de investigación para ver su posible optimización en el control de la producción de aflatoxina y/o crecimiento de *A. flavus*.
- ✓ Se sugiere realizar también conteo de *E. coli*, sólo si se quiere confirmar los datos obtenidos por Densidad óptica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Natural Poissons. 17ava. Ed. Cap.49, vol 1: 1184-1204. Gaithersburg, Maryland .USA.
2. Abee T., Klaenhammer T.R. and Letellier L. 1994. Kinetic studies of action of Lactacin F a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the citoplasmic membrana. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1006-1013.
3. Alvarez M. Clara I. Y Mendoza E, Susana. 1994. Manual Básico de Bacteriología. FESC. UNAM.
4. Axelsson L.T. 1993. Chap 1: Lactic acid bacteria: classification and physiology. En : Von Wright A., Salminen, S. Lactic acid bacteria, 1er. Ed. Marcel Dekker Inc. N.Y. EUA.
5. Bhatnagar Deepak, Cleveland E. Thomas. 2000. Encyclopedia of Food Microbiology. Advisory Board. San Diego California. Vol. 1. p. 72-79
6. Blanco José Luis, Domínguez Lucas y Suárez Guillermo. 1989. Problemática de la presencia de Aflatoxinas en la Leche y Productos Lácteos (II). Alimentaria. p.43-51
7. Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray B. y Kalchayanand N. 1991. Mode of action pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.* 70:25-33
8. Burdaspal P.A. y Gorostidi A. 1989. A. Datos sobre la Contaminación por Aflatoxinas en Cacahuates y otros Frutos Secos. Alimentaria. p.51-53.
9. Burdaspal, P.A., Jiménez, I., y Tejedor, M.C. 1990. B. Prospección sobre la contaminación por Aflatoxinas en Mantequilla de Cacahuete. Alimentaria. P.39-42.
10. Casanova C., Garre J, Pujola M y Sancho J. 1995. Identificación y Semicuantificación de Aflatoxinas en Malz. Alimentaria. p. 45-48
11. Coallier-Ascah J and Idziak E.S. 1985. Interaction Between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on production of Aflatoxin. *Applied. Environ. Microbiology.* 49:163-167
12. Cole Ricard J and Cox Richard H. 1981. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. Academic Press. p.1-49
13. Diario Oficial. 2000. Secretaría de Salud. Miércoles 14 de Junio. Método HPLC. pp. 37-40
14. El-Gendy S. M. And Marth E. 1981. Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Protection.* 44:211-213

15. Fragoso Sousa L y Fernández Riusech M. 2000. Las Bacterias Lácticas como Probióticos y Biopreservantes. Alimentaria. p.89-97
16. Gilchrist Saavedra L., Fuentes Dávila G., y Martínez Cano C. 1995. Guía práctica para la Identificación de Algunas Enfermedades de Trigo y Cebada. p.19-23.
17. González B., Glaasker E., Kunji E.R.S., Driessen A.J.M., Suárez J.E. and Konings W.N. 1996. Bactericidal Mode of action of Plantaricin C. Appl. Environ. Microbiol. 62:2701-2709.
18. Gourama,A. y B.Bullerman. 1997. Anti-Aflatoxigenic Activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. International Journal of Food Microbiology. 34:131-143.
19. Haskard Carolyn A., El-Nezami Hani S. 2000. Surface binding of aflatoxin B₁ by Lactic Acid Bacteria. Applied Environ. Microbiology. 67: 3086-3091.
20. Holcomb M, Wilson D.M, Trucksess M.W and Thompson Jr. H.C. 1992. Determination of aflatoxins in Food products by Cromatography. Journal of Cromatography. 624:341-352
21. Holmquist G.U, Walker H.W and Stahr H.M. 1983. Influence of Temperature, pH, Water Activity and Antifungal Agents on Growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Journal of Food Science. 48:778-782.
22. Holt G.J: 1979. The shorter Bergey's manual of determinative bacteiology. 8a. Ed. Williams & wilkins Company. Baltimore. U.S.A.
23. Hoover Dallas G., Steenson Larry R. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic Press Inc. San Diego California.
24. Horn B.W. and Dörner J.W. 1999. Regional Differences in Production of Aflatoxin B₁ and Cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. Applied Environ. Microbiology. 65 (4): 1444-1449.
25. Jack Raph W., Tagg John R. and Bibek Ray. 1995. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. Microbiological Reviews. 59:171-200
26. Karunaratne Anjani, Wezenberg Elenora and Bullerman B. Lloyd 1990. Inhibition of Mold Growth and Aflatoxin production by *Lactobacillus spp.* Journal of Food Protection. 53 (3): 230-236.
27. Kuiper-Goodman T.1999. Enfoque del Análisis de Riesgos de Micotoxinas en los Suministros Alimentarios. Tercera Conferencia Internacional FAO/OMS/PNUMA sobre Micotoxinas. Túnez, Túnez, p.2-10.

28. Koninsky, J. 1982. Colicins and the other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.* 36:125-144.
29. Magnusson Jesper and Schnurer Johan. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal compound. *Applied. Environ. Microbiology.* 67:1-5
30. Martínez Magro M. I., Martínez Corbacho J.Ma, Herranz Sorribtes C., Suárez Gea A.M. y Rodríguez Gómez J.M. 2000. A. Las bacteriocinas de las Bacterias Lácticas I. Alimentaria p. 59-66.
31. Martínez Magro M. I., Martínez Corbacho J.Ma, Herranz Sorribtes C., Suárez Gea A.M. y Rodríguez Gómez J.M. 2000. B. Las bacteriocinas de las Bacterias Lácticas II. Alimentaria p. 67-73.
32. Meyer-Nissen J., Helge Holø., leiv Sigve Havarstein, Knut Sletten and Ingolf F. Ness. 1992. A novel Lactococcal Bacteriocin Whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J.Bacteriol.* 174: 5686-5692.
33. Moreno, E. y Gil M. 1991. La Biología de *Aspergillus flavus* y la producción de alfatoxinas. UNAM. p.1-42
34. Moreno Martínez, E. 1988. Manual para la Identificación de Hongos en granos y sus derivados. UNAM. p.1-77
35. Moss M. O. Department of Microbiology. 1989. Mycotoxins of *Aspergillus* and other filamentous Fungi. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement.* p.69s-81s.
36. Pérez Perdueles Angel, Hurtado A. Tania 1997. Actividad Antimutagénica de extractos vegetales sobre la Aflatoxina B₁. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.* 11:10-14.
37. Schliefer, K.H., Ehrmann, M., Beinfuhr, C., Brockmann E., Ludwig W. y Amann R. 1995. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 5:1081-1089
38. Speck Marvin. 1984. Compendium of Methods for the microbiological examination of food. 2a.Ed. American Public Health Association. Washintong D.C.
39. Sutic M., Banina A. 1990. Influence of Aflatoxin B₁ on gas production by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Environ, Pathol. Toxicol., and Oncology.* 10:149-153
40. Tsai Wei-Yun J., Lambert Jimmy D. and Bullerman Lloyd B. 1984. Simplified Method for Microscale Production and Quantification of aflatoxina in Broth. *Journal of Food Protection.* 47: 526-529

APÉNDICE

Anexo 1

PRUEBA DE LA CATALASA

Reactivos:

Peróxido de Hidrógeno 30%

Agua destilada

Procedimiento:

Método del Portaobjetos

Con aguja de inoculación recoger una colonia pura de 18 a 24 hrs., y colocarla en un portaobjetos. Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre la colonia.

Observar si hay formación de gas o no. El resultado de esta prueba debe ser negativo para los *Lactobacillus*.

PRUEBA DE LA OXIDASA

Reactivos:

Diclorohidrato de tetrametil-p-fenilendiamina 1% (reactivo de Kovac)

Procedimiento:

Prueba en caja Petri.

En un trozo de papel filtro colocado dentro de una caja Petri e impregnado con el reactivo se coloca la colonia en estudio utilizando el asa de platino.

Resultado positivo: indicado por la aparición de un color púrpura, en un lapso no mayor de 10 seg.

Resultado negativo: no hay cambio de color o bien este ocurre después de los 10 seg.

*Para los *Lactobacillus* debe ser negativo.

ANEXO 2

AFLATEST

1. Preparar una dilución de metanol:agua 80:20
2. Extracción de la muestra.
 - Pesar 50g de la muestra, adicionar 5g de NaCl (sal) y agitar.
 - Adicionar 100ml de metanol 80%, agitar por 1 minuto.
 - Filtrar en papel Whatman #1 hasta obtener 50 ml.
 - Del filtrado tomar 10ml y adicionar 40 ml de agua destilada.
 - Filtrar a través de papel lana de vidrio.
3. Tomar 10ml del filtrado y pasarlo por la columna de inmunoafinidad.
4. Lavar dos veces la columna con agua destilada en volúmenes de 10ml.
5. Pasar por la columna 1ml de metanol grado HPLC y colectarlo.
6. Del colectado de la columna se toma para leer en Cromatografía de capa fina.

ANEXO 3

Método: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución HPLC.

-Preparación de la muestra.

Las muestras se centrifugaron a 2500rpm por 15 minutos. Se filtraron a través de filtro de 0.22 micrometros.

- Después de cada filtrado se hizo una solución en metanol grado HPLC en una relación 90:10 metanol: muestra.
- Condiciones de trabajo por equipo.
- Columna: C₁₈ de 4.6 x 150 mm., 5µm de tamaño de partícula.
- Velocidad de flujo: 0.8 ml/min.
- Fase móvil: metanol 100%, grado HPLC.
- Volumen de inyección: 50µl.
- Longitud de onda: 360 nm.
- Tiempo de retención: 15 min.

Características del equipo:

Equipo marca Thermo Separation Products (TSP).

Desgasificador con filtro para 4 líquidos.

Bomba de gradientes para mezclado automático de 4 disolventes.

Inyector automático de muestras con Loop de 50µl.

Columna HPLC de C₁₈ de 4.6 x 150 mm, 5µm de tamaño de partícula.

Detector de UV1000 TSP.

Computadora con Software adecuado para el control de equipo y procesamiento de datos.