



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

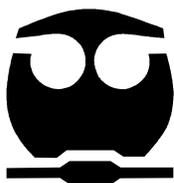
**PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS A PARTIR DE BACTERIAS  
ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE POZOL PARA LA INHIBICIÓN DE  
BACTERIAS PATÓGENAS**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**FRANCISCO LEONARDO TAVERA MONTES**



**MÉXICO, D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**Presidente**      Aurora Irma Ortegón Ávila  
**Vocal**            Ruth Edith Martín Fuentes  
**Secretario**      Gloria Díaz Ruíz  
**1er. Suplente**    Ma. del Pilar Granada Macias  
**2º Suplente**      Aleida Mina Cetina

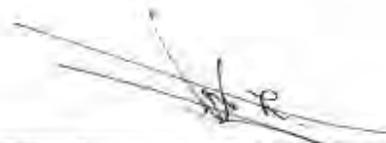
**Sitio en donde se desarrolló el tema:**

Lab. 324, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Facultad de Química

  
\_\_\_\_\_  
**Asesor:** Gloria Díaz Ruíz

  
\_\_\_\_\_  
**Asesor técnico:** Ma. del Carmen Wachter Rodarte

**Sustentante:**

  
\_\_\_\_\_  
Francisco Leonardo Tavera Montes

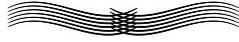
## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Gloria Díaz, por el tiempo, paciencia, dedicación, confianza, facilidades y dirección ofrecida en la realización de esta tesis.

A la Dra. Carmen Wachter, por su ayuda, orientación, consejos, observaciones y estímulos en la realización de este proyecto.

A Teresa Flores, por las sugerencias, amistad y apoyo en el periodo que estuve realizando el trabajo experimental en el laboratorio.

También agradezco al jurado y a todas aquellas personas que intervinieron en este proyecto; desde su ayuda en la realización, hasta sus observaciones para hacer de éste, un mejor trabajo.



*A mi madre. Por tu apoyo, por ser el ejemplo a seguir, por la paciencia y confianza que depositaste en mi, por demostrarme que sí se puede remar en contra de la corriente, por todos aquellos detalles que motivaron mi deseo por ser un poco más cada día. Son tantas las cosas que tengo que decirte y agradecerte, que no hay palabras que logren describir todo lo que he aprendido de ti a lo largo de estos años que he estado contigo madre. Gracias.*

*A mi hermana. Porque siempre estuviste ahí para ofrecer lo que estaba al alcance de tus manos y más; por tu fiel e incondicional apoyo en mi formación profesional y tu ayuda en momentos difíciles.*

*A mi padre. Por el apoyo, los consejos y ayuda en la toma de decisiones que he tenido a lo largo de mi vida y han hecho de mi una persona más humana.*

*A mis abuelos y tíos. Por sus aportes a lo largo de mi vida, desde mi formación personal hasta mi formación profesional, ya que cada miembro aportó conocimiento a mi persona.*

*A mi novia. Por su apoyo, ayuda, cariño, paciencia y consejos además de estar conmigo en momentos difíciles y ayudarme a ver la vida de forma más sencilla, te adoro.*



## INDICE GENERAL

Contenido	Página
Índice General.....	i
Índice de Tablas.....	iv
Índice de Figuras.....	v
Resumen.....	vii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 El Pozol.....	3
2.1.1 Elaboración.....	4
2.2 Microbiología del pozol.....	7
2.2.1 Bacterias ácido lácticas.....	8
2.2.2 Bacterias indeseables.....	9
2.2.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	10
2.2.2.2 <i>Salmonella enterica</i> .....	11
2.2.2.3 <i>Bacillus cereus</i> .....	12
2.2.2.4 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	13
2.2.2.5 <i>Proteus mirabilis</i> .....	14
2.2.2.6 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	15
2.2.2.7 <i>Micrococcus luteus</i> .....	16
2.3 Bacteriocinas.....	17
2.3.1 Definición.....	17
2.3.2 Clasificación.....	21

	ÍNDICE
2.3.3 Características de las bacteriocinas.....	27
2.3.4 Producción de Bacteriocinas.....	29
2.3.5 Factores de producción.....	30
2.3.6 Mecanismo de producción.....	30
2.3.7 Translocación de proteínas.....	30
2.3.8 Transporte y secreción de proteínas.....	32
2.3.9 Procesado, transporte y secreción de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas mediante transportadores ABC o sistema dedicado de transporte (DTS).....	33
2.4 Mecanismo de acción.....	34
2.5 Métodos de detección.....	36
3. Hipótesis.....	39
4. Objetivos.....	40
5. Metodología.....	41
5.1 Microorganismos.....	41
5.1.1 Bacterias Ácido lácticas (BAL).....	41
5.1.2 Microorganismos sensibles.....	41
5.1.3. Activación y conservación de BAL.....	42
5.1.4 Activación y conservación de microorganismos sensibles.	43
5.2 Cinética de crecimiento de los microorganismos sensibles.....	45
5.3 Preparación del medio infusión cerebro-corazón amortiguado (BHI-A).....	45
5.3.1 Preparación del medio BHI-A para placa.....	45
5.3.2 Preparación del medio BHI-A para sobrecapa.....	46

	ÍNDICE
5.3.3 Montaje de los medios BHI-A.....	46
5.4 Pruebas a medios amortiguados con ácido acético y láctico.....	47
5.5 Métodos empleados en la detección de la actividad de bacteriocinas.....	48
5.5.1 Preparación de medios para la detección de actividad de bacteriocinas.....	48
5.5.2 Preparación de cepas productoras e indicadoras.....	48
5.5.2.1 Preparación de cepas productoras (BAL).....	48
5.5.2.2 Preparación de cepas indicadoras.....	48
5.5.3 Determinación de la actividad bacteriocinogénica.....	49
5.5.4 Prueba de reto en medio MRS de una bacteria láctica productora de bacteriocina y <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	51
6. Resultados y discusión.....	57
6.1 Determinación de la actividad bacteriocinogénica de las cepas de bacterias lácticas aisladas del pozol.....	57
7. Conclusiones.....	83
8. Perspectivas.....	84
9. Anexo A.....	85
Anexo B.....	93
10. Bibliografía.....	98

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Bacterias lácticas aisladas del pozol.....	7
<b>Tabla 2.</b> Ejemplos de Bacteriocinas, cepa productora y origen de la cepa.....	20
<b>Tabla 3.</b> Clasificación y características de bacteriocinas por grupo.....	26
<b>Tabla 4.</b> Propiedades de algunas bacteriocinas de la clase I y II.....	28
<b>Tabla 5.</b> Microorganismos sensibles empleados.....	41
<b>Tabla 6.</b> Cepas de <i>E. coli.</i> aisladas del pozol.....	42
<b>Tabla 7.</b> Componentes del medio BHI-A para placa.....	45
<b>Tabla 8.</b> Componentes del medio BHI-A para sobrecapa.....	46
<b>Tabla 9.</b> Condiciones de crecimiento de la cepa 77g y <i>S. Typhimurium</i> .....	53
<b>Tabla 10.</b> Distribución de corridas para la prueba de reto.....	54
<b>Tabla 11.</b> Diluciones para cuantificación de microorganismos en prueba reto...	55
<b>Tabla 12.</b> Descripción de las cepas sensibles.....	58
<b>Tabla 13.</b> Determinación de actividad de las BAL frente a Gram positivas.....	74
<b>Tabla 14.</b> Determinación de actividad de las BAL frente a Gram negativa.....	75
<b>Tabla 15.</b> Pruebas positivas de actividad bacteriocinogénica contra Gram positivas expresadas en porcentaje.....	76
<b>Tabla 16.</b> Pruebas positivas de actividad bacteriocinogénica contra Gram negativas expresadas en porcentaje.....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación del método de elaboración de pozol indígena.....	6
<b>Figura 2.</b> Estructura molecular de la nisina.....	22
<b>Figura 3.</b> Estructura de la sakacina P.....	23
<b>Figura 4.</b> Estructura de la plantaracina A.....	23
<b>Figura 5.</b> Estructura de la Enterocina AS-48.....	24
<b>Figura. 6.</b> translocación de la preproteína .....	32
<b>Figura 7.</b> Modelo de biosíntesis de la nisina A.....	34
<b>Figura 8.</b> Modelos de formación de poros por la nisina.....	35
<b>Figura 9.</b> Preparación de bacterias ácido lácticas para conservación.....	44
<b>Figura 10.</b> Preparación de bacterias sensibles para conservación.....	44
<b>Figura 11.</b> Preparación de placas de ensayo.....	50
<b>Figura 12.</b> Radio de inhibición. Actividad antimicrobiana.....	51
<b>Figura 13.</b> Método empleado en la prueba de reto en caldo MRS.....	56
<b>Figura 14.</b> Cinética de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	62
<b>Figura 15.</b> Cinética de crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> y <i>Proteus mirabilis</i> .....	62
<b>Figura 16.</b> Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> O8:H10 95268, <i>Escherichia coli</i> O8:H10 95269 y <i>Escherichia coli</i> O8:H7 95238.....	63
<b>Figura 17.</b> Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> O88:H25 95217 y <i>Escherichia coli</i> O88:H25 95222.....	63
<b>Figura 18.</b> Prueba de ácidos a diferentes concentraciones en medio BHA con <i>Bacillus cereus</i> como cepa sensible.....	64

	ÍNDICE
<b>Figura 19.</b> Radio de actividad antimicrobiana contra <i>Listeria monocytogenes</i>	65
<b>Figura 20.</b> Actividad antimicrobiana contra <i>Micrococcus luteus</i> .....	73
<b>Figura 21.</b> Actividad antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> .....	73
<b>Figura 22.</b> Actividad antimicrobiana contra <i>Listeria monocytogenes</i> .....	73
<b>Figura 23.</b> Actividad antimicrobiana contra <i>Proteus mirabilis</i> .....	73
<b>Figura 24.</b> Actividad antimicrobiana contra <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	73
<b>Figura 25.</b> Cinética de crecimiento de <i>Salmonella</i> Typhimurium y pH en el medio MRS a las 48h.....	78
<b>Figura 26.</b> Cinética de crecimiento de BAL (77g) y pH en el medio MRS a las 48h.....	79
<b>Figura 27.</b> Cinética de crecimiento en medio MRS de BAL 77g y <i>Salmonella</i> Typhimurium y pH a las 48h.....	81

## Resumen

El pozol es una bebida ácida, preparada a base de maíz nixtamalizado fermentado, es de origen mesoamericano y en la actualidad sigue siendo consumida en el sureste de México.

En la microbiota del pozol predominan las bacterias lácticas, las cuales se desarrollan en gran cantidad durante su fermentación. A diferencia de otras fermentaciones, en ésta no se eliminan ciertas enterobacterias a pesar del pH bajo (alrededor de 4).

El estudio de bacterias lácticas es de importancia, ya que estos microorganismos elaboran compuestos antimicrobianos para inhibir a otros miembros presentes en el mismo ambiente. Diversas son las sustancias antagónicas que los microorganismos producen para dominar en su hábitat, entre ellas unos compuestos llamados bacteriocinas, que son proteínas con actividad antimicrobiana, sobre todo contra bacterias gram positivas, aunque se han reportado algunas capaces de actuar también contra las gram negativas.

El objetivo de este trabajo fue determinar si en una colección de 80 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol de Villahermosa, Tabasco, se encuentran algunas cepas capaces de generar bacteriocinas.

La presencia de bacteriocinas de BAL (Bacterias ácido lácticas), se llevó a cabo aplicando el método de botón (Lewus y Montville, 1991), utilizando once microorganismos indicadores; *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* y cinco cepas de *Escherichia coli* aisladas de pozol. Se encontró actividad bacteriocinogénica frente a bacterias gram positivas y gram negativas por 39 cepas BAL de las 80 bacterias que conformaban la colección.

Dado que la colección de BAL aisladas del pozol está conformada por diversas especies, es posible que las bacteriocinas producidas sean diferentes y como consecuencia, difieran en el espectro de actividad que generan, así como en sus propiedades bioquímicas.

## 1. Introducción

El pozol es un alimento fermentado en cuyo proceso de elaboración interviene una microbiota compleja, dentro de la cual las bacterias lácticas ocupan un lugar importante. Debido a la acción de estas bacterias se acidifica la masa y se modifican sus propiedades sensoriales; sin embargo la falta de higiene y la forma artesanal en la que se produce tiene por consecuencia la presencia de microorganismos indeseables, como algunas bacterias patógenas, lo que puede representar un riesgo para la salud.

Uno de los beneficios que presentan los alimentos fermentados es la disminución del pH hasta valores menores de 4.5, en donde la mayoría de las bacterias patógenas se inhiben. Del pozol, sin embargo, se han aislado cepas potencialmente patógenas de *Escherichia coli* resistentes a la acidez (Sainz *et al.* 1998) que sobreviven en las diferentes etapas del proceso de elaboración. Del pozol se han aislado cepas de *Escherichia coli* uropatogénicas (O1:H6 O1:H10), enteropatogénicas (O18:H53), enterotoxigénicas (O8:H7, O8:H8, O8:H49, O11:H47, O20:HNM, O173:H23) y enteroagregativas (Sainz *et al.* 2001). Lo anterior apoya la importancia que tiene el encontrar una alternativa para controlar el crecimiento de estos microorganismos.

A través de la evolución, los microorganismos han desarrollado distintos mecanismos para competir por nutrientes en su medio ambiente (Jack *et al.* 1995). Diversas son las

sustancias antagonicas que los microorganismos producen para dominar en su hábitat, entre éstas figuran las bacteriocinas.

Las bacteriocinas son definidas como proteínas biológicamente activas contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora. En la naturaleza existe una enorme diversidad de este tipo de sustancias. Las bacteriocinas han sido encontradas en casi todas las especies de bacterias ácido lácticas (BAL) examinadas hasta la fecha y aún dentro de una especie podrían ser producidos diferentes tipos de bacteriocinas.

El objetivo de este trabajo fue buscar dentro de las BAL aisladas del pozol, la existencia de actividad bacteriocinogénica capaz de inhibir bacterias patógenas, como las cepas de *E. coli* aisladas del pozol que no se inhiben a valores bajos de pH. Esto podría ser utilizado en un futuro como estrategia en la conservación e inocuidad del pozol y de otros alimentos.

## 2. Antecedentes

### 2.1 El pozol

Es una bebida ácida y refrescante que se consume desde la época prehispánica en el sureste de México; el término pozol viene del náhuatl *pozolli*, que significa espumoso. Para su consumo se utiliza diluyendo en agua una masa fermentada de nixtamal (maíz hervido en agua con cal) (Cruz y Ulloa, 1973). Se ingiere como bebida ceremonial, es un alimento básico en las poblaciones indígenas del sureste de México y es una bebida refrescante utilizada por los mestizos de la misma región del país (Ulloa y Herrera, 1982).

Algunos grupos étnicos como los chontales y choles de Tabasco; los mayas de Campeche, Yucatán y Quintana Roo; los lacandones, tzotziles o chamulas, tzeltales, choles y mames de Chiapas; los zapotecos de Oaxaca y los mayas preparaban cataplasmas de pozol enmohecido para curar infecciones cutáneas; también lo utilizaban como ofrenda en ceremonias relacionadas con el cultivo y la cosecha del maíz (Ulloa *et al.* 1987). El pozol se consume como alimento básico y también se utiliza con fines medicinales para controlar diarreas, además para reducir la fiebre se adiciona con miel de abeja.

La fermentación del pozol es llevada a cabo por una microbiota natural, que está constituida por bacterias, levaduras y hongos.

### 2.1.1 Elaboración

Las diferentes etapas de elaboración del pozol comienzan desde la limpieza del maíz, en la cual se elimina el material extraño y granos podridos que darían un mal aspecto al pozol. El paso siguiente es la nixtamalización del maíz, la cual consiste en la cocción de los granos en agua con cal, lo que tiene como objetivo la separación del hollejo o cascarilla del grano. Lo que sigue es el lavado del nixtamal, que se lleva a cabo con agua, ya sea de río o agua potable, con el fin de eliminar la cal y el hollejo; después se lleva a cabo una segunda cocción, también llamada “reventado” que consiste en cocer el nixtamal en agua hasta que el grano de maíz “revienta” o “florece”. Esta segunda cocción solo se lleva a cabo por los productores mestizos (Wacher, 2000).

El remojo, fase que precede a la molienda, se lleva a cabo con agua del último lavado del nixtamal (frío) o con el agua que se utilizó en el reventado (caliente), dependiendo del productor que elabora el pozol. Por lo regular dura toda la noche, y tiene como función aumentar la retención de agua. La molienda se lleva a cabo la mañana siguiente de la nixtamalización, o del reventado, ya sea en un molino de mano o que se lleven a moler a un molino de nixtamal comercial. La principal fuente de contaminación de la masa ocurre durante esta etapa, ya que el molino no se limpia con frecuencia.

La elaboración de la bola se hace inmediatamente después de la molienda, en donde se forman bolas con la mano, con masa previamente amasada de forma vigorosa. Estas bolas se elaboran moldeando la masa con las dos manos, o sobre la mesa, que generalmente, se enjuaga previamente con agua. Durante la formación de la bola, la

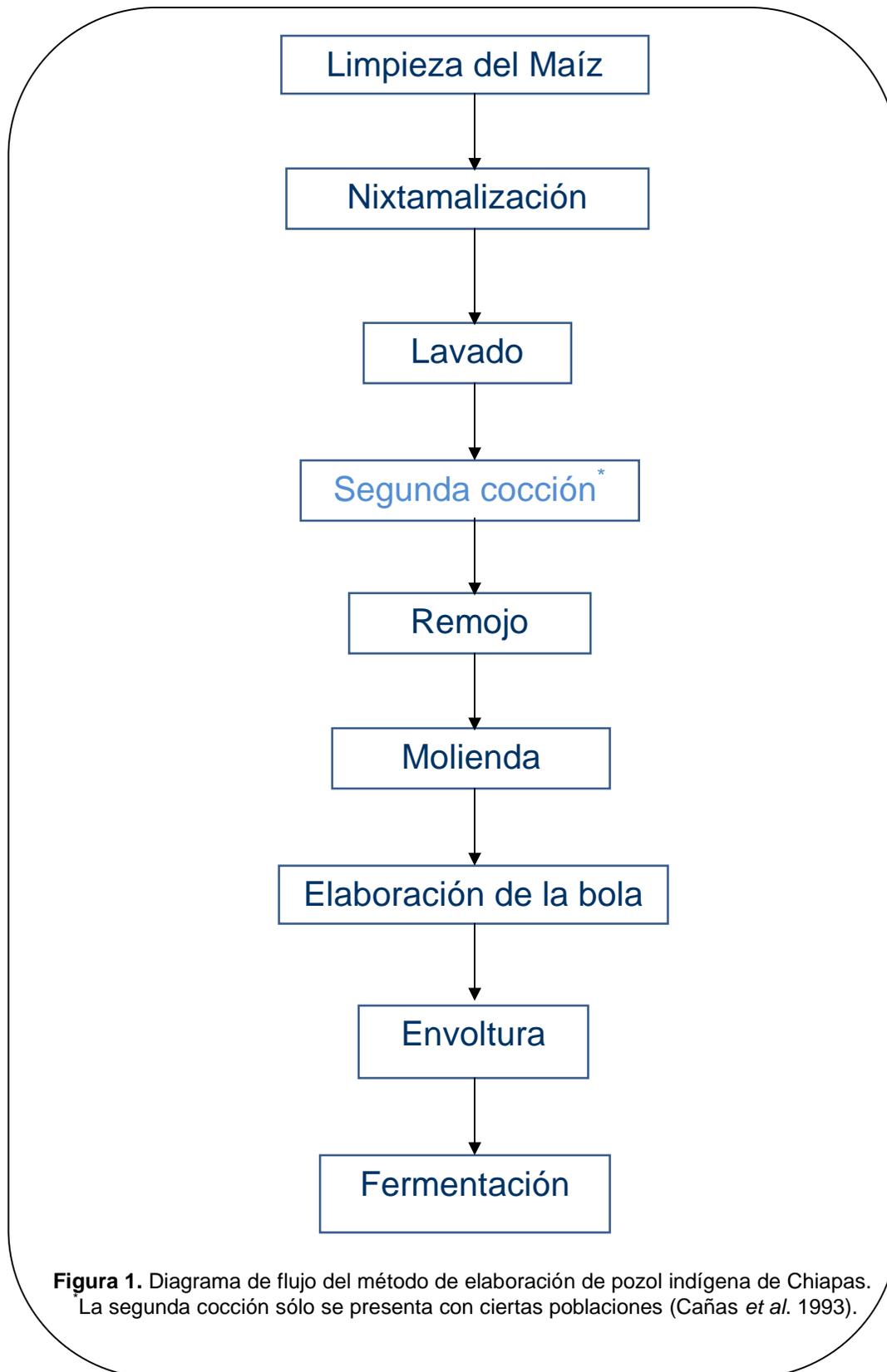
---

masa también se contamina (debido a la manipulación de la masa con las manos y a que se agrega agua no potable).

El pozol se envuelve con hojas de plátano (tradicionalmente); sin embargo, también es común encontrarlo cubierto con bolsas de plástico. En la figura 1 se esquematiza el proceso elaboración pozol.

El pozol que es preparado el mismo día no es muy ácido, aunque presenta cierto grado de fermentación, ya que el tiempo que transcurre desde su preparación hasta su consumo es aproximadamente de 8 horas, lo cual es suficiente para que las bacterias lácticas, responsables de la acidificación, alcancen su máximo desarrollo (Díaz *et al.* 2003).

El pozol maduro (que esta fermentado) puede tener desde unas horas hasta 30 días o más de fermentación a temperatura ambiente, en el último caso presenta un notorio crecimiento superficial de mohos (Cañas *et al.* 1993).



**Figura 1.** Diagrama de flujo del método de elaboración de pozol indígena de Chiapas. La segunda cocción sólo se presenta con ciertas poblaciones (Cañas *et al.* 1993).

## 2.2 Microbiología del pozol

La microbiota del pozol es compleja, ya que está constituida por bacterias, levaduras y hongos (Wacher *et al.* 1993). Se ha demostrado que las BAL representan una fracción importante de la microbiota de la masa del pozol, ya que están presentes en todas las etapas de la fermentación, además de ser las causantes principales de la acidificación del pozol. Estas bacterias constituyen del 89% al 94% de la microbiota activa de la masa del pozol y, dentro de éstas, predominan los géneros: *Streptococcus*, *Lactococcus* y algunos *Leuconostoc* (Wacher, 2004; Ben Omar y Ampe, 2000). Algunas de las especies presentes en el pozol se indican en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Bacterias lácticas aisladas del pozol.

<i>Streptococcus macedonicus</i> <sup>a</sup>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <sup>b</sup>
<i>Streptococcus bovis</i> <sup>a</sup>	<i>Lactobacillus plantarum</i> <sup>b</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> <sup>a</sup>	<i>Lactobacillus casei</i> <sup>b</sup>
<i>Enterococcus sulfureus</i> <sup>a</sup>	<i>Lactobacillus fermentum</i> <sup>c</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <sup>b</sup>	<i>Enterococcus saccharolyticus</i> <sup>c</sup>
<i>Weissella paramesenteroides</i> <sup>d</sup>	<i>Lactobacillus pentosus</i> <sup>d</sup>

- a) Díaz *et al.* 2003
- b) Escalante *et al.* 2001
- c) Ben Omar *et al.* 2000
- d) Ampe *et al.* 1999

## 2.2.1 Bacterias Acido Lácticas

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos que comparten ciertas características ya que son Gram positivos, no esporulados y microaerófilos (De Vuyst y Vandamme, 1994). Dentro de las BAL se incluyen diversos géneros como son: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Jay, 1992; Requena, 1995). Las BAL comúnmente se utilizan como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos y bebidas, contribuyendo principalmente al desarrollo de textura, sabor y aroma. Por otra parte las BAL actúan inhibiendo el crecimiento de ciertas bacterias patógenas y de descomposición dando lugar a productos alimenticios estables y relativamente seguros (Kelly *et al.* 1996; Franz *et al.* 1998; Zamfir *et al.* 1999).

Las BAL se utilizan en productos consumidos por el hombre desde siglos atrás, como por ejemplo en los alimentos fermentados. En general, su consumo no implica riesgos para el humano y tienen status GRAS (Generally Recognized As Safe) para su uso en alimentos, ya que se utilizan como cultivos iniciadores en alimentos fermentados (Stiles, 1996). Éstas proporcionan a lo largo de la fermentación una mejora en las propiedades sensoriales del alimento en el que están presentes.

Además, las BAL tienen gran potencial de bioconservación debido a las sustancias antimicrobianas que producen (ácidos como: el láctico y acético; metabolitos como: diacetilo, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas). Con respecto a esto, se ha reportado el uso del pozol en la antigüedad para combatir infecciones (Cruz y Ulloa, 1973).

---

## 2.2.2 Bacterias indeseables

Las bacterias patógenas se definen como microorganismos capaces de causar alguna enfermedad. La patogenicidad representa una forma de versatilidad y especialización que permite a ciertos microorganismos penetrar y replicarse dentro de un organismo y dañar a células huésped, produciéndole cambios fisiológicos y anatómicos (Brock, 2003).

Una de las características mas significativas de los alimentos fermentados es que durante su proceso fermentativo se inhiben microorganismos indeseables, como son los patógenos, esta inhibición puede darse como consecuencia del crecimiento de las BAL que compiten por los nutrientes (consumidos preferentemente por quienes llevan a cabo la fermentación, al crecer en forma masiva) y a que sintetizan sustancias antimicrobianas, como ácidos orgánicos, bacteriocinas u otras sustancias inhibidoras (Wacher, 1995).

La mayoría de los microorganismos patógenos se ven inhibidos o disminuye la concentración de éstos, debido al descenso del pH causado por las BAL, lo que trae como beneficio una menor cuenta de esta microbiota patógena. Sin embargo, hay ciertos microorganismos patógenos que llegan a sobrevivir en el proceso de fermentación y/o se incorporan al alimento por contaminación cruzada.

Una de las propiedades que tienen algunos patógenos presentes en el pozol y en otros alimentos, es la capacidad de sobrevivir en condiciones ácidas (Sainz *et al.* 2005). Esta

---

resistencia a un bajo pH es importante para patógenos transmitidos por los alimentos, ya que requieren sobrevivir el paso por el estómago, que se encuentra a valores de pH bajos (2-3). Entonces, al incrementar su resistencia al pH bajo podría aumentar su virulencia.

### **2.2.2.1 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaeróbico facultativo, móvil por flagelos y no forma esporas. Las cepas de *E. coli* llegan a causar dos síndromes generales: (i) infección en el tracto urinario, (ii) enfermedades entéricas y diarreicas (Miliotis y Bier, 2003).

La ácido resistencia es una de las características más destacadas que tiene *E. coli* que se encontró en diferentes muestras de pozol. Sainz *et al.* (2001 y 2005) mostraron la presencia y sobrevivencia de cepas de *E. coli* enteropatógena (EPEC) la cual interacciona con las células epiteliales produciendo una lesión histopatológica característica conocida como lesión (A/E) (Doyle y Beuchat, 2007) y la presencia de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) la cual produce enterotoxinas termolábiles y termoestables que provoca la acumulación de líquido y una respuesta diarreica (Doyle y Beuchat, 2007). Este tipo de microorganismos se encontraron en el pozol a pesar de los bajos valores de pH de (4.9 y 3.7) a las 48 horas de fermentación de la masa (Sainz *et al.* 2001).

---

El agua no potable, es el vehiculo más común por el cual hay incidencia de *Escherichia coli* en alimentos, así como por falta de higiene personal en la preparación de los mismos (Miliotis y Bier, 2003).

### **2.2.2.2 *Salmonella enterica***

*Salmonella enterica* subgrupo *enterica* serotipo Typhimurium conocida como *Salmonella* Typhimurium, es un bacilo Gram negativo, aerobio, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. En humanos causa salmonelosis y gastroenteritis (Miliotis y Bier, 2003, McCormick *et al.* 1995).

Al crecer *Salmonella* Typhimurium en condiciones ligeramente ácidas (pH 5.8), Leyer y Johnson (1993) encontraron cierta tolerancia a otros tipos de estrés, como el calor, medio salino y agentes superficiales activos. Esta tolerancia es llamada protección cruzada, que es cuando un estado de estrés confiere protección contra otros tipos de estrés. Esto trae como resultado que las enterobacterias al pasar por el estómago, se preparen para tolerar otros tipos de estrés presentes en el intestino haciéndolas resistentes.

Los niños son los más propensos a contraer salmonelosis. La tasa de infecciones diagnosticadas en niños menores de cinco años de edad es cinco veces superior a la tasa en todas las demás personas. Los niños pequeños, los ancianos y los inmunosuprimidos son los más propensos a tener infecciones graves (C.D.C. "salmonelosis"). Es común encontrar esta bacteria en carne de cerdo, carnes

---

fermentadas, leche bronca, huevo y productos de huevo (Miliotis y Bier, 2003; Brock 2003).

### **2.2.2.3 *Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, esporulado y móvil. Es una bacteria que causa intoxicación por consumo de alimentos contaminados. Produce dos tipos de síndromes: el diarreico y el emético. El tipo diarreico de intoxicación alimentaria es provocado por una(s) enterotoxina(s) producida(s) durante el crecimiento vegetativo de *Bacillus cereus* en el intestino delgado, mientras que la toxina emética es producida por células que crecen en el alimento (Doyle y Beuchat, 2007).

Las bacterias del género *Bacillus* pueden ser importantes en la fermentación de leguminosas, cereales y otros sustratos. Cepas amilolíticas de *Bacillus* estimulan el crecimiento de las bacterias lácticas al hidrolizar el almidón de los granos (Achi, 1990). Hay reportes que muestran la presencia de este microorganismo en arroz y alimentos con alto contenido de azúcares; sin embargo, generalmente son consideradas indeseables, porque dentro de este género se encuentra la especie *Bacillus cereus*.

Además, algunas cepas de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. lentus*, *B. thuringiensis*, *B. polymixa*, *B. carotarum* y *B. pasteurii* han sido reportadas como patógenas (Miliotis y Bier, 2003; Jay, 1992; Wachter, 1995). Se ha encontrado la

---

presencia de *Bacillus* en masas de pozol recién elaboradas, como son: *B. lentus*, *B. mycooides* y *B. cereus* (Rivera, 2001).

*Bacillus cereus* está muy difundido en la naturaleza, aislándose frecuentemente en la tierra y en las plantas en crecimiento, por ello normalmente se encuentra en alimentos como aquellos con alto contenido de almidón (tubérculos), productos lácteos y vegetales (Miliotis y Bier, 2003; Brock, 2003; Doyle y Beuchat, 2007).

#### **2.2.2.4 *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* es una bacteria Gram positiva, catalasa positiva, de movilidad dudosa por flagelos, psicrótrofa, no genera esporas, ácido tolerante, resistente a concentraciones elevadas de NaCl (> a 10%), sobrevive a temperaturas bajas (3°C) y es anaerobia facultativa. En mujeres embarazadas provoca aborto espontáneo, muerte fetal, parto prematuro y septicemia neonatal severa (Ogunmodede, 2005).

Este patógeno intracelular entra en el cuerpo a través del tracto gastrointestinal, con la ingesta de alimentos contaminados, penetra mediante fagocitosis tanto en células fagocíticas como en fagocitos no especializados, inmediatamente después de la entrada, las bacterias son interiorizadas en vacuolas unidas a la membrana que son lisadas. Las bacterias intracelulares quedan libres en el citosol y comienzan a multiplicarse. Esto es frecuente en individuos con inmunidad celular disminuida incluyendo: recién nacidos, ancianos, pacientes inmunosuprimidos con fármacos (como

---

por ejemplo esteroides) o aquellos con enfermedades inmunosupresoras (SIDA). Afecta frecuentemente a mujeres embarazadas.

*Listeria monocytogenes* es capaz de sobrevivir y crecer en tierra y en agua. Se ha presentado en una gran variedad de alimentos crudos y procesados; carnes, lácteos, mariscos, huevos y verduras, estos son los mas susceptibles al ataque de este microorganismo (Doyle y Beuchat, 2007; Miliotis y Bier, 2003; Cox, 1989).

#### **2.2.2.5 *Proteus mirabilis*.**

*Proteus mirabilis* es una bacteria Gram negativa y anaerobia facultativa. Es una bacteria uropatógena oportunista importante; aunque no suele causar infección urinaria en el huésped normal, puede causar infección urinaria grave, especialmente en pacientes con catéter urinario o en personas con anomalías estructurales de las vías urinarias y se asocia frecuentemente con la vejiga y la formación de cálculos renales (Sosa y Zunino, 2009). Se le ha encontrado en polvo y no es común encontrarla en alimentos; sin embargo, cuando se llega a ingerir al microorganismo puede provocar infecciones urinarias.

El género *Proteus* se caracteriza por su rápida movilidad, causa descomposición en los alimentos, principalmente en carne fresca, aves, mariscos y leche (Brock, 2003). Se ha reportado la presencia de *Proteus vulgaris* en la superficie de quesos madurados (Deetae *et al.* 2009).

---

### **2.2.2.6 *Staphylococcus aureus***

Los miembros del género *Staphylococcus* son cocos Gram positivos que se agrupan regularmente en racimos, inmóviles, no esporulados, dan positiva la reacción de la catalasa y por lo general producen una microcápsula de naturaleza polisacárida (Bannerman, 2003). Algunos de los miembros del género *Staphylococcus* forman parte de la microbiota de la piel en humanos.

Las personas son el reservorio principal de los estafilococos involucrados en la enfermedad humana, incluyendo *S. aureus*. Llegan al alimento ya sea por la inoculación de este microorganismo en la preparación de alimentos, higiene deficiente en su preparación o mala limpieza de los utensilios (Doyle y Beuchat, 2007).

*Staphylococcus aureus*, el patógeno más importante del género, produce infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones invasoras y cuadros tóxicos, genera enterotoxinas termoestables que actúan sobre el intestino delgado, causando secreción masiva de líquidos en la luz intestinal. La intoxicación más común es la gastroenteritis estafilocócica.

Los síntomas de intoxicación alimentaria estafilocócica suelen ser los siguientes: náuseas, vómito, retortijones abdominales intensos, diarrea, sudoración, cefalalgia, abatimiento y un eventual descenso de la temperatura corporal. Estos síntomas, que generalmente duran de 24 a 48 horas, suelen aparecer dentro de las 4 horas

siguientes a la ingestión del alimento contaminado. Este microorganismo se encuentra frecuentemente en productos lácteos y cárnicos (Brock, 2003).

#### 2.2.2.7 *Micrococcus luteus*

*Micrococcus luteus* es una bacteria Gram positiva, esférica, saprotrófica y aeróbica. Se encuentra en el suelo, polvo, agua, aire y como parte de la microbiota de la piel de los mamíferos. La bacteria también coloniza la boca, las mucosas, y el tracto respiratorio superior. Se ha reportado alto grado de incidencia de este microorganismo en el pescado además de que esta bacteria puede ocasionar enfermedad o intoxicación alimentaria (Centeno, 2005).

## 2.3 Bacteriocinas

### 2.3.1 Definición.

Las bacteriocinas son proteínas biológicamente activas que se encargan de inhibir o eliminar el crecimiento de especies similares o muy relacionadas a la cepa productora.

Las bacteriocinas que son de naturaleza proteínica, difieren de los antibióticos, ya que las bacteriocinas son de naturaleza proteínica y los antibióticos no.

Un antibiótico puede ser considerado como cualquier molécula química producida por los microorganismos que es dañina para el crecimiento de otros microorganismos, generalmente, los antibióticos son metabolitos secundarios (Brock, 2003).

Las bacteriocinas no se consideran antibióticos ya que son producidas ribosomalmente, mientras que los antibióticos son compuestos producidos por el metabolismo celular y son usados para inhibir microorganismos causantes de enfermedades infecciosas, por ello su uso en alimentos esta prohibido (Hoover y Steenson, 1993), ya que la administración abundante de agentes antimicrobianos como son los antibióticos ha conducido a la aparición y a la persistencia de cepas resistentes (Doyle y Beuchat, 2007).

Existen estudios que demuestran que dentro de un entorno alimentario, hay bacterias que pueden intercambiar material genético que confiere resistencia a antibióticos. Esto ocurre no sólo entre las bacterias de la misma especie (*Salmonella - Salmonella*), sino

---

también entre bacterias de especies diferentes (*Salmonella* - *E. coli*). Además indican que los genes que confieren resistencia son muy móviles y demuestran claramente la facilidad con la que se puede transmitir resistencia a los antibióticos en todo el entorno alimentario (Duffy y Walsh, 2005).

Las bacteriocinas producidas por las BAL presentan una serie de características que las convierten en candidatas adecuadas para ser usadas como conservadores de alimentos, tales como el presentar:

- Naturaleza proteínica, que hace que sean inactivadas por las enzimas del tracto gastrointestinal.
- Una aparente ausencia de toxicidad y escasa inmunogenicidad en animales de experimentación.
- Falta de actividad frente a células eucariotas.
- Una termorresistencia general (sobre todo las bacteriocinas de tamaño pequeño) lo que permite que conserven su actividad antimicrobiana tras ser sometidas a temperaturas similares a las de pasteurización (Chen y Hoover, 2003).

Las bacteriocinas constan de una parte proteínica esencial que les da el carácter bactericida, ya sea por una cadena de aminoácidos específica en su estructura o porque estén unidas a macromoléculas como pueden ser lípidos o carbohidratos.

---

---

Las bacteriocinas son sintetizadas por los ribosomas durante la fase exponencial de crecimiento de la célula productora, como péptidos precursores, éstos son cortados de un péptido líder para formar la molécula biológicamente activa. Algunas de ellas como los lantibióticos (bacteriocinas que presentan deshidratación de serina y treonina, clase I) sufren modificaciones postraduccionales en la molécula precursora antes del rompimiento del péptido líder.

Las bacteriocinas presentan en su estructura, conglomerados de aminoácidos cargados positivamente que favorece su unión con la bacteria blanco. Los residuos de aminoácidos tienen la característica de tener funciones específicas dentro de la proteína, como darle estabilidad en la conformación espacial de la bacteriocina. Como ejemplo está la lantionina y  $\beta$  metil lantionina. En otros casos hay grupos como la cistina y deshidroalanina que pueden incrementar su actividad. Las bacteriocinas que contienen lantibióticos en su estructura presentan conformaciones muy semejantes. Son péptidos helicoidales anfifílicos con mayor flexibilidad en soluciones acuosas que favorecen su actividad en comparación con soluciones lipofílicas donde la estructura tiende a ser mas rígida (Jack *et al.* 1995).

Se han investigado una gran cantidad de bacteriocinas de bacterias lácticas aisladas de diversas fuentes, algunas de ellas se muestran en la tabla 2. Se puede aprovechar esta gran diversidad de moléculas para que puedan ser utilizadas como inhibidores de microorganismos patógenos en los alimentos y evitando el uso de conservadores haciendo de un alimento, un producto seguro y más natural.

---

Se sabe que el espectro de inhibición de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas se restringe a bacterias Gram positivas; sin embargo, dicho espectro puede variar significativamente, desde uno relativamente estrecho como en el caso de lactocinas, las cuales solamente inhiben a *Lactococcus* (Roos, 1999), hasta las de mayor espectro, que pueden inhibir a las Gram negativas.

**Tabla 2.** Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas aisladas de diversas fuentes.

Bacteria ácido láctica	Bacteriocina	Origen de la cepa
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> IPLA* 972	Nisina Z <sup>a</sup> Lactococina 972 <sup>a</sup>	Quesos artesanales asturianos
<i>Lactobacillus sakei</i> Lb 706 <sup>c</sup>	Sakacina A <sup>c</sup>	Aislada de productos cárnicos <sup>c</sup>
<i>Lactobacillus sakei</i> 251 <sup>d</sup>	Sakacina B <sup>d</sup>	Salchicha seca griega <sup>d</sup>
<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH 1174	Curvacina A <sup>b</sup>	Productos cárnicos fermentados (salchicha)
<i>Streptococcus macedonicus</i> ACA-DC 198	Macedocina <sup>e</sup>	Aislado del queso griego tradicional (Kasseri)
<i>Weissella cibaria</i> 110	Weissellicina 110 <sup>f</sup>	Pescado fermentado de Tailandia "Plaa-Som"
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> FR 52	Mesenterocina 52 <sup>g</sup>	Leche cruda
<i>Streptococcus bovis</i> HJ50	Bovicina HJ50 <sup>h</sup>	Leche cruda
<i>Streptococcus macedonicus</i>	Macedocina <sup>i</sup> y lantibióticos <sup>i</sup>	Quesos fermentados
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricina <sup>j</sup>	Cerveza de sorgo

a) Martínez, 1996

b) Messens *et al.* 2003

c) Schillinger *et al.* 1989

d) Samelis *et al.* 1994.

e) Poirazi *et al.* 2006

f) Srionnual *et al.* 2007

g) Mathieu *et al.* 1993

h) Xiao *et al.* 2004

i) Papadelli, 2007

j) Van Reenen *et al.* 1998

### 2.3.2 Clasificación

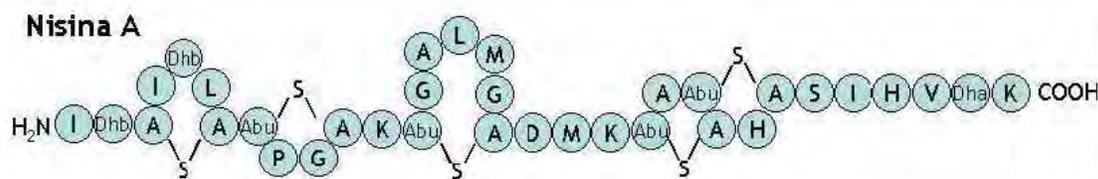
Las BAL son capaces de producir distintos tipos de bacteriocinas. La mayoría de estas bacteriocinas son péptidos catiónicos, hidrofóbicos o anfifílicos, compuestos de 20 a 60 aminoácidos (Nes y Holo, 2000). Los aminoácidos que le dan a la proteína sus características hidrofóbicas y catiónicas son: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina, triptófano (hidrofóbicos); lisina, arginina e histidina (catiónicos). Estas bacteriocinas han sido agrupadas según sus diversas características, tales como: espectro de inhibición, mecanismo de acción, estructura química, tamaño y resistencia a la temperatura (Álvarez, 2008).

Klaenhammer (1993) propuso cuatro clases de bacteriocinas producidas por BAL en función de sus características estructurales y su actividad biológica.

La clase I son los lantibióticos. Grupo integrado por péptidos termoestables (<5 kDa), caracterizados por la presencia de deshidroaminoácidos y aminoácidos tioéter (deshidroalanina, deshidrobutirina, lantionina y B-metil-lantionina) en su estructura; que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. El ejemplo más conocido es la nisina (Meghroun *et al.* 1999).

Con base a las características estructurales y su modo de acción, los lantibióticos han sido subdivididos en dos subgrupos: A y B. Los lantibióticos tipo A inhiben a las células sensibles por despolarización de la membrana citoplasmática, son mas grandes que los lantibióticos tipo B y su tamaño varía entre 21 y 38 aminoácidos.

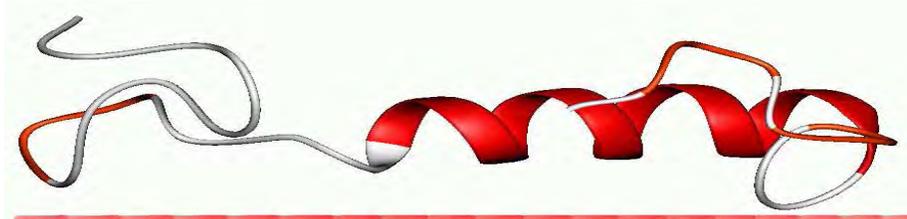
La nisina es un lantibiótico de tipo A (Figura 2) y es la bacteriocina mejor estudiada de las bacterias Gram positivas. Los lantibióticos de tipo B tienen una estructura secundaria más globular y no exceden los 19 aminoácidos. Los lantibióticos de tipo B funcionan a través de inhibición enzimática. Un ejemplo es la mersacidina, la cual interfiere con la biosíntesis de pared celular.



**Figura 2.** Estructura molecular de un lantibiótico. La nisina A es una molécula típicamente alargada formada por péptidos flexibles (tipo A) que actúan rompiendo la integridad de la membrana. Tomado de: McAuliffe *et al.* 2001.

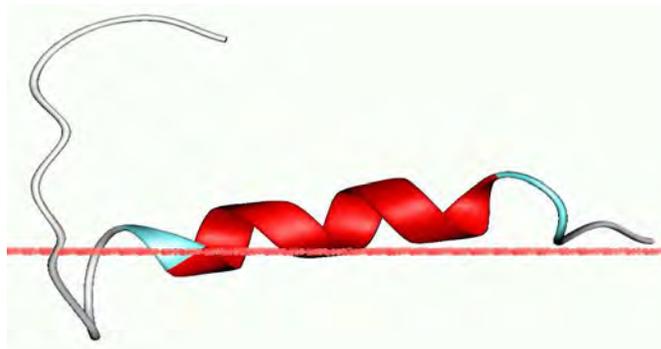
Las bacteriocinas de las BAL de clase II (No lantibióticos) son también pequeñas, con una variación de tamaño de 30 a 60 aminoácidos, son estables al calor y no contienen lantionina en los péptidos. Se han propuesto varios subgrupos dentro de esta clase de bacteriocinas (Nes *et al.* 1996; Van Belkum y Stiles, 2000) pero su naturaleza heterogénea hace que una inclusión en una única clase sea complicada, y se subclasifican en 3 grupos:

La clase IIa: Es el grupo más grande y sus miembros se distinguen por tener una actividad compartida contra *Listeria monocytogenes*. Semejante a los lantibióticos de tipo A, las bacteriocinas de clase IIa actúan a través de la formación de poros en la membrana citoplasmática (Figura 3).



**Figura 3.-** Sakacina P, bacteriocina clase IIa, producida por *Lactobacillus sake* (Tichaczek *et al.*, 1992) imagen tomada de OPM Database: *Lactobacillus sake*

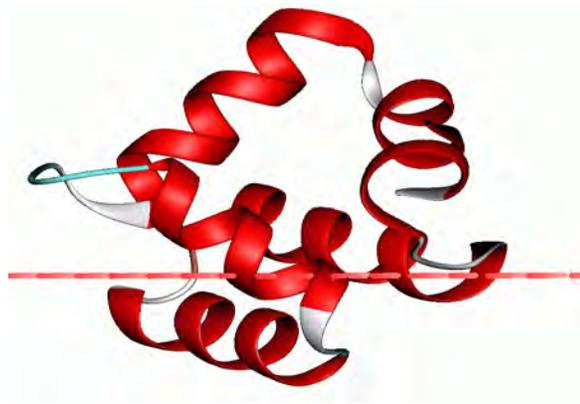
La clase IIb: La lactocina G y la lactocina M, forman poros en las membranas de sus células blanco y están compuestas por dos proteínas que funcionan complementariamente, un ejemplo es la figura 4. Cotter *et al.* (2005), proponen dos subgrupos más, aparte de los dos antes mencionados, clases IIc y IId, que serían:



**Figura 4.** Plantaricina A, bacteriocina clase IIb, producida por *Lactobacillus plantarum* (Nissen-Meyer, 1993) imagen tomada de OPM Database: *Lactobacillus plantarum*

La clase IIc: Las bacteriocinas pertenecientes a esta clase se agrupan sobre la base de presentar la unión covalente de sus extremos C y N, dando lugar a una estructura cíclica. Si bien hay pocas bacteriocinas cíclicas descritas, los autores proponen dos

subdivisiones en esta clase con base en el porcentaje de similitud en la secuencia de aminoácidos: la subclase *c (i)*, que comprende la enterocina AS-48 (Figura 5) y la circularina A (no perteneciente a las bacteriocinas de las BAL); y la subclase *c(ii)*, que comprende la gasicina A, reuterina 6, la butirivibriocina AR10 (no perteneciente a las bacteriocinas de las BAL) y, aunque aún no se ha determinado su estructura circular, la acidocina B. Algunos otros ejemplos son: enterocina P, B y L50, que son péptidos conformados por grupos tiol (-SH) activos que requieren cisteína reducida para activarse.



**Figura 5.** Enterocina AS-48, bacteriocina clase IIc, producida por *Enterococcus faecalis* (Gonzalez *et al.* 2000) imagen tomada de OPM Database: *Enterococcus faecalis*

La clase IIc: Incluye el resto de pequeñas bacteriocinas no lantibióticos formadas por un péptido lineal único.

La clase III: Se trata de bacteriocinas complejas en cuanto a su actividad y/o su estructura proteínica, sensibles al calor. Como ejemplo cabe citar las helveticinas J y V y la lactocina B.

Actualmente este grupo también puede encontrarse bajo la denominación de bacteriolisinas y no se aconseja su inclusión entre las bacteriocinas (Cotter *et al.* 2005).

La clase IV se caracteriza por incorporar carbohidratos o lípidos en la molécula para tener actividad. Estas bacteriocinas incluyen glicoproteínas, lipoproteínas y glicolipoproteínas. Algunos ejemplos incluyen la leuconocina S y la lactocina 27 (Upetri, 1975).

Las bacteriocinas mejor estudiadas de las BAL son las de las clases I y II, posiblemente debido a que al ser termorresistentes son más adecuadas para ser usadas en conservación de alimentos.

En la tabla 3 se observa la clasificación y características por grupo y subdivisión de las bacteriocinas.

**Tabla 3.** Clasificación y características de bacteriocinas por grupo (Klaenhammer, 1993 y Cotter *et al.* 2005).

Clase de bacteriocina	Características	Subgrupos	Características de subdivisión	Ejemplos
Clase I (lantibióticos)	Péptidos termoestables (<5 kDa), aminoácidos no comunes por deshidratación de serina y treonina, con la posterior adición de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidro-aminoácidos.	la	Inhiben a las células sensibles por despolarización de la membrana citoplasmática, estos son mas grandes que los lantibióticos tipo B	nisina
		lb	Tienen una estructura secundaria más globular y no exceden los 19 aminoácidos. Funcionan a través de inhibición enzimática.	mersacidina
Clase II (no lantibióticos)	Su tamaño va de 30 a 60 aminoácidos (<10 kDa) , son estables al calor y no contienen lantionina ni aminoácidos modificados en los péptidos	IIa	Es el grupo más grande y se distingue por tener una actividad compartida contra <i>Listeria monocytogenes</i> .	pediocina PA-1
		IIb	Son formadores de complejos que consisten en dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana.	Lactococina A Lactococina B
		IIc	Presentan la unión covalente de sus extremos C y N, dando lugar a estructuras cíclicas.	Divergicina
Clase III	Son péptidos grandes, mayores de 30 kDa. Bacteriocinas complejas en cuanto a su actividad y/o su estructura proteínica; son sensibles al calor.			helveticinas J y V,
Clase IV	Se caracterizan por incorporar carbohidratos o lípidos en la molécula para tener actividad. Estas bacteriocinas incluyen glicoproteínas, lipoproteínas y glicolipoproteínas.			leuconocina S lactocina 27

### 2.3.3 Características de las bacteriocinas

Las bacteriocinas de las clases I y II de son estables al calor y a pH ácido; sin embargo la resistencia al calor esta en función del pH en el que se encuentran (Tabla 4).

Algunas características importantes de ciertas bacteriocinas están relacionadas con su carga neta. La primera es que muchas bacteriocinas tienen mayor actividad bacteriana a un pH menor a 5 y la segunda es que su adsorción a la superficie celular de las bacterias sensibles es dependiente del pH, con una máxima adsorción a pH=6 o mayor y con una mínima a un pH cercano a 2, lo cual es una ventaja ya que la mayoría de los alimentos fermentados, mantienen un pH ácido, mismo que facilitaría la acción de la bacteriocina frente al microorganismo sensible.

La termorresistencia de las bacteriocinas permite que éstas permanezcan activas después de los tratamientos térmicos, como por ejemplo la pasteurización; este tratamiento se lleva a cabo a 63°C por 30 min. La termorresistencia es una ventaja de algunas bacteriocinas (Zapata *et al.* 2009), la cual puede ser debida a que son estructuras globulares pequeñas y a que tienen enlaces entrecruzados estables.

**Tabla 4.** Propiedades de algunas bacteriocinas de las clases I y II (Chen y Hoover, 2003).

Clase	Bacteriocina	Propiedades
Clase I	Lactacina A	Estable a 100°C por 10 min a pH=5, 90°C por 10 min a pH=7
	Nisina	Estable a 121°C y calentamiento prolongado a pH=2, llega a ser menos estable a pH=5.7
	Plantaricina C	Estable a 100°C por 60 min, 121°C por 10 min, estable a pH ácido y neutro.
Clase II	Pediocina MXVK133	Estable a 121°C por 15 min, pH=6 y almacenamiento a 20°C
	Bavaracina A	Estable 100°C por 60 min y pH= 2 - 9.7
	Lactococcina MMFII	Estable a 70°C por 30 min a pH= 5 - 6.
	Pediocina PA-1	Estable a 80°C por 60 min a pH= 4-6.
	Pediocina 126	Estable a 100° por 120 min a pH=2-3.

Debido a que la mayoría de las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas tienen mayor efecto a un pH bajo, otra estrategia sería encontrar más bacteriocinas pertenecientes a BAL y el posible uso de estas bacteriocinas contra microorganismos resistentes a la acidez.

### **2.3.4 Producción de bacteriocinas**

La producción de algunas bacteriocinas puede ser favorecida bajo ciertas condiciones de crecimiento. Por ejemplo, las condiciones de incubación, como son la temperatura, el pH y el tiempo de incubación, influyen fuertemente en la producción de bacteriocinas activas. Las condiciones óptimas de producción deben ser determinadas para cada organismo productor (Carolissen-Mackay, 1997).

La composición del medio de crecimiento también afecta ampliamente en la producción de bacteriocinas (De Vuyst, 1995). En general, los medios complejos que contienen una fuente rica en nitrógeno, son óptimos para el aumento de producción de muchas bacteriocinas (Yang *et al.* 1994). Por ejemplo, la producción de bacteriocinas de bacterias lácticas se ve favorecida en medios que contienen cantidades significantes de péptidos con peso molecular en el intervalo de 3000 a 6000 Da para su sencilla digestión.

### **2.3.5 Factores de producción.**

La producción de bacteriocinas puede depender del ambiente en el que se desarrolle la bacteria productora y de la actividad fisiológica de la misma. La mayoría de las bacteriocinas estudiadas hasta la fecha, producen a las bacteriocinas como metabolito primario y, en consecuencia, su producción está en función del aumento en la biomasa. Por otro lado, el control del pH a lo largo de la fermentación puede resultar en títulos más altos de actividad (De Vuyst y Vandamme, 1994).

### **2.3.6 Mecanismo de producción.**

Las bacteriocinas se sintetizan en los ribosomas a partir de transcritos procedentes de la expresión del correspondiente gen estructural. Se traducen como prepéptidos inactivos con una extensión amino terminal de 24 a 30 residuos en el caso de los lantibióticos o más corta (18 a 24 residuos) en las bacteriocinas no lantibióticas.

### **2.3.7 Translocación de proteínas**

Las bacterias secretan diversas proteínas entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y enzimas hidrolíticas que requieren en su ciclo de vida. La mayoría de los estudios se han desarrollado con bacterias Gram negativas, en las que las proteínas a translocarse tienen que atravesar dos barreras lipídicas separadas por el espacio periplásmico y la capa de peptidoglicano: la membrana citosólica o membrana interna (MI), y la membrana externa (ME) que está compuesta principalmente por lipopolisacáridos. En

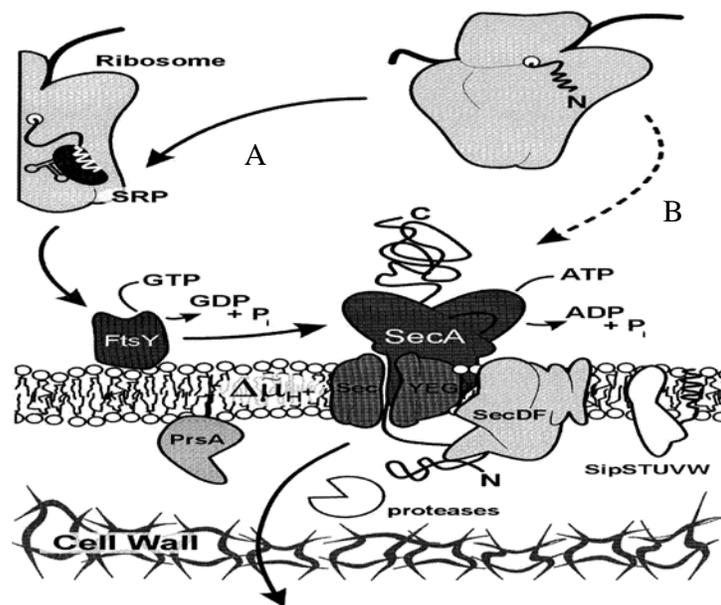
---

las bacterias Gram positivas la secreción de proteínas hacia el exterior celular requiere del transporte a través de una sola membrana sin embargo, dicho proceso ha sido poco estudiado en estos microorganismos. Recientemente, con la secuenciación de los genomas de diferentes bacterias Gram positivas, se ha encontrado que muchos de los genes que participan en el proceso de secreción y que originalmente fueron identificados en *Escherichia coli*, también están presentes en estos organismos. Los componentes de la maquinaria principal de translocación (denominada sistema Sec) en bacterias Gram negativas y Gram positivas muestran un alto grado de similitud, lo que sugiere que el mecanismo funcional puede ser el mismo.

Los sistemas de secreción en las bacterias Gram negativas han sido clasificados en cinco grupos principales: secreción tipo I, II, III, IV y los autotransportadores. Dicha clasificación se basa en la naturaleza molecular de los mecanismos de transporte y las reacciones que éstos catalizan. Sin embargo, estos grupos se pueden aún subdividir en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que se utilice para el transporte a través de la membrana plasmática. Las vías Sec-dependientes, que utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino terminal; y las Sec-independientes en las que los sustratos se pueden translocar directamente desde el citosol hasta el espacio extracelular sin que exista un intermediario periplásmico, ni una secuencia señal en el amino terminal (González y Dreyfus, 2003).

### 2.3.8 Transporte y secreción de proteínas

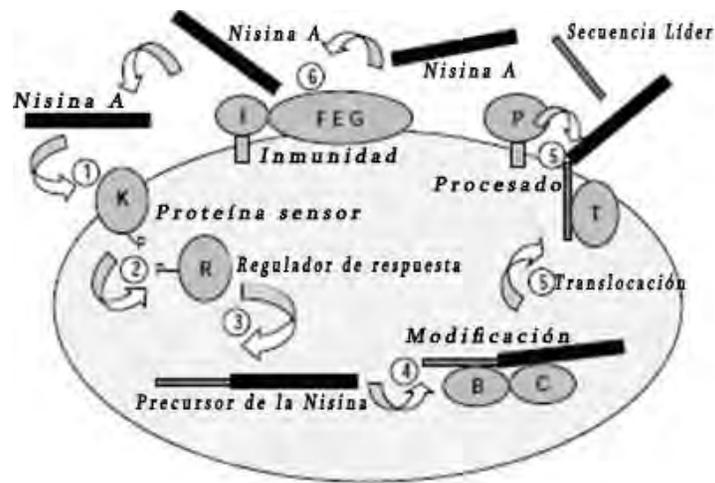
Los extremos amino terminales de las pre-probacteriocinas sintetizadas por las BAL son de dos tipos: (a) secuencia líder del tipo “doble glicina” (Havarstein *et al.* 1995); o (b) secuencia del tipo “péptido señal” (SP). Por ello, se distinguen dos tipos de procesado: transporte y secreción de las bacteriocinas. El primero, mediado por transportadores ABC o sistema de transporte dedicado (DTS), en el caso de pre-probacteriocinas sintetizadas con una secuencia líder del tipo “doble glicina”; y el segundo, mediante la ruta general de secreción (GSP) o sistema sec, en el caso de las pre-probacteriocinas sintetizadas con un “péptido señal” (Gutiérrez, 2005) (Figura 6).



**Figura 6.** La preproteína alcanza la translocasa con ayuda de la SRP (Signal Recognition Protein) (A) o por sí misma (B). Las proteasas que reconocen el péptido señal (SP) de las proteínas de secreción se localizan cerca de la membrana o en la pared celular. Tomado de: Van Wely *et al.* 2001.

### **2.3.9 Procesado, transporte y secreción de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas mediante transportadores ABC o sistema dedicado de transporte (DTS)**

El grupo amino terminal de la mayoría de las bacteriocinas de la Clase II es del tipo secuencia líder, cuya aparente función es la de inactivar la bacteriocina en el interior de la célula bacteriocinogénica, así como aportar la señal de reconocimiento para el procesado, transporte y secreción de la bacteriocina madura al espacio extracelular. Como se mencionó antes, el procesado, transporte y secreción de bacteriocinas con una secuencia líder y un lugar de procesado del tipo "doble-glicina" (Havarstein *et al.*, 1995), se encuentra mediado por un translocador de membrana de la familia de transportadores ABC. No obstante, estos transportadores difieren de los transportadores ABC clásicos, debido a que poseen tres dominios: uno de integración a la membrana, otro de unión al ATP citoplasmático y un último involucrado en la hidrólisis de la pre-probacteriocina con la subsecuente liberación de su secuencia líder. El último dominio de aproximadamente 150 aminoácidos, y que contiene residuos conservados de cisteína e histidina, reconoce al precursor o pre-probacteriocina e hidroliza la secuencia líder, de modo que el transportador ABC no sólo interviene en el transporte, sino también en el reconocimiento y procesado de la bacteriocina (Gutiérrez, 2005) (Figura 7).



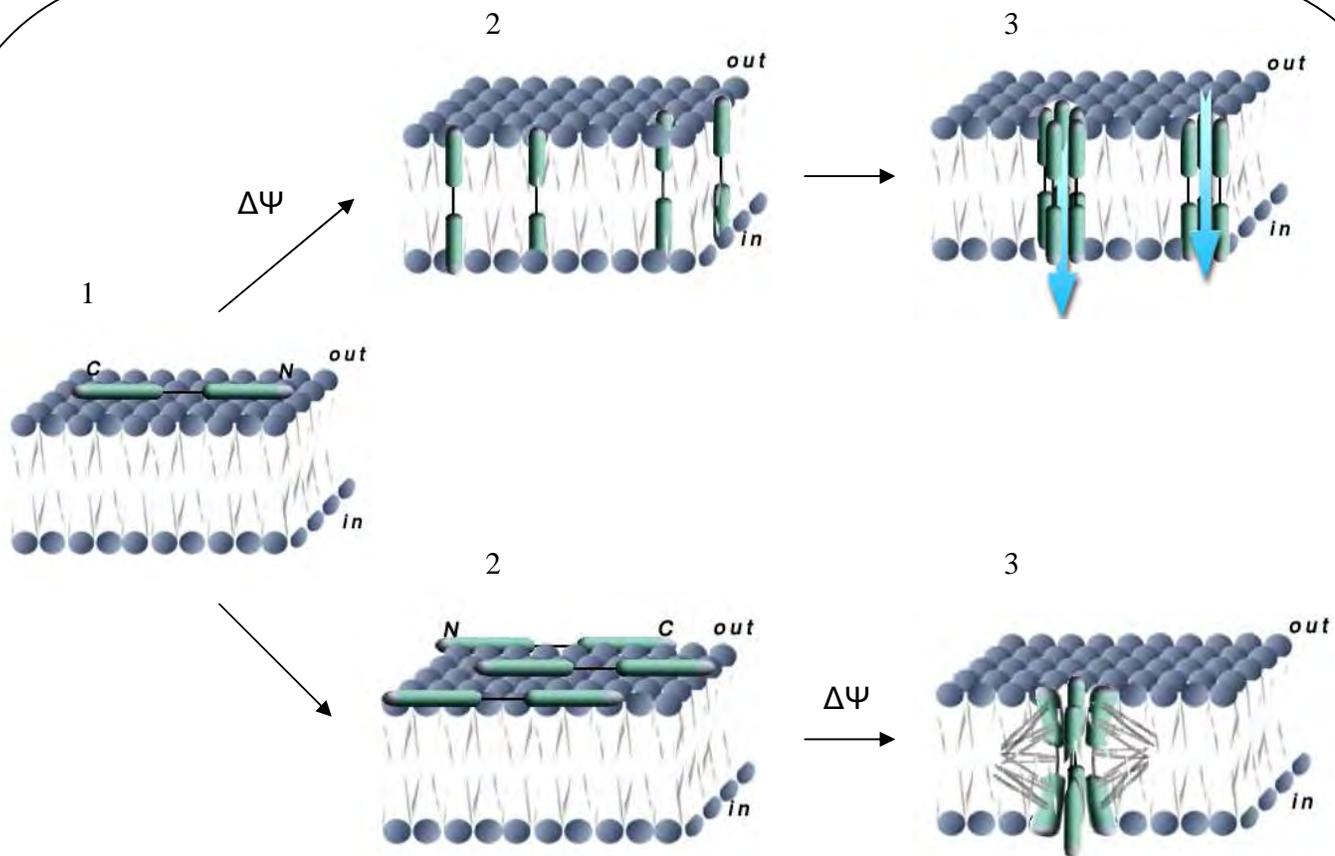
**Figura 7. Modelo de biosíntesis de la nisina A:** (1) en presencia de nisina extracelular, la proteína sensor histidín-quinasa NisK se fosforila; (2) el grupo fosfato de la proteína NisK fosforilada se transfiere a la proteína reguladora de respuesta NisR, que actúa como un activador transcripcional (3) la proteína NisR fosforilada activa la transcripción de la síntesis del precursor de la nisina y del resto de enzimas que intervienen en la biosíntesis del antibiótico (Nis B y Nis C); (4) el péptido pre-pronisina A es modificado por las enzimas Nis B y Nis C; (5) el precursor modificado es procesado y transportado por la proteasa NisP por transportadores ABC NisT, originando la nisina madura; (6) las proteínas NisI, NisF, NisE y NisG evitan daño a la célula productora de la actividad bactericida de la nisina. Las proteínas NisK y NisR se encuentran siempre en el interior de la célula ya que la transcripción de sus genes se encuentra regulada por un promotor constitutivo. A diferencia de otros sistemas de regulación, la nisina A extracelular actúa como factor de inducción. Tomado y modificado de: Kuipers *et al.* 1995.

## 2.4 Mecanismo de acción

Las bacteriocinas de la clase I también llamados antibióticos, han demostrado que tienen la capacidad de inhibir a bacterias Gram positivas, ya que éstas actúan a nivel de membrana, causando un desequilibrio en la fuerza protón motriz de la célula. Se ha sugerido que en la membrana citoplasmática es donde ocurre esta acción (Jung y Sahl, 1991).

La formación del poro a partir de los antibióticos tipo A comienza en la membrana citoplasmática, por medio de la asociación de la bacteriocina a la membrana y una

posterior inserción, dando como resultado la formación del poro. La nisina A ha demostrado que se asocia con la carga negativa de los fosfolípidos y con los liposomas de estos fosfolípidos. Esto indica que además de las interacciones hidrofóbicas, hay una asociación entre los tres residuos de lisina con carga positiva y los fosfolípidos aniónicos fosfatidilglicerol y/o difosfatidilglicerol (Abee, 1995) (Figura 8).



**Figura 8.** Modelos de formación de poros por la nisina. La molécula de la nisina con N-terminal (N) contiene 1-19 aminoácidos con residuos que contienen una lisina (+). Esta conectado a través de una bisagra flexible hasta la región con 21-34 aminoácidos, C-terminal (C), que contiene dos lisinas (++)). El mecanismo de barril (arriba) consta de tres etapas distintas: (1) La unión de moléculas de nisina a la membrana, (2)  $\Delta\Psi$  (interior negativo) inserción dependiente de la membrana, y (3) la agregación de los monómeros, dando como resultado la formación de poros llenos de agua.

En el segundo modelo (abajo), los monómeros de la nisina están asociados a la superficie de la membrana (2), seguido  $\Delta\Psi$ , inserción dependiente de la lisina dentro de la membrana por las cabezas de los fosfolípidos polares (aniónicos) incorporados dentro del poro (3). (Modificado de Abee, 1995).

\* $\Delta\Psi$  penetración de ambos residuos a través de la membrana.

## 2.5 Métodos de detección

Los métodos de detección de la actividad de las bacteriocinas se dividen en dos clases:

### **Métodos directos.**

Los métodos directos se utilizan para medir la actividad antimicrobiana de todos los metabolitos producidos por BAL y consiste en incubar la bacteria productora de compuestos antimicrobianos simultáneamente con el organismo sensible; la demostración del antagonismo depende de la liberación en el medio de un inhibidor durante la fase de crecimiento del organismo de prueba (Álvarez, 2008).

El método de pozos es el más común para demostrar la detección de la producción de bacteriocinas o efectividad de la bacteriocina frente a un microorganismo sensible. Consiste en inocular sobre una placa de agar, pozos con cultivo que contienen a la bacteria productora de la bacteriocina, posteriormente se adiciona una sobrecapa de agar que contiene al microorganismo sensible. Zonas de inhibición en forma de halos en el contorno del crecimiento de la bacteria, son evidencia presuntiva de la producción de bacteriocinas (Lewus *et al.* 1992), y en caso de haber colocado sólo la bacteriocina, es indicativo de la efectividad de ésta frente al microorganismo sensible.

**Métodos indirectos.**

Consiste en hacer crecer, en primer lugar, la cepa productora de la sustancia inhibidora, de esta forma se permite que libere el antagónico; después las células se eliminan o inactivan y finalmente se inocula el microorganismo indicador permitiendo su crecimiento en el medio.

Los métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), son métodos empleados para la detección de los genes responsables de la producción de bacteriocinas y la regulación en cultivos bacterianos. Mediante esta técnica se han identificado algunos genes responsables de la síntesis de bacteriocinas (Chen y Hoover, 2003).

La técnica de difusión en agar utiliza el sobrenadante que se obtiene del cultivo activo del caldo donde se haya inoculado la cepa productora de bacteriocinas, los cuales con colocados en pozos efectuados sobre un medio que ha sido inoculado con el microorganismo sensible, posterior a la incubación se miden los halos de inhibición obtenidos.

## Justificación

Las bacteriocinas obtenidas de bacterias ácido lácticas son de importancia, ya que la mayoría de estas bacterias están presentes en muchas fermentaciones. El pozol contiene un gran número de bacterias lácticas presentes como parte de su microbiota natural. Es posible que dentro de las BAL aisladas del pozol, exista actividad bacteriocinogénica capaz de inhibir bacterias patógenas, como las cepas de *E. coli* aisladas del pozol que no se inhiben a valores bajos de pH. Esto podría ser utilizado en un futuro como estrategia en la conservación e inocuidad del pozol y de otros alimentos.

### 3. Hipótesis

Si las bacterias ácido lácticas aisladas del pozol producen bacteriocinas y existen bacterias patógenas que son resistentes a la acidez, entonces, será posible:

- Encontrar la inhibición de bacterias patógenas resistentes a la acidez por cepas de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas

## 4. Objetivos

### Objetivo general:

Evaluar la producción de bacteriocinas por bacterias lácticas aisladas del pozol de Villahermosa, Tabasco.

### Objetivos particulares:

- 1) Determinar la producción de las bacteriocinas y su acción contra otras bacterias Gram positivas.
- 2) Investigar la producción de bacteriocinas de las bacterias lácticas aisladas del pozol y su actividad contra bacterias Gram negativas, que incluya bacterias patógenas resistentes a la acidez provenientes del pozol.
- 3) Averiguar, mediante una prueba de reto, si una bacteria láctica productora de bacteriocinas es capaz de inhibir una bacteria patógena de importancia en alimentos.

## 5. Metodología

### 5.1 Microorganismos

#### 5.1.1 Bacterias Ácido lácticas (BAL)

Las BAL empleadas pertenecen a una colección de bacterias aisladas de pozol procedente de Villahermosa Tabasco. Se usaron 80 cepas que fueron aisladas de un estudio anterior (Pilatasig, comunicación personal) y se conservan en glicerol a - 65°C.

#### 5.1.2 Microorganismos sensibles

Para evaluar la producción de bacteriocinas de las bacterias lácticas, se utilizaron las siguientes bacterias que se denominaron indicadoras. Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus cereus* y Gram negativas: *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*. Sus características más relevantes, procedencia y referencias se detallan en las tablas 5 y 6.

**Tabla 5.** Microorganismos sensibles empleados en este trabajo.

Espece	Clave de la cepa y origen
<i>Salmonella</i> Typhimurium	14028 <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923 <sup>a</sup>
<i>Proteus mirabilis</i>	P13 <sup>a</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<sup>a</sup>
<i>Micrococcus luteus</i>	9341 <sup>a</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	11778 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Clave de la colección de microorganismos de la Facultad de Química, UNAM

**Tabla 6.** Cepas de *E. coli* aisladas de pozol (Sainz, 2001) y usadas como bacterias indicadoras.

Especie	Serotipo	Clave de cepa
<i>Escherichia coli</i>	O8 :H7 <sup>a</sup>	95238 <sup>c</sup>
<i>Escherichia coli</i>	O8:H10	95268 <sup>c</sup>
<i>Escherichia coli</i>		95269 <sup>c</sup>
<i>Escherichia coli</i>	O88:H25 <sup>b</sup>	95217 <sup>c</sup>
<i>Escherichia coli</i>		95222 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Serogrupo identificado como enterotoxigénico ETEC.

<sup>b</sup> Serotipo sugerido dentro de las EPEC.

<sup>c</sup> Clave de la colección de microorganismos del Depto. de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM.

### 5.1.3. Activación y conservación de BAL

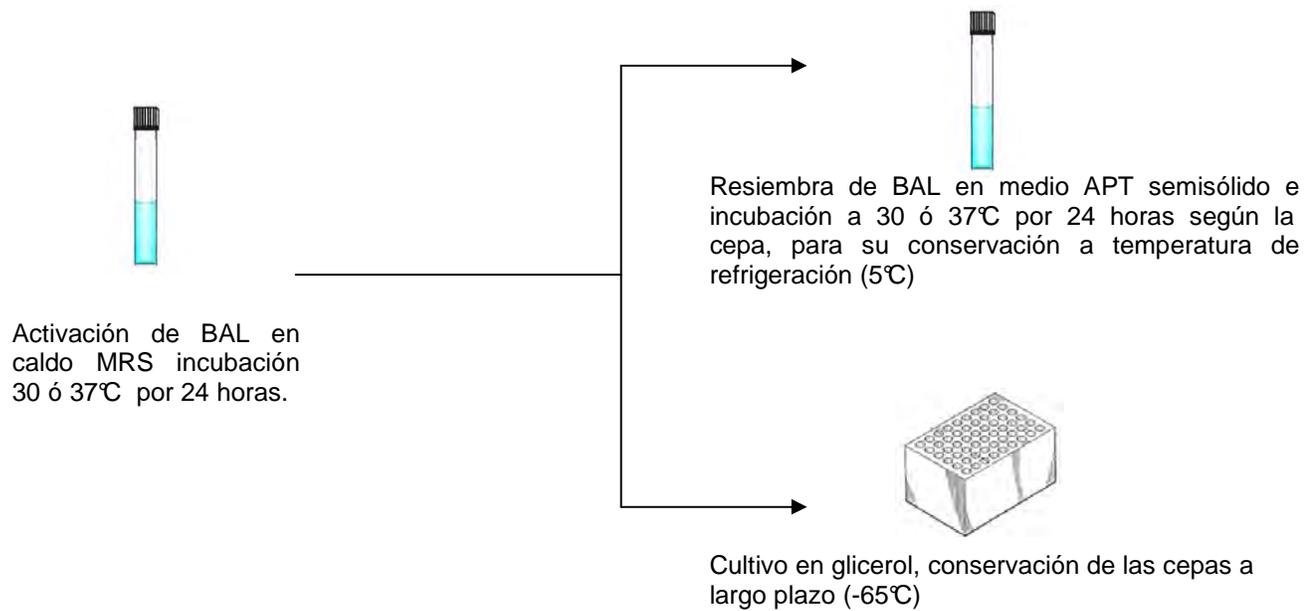
Las 80 cepas de bacterias lácticas pertenecientes a la colección se activaron en caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe, OXOID ®) a 30°C por 24 horas (Cepas BAL: 10, 33, 45, 48, 49, 62, 64, 65, 74g, 71 y 80) ó 37°C (el resto de las 80 cepas). La mayoría de las cepas presentaron crecimiento adecuado cuando se incubaron a 37°C.

Para activar las cepas, se tomaron 20 µL del inóculo conservado en congelación y se depositaron en 4 mL de caldo MRS, el medio inoculado se incubó a 30°C ó 37°C por 24 horas. Cuando las cepas estuvieron activas se les conservó a mediano plazo, en medio APT (DIFCO®) semisólido (Anexo A). Para ello se tomó una asada del inóculo activo y se colocó en este medio por picadura, dicho medio se incubó a 30 o 37°C, por 24 horas. El cultivo se conservó en refrigeración (5°C). Para la conservación de las cepas a largo plazo se tomaron 1.2 mL del inóculo activo a partir del caldo MRS y se depositaron en criotubos con 0.3 mL de glicerol, la mezcla se mantuvo a - 65°C como se muestra en la figura 9.

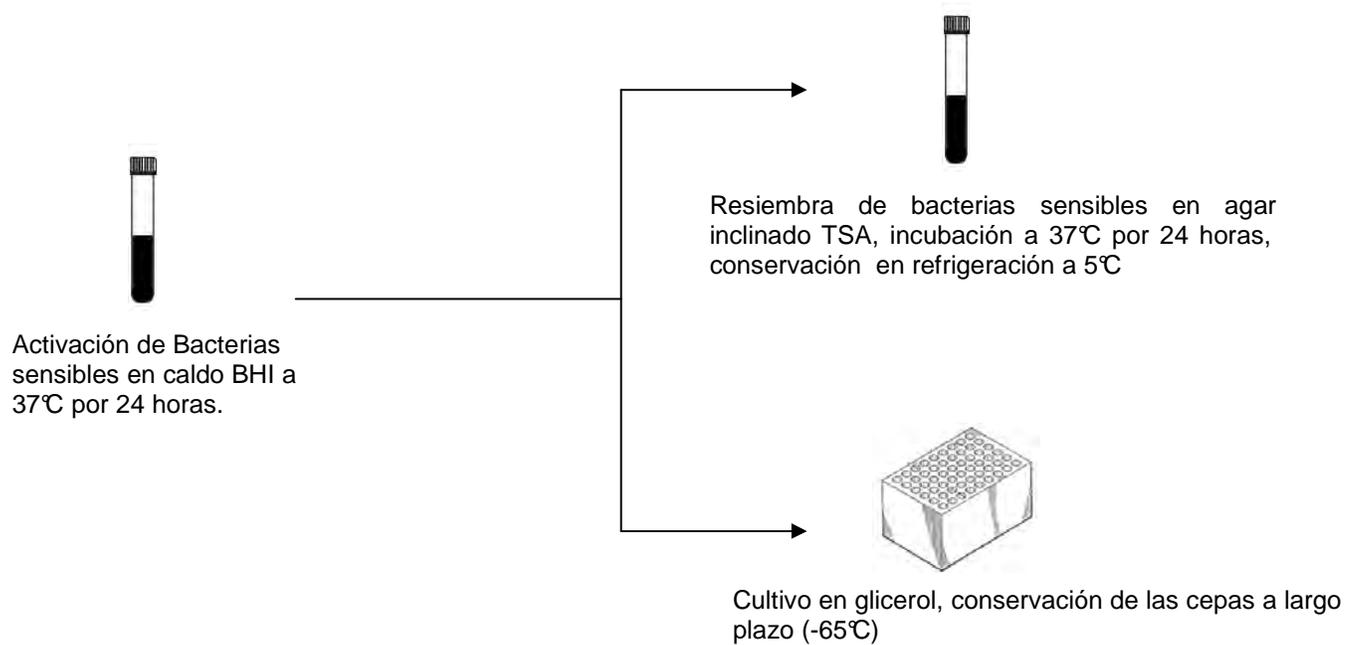
#### 5.1.4 Activación, pureza y conservación de microorganismos sensibles.

Para activar las cepas, se tomaron 20 µL del cultivo en glicerol y se depositaron en 4 mL de caldo BHI (Infusión Cerebro-Corazon, OXOID ®), incubándoseles a 37°C por 24 horas. Cuando las cepas estuvieron activas, se les conservó a mediano plazo, en agar inclinado TSA (Agar Soya Trypticaseina, OXOID ®). Para ello se tomó una asada del inóculo activo y se sembró por estría en el medio TSA. A continuación, los tubos se incubaron a 37°C por 24 horas para su posterior conservación a temperatura de refrigeración (5°C). Para la conservación de las cepas a largo plazo se tomaron 1.2 mL del inóculo activo a partir del caldo BHI y se depositaron en criotubos con 0.3 mL de glicerol, la mezcla se mantuvo a - 65°C (Figura 10).

Para comprobar la pureza de las cepas se realizó siembra por agotamiento de los microorganismos activos a partir de caldo BHI: *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* en agar nutritivo (OXOID ®) y las cinco cepas de *Escherichia coli* en agar eosina azul de metileno (OXOID ®), las placas con el microorganismo se incubaron a 37°C por 24 horas. Para la prueba de la catalasa, se tomó una colonia aislada y se colocó en un portaobjetos, se depositó una gota de peróxido de hidrógeno al 30% cubriendo totalmente la colonia, el desprendimiento de gas indica una prueba positiva. La tinción de Gram, se llevó a cabo de acuerdo con la referencia según lo establecido en el protocolo (Anexo 1).



**Figura 9.** Preparación de bacterias ácido lácticas para su conservación.



**Figura 10.** Preparación de bacterias sensibles para su conservación.

## 5.2 Cinética de crecimiento de los microorganismos sensibles.

Las cepas sensibles que estaban conservadas en congelación se reactivaron sembrando en caldo BHI y permitiendo su crecimiento a 37°C durante 24 horas.

Dicho cultivo sirvió como inóculo del caldo BHI, mismo que se incubó en condiciones estáticas durante 24 horas a 37°C. Cada hora se tomaron muestras de 1 ml hasta cumplir 12 horas y una última muestra se consideró a las 24 horas. Se evaluó el crecimiento de los microorganismos midiendo la densidad óptica (Absorbancia a 600 nm) con el espectrofotómetro (Spectronic 21D). Se construyeron gráficas de la absorbancia (600nm) respecto al tiempo.

## 5.3 Preparación del medio infusión cerebro-corazón amortiguado (BHI-A).

### 5.3.1 Preparación del medio BHI-A para placa

El medio BHI-A para la base de la placa, se preparó disolviendo los componentes mostrados en la tabla 7 en 1L de agua destilada. El medio se esterilizó a 121°C durante 15 min. Posteriormente se depositaron 10 mL del medio en las placas y se mantuvieron a 30°C por 24 horas antes de utilizarlo para comprobar su esterilidad.

**Tabla 7. Componentes del medio BHI-A para placa**

Componente	(g/L)
Fosfato de sodio monobásico (J.T. BAKER®)	4.3
Fosfato de sodio dibásico (J.T. BAKER®)	10
Agar bacteriológico (OXOID®)	17
Caldo BHI (OXOID®)	37

### 5.3.2 Preparación del medio BHI-A para sobrecapa

El medio BHI-A para la sobrecapa de la placa, se preparó disolviendo los componentes de la tabla 8 en un 1L de agua destilada. Una vez homogeneizado el medio, se vertieron 8 mL de medio en tubos de ensaye con tapón de rosca y se esterilizaron a 121°C durante 15 min. Los tubos con el medio estéril se mantuvieron a 30°C por 24 horas para comprobar su esterilidad.

**Tabla 8. Componentes del medio BHI-A para sobrecapa**

Componente	(g/L)
Fosfato de sodio monobásico (J.T. BAKER®)	4
Fosfato sodio dibásico (J.T. BAKER®)	10
Agar bacteriológico (OXOID®)	8
BHI (OXOID®)	15

### 5.3.3 Montaje de los medios BHI-A

La forma en que se ensambla la prueba es: sobre el medio sólido (BHI-A, placa), se colocaron los cilindros de vidrio estériles en condiciones asépticas, posteriormente se depositó el medio (BHI-A, sobrecapa) en la placa, previamente fundido a 80°C y atemperado a 40°C. Se inoculó el microorganismo sensible en la sobrecapa fundida y enseguida se vertió el medio homogeneizado en la placa esperando a que enfríe. Una vez solidificado el medio, se retiraron los cilindros para que en el pozo formado se depositaran los ácidos para la prueba de amortiguamiento ó las cepas BAL para la prueba de actividad bacteriocinogénica.

#### **5.4 Pruebas a medios amortiguados con ácido acético y láctico.**

Se usaron ácido acético y láctico como controles de la efectividad del amortiguamiento del medio BHI-A. Se probaron diferentes concentraciones de cada ácido (0.5%, 1% y 2%). La prueba consistió en depositar la sobrecapa de BHI-A fundida (atemperada a 40°C) e inoculada con 40 µL de cada microorganismo sensible previamente activado en caldo BHI. Una vez que el microorganismo se incorporó al medio, se homogeneizó el cultivo y se depositó en la placa BHI-A sobre la que previamente se habían depositado seis cilindros de vidrio con un diámetro de 1cm. Una vez que el medio de la sobrecapa solidificó, los cilindros se retiraron y se depositaron 80µL de cada una de las concentraciones de los ácidos correspondientes en los orificios (pozos) formados por los cilindros. Las placas inoculadas se incubaron a 37°C por 24 horas. La prueba para validar el medio fue: la ausencia de halos, que indicaría que el ácido difunde por el pozo y es neutralizado por los componentes del medio. En una prueba negativa se observarían halos, ya que el ácido difunde por el pozo y no es neutralizado por los componentes del medio, aunado a que se inhibiría el crecimiento del microorganismo haciendo que el medio fuese deficiente para la detección de la bacteriocina.

## **5.5 Métodos empleados en la detección de la actividad de bacteriocinas**

La detección se llevó a cabo utilizando el método de pozos.

### **5.5.1 Preparación de medios para la detección de actividad de bacteriocina**

La preparación de la placa y sobrecapa de medio BHI-A se describieron previamente en las secciones 5.3.1 y 5.3.2.

### **5.5.2 Preparación de cepas productoras e indicadoras.**

#### **5.5.2.1 Preparación de cepas productoras (BAL)**

Para activar las cepas, se tomaron 20  $\mu$ L del inóculo conservado en glicerol y mantenido en congelación (-65°C). Se depositaron en 4 mL de caldo MRS el cual fue preparado y esterilizado conforme lo indican las instrucciones del proveedor; se incubaron los medios inoculados a 30 ó 37°C por 24 horas. La presencia de turbidez en el medio indicó que el microorganismo había crecido, de lo contrario no era apto para la prueba.

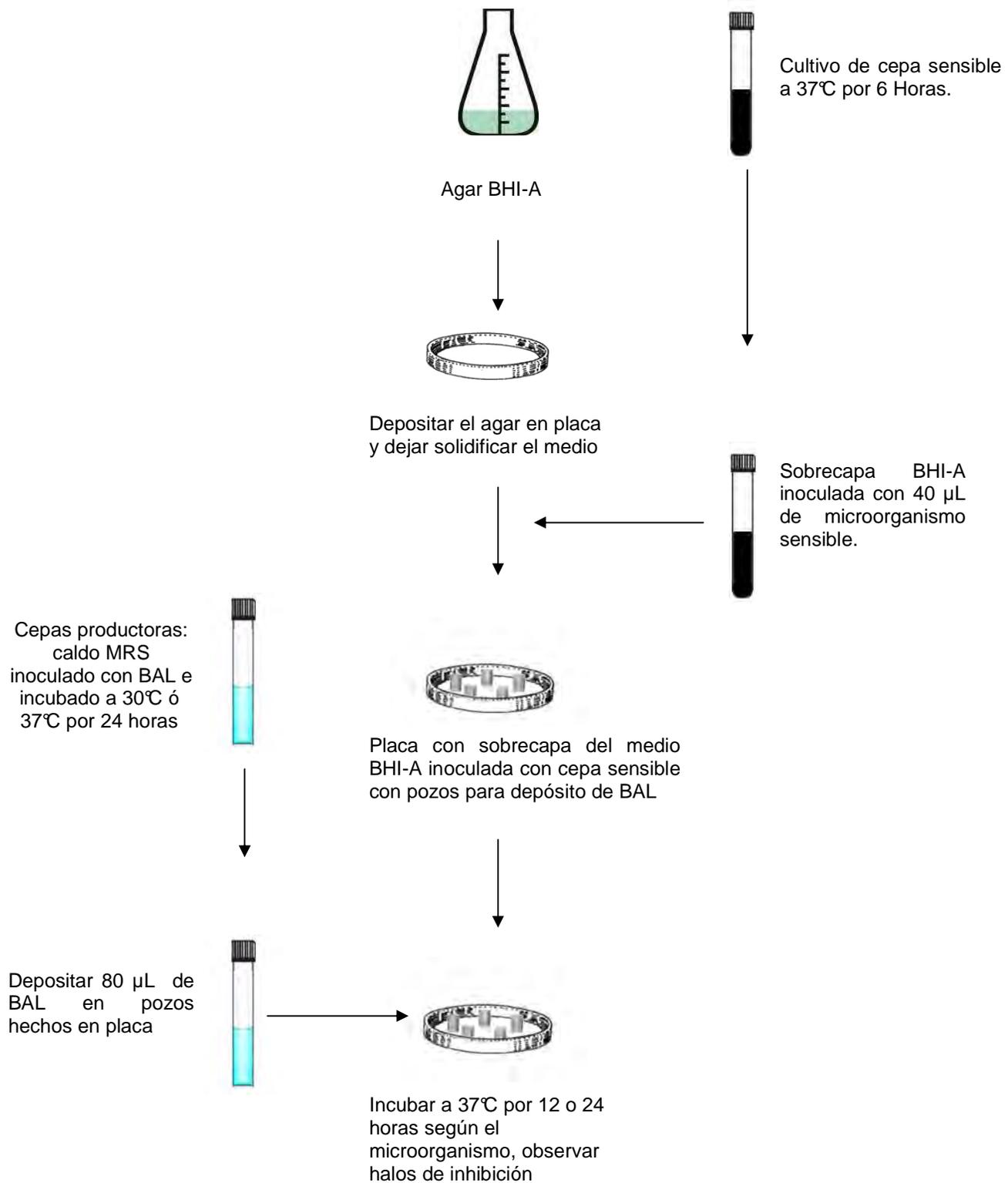
#### **5.5.2.2 Preparación de cepas indicadoras**

Para activar las cepas, se tomaron 20  $\mu$ L del inóculo conservado en glicerol y mantenido en congelación (-65°C). Se depositaron en 4 mL de caldo BHI (OXOID®), se les incubó a 37°C por 24 horas. Cuando las cepas estuvieron activas, se hizo una nueva resiembra en el mismo medio por 6 horas (microorganismo en fase exponencial llegando a la fase estacionaria). La turbidez en el medio indicó que el microorganismo había crecido transcurridas las seis horas.

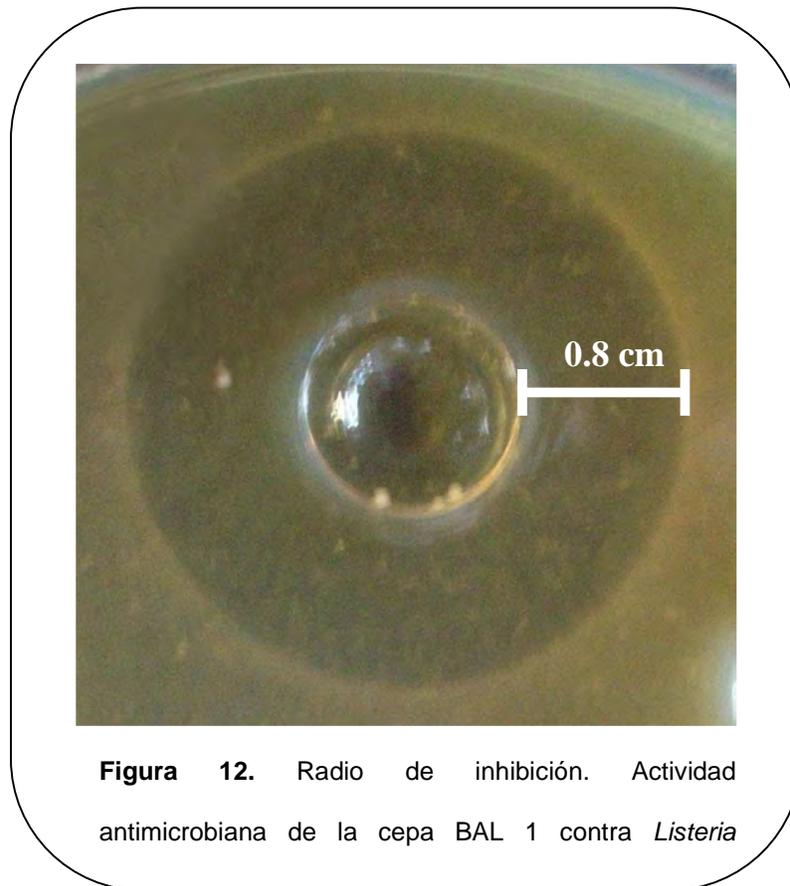
---

### 5.5.3 Determinación de la actividad bacteriocinogénica

Se prepararon placas y tubos de ensaye con medio BHI-A (en la sección 5.3 se describe su composición y elaboración). La placa de medio BHI-A se utilizó como base para colocar cinco cilindros de vidrio estériles por cada caja petri. La sobrecapa de medio BHI-A, se mantuvo atemperada a 40°C y se inoculó con 40µl de la cepa indicadora, tal como se indicó en la sección 5.4.3. El medio de la sobrecapa inoculado se vertió sobre la placa del medio BHI-A, una vez solidificada la sobrecapa, y se retiraron los cilindros en cuyos pozos formados se depositaron 80 µl de la cepa productora (BAL) a ensayar (Figura 11). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 12-18 horas. Tras el crecimiento de la cepa indicadora se observó la presencia de un halo, al cual se le midió el radio de inhibición alrededor de cada muestra o pozo, en caso de que se haya formado (Figura 12).



**Figura 11.** Preparación de placas de ensayo.



#### 5.5.4 Prueba de reto en medio MRS de una bacteria láctica productora de bacteriocina y *Salmonella* Typhimurium.

##### a) Selección de microorganismos.

El experimento se llevó a cabo con la cepa de BAL 77g (microorganismo seleccionado por presentar actividad bacteriocinogénica contra bacterias Gram positivas y negativas) y el microorganismo sensible utilizado fue *Salmonella* Typhimurium, microorganismo Gram negativo seleccionado por su alta incidencia en enfermedades transmitidas por alimentos.

b) Preparación del caldo MRS.

La preparación del caldo se realizó de acuerdo a las instrucciones descritas en el medio MRS.

c) Preparación del inóculo.

1. Reactivación de las cepas

La bacteria láctica productora fue reactivada como se mostró en la sección 5.5.2.1. Se tomaron 2.5 mL del microorganismo activo, se inocularon en 100 mL de caldo MRS con la dilución y cantidad mostrada en la tabla 9, incubándose a 37°C por 48 horas.

La bacteria sensible se reactivó como se describió en la sección 5.5.2.2. Se tomó 1 mL del microorganismo activo de la dilución correspondiente y se aplicaron 500 µL en 100 mL de caldo MRS (tabla 9), incubándose a 37°C por 48 horas.

Las condiciones de crecimiento de los microorganismos, así como la cantidad del cultivo que se aplicó en el caldo MRS se muestran en la tabla 9.

2. Concentración de bacterias en el inóculo

Se determinó la cuenta de ambos microorganismos, para saber a qué concentración se encontraba cada uno de ellos y qué dilución era indicada para la prueba. Para la cuantificación de la BAL se inoculó el medio sólido MRS con la cepa activada (24 horas de incubación) y la bacteria sensible se cuantificó inoculando el medio sólido XLD (Xilosa, Lisina y Desoxicolato, OXOID®) con un cultivo de 9 horas (Tabla 9). Para

---

obtener la cuenta en placa se hizo lo siguiente: Se tomaron 0.5mL de los medios de cultivos ya descritos (cultivo concentrado) previamente homogeneizados y se depositaron en 4.5mL de solución salina al 0.1%; se homogeneizó y se realizó el mismo procedimiento hasta una dilución de  $10^{-3}$ . Se tomaron 0.1mL de cada una de las diluciones, se colocaron en la placa y distribuyeron con una varilla metálica estéril sobre toda la superficie de los medios sólidos MRS para la BAL y XLD para la bacteria sensible. Posteriormente se incubaron a 37°C por 24 horas y se realizó el conteo de las colonias, las cuales eran pequeñas, con forma convexa, color marfil y textura cremosa para las BAL; las colonias de *Salmonella* Typhimurium en XLD eran rosas con centro negro salmón y textura cremosa.

**Tabla 9.** Condiciones de crecimiento de la cepa 77g y *S. Typhimurium* para la prueba de reto.

Microorganismo	Medio de cultivo	Tiempo de incubación (horas)	Dilución del cultivo	Cantidad de cultivo diluido a inocular en el medio	Concentración
BAL 77g	MRS	24	$10^{-1}$	500 $\mu$ L/ 20mL de cultivo	25 $\mu$ L/mL
<i>Salmonella</i> Typhimurium	BHI	9	$10^{-3}$	100 $\mu$ L/ 20mL	5 $\mu$ L/mL

d) Prueba de reto en el medio MRS.

Se prepararon los inóculos de la BAL 77g y de la bacteria sensible (*Salmonella* Typhimurium) tal como se describió en la tabla 9 y se inocularon los matraces

correspondientes para cada una de las corridas en caldo MRS como se muestra en la tabla 10.

e) Corridas realizadas para la prueba de reto:

- Control negativo: se utilizó el medio sin inocular para verificar que no existiera presencia de microorganismos contaminantes. Este medio pertenecía al mismo lote de medio MRS con el cual se prepararon todos, al no haber turbidez, se asume que esta estéril.

- Controles positivos: La bacteria láctica y la bacteria sensible fueron sembrados por separado en el medio MRS. El inóculo se muestra en la tabla 10.

- Cocultivo: Ambas bacterias se inocularon en el medio MRS de acuerdo con lo presentado en la tabla 10.

**Tabla 10. Distribución de corridas para la prueba de reto**

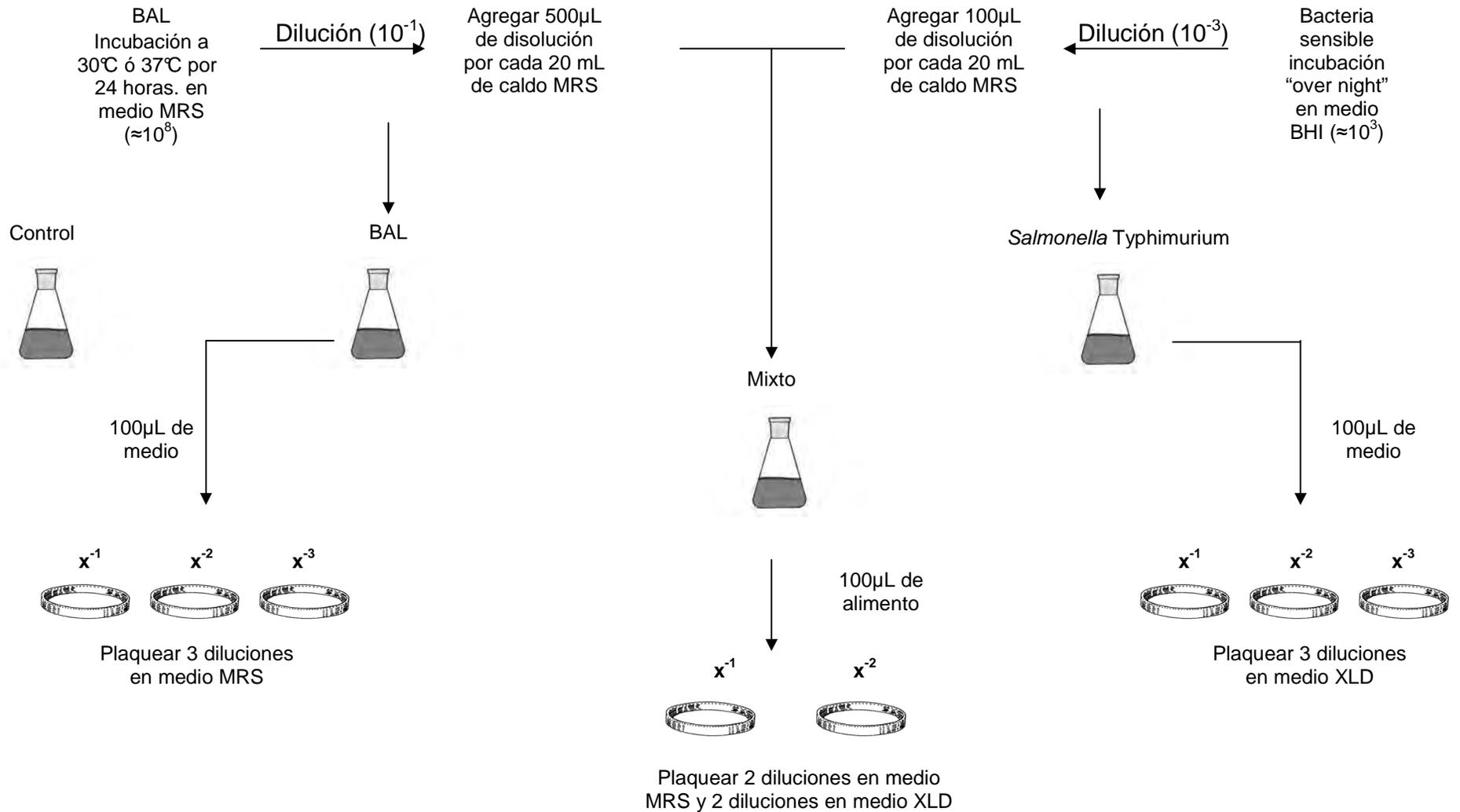
Matraz	Microorganismo
Control negativo	Ningún Microorganismo
Control positivo (BAL)	77g
Control positivo (bacteria sensible)	<i>Salmonella</i> Typhimurium
Cocultivo	77g + <i>Salmonella</i> Typhimurium

Todos los matraces se sometieron a las mismas condiciones de incubación a 37°C, por 48 horas, en condiciones estáticas. El muestreo se llevó a cabo a las 0, 12, 24 y 48 horas y se realizaron las siguientes determinaciones:

- a) Cuantificación de los microorganismos por el método de cuenta en placa. Se llevó a cabo considerando las diluciones mostradas en la tabla 11. Se inocularon 0.1mL de cada una de las muestras previamente homogeneizadas en la placa correspondiente y se distribuyeron con una varilla metálica estéril. El medio en el que se distribuyó la muestra para la BAL fue MRS y para el microorganismo sensible se utilizó XLD. Las cajas Petri con los medios se incubaron a 37°C por 48 horas (Figura 13). Para el conteo en placa, se tomaron en cuenta aquellas diluciones que tuvieron el número de colonias dentro del rango estadístico correcto. Las placas MRS tomadas en cuenta para el conteo de la BAL fueron las que tenían entre 30 y 300 colonias y las placas XLD consideradas para el conteo del microorganismo sensible fueron las que tenían entre 15 y 200 colonias. Con los datos de la cuantificación de los microorganismos se realizaron gráficas con respecto al tiempo para observar el comportamiento de los microorganismos en las diferentes corridas.
- b) Los valores de pH de las muestras se determinaron con un potenciómetro (Jenway 3020 pH meter).

**Tabla 11. Diluciones consideradas para la cuantificación de microorganismos en la prueba de reto**

Tiempo (horas)	Diluciones
0	$10^0$ a $10^{-3}$
12	$10^{-1}$ a $10^{-6}$
24	$10^{-1}$ a $10^{-6}$
48	$10^0$ a $10^{-3}$



**Figura 13.** Método empleado en la prueba de reto en caldo MRS

---

---

## 6. Resultados y Discusión

### 6.1 Determinación de la actividad bacteriocinogénica de las cepas de bacterias lácticas aisladas del pozol.

#### a) Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas utilizadas en las pruebas fueron aisladas del pozol, de Villahermosa, Tabasco en un estudio previo realizado por Pilatasig (2008, comunicación personal). Las bacterias de dicha colección se identificaron como: *Streptococcus sp.*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Lactobacillus pentosus/ Lactobacillus plantarum*.

Las pruebas de pureza que se llevaron a cabo en estudios previos (Pilatasig, comunicación personal) fueron: la prueba catalasa, que fue negativa, respondieron de forma positiva a la tinción de Gram, se verificó su homogeneidad en la morfología de cada cepa al observarse al microscopio, además de confirmar la pureza de la cepa mediante cultivo por agotamiento en agar MRS. Posteriormente el cultivo de la cepa pura se conservó en glicerol y se congeló a -65°C.

#### b) Bacterias indicadoras.

Los microorganismos Gram positivos utilizados fueron: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus cereus*. Las bacterias Gram negativas utilizadas fueron: *Proteus mirabilis*, *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli*. Las

---

---

cinco cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este estudio fueron aisladas de pozol y son de tipo ETEC y EPEC (Sainz, 2005).

Las pruebas de pureza que se hicieron para las bacterias sensibles fueron: la prueba de catalasa, la tinción de Gram (Tabla 12) y siembra por agotamiento en placa.

**Tabla 12. Descripción de las cepas sensibles.**

Cepa	Clave de cepa	Morfología	Gram	Catalasa
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Cocos en racimos	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>		cocobacilos	+	+
<i>Micrococcus luteus</i>	9341	Cocos en racimos	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	11778	Bacilos largo	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	P13	Bacilos corto	-	+
<i>Salmonella Typhimurium</i>	14028	Bacilos largo	-	+
<i>Escherichia coli</i> O8:H7	95238	Bacilo delgados	-	+
<i>Escherichia coli</i> O8:H10	95268	Bacilo corto	-	+
<i>Escherichia coli</i> O8:H10	95269	Bacilo delgados	-	+
<i>Escherichia coli</i> O88:H25	95217	Bacilo corto	-	+
<i>Escherichia coli</i> O88:H25	95222	Bacilo corto	-	+

### c) Curvas de crecimiento de las cepas indicadoras.

Las cinéticas de crecimiento se realizaron con el fin de determinar el tiempo de incubación necesario para que los microorganismos alcanzaran su fase exponencial, ya que en esta fase los microorganismos son más susceptibles a la acción de las bacteriocinas. Sin embargo, si éste se encuentra en la fase estacionaria, no se sabría si son las bacteriocinas las que detienen el crecimiento o es debido a que muchas de las bacterias están en fase de muerte.

Los ensayos de la cinética de crecimiento de los microorganismos sensibles se realizaron en caldo BHI obteniéndose los siguientes resultados. En la figura 14 se observa cómo *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Typhimurium* inician la fase exponencial en la segunda hora de incubación, alcanzando su fase estacionaria en la quinta hora y un posterior incremento de biomasa en ambas cepas a partir de las 12 horas de incubación, hasta llegar a las 24 horas; por lo tanto, entre la segunda y quinta hora de incubación, fue cuando se consideraron ambos microorganismos sensibles para someterlos a la prueba de la detección de bacteriocinas. En el mismo gráfico se muestra el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, donde este microorganismo muestra un crecimiento continuo durante las 24 horas de desarrollo; sin embargo, entre la segunda y séptima hora de incubación, se obtuvo la fase exponencial, que es la pendiente mas pronunciada de toda la cinética de crecimiento perteneciente a este microorganismo y la etapa que es óptima para el ensayo en la detección de bacteriocinas.

En el figura 15 se muestra la cinética de crecimiento de *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* y *Proteus mirabilis*, donde *Bacillus cereus* alcanza su fase exponencial entre la segunda y quinta hora de crecimiento, que es el tiempo donde es apta la cepa para someterla al ensayo frente a las BAL para la detección de bacteriocinas; a partir de la sexta hora de desarrollo se muestra una densidad óptica constante que es la fase estacionaria de este microorganismo. A diferencia de las cepas sensibles descritas previamente, *Micrococcus luteus*, comenzó su crecimiento exponencial más tarde, después de las 6 horas de incubación y así permaneció hasta el final del ensayo (24 horas); sin embargo, se tomó la muestra a las seis horas de crecimiento para realizar

---

los ensayos de detección de la actividad de bacteriocinas. *Proteus mirabilis* comenzó su crecimiento desde la primera hora. Su crecimiento acelerado se localizó entre la tercera y sexta hora de desarrollo, en la séptima hora se observa como se mantiene en fase estacionaria hasta llegar a las 24 horas.

El crecimiento de *Escherichia coli* O8:H1 95268, *Escherichia coli* O8:H10 95269 y *Escherichia coli* O8:H7 95238 se muestran en el figura 16. Las tres cepas mencionadas tuvieron el mismo comportamiento cinético, teniendo como única diferencia la densidad óptica final. Las tres cepas tienen su fase exponencial entre la segunda y la quinta hora; a partir de la sexta hora mantuvieron un crecimiento moderado, lo que se tomó como su fase estacionaria.

*Escherichia coli* O88:H25 95217 y *Escherichia coli* O88:H25 95222, son mostradas en el figura 17, donde el comportamiento de ambas cepas fue muy parecido. Su fase exponencial comenzó en la segunda hora de incubación y culminó en la quinta hora, a partir de la sexta hora comenzó su fase estacionaria con escaso crecimiento hasta llegar a las 24 horas.

En general todos los microorganismos sensibles empleados en el ensayo de detección de bacteriocinas producidas por las BAL, mostraron su fase exponencial entre la segunda y sexta hora de incubación, para realizar la prueba, se tomó la muestra de los microorganismos sensibles a las seis horas de incubación, así se asegura un buen crecimiento del microorganismo, sin embargo si se cosechara en la fase estacionaria, las bacterias tienden a adquirir mas resistencia.

---

El caldo BHI fue utilizado ya que es un medio rico en nutrientes que proporciona un buen desarrollo microbiano. La infusión de cerebro-corazón junto con la peptona, son la fuente de carbono, nitrógeno y vitaminas. La glucosa es el carbohidrato fermentable, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico evitando la lisis del microorganismo y el fosfato disódico agrega la función de amortiguador de pH. En el desarrollo de los microorganismos sensibles, éstos tenían un óptimo desarrollo además de tener crecimiento abundante en un corto periodo de incubación.

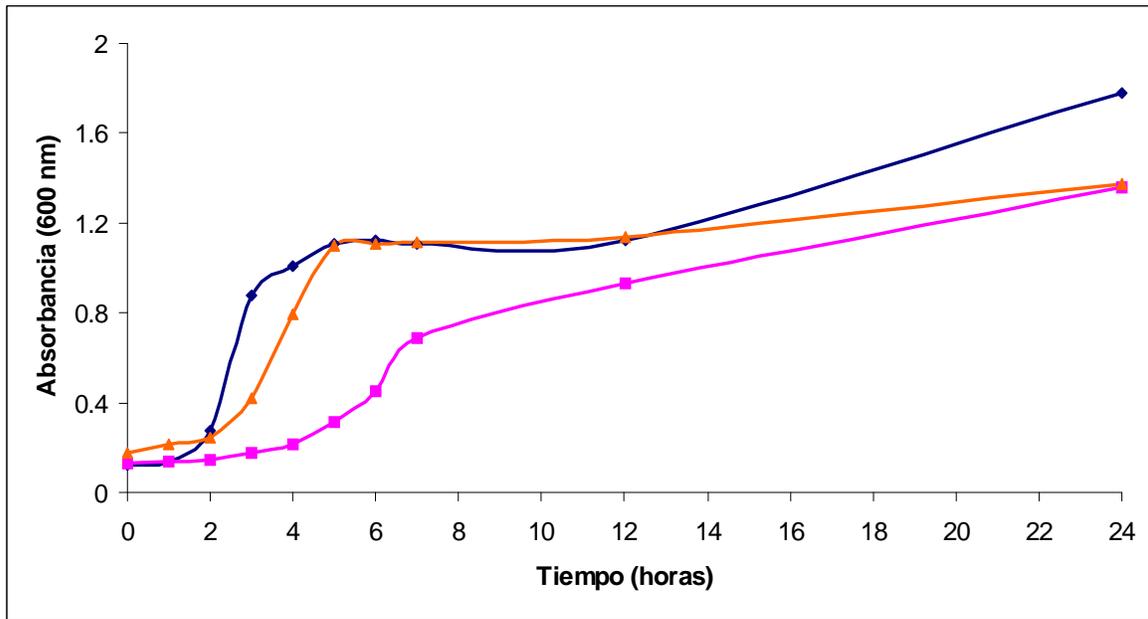


Figura 14. Cinética de crecimiento de cepas sensibles en caldo BHI

- ◆ *Listeria monocytogenes*
- ▲ *Salmonella Typhimurium*
- *Staphylococcus aureus*

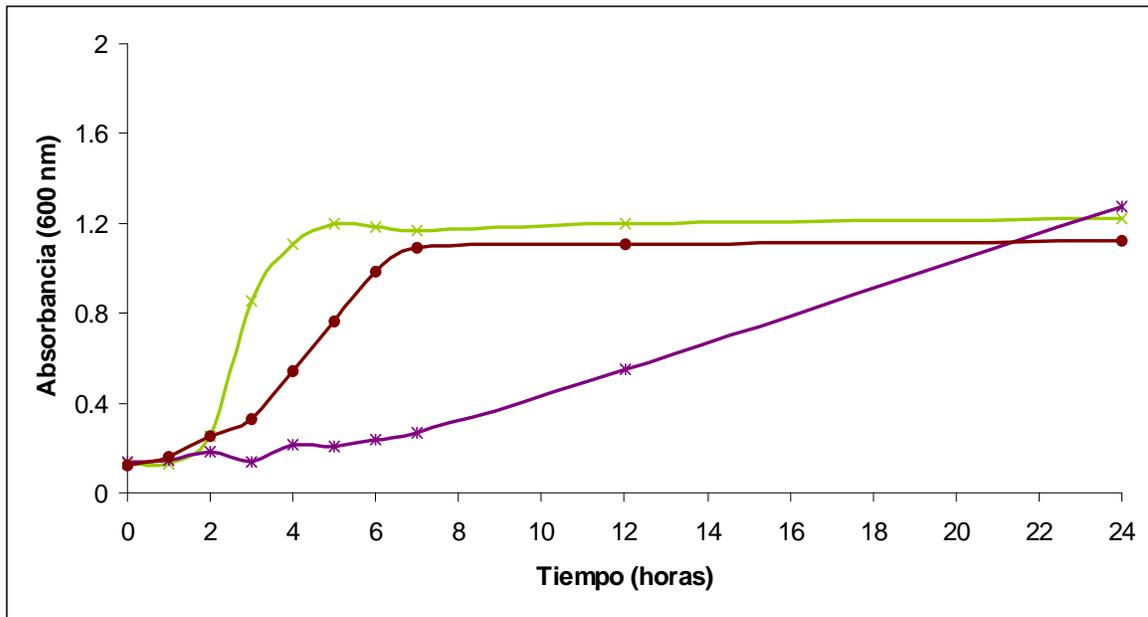


Figura 15. Cinética de crecimiento de cepas sensibles en caldo BHI

- × *Bacillus cereus*
- \* *Micrococcus luteus*
- *Proteus mirabilis*

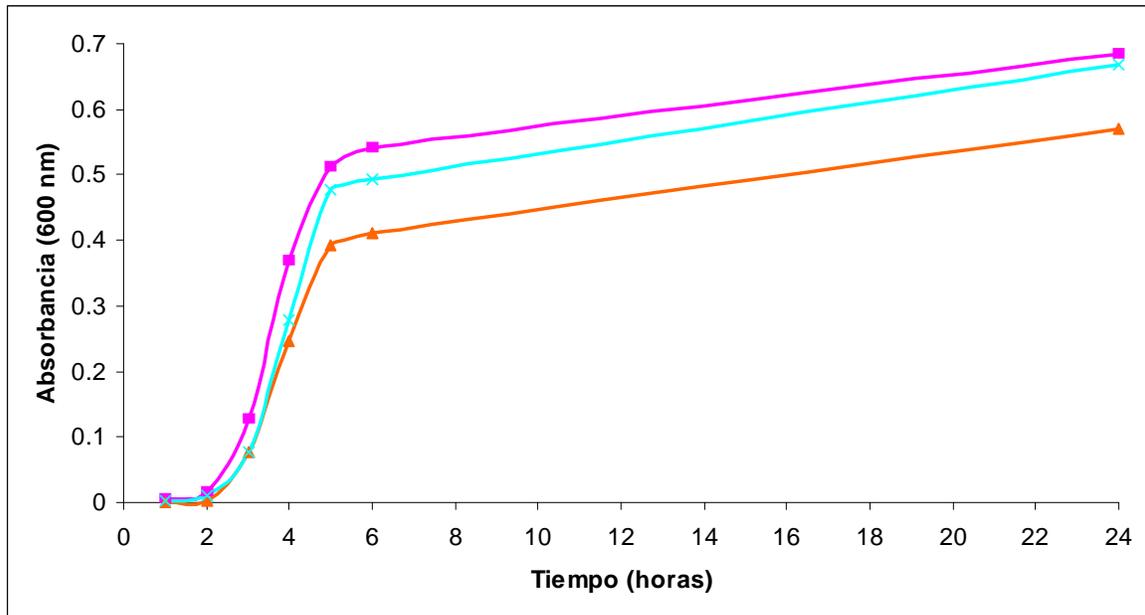


Figura 16. Cinética de crecimiento de cepas de *E. coli* aisladas del pozol en caldo BHI

- *Escherichia coli* O8:H10 95268
- ×— *Escherichia coli* O8:H10 95269
- ▲— *Escherichia coli* O8:H7 95238

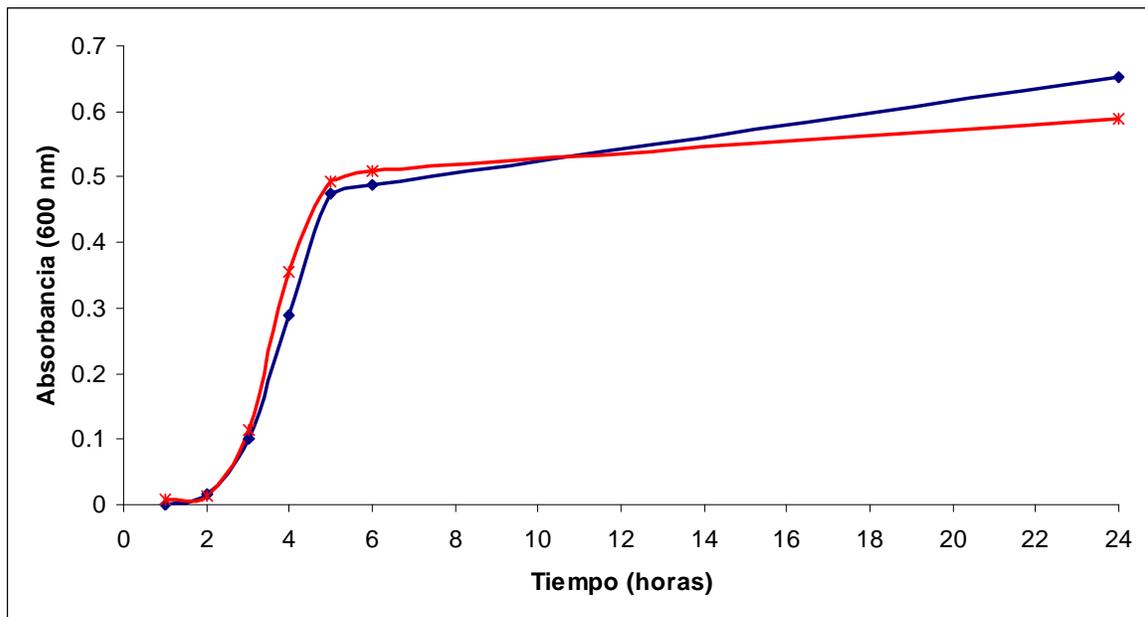


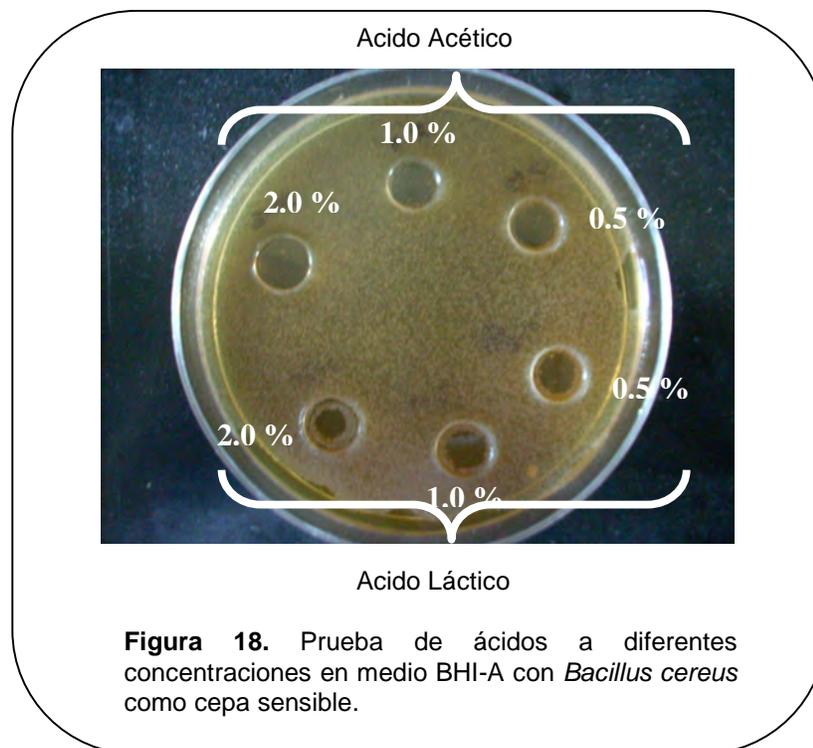
Figura 17. Cinética de crecimiento de *E. coli* en caldo BHI

- \*— *Escherichia coli* O88:H25 95217
- ◆— *Escherichia coli* O88:H25 95222

**d) Pruebas a medios BHI-A amortiguados con ácido acético y láctico.**

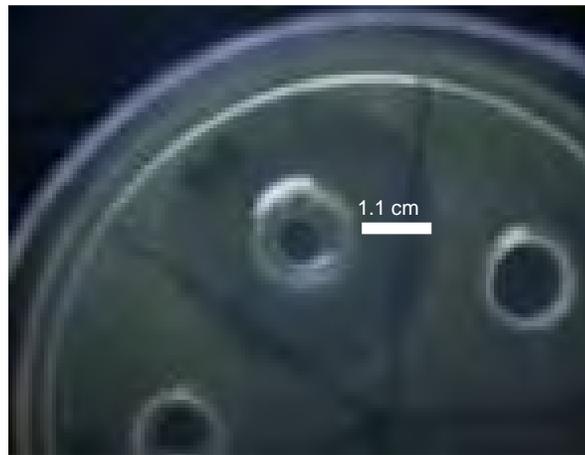
Las pruebas en medios amortiguados se realizaron con el fin de saber si el medio BHI-A podía amortiguar el pH manteniéndolo estable y de esta manera tener la seguridad de que la inhibición se llevaba a cabo por la bacteriocina y no por algún ácido orgánico generado por la BAL.

En la prueba realizada se mostró que al agregar ácido láctico o ácido acético en los pocillos de la sobrecapa del medio BHI-A, todos los microorganismos indicadores crecieron en el medio, lo que indicaba el amortiguamiento del medio BHI-A (Figura 18). De acuerdo con lo anterior, la formación de halos en el medio BHI-A debía darse como consecuencia a la presencia de bacteriocinas en el medio de cultivo y no por la presencia de ácidos, y como consecuencia tener presente una variable o un falso positivo.



**e) Ensayo de detección de la actividad de bacteriocina: método de botón.**

La actividad bacteriocinogénica de las muestras se ha expresado mediante la formación del halo de inhibición y el diámetro del halo expresado en cm. El halo de inhibición se forma por la acción de las bacteriocinas presentes en los cultivos de las bacterias productoras sobre la bacteria sensible. En la figura 19 se muestra la acción inhibitoria contra la cepa sensible *Listeria monocytogenes*, al colocar en el pozo el sobrenadante de la cepa numero 50 de las BAL.



**Figura 19.** Radio de actividad antimicrobiana de la BAL 50 contra *Listeria monocytogenes*.

De acuerdo con la metodología propuesta (sección 5.6.3), se llevó a cabo la determinación de la producción y actividad de las bacteriocinas producidas por las 80 cepas de la colección de BAL aisladas previamente a partir del pozol de Villahermosa Tabasco.

Dentro de los resultados obtenidos, se observó que en la colección de cepas BAL, hay cepas que no tienen actividad frente a ninguna cepa sensible evaluada en este estudio, también se detectó la presencia de cepas BAL que lograban inhibir un solo microorganismo sensible, y la existencia dentro de la colección de algunas cepas que llegaron a presentar actividad hasta con dos microorganismos sensibles.

El mayor efecto bacteriocinogénico se observó contra las bacterias Gram positivas: *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

El menor sobre bacterias Gram negativas: *Salmonella* Typhimurium y *Proteus mirabilis*.

En los resultados de las cepas que se muestran en las Tablas del anexo 2, se observa la producción de halos en el medio inoculado con diferentes cepas a partir de los cultivos de BAL, demostrando que hay actividad inhibitoria frente a algunas de las cepas sensibles. Todos los resultados de actividad de las BAL frente a los microorganismos patógenos se muestran en las tablas 13 y 14; los porcentajes obtenidos de cada cepa sensible que se vio inhibida frente a las bacteriocinas pertenecientes a las BAL, se aprecian en las tablas 15 y 16; mientras que el cálculo del porcentaje obtenido de cada cepa se describe en el anexo 1.

Con respecto a los microorganismos sensibles Gram positivos, *Listeria monocytogenes* fue la cepa sensible que obtuvo el más alto porcentaje de inhibición con un 41.25% de inhibición de las 80 cepas BAL aisladas de pozol (tabla 15), dando un total de treinta y tres cepas BAL que inhibieron a este microorganismo sensible. El radio del halo de inhibición formado por estos microorganismos va desde 0.2 cm hasta 1.2 cm, mostrando halos translúcidos y opacos, esto se puede atribuir a que la BAL provocaba

---

en el halo translúcido una completa inhibición, y en el opaco un crecimiento menor posiblemente causado por la bacteriocina. Aunque no se ha encontrado presencia de este microorganismo en el pozol, es importante mantener controlado al mismo, ya que es una bacteria que se mantiene durante largos periodos a temperatura de refrigeración y a altas concentraciones de sal, y, además, tiene una alta incidencia en gente de la tercera edad, mujeres embarazadas y pacientes con el sistema inmune comprometido (Ogunmodede, 2005). Se han reportado diversas bacteriocinas provenientes de bacterias ácido lácticas que causan la inhibición de este microorganismo, como ejemplo, se tiene la nisina que es producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, y la lactocina S generada por *Lactobacillus sake* L45 (Chen y Hoover, 2003).

*Micrococcus luteus* obtuvo el 3.75% de inhibición en todo el ensayo. Tres cepas BAL fueron las que mostraron actividad inhibitoria frente a este microorganismo sensible (tabla 15). El radio de inhibición que se presentó en este microorganismo fue de 0.1cm hasta 0.5 cm; todos los halos que se presentaron fueron translúcidos, lo que indica una completa inhibición en el crecimiento de este microorganismo. No se ha encontrado este microorganismo en el pozol; sin embargo, puede estar presente en alimentos provenientes de mamíferos como es la leche bronca, ya que este microorganismo se ha encontrado en la piel de estos animales. Las cepas de *Micrococcus* se han utilizado como indicadoras en la bioactividad de la nisina, como por ejemplo *Micrococcus luteus* ATCC 10240, que fue utilizada para observar la actividad antimicrobiana de una película de plástico para el envasado de alimentos recubierta con nisina (Mauriello *et al.* 2005).

---

*Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Con estas bacterias Gram positivas, se obtuvo el menor porcentaje de actividad con respecto a las otras bacterias Gram positivas sensibles utilizadas. Obteniéndose el 1.25% de actividad, donde una cepa inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* 25923 y otra a *Bacillus cereus* 11778 (tabla 15). *Staphylococcus aureus* se vio inhibida por una cepa de la colección de BAL aislada del pozol con un radio de 0.3 cm y un halo translúcido que muestra la inhibición en el crecimiento de este microorganismo. Esta bacteria no se ha encontrado en muestras de pozol; sin embargo, en este alimento se encuentra por lo menos una cepa que logra inhibir este microorganismo. Se ha demostrado que hay BAL que han logrado inhibir a *Staphylococcus aureus* como es la lacticina 3147 generada por *Lactococcus lactis* DPC3147 (Ryan et al. 1996).

Con una cepa de *Bacillus cereus* se logró el 1.25% de inhibición en el ensayo (tabla 15), la cepa que logró la inhibición de este microorganismo sensible, mostró un radio de 0.2 cm en el halo y como el halo es opaco se asume que no hubo una total inhibición de la cepa sensible, ya que se detectó un ligero crecimiento del microorganismo sensible dentro del halo. La incidencia de este microorganismo en alimentos es frecuente por la generación de esporas, que hace que pueda sobrevivir en condiciones ambientales adversas, el pozol es uno de los alimentos donde se ha detectado (Rivera, 2001). Dentro de la colección de BAL aisladas del pozol de Villahermosa Tabasco, se encontró una cepa que logró inhibir el crecimiento de *Bacillus cereus*. También se han realizado estudios en los que cepas BAL productoras de bacteriocina han logrado la inhibición del crecimiento de este microorganismo, como es la lactocina S producida por *Lactobacillus sake* L45 (Chen y Hoover, 2003).

---

Las bacterias Gram negativas empleadas en el ensayo de detección de bacteriocinas fueron: *Salmonella* Typhimurium, *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli*. Siendo *Salmonella* Typhimurium la que tuvo el mas alto porcentaje de inhibición con el 8.75%, siendo siete cepas BAL las que provocaron la inhibición de *Salmonella* Typhimurium. La relevancia de tener actividad bacteriocinogénica frente a este microorganismo es debido al alto grado de incidencia y a la gran diversidad de alimentos semi-elaborados en los que se encuentra (Carrera *et al.* 1998); además de que es una bacteria Gram negativa y no es muy común encontrar bacteriocinas que logren inhibir a este tipo de microorganismos. Son pocos los datos publicados que muestran la inhibición de una bacteria Gram negativa por causa de una bacteriocinas producida por una bacteria Gram positiva; sin embargo, Cutter y Siragusa, (1995) mostraron que la nisina, en combinación con EDTA, citrato o lactato, resulta eficaz en contra de esta bacteria.

*Proteus mirabilis* tuvo el 5% de actividad bacteriocinogénica, siendo cuatro cepas de BAL las que lograron inhibir a este microorganismo, teniendo un halo con radio entre 0.1 y 0.2 cm. No se ha detectado *Proteus mirabilis* en muestras de pozol, y no es común encontrarlo en alimentos, sin embargo existen reportes de que este microorganismo se ha encontrado en infecciones urinarias. En estudios realizados por Kang y Lee (2005) para caracterizar parcialmente la bacteriocina producida por la cepa de *Enterococcus faecium* GM-1, aislado de las heces de un bebé recién nacido, se mostró un espectro antimicrobiano de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* GM-1 frente a *Proteus mirabilis* KCTC 2510 (Korean Collection for Type Cultures).

---

Con respecto a *Escherichia coli*, que es una bacteria Gram negativa, las cinco cepas evaluadas (Tabla 6) fueron aisladas de muestras de pozol (Sainz, 2001). No se obtuvo algún resultado positivo en la prueba de actividad bacteriocinogénica frente a las BAL, lo que da un 0% de actividad. Esto se pudo deber a que este microorganismo es muy resistente a las bacteriocinas que producen las BAL del pozol, las cuales no logran contrarrestar su crecimiento. Es necesario hacer pruebas adicionales, como el tipo de resistencia que tienen estas cepas de *E. coli* a las bacteriocinas de diversos microorganismos, sin embargo, se han reportado resultados que muestran inhibición de *E. coli* frente a una BAL (Zapata *et al.* 2009); existen estudios que muestran efecto en contra de *E. coli* CECT 4972 causado por cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas del producto de maíz fermentado tradicional de África, llamado poto poto (Ben Omar *et al.* 2008). Cutter y Siragusa (1995) mostraron que el uso de EDTA, citrato o lactato, en combinación con la nisina causa efecto en contra de *E. coli* O157:H7.

Las bacterias lácticas de la colección evaluada son capaces de producir bacteriocinas que inhiben diversos patógenos tanto Gram positivos como negativos, como se ha observado, cada uno de ellos se pueden encontrar en ciertos alimentos y, como consecuencia, representan un posible riesgo para la salud. El hecho de que las cepas detectadas como productoras de bacteriocinas presenten efecto inhibitorio en contra de microorganismos Gram negativos es de importancia ya, que es conocido que el espectro de inhibición de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas se restringe a bacterias Gram positivas. Sin embargo, dicho espectro puede variar significativamente, desde uno relativamente estrecho hasta uno muy amplio que

---

consiste en la inhibición de una bacteria Gram positiva hasta una bacteria Gram negativa (Roos, 1999).

En la tabla 13 se muestran las BAL que lograron tener actividad inhibitoria frente a microorganismos sensibles Gram positivos así como la cepa que provocó la inhibición; y en la tabla 14 se muestran las BAL que tuvieron actividad frente a microorganismos Gram negativos.

Otro resultado importante que es de trascendencia, es el hecho de que haya bacteriocinas que inhiban hasta a dos microorganismos sensibles. Las cepas que presentaron esta característica fueron: 30, 58, 60, 62, 73, 74 ch, 74 g, 77 g, 77 ch. De las cuales la cepa 30 es la que inhibió a dos bacterias Gram positivas, esto puede ser debido a que ambos microorganismos sensibles son susceptibles a la misma bacteriocina generada por esta BAL ó a que esta cepa produzca dos bacteriocinas con diferentes espectros de inhibición (Jiménez *et al.* 2003). Las cepas 58, 60, 62, 73, 74 ch, 74 g, 77 g, 77 ch tienen actividad en contra de una bacteria Gram positiva y una Gram negativa. La literatura con respecto a estas bacteriocinas es muy limitada; sin embargo, existen estudios que muestran resultados de cepas de bacterias ácido lácticas que inhiben a más de una bacteria Gram positiva y a más de una bacteria Gram negativa (Ben Omar *et al.* 2008). El hecho de poder inhibir una bacteria Gram positiva y Gram negativa se puede atribuir a que la cepa BAL que causó esta inhibición puede: generar una bacteriocina diferente para cada cepa sensible que causa su inhibición, generar más de una bacteriocina causando efecto inhibitorio en las cepas sensibles o que ambas cepas sensibles sean susceptibles a la misma bacteriocina.

---

Del Castillo y Mestres (2004) afirman que cepas de distintos géneros pueden producir la misma bacteriocina, mientras que una misma cepa puede generar distintas bacteriocinas y más de una bacteriocina.

En estudios previos se han demostrado halos de inhibición que van desde 0.1 cm hasta 1.5 cm (Ryan *et al.* 1996), que son tamaños de radio semejantes a los halos obtenidos en este proyecto. En las figuras 20-24 se observan ejemplos de los resultados obtenidos para algunas de las cepas utilizadas en este trabajo (Anexo 2).

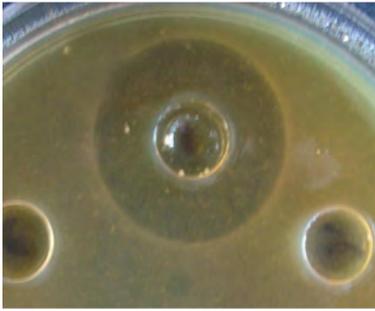
En la industria alimentaria, algunas bacterias Gram negativas representan un gran problema tanto económico como de salud pública, ya que presentan resistencia frente a algunos de los compuestos antimicrobianos utilizados para el control de estos microorganismos indeseables (Zapata *et al.* 2009). Esto hace que las sustancias antimicrobianas producidas por las BAL como las bacteriocinas sean de importancia, ya que puede ser algo innovador y con un amplio campo de aplicaciones.



**Figura 20.** Actividad antimicrobiana de la BAL 30 contra *Micrococcus luteus*



**Figura 21.** Actividad antimicrobiana de la BAL 14 contra *Staphylococcus aureus*



**Figura 22.** Actividad antimicrobiana de la BAL 1 contra *Listeria monocytogenes*.



**Figura 23.** Actividad antimicrobiana de la BAL 30 contra *Proteus mirabilis*



**Figura 24.** Actividad antimicrobiana de la BAL 74ch contra *Salmonella Typhimurium*

**Tabla 13.** Resultados de la determinación de la actividad bacteriocinogénica de las BAL frente a bacterias Gram positivas.

No.Cepa BAL	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	No.cepa BAL	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
1	-	++	-	-	45	-	++	-	-
13	-	+	-	-	46	-	+++	-	-
14	-	-	-	-	47	-	++	-	-
15	-	++	-	+	50	-	+++	-	-
19	+	-	-	-	56	-	+++	-	-
22	-	++	-	-	58	-	++	-	-
26	-	++	-	-	60	-	++	-	-
28	-	++	-	-	62	-	+++	-	-
30	++	-	+	-	64	-	++	-	-
32	+	-	-	-	65	-	++	-	-
33	-	+++	-	-	67	-	++	-	-
34	-	+++	-	-	68	-	++	-	-
35	-	+++	-	-	69	-	++	-	-
36	-	++	-	-	73	-	++	-	-
37	-	+++	-	-	74 ch	-	++	-	-
38	-	+++	-	-	74 g	-	+++	-	-
41	-	+++	-	-	77 ch	-	++	-	-
42	-	++	-	-	77 g	-	++	-	-
44	-	+++	-	-					

Representación de símbolos del tamaño de halo.

- +
  - ++
  - +++
  -
- 0.1 cm a 0.3 cm  
0.4 cm a 0.9 cm  
1 cm a 1.3 cm  
No hay presencia de halo

**Tabla 14.** Resultados de la determinación de la actividad bacteriocinogénica de las BAL frente a bacterias Gram negativas.

No. cepa BAL	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>
4	+	-	-
14	-	+	-
54ch	-	++	-
58	+	-	-
60	+	-	-
62	+	-	-
73	-	++	-
74 ch	-	++	-
74 g	-	+	-
77 ch	-	++	-
77 g	-	++	-

Representación de símbolos del tamaño de halo.

+	0.1 cm a 0.3 cm
++	0.4 cm a 0.9 cm
+++	1 cm a 1.3 cm
-	No hay presencia de halo

Se evaluaron un total de 80 bacterias ácido lácticas aisladas del pozol frente a once microorganismos sensibles, dando un total de 880 pruebas, de las cuales 49 dieron positivo para las pruebas de detección de bacteriocinas en la inhibición de los microorganismos sensibles. Se sometió cada una de las BAL a todas las cepas sensibles con las que se trabajó, obteniéndose los porcentajes de las cepas que tuvieron actividad sobre al menos un microorganismo sensible (tablas 15 y 16).

**Tabla 15.** Resultados de pruebas positivas obtenidas de la actividad bacteriocinogénica de las BAL del pozol sobre las bacterias sensibles Gram positivas expresadas en porcentaje.

Microorganismo sensible	Clave de la Cepa	No. de pruebas positivas	Porcentaje de actividad (%)
<i>Listeria monocytogenes</i>	<sup>a</sup>	33	41.25
<i>Micrococcus luteus</i>	9341 <sup>a</sup>	3	3.75
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923 <sup>a</sup>	1	1.25
<i>Bacillus cereus</i>	11778 <sup>a</sup>	1	1.25

<sup>a</sup> Clave de la colección de microorganismos de la Facultad de Química, UNAM

**Tabla 16.** Resultados de pruebas positivas obtenidas de la actividad bacteriocinogénica de las BAL del pozol sobre las bacterias sensibles Gram negativas expresadas en porcentaje.

Microorganismo sensible	Serotipo	Clave de la cepa	No. de pruebas positivas	Porcentaje de actividad (%)
<i>Salmonella Typhimurium</i>		14028 <sup>a</sup>	7	8.75
<i>Proteus mirabilis</i>		P13 <sup>a</sup>	4	5
<i>Escherichia coli</i> *	O8 :H7	95238 <sup>b</sup>	0	0
<i>Escherichia coli</i> *	O8:H10	95268 <sup>b</sup>	0	0
<i>Escherichia coli</i> *		95269 <sup>b</sup>	0	0
<i>Escherichia coli</i> *	O88:H25	95217 <sup>b</sup>	0	0
<i>Escherichia coli</i> *		95222 <sup>b</sup>	0	0

\* cepas aisladas de pozol de Villahermosa, Tabasco.

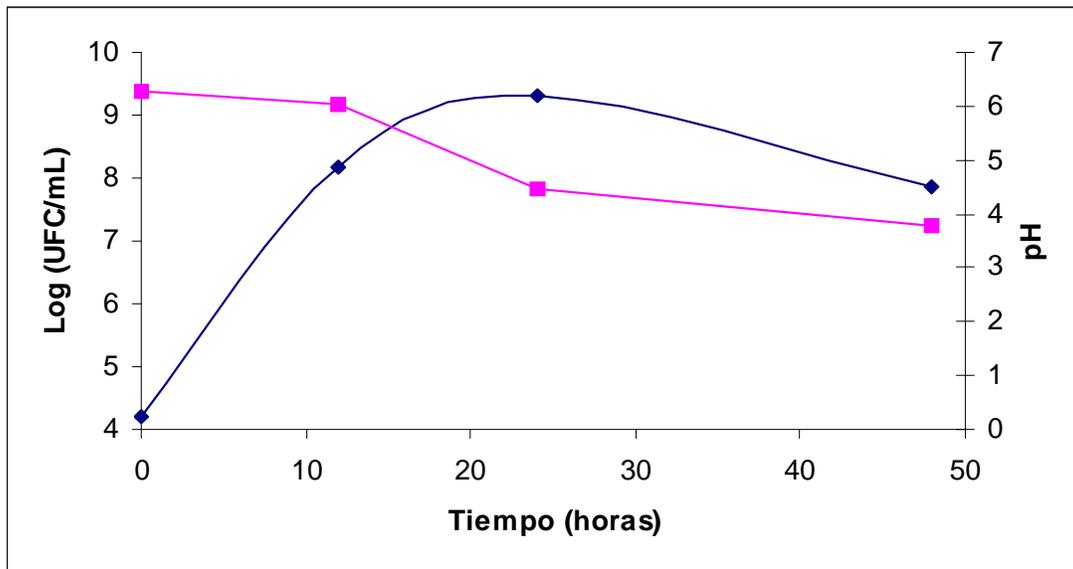
<sup>a</sup> Clave de la colección de microorganismos de la Facultad de Química, UNAM

<sup>b</sup> Clave de la colección de microorganismos del Depto. de Salud Pública Facultad de Medicina, UNAM.

## 2. Prueba de reto en caldo MRS de la cepa 77g y *Salmonella* Typhimurium.

La prueba en caldo MRS se realizó con el objetivo de poner en competencia la bacteria ácido láctica 77g y la bacteria patógena *Salmonella* Typhimurium, para observar si el microorganismo patógeno es inhibido frente a la BAL en el transcurso del crecimiento de ambos microorganismos en el mismo medio de cultivo. Estos microorganismos fueron seleccionados a partir de la prueba realizada por el método del botón antes descrita, en donde se muestra que hay actividad bacteriocinogénica de la cepa 77g sobre *Salmonella* Typhimurium.

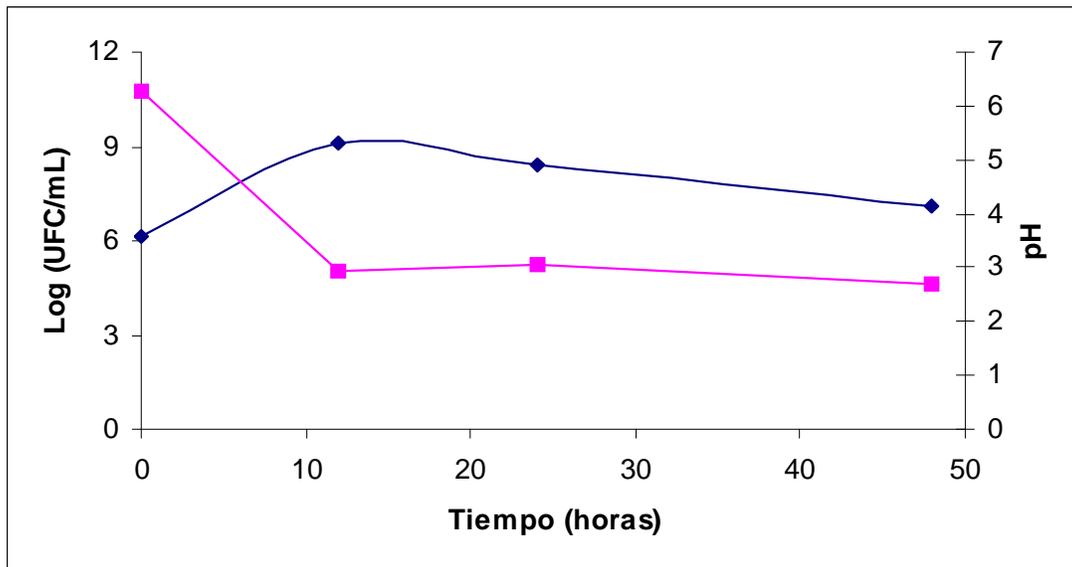
El medio MRS control, donde se inoculó únicamente *Salmonella* Typhimurium, se dejó en incubación a 37°C, para posteriormente tomar muestras a las 0, 12, 24 y 48 horas. En cada toma de muestra se midió el pH del medio y se cuantificó al microorganismo en el medio sólido XLD. Se observó que al inicio la cepa estaba a una concentración de  $1.6 \cdot 10^4$  UFC/mL y a un pH de 6.3; a las 12 horas de incubación la cepa se encontraba a una concentración de  $1.6 \cdot 10^8$  UFC/mL y un a pH de 6.0; a las 24 horas la cepa alcanzó su máximo crecimiento de biomasa activa llegando a  $1 \cdot 10^9$  UFC/mL y a un pH de 4.5. Posterior a este tiempo comenzó la fase de muerte al disminuir la cantidad de células viables con una cantidad aproximada a  $8 \cdot 10^8$  UFC/mL y a un pH de 3.78 al cabo de 48 horas (Figura 25).



**Figura 25.** Cinética de crecimiento *Salmonella Typhimurium* en el medio MRS

—◆— *Salmonella Typhimurium*  
—■— pH

El medio MRS control donde sólo se inoculó la cepa BAL 77g, se dejó en incubación a 37°C, y se tomó muestra a las 0, 12, 24 y 48 horas. Cada toma de muestra se llevó a cabo como se describió anteriormente: midiendo el pH y cuantificando a la bacteria en el medio sólido MRS. Al inicio, la cepa estaba a una concentración de  $1.3 \cdot 10^6$  UFC/mL y a un pH de 6.3; a las 12 horas de incubación la cepa alcanzó su máximo crecimiento encontrándose a una concentración de  $2.5 \cdot 10^8$  UFC/mL y a un pH de 2.9; a las 24 horas se redujo la cantidad de células viables de la cepa llegando a  $2.5 \cdot 10^8$  UFC/mL y un a pH de 3.1; la última toma de muestra tuvo una concentración de  $1.3 \cdot 10^7$  UFC/mL y a un pH de 2.7 (Figura 26).



**Figura 26.** Cinética de crecimiento en medio MRS de BAL (77g)

—◆— Bacteria ácido láctica (77g)  
—■— pH

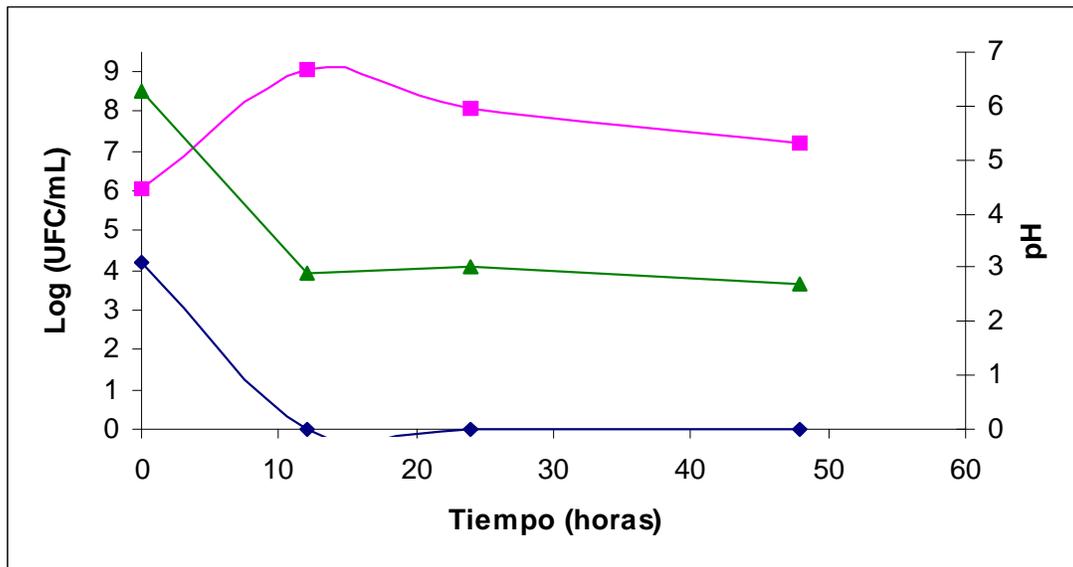
El medio MRS donde se sembraron *Salmonella* Typhimurium y a la BAL 77g se incubó a 37°C, por 48 horas. En cada muestra se midió el pH en el que se encontraba el medio con ambas bacterias y se cuantificaron tanto la BAL como la bacteria sensible en los medios MRS y XLD, respectivamente. Se calcularon las UFC/mL y se observó que al inicio la cepa de *Salmonella* Typhimurium estaba a una concentración de  $1.6 \cdot 10^4$  UFC/mL y la BAL 77g a una concentración de  $1.3 \cdot 10^6$  con un pH de 6.3 ; a las 12 horas de incubación la cepa de *Salmonella* Typhimurium no presentó crecimiento en el medio donde se sembró, lo que muestra la inhibición de esta bacteria ya que en las siguientes muestras tampoco hubo crecimiento de este microorganismo; la BAL 77g alcanzó su máximo crecimiento a una concentración de  $1.3 \cdot 10^9$  UFC/mL y a un pH de 2.9; a las 24 horas la cepa BAL 77g llegó a una concentración de  $1.3 \cdot 10^8$  UFC/mL y a un pH de 3 donde se detectó una reducción de células viables, mientras que a las 48 horas la cepa BAL se redujo hasta  $1.6 \cdot 10^7$  UFC/mL y a un pH de 3.78 (Figura 27).

En el medio control, donde se sembró *Salmonella* Typhimurium, se observa cómo esta cepa tuvo un desarrollo óptimo hasta llegar a las 24 horas. Después de este tiempo comienza el descenso de la cuenta de células viables, mostrándose una caída en la curva de UFC/mL (Figura 25), lo que indica la fase de muerte de la cepa. Sin embargo, en el cultivo mixto, se observa cómo al haber transcurrido 12 horas de incubación, *Salmonella* Typhimurium ya no se encuentra viable dentro del cultivo mixto al no haber crecimiento en el medio XLD; sin embargo, en el medio MRS, donde se sembró la BAL, sí hubo crecimiento de la cepa en todos los tiempos, llegando a su máximo desarrollo a las 24 horas. Esta cepa tuvo un comportamiento muy similar al que se obtuvo en la curva de crecimiento control (Figura 26).

En la prueba de reto, el cultivo mixto muestra que cuando los dos microorganismos están presentes en el mismo ambiente hay un descenso del microorganismo patógeno hasta su completa ausencia en el medio, esto puede ser a causa de la bacteriocina producida por la BAL y/o por algún otro metabolito generado por la BAL, como pueden ser: peróxido, reuterina o ácidos. Este microorganismo muestra tener la capacidad de inhibir el crecimiento de *Salmonella* Typhimurium en medio MRS. El comportamiento observado en la prueba de reto coincide con lo observado en la prueba de pozos.

La acción bactericida que tiene la cepa 77g, sobre *Salmonella* Typhimurium, se muestra a las 12 horas cuando el pH del medio era de 2.9, lo que muestra que el descenso del pH del medio puede incrementar la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas. Las bacteriocinas de la clase I y II generalmente son muy estables a pH ácido (Chen y Hoover, 2003).

---



**Figura 27.** Cinética de crecimiento en medio MRS de BAL 77g en presencia de *Salmonella* Typhimurium.

—■— Bacteria ácido láctica (77g)  
 —◆— *Salmonella typhimurium*  
 —▲— pH

El medio MRS fue útil para el crecimiento de los controles BAL y del microorganismo sensible. Este medio permitió el desarrollo de ambos microorganismos como se muestra en las figuras 25 y 26. El medio de cultivo mixto (figura 27) mostró que al final de la fase exponencial de la BAL (12 horas) ya no hay presencia del microorganismo sensible. La bacteriocina generada por esta cepa puede ser la que inhibió a *Salmonella* Typhimurium; sin embargo, puede haber varias bacteriocinas producidas por las BAL generadas en su fase exponencial ya que se ha visto que un microorganismo puede generar más de una bacteriocina (Del Castillo y Mestres, 2004). Las BAL generan cantidades importantes de ácido láctico, el cual por naturaleza inhibe a muchos microorganismos; sin embargo, en el ensayo de detección de la actividad de bacteriocina (método de botón), se eliminó la posibilidad de que haya sido algún ácido el que haya provocado la inhibición; sin embargo, en el cultivo mixto MRS, la presencia de ácido puede ser uno de los factores que contribuyó a la inhibición del

microorganismo sensible. Para evitar esta complicación, es necesario saber qué tipo de bacteriocina o bacteriocinas son las que produce este microorganismo, así como saber cuál es la que provocó la inhibición de la cepa sensible. El saber qué tipo de bacteriocina es la que causó la inhibición y en qué etapa de crecimiento se generó es de importancia ya que, a pesar de que existen varios procesos para evitar la contaminación con microorganismos indeseables, los casos de infección y de intoxicación siguen siendo un problema que se presenta en la industria alimentaria, por lo tanto, las BAL pueden tener una importante aplicación en la mejora de la vida útil de alimentos así como en la inocuidad de los mismos (Zapata *et al.* 2009).

## 7. Conclusiones:

- Se detectó la producción de probables bacteriocinas producidas por bacterias lácticas aisladas del pozol de Villahermosa Tabasco, al probarlas contra bacterias patógenas.
- Se demostró efecto de inhibición de algunas bacterias Gram positivas, principalmente la especie *Listeria monocytogenes* provocadas por BAL de la colección.
- Se demostró efecto de inhibición de bacterias Gram negativas como *Salmonella* Typhimurium causado por BAL de la colección.
- No se presentó inhibición contra cepas de *E. coli* aisladas del pozol y resistentes a la acidez.
- La cepa 77g es capaz de inhibir el crecimiento de *Salmonella* Typhimurium, después de 12h de crecimiento en el medio líquido MRS. La producción de bacteriocinas por la bacteria láctica podría ser la causa de ello.

## 8. Perspectivas

- Evaluar las condiciones de temperatura y tiempo que puedan favorecer una mayor producción de bacteriocinas en el medio de cultivo por las bacterias lácticas productoras.
- Estudiar las condiciones óptimas de actividad de las bacteriocinas producidas por las BAL de la colección aislada del pozol.
- Hacer estudios posteriores para observar si alguna bacteriocina generada por las BAL empleadas, en compañía de algún agente quelante, puede inhibir el crecimiento de las cepas de *Escherichia coli* con las que se trabajó en este proyecto.
- Realizar las pruebas de reto frente a patógenos de interés de aquellas BAL con mayor actividad bacteriocinogénica en sistemas modelo (medio líquido MRS y suspensiones de masa de maíz nixtamalizado).
- Purificar y caracterizar aquellas bacteriocinas que por su actividad puedan ser de interés en el control de bacterias patógenas.
- Probar el comportamiento de inhibición de las bacteriocinas como bioconservadores en alimentos.

## 9. Anexos

### Anexo A

#### A. Medios de cultivo.

##### 1. Man Rogosa Sharpe (MRS, OXOID ®)

MRS es el medio líquido rutinariamente empleado para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas. La hidratación del agar MRS y el caldo MRS se lleva a cabo de acuerdo a las instrucciones de manufactura. Se esteriliza a 121°C por 15 min. Antes de ser utilizado se mantiene a 30°C durante 24 horas para verificar su esterilidad.

**Tabla A.1. Man Rogosa Sharpe (MRS, OXOID ®)**

<b>Compuesto</b>	<b>gramos / litro</b>
Peptona	10.0
Extracto de carne	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
'tween 80'	1.0mL
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio trihidratado	5.0
Citrato triamoniacal	2.0
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2
Sulfato de manganeso tetrahidratado	0.05

## 2. Caldo infusión de cerebro-corazón (BHI ,OXOID ®)

BHI es el medio líquido rutinariamente empleado para el crecimiento bacteriano de cepas sensibles. La hidratación del caldo BHI se lleva a cabo de acuerdo a las instrucciones de manufactura. Se esteriliza a 121°C por 15 min. Antes de ser utilizado se mantiene a 30°C durante 24 horas para verificar su esterilidad.

**Tabla A.2. Caldo infusión de cerebro-corazón (BHI, OXOID ®)**

<b>Compuesto</b>	<b>gramos / litro</b>
Sólidos de infusión de cerebro de buey	12.5
Sólidos de infusión de corazón de ternera	5.0
Proteosa peptona	10.0
Glucosa	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	2.5

### 3. Medio Agar Soya Trypticaseina (TSA, OXOID ®)

Este medio es empleado para conservar las cepas sensibles a temperatura de refrigeración durante dos semanas. Su preparación es igual que los antes mencionados.

**Tabla A.3. Agar Soya Trypticaseina (TSA, OXOID ®)**

<b>Compuesto</b>	<b>gramos / litro</b>
Peptona de caseína (Tryptona)	17.0
Peptona de soya	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	2.5
Glucosa	2.5

#### 4. Medio Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD, OXOID ®)

Este medio se utiliza para la cuantificación de *Salmonella* Typhimurium. La preparación del medio se lleva a cabo de acuerdo a las instrucciones de manufactura. Antes de ser utilizado se mantiene a 30°C durante 24 horas para verificar su esterilidad.

**Tabla A.4. Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD, OXOID ®)**

<b>Compuesto</b>	<b>gramos / litro</b>
Xilosa	3.5
L- Lisina	5.0
Lactosa	7.5
Sacarosa	7.5
Cloruro de Sodio	5.0
Citrato Férrico de Amonio	0.8
Extracto de Levadura	3.0
Rojo de Fenol	0.08
Desoxicolato de Sodio	2.5
Tiosulfato de Sodio	6.8
Agar Bacteriológico	13.5

## 5. Medio APT semisólido

La preparación del medio se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones de manufactura, se le agrega agar bacteriológico (0.3%), se calienta el medio para la disolución del agar, posteriormente se depositan 4 mL del medio en viales de vidrio con tapón de rosca y se agrega una punta de espátula de  $\text{CaCO}_3$ . Finalmente se esteriliza a  $121^\circ\text{C}$  por 15 min.

**Tabla A.5. APT semisólido.**

<b>Compuesto</b>	<b>gramos / litro</b>
Extracto de levadura	7.5
Digerido pancreático de caseína	12.5
Dextrosa	10.0
Citrato de Sodio	5.0
Clorhidrato de Tiamina	0.001
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato Dipotásico	5.0
Cloruro de Manganeso	0.14
Sulfato de Magnesio	0.8
Sulfato Ferroso	0.04
Polisorbato 80	0.2
Agar Bacto ®	3.0

## 6. Agua salina

Diluyente empleado en los ensayos.

**Tabla A.6. Agua salina**

<b>Compuesto</b>	<b>gramos / litro</b>
Cloruro de sodio (J.T. BAKER®)	1.0

## 7. Medio BHI-amortiguado (placa y sobrecapa)

Ambos medios se utilizan en los ensayos de reto. El fosfato monosódico y el fosfato disódico mantienen la estabilidad del pH en el medio.

**Tabla A.7. El medio BHI-A (Placa)**

<b>Compuesto</b>	<b>gramos / litro</b>
Fosfato monobásico de sodio (J.T. BAKER®)	4.3
Fosfato dibásico de sodio (J.T. BAKER®)	10
Agar bacteriológico (OXOID®)	17
BHI (OXOID®)	37

**Tabla A.8. El medio BHI-A (Sobrecapa)**

<b>Compuesto</b>	<b>gramos / litro</b>
Fosfato monobásico de sodio (J.T. BAKER®)	4
Fosfato dibásico de sodio (J.T. BAKER®)	10
Agar bacteriológico (OXOID®)	8
BHI (OXOID®)	15

**Tinción de Gram.**

La prueba se realiza tomando una asada de los cultivos activados, se extiende en un portaobjetos limpio y desengrasado, se fija a la flama del mechero y se tiñe con los siguientes reactivos: cristal violeta (1min.), se lava con agua destilada, lugol (solución yodo-yoduro al 4%) (1min.), se lava con solución alcohol-acetona y por último safranina (1min.) y finalmente, un lavado con agua destilada. Se deja secar el frotis a temperatura ambiente y se observa al microscopio a 100X.

---

**Pruebas totales:** Las pruebas totales fueron de los 11 microorganismos sensibles que se sometieron a la prueba de detección de actividad bacteriocinogénica frente a las 80 bacterias ácido lácticas aisladas de pozol de Villahermosa, Tabasco. Dando un total de 880 pruebas totales.

**Porcentaje de las pruebas totales:**

880 pruebas – 100%  
49 pruebas positivas – 5.57% pruebas positivas

**Pruebas a *Bacillus cereus*:**

80 pruebas – 100%  
1 pruebas positivas – 1.25% pruebas positivas

**Pruebas a *Staphylococcus aureus*:**

80 pruebas – 100%  
1 pruebas positivas – 1.25% pruebas positivas

**Pruebas a *Micrococcus luteus*:**

80 pruebas – 100%  
3 pruebas positivas – 3.75% pruebas positivas

**Pruebas a *Proteus mirabilis*:**

80 pruebas – 100%  
4 pruebas positivas – 5% pruebas positivas

**Pruebas a *Salmonella Typhimurium*:**

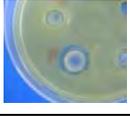
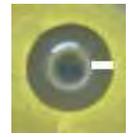
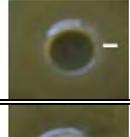
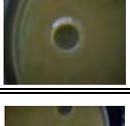
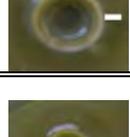
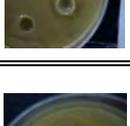
80 pruebas – 100%  
7 pruebas positivas – 8.75% pruebas positivas

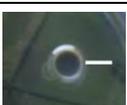
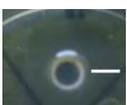
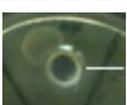
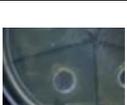
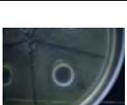
**Pruebas a *Listeria monocytogenes*:**

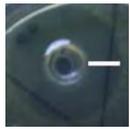
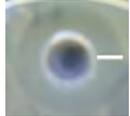
80 pruebas – 100%  
33 pruebas positivas – 41.25% pruebas positivas

## 9. Anexo B

Tabla B.1. Actividad bacteriocinogénica detectada por el método de botón, inhibición de bacterias sensibles Gram positivas por producción de bacteriocinas a partir de BAL.

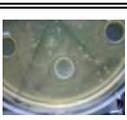
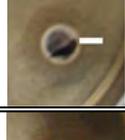
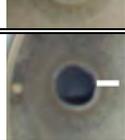
Bacteria sensible	Clave de cepa (BAL)	Tipo de halo	Diámetro de halo (cm)	Descripción	Imagen de halo	Imagen de caja
<i>Micrococcus luteus</i>	19	Translúcido	0.3	Halo sin colonias dentro, incubado 24hrs		
	30	Translúcido	0.5	Dentro del halo tres colonias, fuera una colonia con halo incubado 24hrs		
	32	Translúcido	0.1	Halo muy pequeño, incubado 24hrs		
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	Opaco	0.8	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 24hrs		
	4	Opaco	0.2	No hay colonias presentes, halo poco visible, incubado 24hrs		
	13	Opaco	0.3	Dos colonias dentro del halo, incubado 24hrs		
	15	Opaco	0.4	Una colonia BAL dentro del halo, incubado 24hrs		
	22	Opaco	0.5	No hay crecimiento de bacterias dentro del halo, incubado 24hrs		
	26	Opaco	0.4	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 24hrs		
	33	Translúcido	1	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		

<i>Listeria monocytogenes</i>	34	Translúcido	1	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	35	Translúcido	1	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	36	Translúcido	0.5	Hay crecimiento de colonias de BAL dentro del halo, incubado 12hrs		
	37	Translúcido	1.2	Ligero crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	38	Translúcido	1.1	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	41	Translúcido	1.1	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	42	Opaco	0.4	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	44	Translúcido	1.1	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	45	Translúcido	0.8	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	46	Translúcido	1.2	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	47	Translúcido	0.4	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		

<i>Listeria monocytogenes</i>	50	Translúcido	1.1	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	56	Translúcido	1	Una colonia dentro del halo, incubado 12hrs		
	58	Translúcido	0.9	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	60	Translúcido	0.9	No hay crecimiento de colonias dentro del halo		
	62	Translúcido	1	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	64	Opaco	0.6	Halo opaco, no hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	65	Translúcido	0.5	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, la sobrecapa no cubrió por completo la caja incubado 12hrs		
	67	Translúcido	0.8	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, la sobrecapa no cubrió por completo la caja, incubado 12hrs		
	68	Opaco	0.6	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	69	Opaco	0.6	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		

<i>Staphylococcus aureus</i>	14	Translúcido	0.3	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, se escurrió la BAL por la caja causando inhibición incubado 12hrs		
------------------------------	----	-------------	-----	---	---	---

Tabla B.2. Actividad bacteriocinogénica detectada por el método de botón, inhibición de bacterias sensibles Gram negativas por producción de bacteriocinas a partir de BAL.

Bacteria sensible	Clave de cepa (BAL)	Tipo de halo	Diámetro de halo (cm)	Descripción	Imagen de halo	Imagen de caja
<i>Proteus mirabilis</i>	58	Opaco	0.2	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	60	Opaco	0.1	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	62	Translúcido	0.1	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	30	Translúcido	0.2	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
<i>Salmonella Typhimurium</i>	54ch	Translúcido	0.4	No hay colonias dentro del halo, se escurrió la BAL por la caja causando inhibición incubado 12hrs		
	73	Opaco	0.5	No hay crecimiento de colonias dentro del halo, incubado 12hrs		
	74ch	Opaco	0.6	No hay crecimiento de colonias dentro del halo		
	74g	Opaco	1.1	No hay crecimiento de colonias dentro del halo		
	77ch	Opaco	0.4	No hay crecimiento de colonias dentro del halo		
	77g	Opaco	0.4	No hay crecimiento de colonias dentro del halo		

---

## 10. Bibliografía

- Achi, O. K. (1990) Microbiology of "obiolor": a Nigerian fermented non-alcoholic beverage. *Journal of Applied Bacteriology*. 69, 321-325.
- Abee, T. (1995) Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiology Letters* 129, 1-10.
- Ampe, F., N. ben Omar, C. Moizan, C. Wachter y J.-P. Guyot. 1999. Polyphasic study of spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* . 65(9):5464-5473.
- Álvarez Y. M. (2008) Identificación de bacteriocinas producidas por *Enterococcus* sp. aisladas de productos cárnicos. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Distrito Federal, México.
- Bannerman T. L. (2003) *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase positive cocci that grow aerobically. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Manual of clinical microbiology. 8th edition. *American Society for Microbiology*. Washington DC. 384-404.
- Ben Omar, N., y F. Ampe. (2000). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:9, 3664-3673.
- Ben Omar, N., Abriouel, H., Keleke, S., Sánchez, A., Martínez, M., Lucas, R., Ortega, E. and Gálvez, A. (2008) Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from potopoto, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons. *International Journal of Food Microbiology* 127, 18–25.
- Brock T.D., Madigan M.T., Martinko J.M. y Parker J. (2003) Biología de los microorganismos. Ed. Pearson, Prentice Hall. 399, 738, 944, 948, 952-954.
- Cañas A., Barzana E., Owens J.D. y Wachter C. (1993). La elaboración de pozol en Los Altos de Chiapas; *Ciencia* 44, 219-229.
- Carrera, J.A., Torres, A.C. y Lengomín, M.E. (1998). Vigilancia de *Staphylococcus* y *Salmonella* en alimentos. *Revista Cubana Alimentación y Nutrición*. 12:1,16-9
- Carolissen-Mackay, V., G. Arendse, y J. W. Hastings. (1997). Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *International Journal of Food Microbiology*. 34, 1-16.

---

Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, USA, 2008 [Sitio en Internet A]. Disponible en [http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease\\_listing/listeriosis\\_gi.html](http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/listeriosis_gi.html) Consultado: 15 de Octubre de 2009, Página modificada por última vez: 27 de marzo 2008.

Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, USA, 2008 [Sitio en Internet B]. Disponible en [http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease\\_listing/salmonellosis\\_gi.html](http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/salmonellosis_gi.html) Consultado: 15 de Octubre de 2009, Página modificada por última vez: 21 de mayo 2008.

Centeno, S. y Rodriguez, R. Evaluación Microbiológica de pescados congelados producidos en Cumana, estado Sucre, Venezuela. (2005) *Revista científica FCV-LUZ*. XV(2), 168-175.

Chen, H. y Hoover, D.G. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety. *Institute of Food Technologists*. 2, 82-100.

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

Coventry, M.J., Gordon, J.B., Wilcock, A., Harmark, K., Davidson, B.E., Hickey, M.W., Hillier, A.J. y Wan, J. (1997) Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. *Journal of Applied Microbiology*. 83, 248–258

Cox Lynton J. (1989) A perspective on listeriosis. *Institute of Food Technologists*. 43:12, 52-59

Cruz S. y Ulloa M. (1973) Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y otros países Latinoamericanos. *Revista de la Sociedad de Historia Natural*. 34, 423-457.

Cutter, C.N. and Siragusa G. (1995). Population reductions of Gram negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. *Journal of Food Protection* 58, 977-983.

De Vuyst L. y Vandamme E. J. (1994) Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. Blackie Academic and professional. London, England.

De Vuyst, L. (1995). Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. *Journal of Applied Bacteriology*. 78, 28-33.

Del Castillo R. R. y Mestres J.L. (2004) Productos lácteos tecnología, Ediciones UPC, Barcelona. 102

---

Deetae, P., Mounier, J., Bonnarme, P., Spinnler, H.E., Irlinger, F. y Helinck S. (2009) Effects of *Proteus vulgaris* growth on the establishment of a cheese microbial community and on the production of volatile aroma compounds in a model cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1404–1413.

Díaz G., Guyot J. P., Ruiz-Teran F., Morlon-Guyot J., and Wacher C. (2003). Microbial and Physiological Characterization of Weakly Amylolytic but Fast-Growing Lactic Acid Bacteria: a Functional Role in Supporting Microbial Diversity in Pozol, a Mexican Fermented Maize Beverage. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 4367- 4374.

Duffy, G. and Walsh C. (2005) Antibiotic resistance in foodborne pathogens. *The National Food Centre*, Ashtown, Dublin. Research report No. 76.

Doyle M.P. and Beuchat L.R. (2007) Food Microbiology. 3<sup>o</sup> Edition. ASM Press. Washington, DC. 249-250.

Escalante A., Wacher C., Farrés A. (2001) Determination of lactic acid bacteria diversity present in pozol, a Mexican traditional fermented dough, determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 21-31.

Franz C. M. A. P., Toit M. D., Olasupo N.A., Schillinger U., Holzapfel W. H. (1998). Plantaricin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 From Ready-to-eat salad. *Letters in Applied Microbiology*. 26, 231-235.

González, B. y Dreyfus, G. (2003). Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. Mensaje Bioquímico, Depto. Bioquímica, Facultad Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México. XXVII.

González, C., Langdon, G.M., Bruix, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M. y Rico, M. (2000) Bacteriocin AS-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 21, 11221–11226.

Gutiérrez, J. (2005). Caracterización inmunoquímica de la enterocina p y evaluación de su clonación, producción y expresión funcional en *Escherichia coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Lactococcus lactis* y *Pichia pastoris*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España.

Havarstein, L.S., Diep, D.B. and Nes, I.F. (1995) A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Molecular Microbiology*. 16, 229-240.

Hoover, D. G., Steenson, L. R. (1993). Bacteriocins of lactic acid bacteria. Department of Food Science, University of Delaware, Newark, DE, USA. Ed. Academic Press Inc.

Jack, R. W., J. R. Tagg, y B. Ray. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 59, 171-200.

---

- 
- Jay J.M. (1992) *Microbiología Moderna de los alimentos*. 3<sup>ra</sup> edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. 153-155, 299-335, 441-449, 462-465, 537-564 y 590-593.
- Jiménez-Díaz, R., Rios-Sánchez, R. M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, y Piard, J.C. (1993). Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 59, 1416-1420.
- Jung, G. y Sahl, H. (1991) *Nisin and Novel Lantibiotics*. ESCOM, Leiden. Universidad de Tübingen.
- Kang, J.H. and Lee, M.S. (2005) Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1169–1176.
- Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, P. G. G. A. de Ruyter, E. J. Luesink y W. M. de Vos. (1995). Autorregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*. 270, 27299-27304.
- Kuipers, O.P., P.G.G.A de Ruyter, M. Kleerebezem y W. M. de Vos. (1998). Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 64, 15-21.
- Kelly, W. J., Asmundson R. V. y Huang C.M. (1996). Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*. 81, 657-662.
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12, 39-86.
- Lewus C.B., Sun S. and Montville. (1992). Production of an Amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesentoroides* strain. *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 143-149.
- Lewus C.B. and Montville. (1991). Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 13, 145-150.
- Leyer, G. J. y Johnson, E. A. (1993) Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59, 1842-1847.
- Lior, H., (1994). Classification of *Escherichia coli*. In: Gyles, C.L. Ed., *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. Cab International, UK, pp. 46–47.
- Lomize, A., Lomize, M. and Pogozheva, I. (2005-2010). Orientations of Proteins in Membranes (OPM) database. *Lactobacillus sake* University of Michigan, USA
-

---

Disponible en <http://opm.phar.umich.edu/species.php?species=Lactobacillus%20sake>  
Consultado: 15 de Junio, 2010.

Lomize, A., Lomize, M. and Pogozeva, I. (2005-2010). Orientations of Proteins in Membranes (OPM) database. *Lactobacillus plantarum* University of Michigan, USA disponible en <http://opm.phar.umich.edu/species.php?species=Lactobacillus%20plantarum> Consultado: 15 de Junio, 2010.

Lomize, A., Lomize, M. and Pogozeva, I. (2005-2010). Orientations of Proteins in Membranes (OPM) database. *Enterococcus faecalis* University of Michigan, USA disponible en <http://opm.phar.umich.edu/species.php?species=Enterococcus%20faecalis> Consultado: 15 de Junio, 2010.

Martínez, B. (1996). Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* aislados de quesos asturianos: nisina z y lactococina 972, Tesis doctoral de la Universidad de Oviedo. Departamento de Biología Funcional, y del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), España, p. 27.

Mathieu, F., Sudrman, I., Rekhif, N., Milliere, J.B. y Lefebvre G. (1993). Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR 52. *Journal of Applied Bacteriology* 74, 372-379.

Mauriello, G., De Luca, E., La Stora, A., Villani, F. y Ercolini, D (2005). Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Letters in Applied Microbiology* 41, 464-469.

McAuliffe, O., Ross, R.P. and Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*. 25, 285-308.

McCormick, Beth A., Miller Samuel I., Carnes Denice. y Madara James L. (1995) Transepithelial Signaling to Neutrophils by Salmonellae: a Novel Virulence Mechanism for Gastroenteritis. *American Society for Microbiology*. 63:6, 2302-2309.

Meghrou, J., Lacroix, C., Simard RE. (1999). The effects on vegetative cells and spores of 3 bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 16, 105-14.

Messens, W., Verluyten, J., Leroy, F. y De Vuyst, L. (2003). Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *International Journal of Food Microbiology*. 81, 41-52.

Miliotis Marianne D. y Bier Jeffrey W. (2003). International Handbook of Foodborne Pathogens. Marcel Dekker, Inc.

Nataro, J. P. AND Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11:1, 142-201.

---

Nes, I.F., Diep DB, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V., and Holo H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 113–128.

Nes, I.F. y Holo, H. (2000) Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* (peptide Science). 55, 50-61.

Nissen-Meyer J., Larsen G.A., Sletten K., Daeschel M., Nes I.F. (1993). Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of 2 peptides. *Journal of General Microbiology*, 139:1973-8.

Ogunmodede, F., Jones, J. L., Scheftel, J, Kirkland, E, Schulkin, J. y Lynfield, R. (2005) Listeriosis prevention knowledge among pregnant women in the USA. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, March; 13(1): 11–15.

Papadelli, M., Karsioti, A., Anastasiou, R., Georgalaki, M., Tsakalidou, E. (2007). Characterization of the gene cluster involved in the biosynthesis of macedocin, the lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus*. Laboratory of Dairy Research, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Athens, Greece. *FEMS Microbiology Letters* 272 (1), 75–82.

Pelczar, (1993). Elementos de microbiología. Ed. Mc Graw-Hill. México D.F. (Traducido de la primera edición en ingles de Elements of Microbiology), 747.

Pereyra, E. M. y Trejo, E. (1999). Detección de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas aisladas de pozol. Tesis Licenciatura, Facultad de Química. UNAM.

Poirazi, P., Leroy, F., Georgalaki, M.D., Aktypis, A., De Vuyst L., Tsakalidou. (2007) Use of Artificial Neural Networks and a Gamma-Concept-Based Approach To Model Growth and Bacteriocin Production by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 under Simulated Conditions of Kasseri Cheese Production. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 768–776.

Requena T. y Peláez C. (1995). Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias Lácticas, Producción de bacteriocinas. *Revista española de ciencia y tecnología de alimentos*. 35:1, 19-44.

Rivera A. (2001). Efecto de la acción de microorganismos amilolíticos en la fermentación del pozol. Tesis Licenciatura, Facultad de Química. UNAM

Roos, R. P., M. Galvin, O. McAuliffe, S. M. Morgan, M. P. Ryan, D. P. Twommey, W. J. Meaney, y C. Hill. (1999). Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76:337-346.

Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C. y Ross R.P. (1996). An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 612-619.

- Sainz T. (1998). Estudio sobre la presencia y sobrevivencia de enterobacterias patógenas en el pozol, Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química. UNAM.
- Sainz T., Wachter C., Espinoza J., Centurión D., Navarro A., Molina J., Inzunza A., Cravioto A., Eslava C. (2001) Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *International Journal of Food Microbiology*. 71, 169-176.
- Sainz, T., Perez, J., Villaseca, J., Hernandez, U., Eslava, C., Mendoza, G., Wachter C. (2005) Survival to different acid challenges and outer membrane protein profiles of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pozol, a Mexican typical maize fermented food. *International Journal of Food Microbiology*. 105, 357– 367.
- Salinas Ch., C. (1958) Etnobiología e introducción a la bacteriología del pozol. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 63.
- Samelis, J., Roller, S., Metaxopoulos, J., (1994). Sakacin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* isolated from Greek dry fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology*. 76, 475–486.
- Schillinger, U., Lücke, F.K., (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 55, 1901–1906.
- Sosa V. y Zunino P. (2009). Effect of *Ibicella lutea* on uropathogenic *Proteus mirabilis* growth, virulence, and biofilm formation. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 3:10, 762-770.
- Sriornual, S. , Yanagida, F. ,Lin, L. , Hsiao, K. , Chen, Y. (2007) Weissellicin 110, a Newly Discovered Bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, Isolated from Plaa-Som, a Fermented Fish Product from Thailand. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 2247–2250
- Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70, 331-345.
- Tichaczek P.S., Nissen-Meyer, J., Nes I.F., Vogel R.F., Hammes W.P. (1992). Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. *Systematic and Applied Microbiology*. 15, 460-8.
- Upetri, G. C., y R. D. Hinsdill. (1975). Production and mode of action of lactocin 27-bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 7:13, 139-145.
- Ulloa, M., Herrera, T. y Lappe, P. (1987). Fermentaciones tradicionales indígenas de México. Serie de Investigaciones Sociales. *Instituto Nacional Indigenista*.16:13-20.

- Ulloa M. y Herrera T. (1982) Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche y tepache. *Anales del instituto de biología, UNAM*, 47-53. Serie Botánica, 145-163.
- Van Belkum, M.J., and Stiles, M.E. (2000). Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Natural Product Reports*. 17, 323–335.
- Van Reenen, C. A., Dicks, L.M.T. and Chikindas, M.(1998). Fermentation optimization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423. *Journal of fermentation and bioengineer*, 86, 174-179.
- Van Wely, K. H. M., J. Swaving, R. Freudl y A. J. M. Driessen. (2001). Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 25, 437-454.
- Wacher, C. A. Cañas, E. Bárzana, Lappe, P., Ulloa, M. y J.D. Owens. (2000). Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentation. *Food Microbiology*. 17: 251-256.
- Wacher, C. A. Cañas, P.E. Cook, E. Bárzana y J.D. Owens. (1993). Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9, 269-274.
- Wacher, M. C. (1995) *Estudios sobre la microbiología del pozol*. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas (Alimentos), Facultad de Química, UNAM, México, 174 pp.
- Wacher M. C., (2004) Contribución de las bacterias lácticas en la salud infantil. Simposio CONAMI <http://www.microbiologia.org.mx/CONAMI/Resumenes-Simposios/Wacher.doc> Consultado: 5 de Octubre de 2009.
- Xiao, H., Chen, X., Chen, M., Tang, S., Zhao, X. y Huan L. (2004). Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50. *Microbiology*, 150, 103–108.
- Yang, R., y B. Ray. (1994). Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology*. 11:281-291.
- Zamfir M., Callewaert R., Cornea P.C., Savu L., Vatafu I. y De Vuyst L. (1999). Purification and Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *Journal of Applied Microbiology*. 87, 923-931.
- Zapata, S., Muñoz, J., Ruiz, O., Montoya, O. y Gutiérrez, P. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina, *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*. 16(1), 75-82.