



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE BACTERIAS DEL  
GENERO *WEISSELLA* AISLADAS DEL POZOL**

**TESIS**

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

**PRESENTA  
CARLOS ALBERTO PAZ VALDÉS**



**MÉXICO, D.F.**

**2014**



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:** Olga del Carmen Velázquez Madrazo

**VOCAL:** GLORIA DIAZ RUIZ

**SECRETARIO:** Francisco Ruiz Teran

**1er. SUPLENTE:** Norma Angelica Camacho de la Rosa

**2° SUPLENTE:** Maria del Carmen Wachter Rodarte

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 324, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA CONJUNTO E,  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**ASESOR DEL TEMA: GLORIA DÍAZ RUIZ**

---

**SUPERVISOR TÉCNICO: MA. DEL CARMEN WACHER RODARTE**

---

**SUSTENTANTE: CARLOS ALBERTO PAZ VALDÉS**

---

# Índice

Índice.....	i
Índice de tablas.....	v
Índice de figuras.....	vii
<b>1 Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Antecedentes.....</b>	<b>3</b>
2.1 Alimentos fermentados.....	3
2.2 Pozol.....	5
2.2.1 Proceso de elaboración del pozol.....	6
2.2.1.1 Limpieza del maíz.....	6
2.2.1.2 Nixtamalización.....	6
2.2.1.3 Lavado.....	6
2.2.1.4 Segunda cocción.....	7
2.2.1.5 Remojo.....	7
2.2.1.6 Molienda.....	7
2.2.1.7 Formación de la bola.....	7
2.2.1.8 Envoltura.....	8
2.2.1.9 Fermentación.....	8
2.3 Diversidad microbológica presente en el pozol.....	10
2.4 Bacterias ácido lácticas.....	11
2.4.1 Clasificación.....	12
2.5 Bacterias ácido lácticas en el pozol.....	15
2.5.1 <i>Enterococcus italicus</i> .....	15
2.5.1.1 Importancia en alimentos fermentados.....	16
2.5.2 <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> .....	17
2.5.3 <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	17
2.5.4 <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> .....	18
2.5.5 <i>Streptococcus infantarius</i> .....	19
2.5.6 <i>Weissella confusa</i> .....	19

<b>2.6</b>	<b>Bacteriocinas.....</b>	<b>21</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Clasificación de las bacteriocinas.....</b>	<b>23</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Características de las bacteriocinas.....</b>	<b>25</b>
<b>2.6.2.1</b>	<b>La termoresistencia.....</b>	<b>27</b>
<b>2.6.2.2</b>	<b>Espectro de inhibición.....</b>	<b>27</b>
<b>2.6.2.3</b>	<b>Incremento del espectro de inhibición.....</b>	<b>27</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Biosíntesis y regulación.....</b>	<b>28</b>
<b>2.6.3.1</b>	<b>Biosíntesis y regulación de la clase I (lantibioticos).....</b>	<b>28</b>
<b>2.6.3.2</b>	<b>Biosíntesis y regulación de bacteriocinas de clase II.....</b>	<b>29</b>
<b>2.7</b>	<b>Mecanismo de acción.....</b>	<b>31</b>
<b>2.7.1</b>	<b>Bacteriocinas de la clase IA.....</b>	<b>31</b>
<b>2.7.2</b>	<b>Bacteriocinas de la clase IIA.....</b>	<b>32</b>
<b>2.7.3</b>	<b>Bacterias indeseables en los alimentos.....</b>	<b>33</b>
<b>2.7.3.1</b>	<b><i>Esterichia coli</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>2.7.3.2</b>	<b><i>Listeria monocytogenes</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>2.7.3.3</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>2.7.3.4</b>	<b><i>Salmonella</i> Typhimurium.....</b>	<b>35</b>
<b>2.7.3.5</b>	<b><i>Bacillus cereus</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>2.7.3.6</b>	<b><i>Enterobacter cloacae</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>2.7.3.7</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>Hipotesis.....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1</b>	<b>Microorganismos.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Reactivación de cepas.....</b>	<b>43</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Confirmación de la pureza de las cepas de las bacterias ácido lácticas y patógenas.....</b>	<b>43</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Conservación de las bacterias ácido lácticas y patógenas en glicerol al 20%.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2</b>	<b>Efecto antimicrobiano de las bacterias lácticas del genero <i>Weissella</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Obtención y neutralización de los sobrenadantes.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Concentración de los sobrenadantes con rotavapor y bomba de vacío.....</b>	<b>45</b>

5.2.3	Cuantificación de proteína de los concentrados.....	45
5.2.4	Esterilización de los sobrenadantes concentrados.....	46
5.3	Determinación de la actividad antimicrobiana de los compuestos proteicos presentes en los SAWCN frente a diversas bacterias indicadoras.....	46
5.3.1	Método de difusión en agar.....	47
5.3.2	Preparación de placa de medio BHI.....	47
5.3.3	Preparación de sobrecapa de medio BHI.....	47
5.3.4	Ensayo del método de difusión en agar.....	47
5.4	Termoresistencia de las posibles bacteriocinas.....	48
5.5	Selección de los mejores sobrenadantes.....	48
5.5.1	Cinética de crecimiento bacteriano frente a un inhibidor.....	49
<b>6</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>51</b>
6.1	Reactivación de las cepas de bacterias ácido lácticas e indicadoras a estudiar y comprobación de la pureza.....	51
6.1.1	Determinación de la pureza de las cepas a estudiar.....	51
6.1.1.1	Descripción macroscópica de las cepas.....	51
6.1.1.2	Descripción microscópica.....	53
6.2	Conservación de las cepas.....	55
6.3	Obtención, neutralización, cuantificación y purificación de los sobrenadantes obtenidos a partir de bacterias ácido lácticas del genero <i>Weissella</i> .....	56
6.3.1	Neutralización de los sobrenadantes.....	56
6.3.2	Cuantificación de proteína por el método de Bradford.....	57
6.3.3	Esterilización de los sobrenadantes mediante el método de filtración por membrana.....	58
6.4	Efecto de los compuestos proteicos sobre el crecimiento de diversas bacterias sensibles.....	59
6.4.1	Método de difusión en agar, pruebas frente a microorganismos patógenos y de descomposición presentes en alimentos.....	60
6.4.2	Método de difusión en agar, pruebas frente a bacterias ácido lácticas aisladas del pozol.....	63
6.5	Efecto de la temperatura hacia los sobrenadantes y su actividad biológica.....	67

<b>6.5.1</b> Influencia de la temperatura en la actividad biológica de los sobrenadantes de las cepas de <i>Weissella</i> frente a microorganismos patógenos y bacterias ácido lácticas aisladas del pozol.....	68
<b>6.6</b> Crecimiento de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol en los sobrenadantes de las cepas de <i>Weissella</i> tratados térmicamente.....	72
<b>6.6.1</b> <i>Leuconostoc Pseudomesenteroides</i> .....	73
<b>6.6.2</b> <i>Lactococcus lactis</i> .....	75
<b>6.6.3</b> <i>Enterococcus italicus</i> .....	76
<b>6.6.4</b> <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	77
<b>6.6.5</b> <i>Streptococcus infantarius</i> .....	78
<b>6.6.6</b> Cinética y crecimiento de las bacterias ácido lácticas aisladas del pozol en un medio de SAWCNTT.....	79
<b>6.6.6.1</b> <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> .....	80
<b>6.6.6.2</b> <i>Lactococcus lactis</i> .....	81
<b>7 Conclusiones</b> .....	83
<b>8 Perpectivas</b> .....	85
<b>9 Anexos</b> .....	86
<b>9.1</b> Anexo I: Reactivos.....	86
<b>9.2</b> Anexo II: Medios de cultivo.....	86
<b>9.3</b> Anexo III: Cuantificación de proteína por el método de Bradford.....	87
<b>10 Bibliografía</b> .....	90

## Índice de tablas

Tabla 1: Algunos alimentos fermentados de maíz de diferentes países del mundo (Steinkraus, 1996; Cruz & Ulloa 1973).

Tabla 2 Bacterias Lácticas aisladas del pozol (Tavera, 2010).

Tabla 3 Características diferenciales de las bacterias ácido lácticas (Carr et al., 2002).

Tabla 4. Algunos ejemplos de quesos que contienen enterococos (Hikmate et al., 2008).

Tabla 5. Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (Monroy et al., 2009).

Tabla 6: Clasificación y características de bacteriocinas por grupo (Kemperman et al., 2003).

Tabla 7. Propiedades de algunas bacteriocinas de la clase I y II (Chen & Hoover, 2003).

Tabla 8 Bacterias lácticas utilizadas en el presente trabajo.

Tabla 9 Bacterias ácido lácticas indicadoras en el experimento. En la tabla se detalla el código de la cepa, así como su procedencia.

Tabla 10 Cepas y origen de bacterias indicadoras utilizadas en esta metodología. Colección de microorganismos de la Facultad de Química, UNAM.

Tabla 11 Características macroscópicas de las cepas a estudiar.

Tabla 12 Características microscópicas de las cepas a estudiar.

Tabla 13 Valores de pH de los cultivos de BL incubadas durante 24 horas.

Tabla 14 Efecto de los sobrenadantes producidos por cepas del género *Weissella* hacia diversas bacterias patógenas.

Tabla 15 Efecto de los sobrenadantes producidos por cepas del género *Weissella* hacia diversas bacterias ácido lácticas aisladas del pozol.

Tabla 16 Efecto antimicrobiano de los SAWCNTT hacia diversas bacterias patógenas.



Tabla 17 Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de las cepas de *Weissella* tratados térmicamente frente a diversas bacterias ácido lácticas aisladas del pozol.

Tabla 18 Combinaciones entre SAWCNTT y Bacterias indicadoras.

Tabla 19 Resumen del efecto de los sobrenadantes de *Weissella* a determinados tiempos clave.

Tabla 20 Preparación de la curva patrón de BSA a partir de una solución stock de 2000 $\mu$ g/ml.

## Índice de figuras

Figura 1 Estados de la República Mexicana, donde es consumido el pozol (Cañas et al., 1993; Wachter et al., 1993).

Figura 2 Proceso de elaboración del pozol (Cañas *et al.*, 1993).

Figura 3 Concentraciones de microorganismos en nueve muestras de masa indígena y nueve de masas mestizas. (Wachter, 2000).

Figura 4. Fermentación láctica homofermentativa (directa) (Cabeza, 2006).

Figura 5. Fermentación láctica heterofermentativa (Cabeza, 2006).

Figura 6 Biosíntesis de lantibióticos.

Figura 7. Biosíntesis de las bacteriocinas Clase II.

Figura 8 Mecanismo de acción de las bacteriocinas clase I.

Figura 9. Mecanismo de acción de las bacteriocinas clase II.

Figura 10 Bacterias ácido lácticas conservadas en glicerol al 20%.

Figura 11 Bacterias ácido lácticas indicadoras conservadas en glicerol al 20%.

Figura 12 Bacterias indicadoras, patógenas y de descomposición conservadas en glicerol al 20%.

Figura 13 Concentración de proteína en el SAWCN.

Figura 14 Efecto de los sobrenadantes producidos por cepas del género *Weissella* en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 15 Efecto de los sobrenadantes aislados de *Weissella*, en el crecimiento de *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

Figura 16 Efecto de los SAWCNTT Lilis 13 y 3a en el crecimiento de *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

Figura 17. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de *Weissella* tratados térmicamente en el crecimiento de *Lactococcus lactis*.

Figura 18 Efecto de los sobrenadantes de *Weissella* tratados térmicamente en el crecimiento de *Enterococcus italicus*.

Figura 19 Efecto de los sobrenadantes de *Weissella* en el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*.

Figura 20 Efecto de los sobrenadantes de *Weissella* en el crecimiento de *Streptococcus infantarius*.

Figura 21 Efecto de los sobrenadantes de *Weissella* en el crecimiento de *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

Figura 22 Efecto de los sobrenadantes de *Weissella* en el crecimiento de *Lactococcus lactis*.

Figura 23 Kit Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent Bio-Rad®.

Figura 24 Curva patrón: Concentración de proteína en el estándar vs absorbancia. Mediante el método de Bradford.

# 1. Introducción

La fermentación es un proceso que surge como método de conservación de los alimentos, además se sabe que la fermentación produce un aumento considerable de los nutrientes que hay en los alimentos (Campbell & Platt, 1987). El pozol es una bebida tradicional fermentada de maíz; refrescante, ácida, sin alcohol y es de origen maya. Se consume en el sureste de México principalmente en los estados de Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo y Yucatán. Para prepararlo, los granos de maíz se hierven en agua con cal. El nixtamal obtenido se muele y la masa se moldea para formar una bola compacta que se envuelve en hojas de plátano. Se deja a temperatura ambiente desde unas pocas horas a varios días o incluso más de un mes. Una gran comunidad microbiana compleja se incorpora sobre todo durante el procedimiento de molienda. La microbiota puede estar constituida por bacterias, levaduras y hongos (Wacher et al., 1993), pero las bacterias ácido lácticas son las encargadas de la fermentación del pozol, la cual es la etapa más importante de su elaboración debido a que durante la misma se desarrolla el sabor y aroma, aumenta el valor nutricional y se retrasa el deterioro del mismo.

En la fermentación del pozol existe una gran gama de microorganismos, entre los cuales se han encontrado bacterias ácido lácticas de los géneros: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Weissella*.

Cada microorganismo ha venido evolucionando a lo largo del tiempo cambiando diversas características que los hacen únicos y les permitan subsistir en su medio; ya sea para competir por los nutrientes o generar compuestos capaces de inhibir o erradicar el crecimiento de otros microorganismos. Existen compuestos que las bacterias ácido lácticas (BAL) secretan, como lo es al ácido láctico y acético, que promueven las condiciones para el retraso del deterioro del alimento, sin embargo, las BAL también son capaces de producir sustancias distintas a estos ácidos. Entre las que se encuentran el peróxido de hidrogeno, etanol, dióxido de carbono y bacteriocinas.

El uso de BAL en la biopreservación de alimentos ha tomado gran importancia en los últimos años, dada la gran cantidad de problemas relacionados con las formas de conservación de los alimentos frescos, sumado al hecho de la continua exigencia de disminuir y prohibir cada vez más el uso de aditivos químicos en los alimentos. Esto obliga a la búsqueda de metodologías alternativas para conservar los alimentos (FAO/WHO, 1997).

En dos estudios previos (Tavera, 2010 y Rodríguez 2011) se ha demostrado que bacterias ácido lácticas aisladas del pozol, entre las cuales se encuentra el género *Weissella* han generado un efecto bacteriostático sobre otros microorganismos. *Weissella* está presente en diferentes etapas de la fermentación del pozol, por lo que es posible que bacterias de dicho género, tengan la capacidad de sintetizar bacteriocinas, capaces de inhibir microorganismos

patógenos y de ejercer un efecto antagonista frente a otras bacterias lácticas importantes en la fermentación del pozol.

A partir de bacterias del género *Weissella* aisladas e identificadas en trabajos previos, se evaluará el potencial de las mismas para producir compuestos de carácter proteico con efecto antimicrobiano, llamados “bacteriocinas”, así como el efecto que produzcan sobre el desarrollo de bacterias patógenas y de descomposición presentes en alimentos y también frente a algunas bacterias ácido lácticas predominante durante la fermentación del pozol.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. ALIMENTOS FERMENTADOS.**

Los alimentos fermentados son aquellos alimentos que han estado sujetos a la acción de microorganismos o enzimas, de tal forma que, los cambios originados en estos, causan modificaciones significativas en los sustratos iniciales. Son producidos en todo el mundo desde hace años.

La integración de métodos fermentativos en la conservación de alimentos tiene ventajas, tales como: la reducción en el tiempo de cocción, aumento en la digestibilidad del sustrato, así como cambios en el sabor, aroma y textura del producto final. Se conocen cuatro principales procesos de fermentación: alcohólica, ácido láctico, ácido acético y alcalofermentación (Campbell & Platt, 1987).

Cada cultura está íntimamente ligada a ciertos alimentos que forman parte de su dieta (Vargas, 1984). Es interesante notar que existen similitudes entre alimentos fermentados de regiones geográficamente lejanas del mundo. Tanto en Africa como en América latina predominan los alimentos fermentados preparados a base de sustratos amiláceos (de cereales y tubérculos), en la tabla 1 se muestran algunos alimentos fermentados de maíz.

**Tabla 1 Algunos alimentos fermentados de maíz de diferentes países del mundo (Steinkraus, 1996; Cruz & Ulloa 1973).**

Nombre	Descripción	Tratamiento del maíz previo a la fermentación	País donde se consume
<b>Chicha</b>	Bebida alcohólica de maíz, clara efervescente, amarillenta	Adición de saliva o germinación del maíz	Ecuador, Brasil, Bolivia, Perú, Colombia, Argentina.
<b>*Pozol</b>	Bebida ácida no embriagante preparada diluyendo en agua masa fermentada de maíz nixtamalizado.	Nixtamalización y molienda de granos.	México
<b>Uji</b>	Sopa cremosa preparada a partir de una suspensión de maíz fermentado antes o después de la cocción.	Preparación de una pasta mezclando el cereal crudo molido con agua.	Kenya
<b>Ogi</b>	Papilla de sabor ácido, parecido al del yogurt.	Remojo de los granos de maíz.	Nigeria
<b>Mahewu</b>	Bebida ácida no alcohólica de maíz.	Preparación de una suspensión de maíz molido con agua, a la que se le agrega harina o pasta de trigo.	Sudáfrica
<b>Kenkey</b>	Masa agria de maíz que se consume cocida con caldo de carne o pescado.	Remojo de los granos de maíz en agua.	Kenya
<b>Cerveza kaffir</b>	Bebida alcohólica efervescente, con sabor ácido parecido al del yogurt.	Remojo y germinación de una parte de los granos de maíz, la otra parte se muele, se mezcla con agua y se cuece.	Sudáfrica

Los alimentos fermentados se han consumido en México desde épocas prehispánicas (Vargas, 1999; Escamilla 2007). En México existe una gran gama de alimentos fermentados entre los cuales se encuentran el: pulque, colonche, tepache, tesguino, mezcal, tequila y el pozol entre otros (Herrera, 2005). Las bebidas fermentadas en México, se han investigado desde la época colonial hasta nuestros días. Al inicio, se centraron en aspectos, historiográficos, antropológicos, étnicos, sociales y médicos; posteriormente incluyeron la

química y microbiología de estos productos (Herrera, 1993; Lozano, 1997). Trabajos más recientes, abordan el estudio de las bebidas y alimentos fermentados bajo una perspectiva interdisciplinaria, integrando el conocimiento étnico, microbiológico y químico (Sánchez, 2010).

## 2.2. POZOL

El pozol es una bebida fermentada, no alcohólica, ácida y refrescante hecha a base de maíz, preparada en nuestro país desde antes de la conquista, en algunos grupos étnicos es considerado como alimento básico (Cañas et al., 1993; Wachter et al., 1993). El pozol es comúnmente consumido, en los estados de Chiapas, Tabasco, Campeche y Yucatán, como bebida fermentada o no fermentada. El consumo diario de las diferentes gamas de pozol va de 80 a 1000 g por persona (figura 1) (Ulloa et al., 1987).



Figura 1 Estados de la República Mexicana, donde es consumido el pozol (Cañas et al., 1993; Wachter et al., 1993).



El pozol, se ha venido utilizando desde la época prehispánica como ofrenda en diversas ceremonias las cuales están estrechamente relacionadas con la cosecha, principalmente del maíz; pero también su uso se ha vinculado con fines medicinales para controlar diarreas, adicionado de miel de abejas se usa para reducir la fiebre, y los mayas preparan cataplasmas de pozol enmohecido para curar infecciones superficiales (Ulloa et al., 1987).

### **2.2.1. Proceso de elaboración del pozol**

Su preparación es de forma artesanal siendo esto uno de los principales factores que podrían influir en la gran diversidad microbiológica de este alimento. El proceso de elaboración del pozol incluye diversas etapas que son: limpieza del maíz, nixtamalización, lavado, segunda cocción, remojo, molienda, formación de la bola envoltura y fermentación (figura 2).

#### **2.2.1.1. Limpieza del maíz**

El proceso de elaboración del pozol comienza desde que el maíz es limpiado, siendo esta la eliminación de polvo, material extraño y algunos granos podridos que darían una mala apariencia al pozol.

#### **2.2.1.2. Nixtamalización**

El maíz se cocina en una solución de cal aproximadamente un 1% (m/v) con agua, durante un periodo de 1 a 3 horas, este proceso tiene como objetivo la separación de la cascarrilla del grano (pericarpio). La nixtamalización incluye también un efecto nutricional sobre el maíz, mismo que se ve reflejado en el incremento de su digestibilidad (Camacho et al., 2005).

#### **2.2.1.3. Lavado**

El lavado se realiza utilizando agua del río, del pozo o potable, en este proceso se elimina el pericarpio y la cal. Estudios previos han reportado que este proceso debe de realizarse antes de la elaboración del pozol ya que, sino se lava bien el grano de maíz se impregna de cal, adquiere una tonalidad verde-azulosa y el sabor del pozol se vuelve picante (Cañas *et al.*, 1993).

#### **2.2.1.4. Segunda cocción**

El pozol puede llevar o no una segunda cocción ya que el pozol elaborado por los indígenas no concibe esta segunda cocción mientras que el pozol mestizo sí. Esta segunda cocción consiste en cocer el nixtamal durante un amplio intervalo de tiempo (aproximadamente de 3 a 12 horas) en agua provocando así que el maíz explote o floree proporcionando una textura más tersa al mismo y disminuyendo la sensación que guarda después de que se bebe.

#### **2.2.1.5. Remojo**

Como se mencionó anteriormente, el remojo se realiza ya sea con el agua del nixtamal (para el pozol indígena) o bien con el agua de la segunda cocción (pozol mestizo), este proceso tiene como finalidad que la humedad del grano incremente hasta 48-55%, así como también facilitar la remoción del pericarpio. Dicho proceso se realiza dejando reposar el grano en el agua durante toda la noche.

#### **2.2.1.6. Molienda**

La molienda es llevada a cabo después del remojo del grano. Este tratamiento es realizado tanto en un molino de mano como en un molino comercial (figura 2). Las condiciones de este proceso lo vuelven en la principal fuente de ingreso de microorganismos, ya que el lavado del molino es muy escaso y solo se remueven al final del día los restos de masa sin el uso de agua potable (Wacher et al., 1993) lo que hace posible que adquiera una gran variedad de bacterias.

#### **2.2.1.7. Formación de la bola**

La formación de la bola se realiza justo después de la molienda tomando con las manos la masa y formando bolas de aproximadamente 8 cm de diámetro y un peso entre 150-170g (figura 2) (Rodríguez, 2011). Dicho tratamiento se realiza sobre la mesa o bien una tabla de madera. Durante este proceso se incorpora en la masa una gran cantidad de microorganismos.

#### **2.2.1.8. Envoltura**

Las bolas de masa se envuelven completamente en hojas de plátano, sin embargo actualmente algunos productores han optado por hacerlo con bolsas de plástico (figura 2).

#### **2.2.1.9. Fermentación**

Finalmente las bolas se dejan reposar por un periodo de 12 horas a 4 días a temperatura ambiente permitiendo que los microorganismos fermenten la masa (figura 2) (Wacher, 2000). El tiempo de fermentación afecta de forma directa los atributos sensoriales del producto ya que el pozol con menos tiempo de fermentación no es muy ácido, pero un pozol fermentado por varios días tiene un sabor muy ácido además de que presenta un notorio crecimiento superficial de mohos (Cañas et al., 1993).

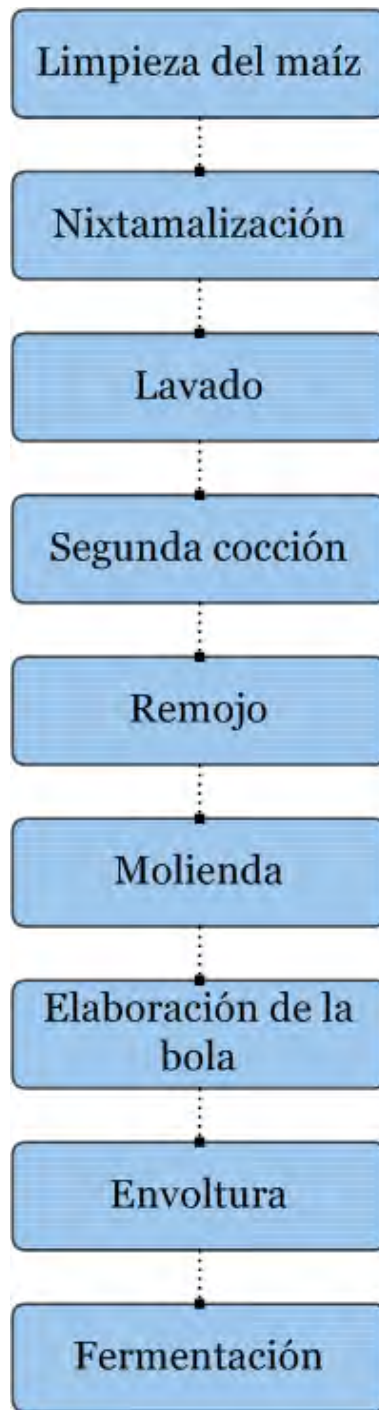
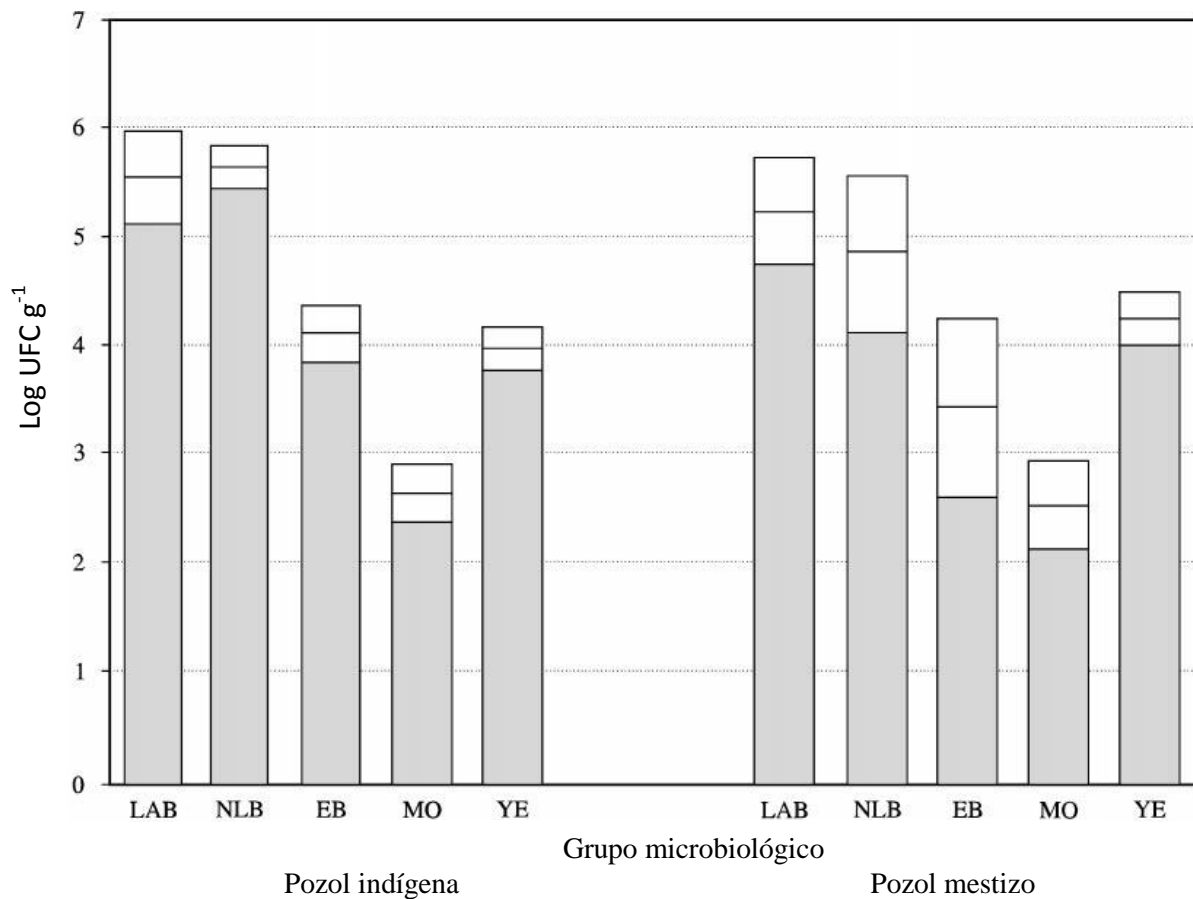


Figura 2 Proceso de elaboración del pozol (Cañas *et al.*, 1993).

### 2.3. DIVERSIDAD MICROBIOLÓGICA PRESENTE EN EL POZOL

La fermentación del pozol es llevada a cabo por la microbiota natural constituida por bacterias lácticas, hongos y levaduras (Wacher et al., 1993) mismas que son incorporadas durante la molienda principalmente. Las bacterias lácticas son el grupo mayoritario presente en la fermentación del pozol, como consecuencia de la acción de estas bacterias el pH desciende hasta valores de 4.

Durante su proceso de elaboración ocurren una gran variedad de cambios en las condiciones del tratamiento (temperatura, humedad, pH, etc.) que generan cambios en la carga microbiana; como la nixtamalización, la segunda cocción en el pozol mestizo que disminuye considerablemente la carga microbiana del medio. Por otro lado, después del remojo y la molienda, la carga microbiana aumenta de forma considerable. La carga inicial de bacterias ácido lácticas, mesófilos aerobios, enterobacterias, hongos y levaduras, así como la diferencia que existe entre el pozol indígena y el pozol mestizo (fig. 3).



**Figura 3 Concentraciones de microorganismos en nueve muestras de masa indígena y nueve de masas mestizas. Las concentraciones de bacterias del ácido láctico (LAB), mesofilas aerobias (NLB), enterobacterias (EB), hongos (MO) y levaduras (YE) en muestras recién preparadas de pozol mestizo y del San Cristóbal de las Casas, Chiapas. Columnas en blanco son las desviaciones estándar y las líneas centrales son los medios (Wacher, 2000).**

Sin embargo, pese a la gran diversidad microbiológica del pozol; las bacterias ácido lácticas son el grupo dominante en su fermentación (en todas sus etapas), además de que son las responsables de su acidificación son un factor importante en la inhibición de microorganismos no deseados. Pero así como la diversidad microbiana en el pozol es amplia también lo es el grupo de las bacterias ácido lácticas entre las cuales destacan: bacterias ácido lácticas no amilolíticas y bacterias ácido lácticas amilolíticas. Estudios previos han demostrado que la mayoría de las bacterias ácido lácticas presentes en la masa al inicio de la fermentación son amilolíticas, siendo el género *Streptococcus* el predominante (Díaz-Ruiz et al., 2003).

Hasta la fecha, se han identificado diferentes especies de bacterias ácido lácticas del pozol entre las que destacan las descritas en la Tabla 2.

**Tabla 2. Bacterias Lácticas aisladas del pozol (Tavera, 2010).**

<i>Streptococcus macedonicus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Enterococcus sulfureus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Enterococcus saccharolyticus</i>
<i>Weissella confusa</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>

## 2.4. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

El concepto de las bacterias ácido lácticas (BAL) como un grupo de organismos fue desarrollado a principios del siglo XX, precedido por pioneros científicos y avances técnicos durante la última parte del siglo XIX. La descripción general de las bacterias incluidas en este grupo es que son Gram positivas, no esporuladas, tiene una morfología de cocos o bacilos, son aerobios facultativos o anaerobios, son catalasa y oxidasa negativa,

tienen producción de ácido láctico como el principal producto final, no reducen nitratos a nitritos y no utilizan el lactato como sustrato, entre otras (Stiles & Holzapfel., 1997).

### 2.4.1. Clasificación

La clasificación en diversos géneros de las bacterias ácido lácticas, se basa en gran medida en: la morfología, el crecimiento frente a diversas condiciones pero también en la capacidad de fermentar los azúcares para generar su producto final (ácido láctico) es un factor para subdividir las; ya sea en homofermentativas o heterofermentativas (Cabeza, 2006).

#### Fermentación homofermentativa

Las bacterias ácido lácticas homofermentativas obtienen ácido láctico como producto principal de su fermentación a partir de la glucosa, sin embargo estos microorganismos tienen las enzimas aldolasa que permite la obtención de ácido láctico de forma directa como se muestra en la figura 4 (Cabeza, 2006).

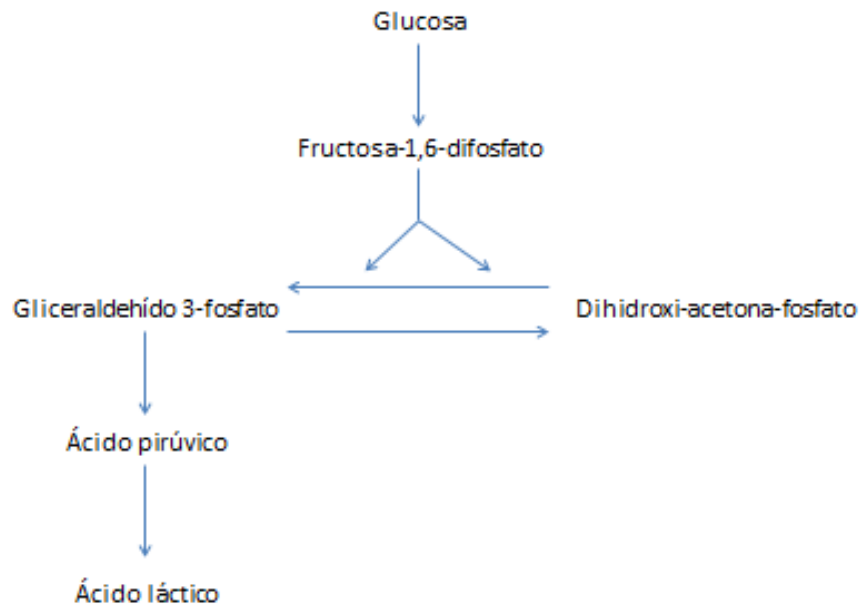
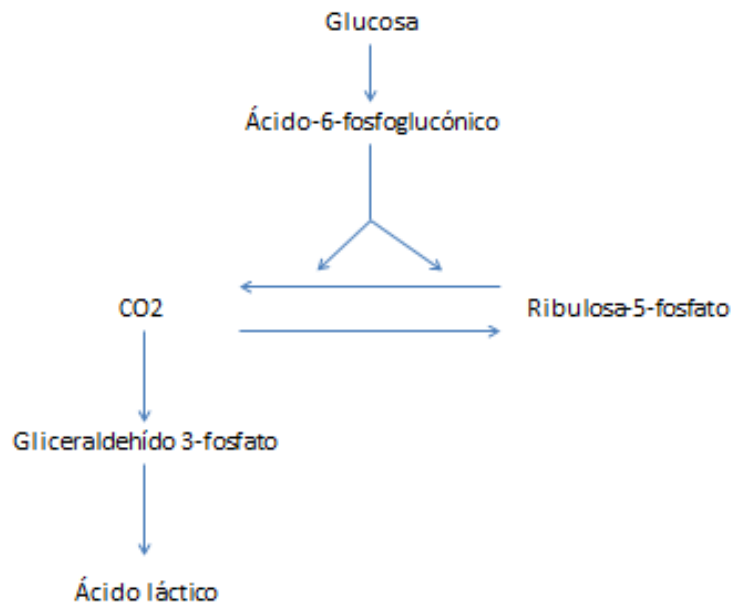


Figura 4. Fermentación láctica homofermentativa (directa) (Cabeza, 2006).

#### Fermentación heterofermentativa

Durante este proceso no solo se produce ácido láctico sino también dióxido de carbono, etanol y ácido acético. La principal diferencia en este proceso es que estas bacterias carecen

de la enzima aldolasa, por lo que la molécula de glucosa (6 carbonos) pasa a una pentosa (5 carbonos).



**Figura 5. Fermentación láctica heterofermentativa (Cabeza, 2006).**

La producción de ácido láctico no solo es un factor para clasificar a este género, sino que también es una de las principales características de su estudio, ya que dicha capacidad les permite inhibir a otros microorganismos y consolidarse como predominantes en el ecosistema microbiano. Además, en la industria de alimentos han sido utilizados para la mejora y conservación de los alimentos (Cabeza, 2006). Las principales bacterias ácido lácticas en la industria alimentaria pertenecen a los géneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Carr et al., 2002). Cada una de ellas posee diferentes características, además de su tipo de fermentación, tal como se muestra en la siguiente tabla.



**Tabla 3 Características diferenciales de las bacterias ácido lácticas (Carr et al., 2002).**

<i>Características</i>	<i>Carnob.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lactoc.</i> <i>Vagoc.</i>	<i>Leucon.</i> <i>Oenoc.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragenoc.</i>	<i>Weissella</i>
<b>Fermentación</b>	Homo	Homo	Homo	Homo	Hetero	Homo	Homo	Homo	Hetero
<b>Formación de tétradas</b>	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<b>CO<sub>2</sub> a partir de glucosa</b>	-	+	-	-	+	-	-	-	+
<b>Crecimiento a 10°C</b>	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>Crecimiento a 45°C</b>	-	+	+	-	-	+	+	-	-
<b>Crecimiento a 6.5%NaCl</b>	ND	+	+	-	+	+	-	+	+
<b>Crecimiento a 18%NaCl</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>Crecimiento a pH 4.4</b>	ND	+	+	+	+	+	-	-	+
<b>Crecimiento a pH 9.6</b>	-	-	+	-	-	-	-	+	-

*Carnob.*=*Carnobacterium*, *Lactob.*=*Lactobacilos*, *Enteroc*=*Enterococcus*, *Lactoc.*=*Lactococcus*, *Vagoc.*=*Vagococcus*, *Leucon.*=*Leuconostoc*, *Oenoc.*=*Oenococcus*, *Pedioc.*=*Pediococcus*, *Streptoc.*=*Streptococcus* y *Tetragenoc.*=*Tetragenococcus*.

ND= No determinado

+= Positiva

-= Negativa

+ -= Varía entre especies

Las bacterias ácido lácticas se usan tradicionalmente como cultivos iniciadores para la fermentación de los alimentos y bebidas debido a su contribución al desarrollo del sabor y aroma, y al retraso en el deterioro (Stiles & Holzapfel, 1997). El efecto de conservación se debe principalmente a las condiciones ácidas que estas bacterias producen en los alimentos

durante su desarrollo, pero son capaces de producir y excretar sustancias inhibidoras distintas de ácido láctico y acético. Estos incluyen el peróxido de hidrógeno, etanol, dióxido de carbono y bacteriocinas (De Vuyst & Vandamme, 1994).

## **2.5. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN EL POZOL**

Como se mencionó anteriormente, existe una gran gama de bacterias en el pozol, sin embargo, las BAL son las de mayor relevancia, ya que son las encargadas de la fermentación, así como de su sabor. A continuación se describen alguna de las BAL que se han encontrado en el pozol.

### **2.5.1. *Enterococcus italicus***

El número de especies incluidas en el género *Enterococcus* ha aumentado considerablemente en las últimas dos décadas, y más de 35 especies válidas son reconocidos actualmente (Carvalho, 2004). Los enterococos, forman parte de la flora normal del tracto gastrointestinal tanto humano como animal y del tracto genitourinario femenino humano, son cocos Gram positivos, que se encuentran aislados, en pares, o formando cadenas cortas que producen principalmente ácido láctico a partir de la fermentación de hidratos de carbono (Carrer, 2010). Ellos pertenecieron, clásicamente, a los *Streptococcus* grupo D de Lancefield; sin embargo, a mediados de la década de 1980 fueron oficialmente clasificados en su propio género. Son catalasa negativa y anaerobios facultativos.

Las características bioquímicas sobresalientes incluyen: la habilidad de crecer en presencia de NaCl al 6,5%, a temperaturas entre 10°C y 45°C, y hasta en un pH de 9,6. Tienen la capacidad de hidrolizar la esculina, crecer en presencia de bilis al 40%, sobrevivir 30 min a 60°C e hidrolizar la L-pirrolidonil β-naftil-amida (PYR); esta habilidad ha sido usada como parte de un test rápido para detección de enterococos en el laboratorio (Chenoweth, 2000).

*Enterococcus italicus* (itálicus. L. adjetivo masculino. Itálico de Italia, donde la bacteria fue aislada por primera vez). Son anaerobios facultativos, no móviles, no formadores de esporas, catalasa-negativos, no pigmentada, cocos Gram-positivos que se producen en pares o en cadenas cortas. Las colonias son de color blanco-gris, circular y lisa, con bordes

enteros (Fortina, 2004). Los *Enterococcus* han sido investigados por su gran importancia en diversas fermentaciones.

### 2.5.1.1. Importancia en alimentos fermentados

Los enterococos (principalmente *E. faecium* y *E. faecalis*) son muy frecuentes en la leche cruda y en los productos lácteos. Se desarrollan en gran variedad de quesos, especialmente en quesos artesanales producidos en el sur de Europa (Portugal, España, Italia y Grecia), como los de cabra crudos o pasteurizados, oveja o búfala, en muchos de los cuales juegan un papel importante en la maduración y el desarrollo del aroma (Hikmate et al., 2008).

**Tabla 4. Algunos ejemplos de quesos que contienen enterococos (Hikmate et al., 2008).**

<b>País de origen</b>	<b>Producto</b>
<b>España</b>	Cebreiro, Tetilla, Serra da Estella, Cueva de la Magahá, Quesailla y Torta Arochena, Genesoto, Armada, Idiazábal, Manchego
<b>Italia</b>	Fiore Sardo, Vanoi, Rolle, Mozzarella, Fontina, Provolone, Pecorino, Montasio
<b>Francia</b>	Saint Nectaires, Comté
<b>Grecia</b>	Feta, Kefalotyri, Batzos, Orinotyri, Anthotyro
<b>Portugal</b>	Picante, y otros quesos regionales
<b>Eslovenia</b>	Tolmic
<b>Serbia</b>	Zlatar
<b>Irlanda</b>	Cheddar
<b>Marruecos</b>	Jben

### **2.5.2. *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis***

Los lactococos son bacterias homofermentativas Gram-positivas y microaerofílicas que crecen a una temperatura de 10 ° C pero no a 45 °C, y producen ácido láctico a partir de glucosa. Se caracterizan por ser células ovoides que aparecen de forma individual, en parejas o en cadenas. A menudo sucede que las células de lactococos se extienden en una cadena, lo que los hace difíciles de diferenciar de los lactobacilos.

La mayoría de los microorganismos del grupo Lancefield de estreptococos han sido transferidos al género *Lactococcus*; el grupo móvil de estreptococos se ha integrado en el género *Vagococcus*. El género *Lactococcus* incluye cinco especies: *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis* y *Lactococcus lactis*. Sin embargo, entre las especies de este género sólo *Lactococcus lactis* se utiliza en la tecnología de productos lácteos (Dalmaso et al., 2008).

Esta especie tiene dos subespecies y una biovar: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* (Schleifer et al., 1985; Stiles y Holzapfel., 1997). Su hábitat natural son las plantas verdes, en particular para los grupos *Lc. lactis* subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis*. Debido a que poseen el sistema fosfotransferasa fosfoenolpiruvato-(PEP-STP), que aseguran la fermentación de la lactosa, algunos de estos organismos se han adaptado bien al crecimiento en la leche y en la actualidad el hábitat más reconocido para lactococos son productos lácteos (Axelsson, 1998).

### **2.5.3. *Lactobacillus plantarum***

Los lactobacilos son uno de los géneros de bacterias ácido lácticas más importantes y más utilizados en la producción de alimentos y están ganando cada vez más atención en el área de los probióticos (Ortua et al., 2007). Dentro del género *Lactobacillus*, *Lactobacillus plantarum* es un miembro del grupo de los lactobacilos heterofermentativos facultativos. Es una especie heterogénea y versátil que se encuentran en una variedad de nichos ambientales, incluyendo productos lácteos, carne, pescado, y muchos vegetales *L. plantarum* también se ha encontrado en muchas variedades de queso. Por otra parte, las cepas de *L. plantarum* han confirmado la capacidad de sobrevivir en condiciones de tránsito

gástrico, es decir pH ácidos y colonizar el tracto intestinal de los seres humanos y otros mamíferos (Candela et al., 2008). Varias propiedades terapéuticas o profilácticas específicas se han asociado con *L. plantarum*, tales como, reducción de la incidencia de diarrea en las guarderías, la reducción del dolor y el estreñimiento asociado con el síndrome del intestino irritable, la reducción de la hinchazón, flatulencia así como la capacidad para desplazar enteropatógenos de las células intestinales.

#### **2.5.4. *Leuconostoc pseudomesenteroides***

El género *Leuconostoc* está compuesto por microorganismos Gram positivos, catalasa negativas con morfología cocoide irregular. Estos organismos pueden ser identificados erróneamente como *Lactobacillus*, *Streptococcus* (en particular el grupo *viridans*), *Pediococcus* o incluso *Enterococcus* ya que todos comparten varias propiedades bioquímicas. A diferencia de otras bacterias Gram positivas, estos microorganismos tienen un importante marcador fisiológico relacionado con su resistencia intrínseca a la vancomicina.

Filogenéticamente, el género *Leuconostoc* pertenece al filo Firmicutes, clase bacilos, orden Lactobacillales. *Leuconostoc* están estrechamente relacionados con *Fructobacillus*, *Oenococcus* y *Weissella*, y juntos se les conoce comúnmente como el "grupo de *Leuconostoc*" de LAB.

*Leuconostoc pseudomesenteroides* está ampliamente presente en los alimentos fermentados, como la carne, los granos de cacao, el kimchi, las aceitunas, el vino y los productos lácteos. En la tecnología de los productos lácteos, las cepas de *Leuconostoc pseudomesenteroides* se encuentran en cultivos iniciadores en asociación con el género lactococos y *Leuconostoc mesenteroides*. Su presencia es beneficiosa para numerosos aspectos tecnológicos. *Leuconostoc pseudomesenteroides* posee un metabolismo heterofermentativo el cual produce gas (CO<sub>2</sub>), lo que permite la apertura en el queso y la colonización de *Penicillium* en el queso roquefort de pasta azul. También produce dextranas, que contribuyen a la textura y la percepción del gusto mediante el aumento de la viscosidad y a la estabilidad final de los productos. Por último, se producen compuestos aromáticos, tales como diacetilo, acetaldehído, y acetona, que contribuyen a las propiedades organolépticas de muchos productos lácteos.

### **2.5.5. *Streptococcus infantarius***

*Streptococcus* es un género de bacterias Gram positivas, no esporuladas, con forma esférica que forman parte de las bacterias ácido lácticas, se desarrollan en cadenas o pares, donde cada división celular ocurre a lo largo de un eje.

Dicho género se ha encontrado en plantas por lo que es lógico que algunas especies de este género se encuentren en leche cruda, asimismo se ha reportado en derivados lácteos y productos fermentados derivados de cereales (Gilliland, 2000).

*Streptococcus infantarius subsp. infantarius* es una bacteria ácido láctica comúnmente asociada con el tracto gastrointestinal de los animales y los seres humanos (Herrera, 2009). Además, ha sido aislado a partir de productos lácteos, las heces fecales de mamíferos, sangre humana y de pacientes con endocarditis (Jans et al., 2012; Wullschleger et al., 2013). Recientemente, se ha identificado como la especie predominante en varios productos lácteos africanos fermentados espontáneamente, tales como Susa, Gariss y fene (Jans et al., 2012) y en el pozol (Díaz et al., 2003). Pertenece al grupo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus* complejo equino grupo D de Lancefield que comprende a la especie *S. bovis*, *S. equino*, *Streptococcus lutetiensis* (conocida como *Streptococcus infantarius subsp. coli*, *Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus* (anteriormente *S. bovis* biotipo I), *Streptococcus gallolyticus subsp. macedonicus*, *Streptococcus gallolyticus subsp. pasteurianus* y *Streptococcus alactolyticus* (Schlegel et al., 2003; Poyart et al., 2002).

### **2.5.6. *Weissella confusa***

El género *Weissella* fue considerado como tal en 1990, una vez que se logró ver que *Leuconostoc paramesenteroides* era filogénicamente distinto a *Leuconostoc mesenteroides*. Son bacterias Gram-positivas, catalasa negativa, no formadoras de esporas, heterofermentativas, inmóviles, organismos irregulares o cocoides en forma de varilla (Björkroth et al., 2002). El género *Weissella* se han aislado de una variedad de fuentes, tales como: La caña de azúcar, el jugo de zanahoria, leche de fila y de aguas residuales (Björkroth et al., 2002), embutidos fermentados (Collins et al., 1993.), alimentos de Malasia (Leisner et al., 1999). Asimismo se ha visto presente en el intestino

humano, como parte de la microbiota normal (Nam et al., 2002). Forma parte de la microbiota del pozol (Ampe et al., 1999).

Así, en la actualidad hay más de 18 especies del género *Weissella* (Gervasio 2012), algunas de ellas son: *Weissella confusa*, *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica*, *Weissella kandleri*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella thailandensis* y *Weissella viridescens*. *Weissella* se ha aislado de una variedad de fuentes. *Weissella paramesenteroides* es una de las especies predominantes en verduras frescas y también juega un papel importante en la primera fase de fermentación del ensilaje (Dellaglio et al., 1984; Dellaglio & Torriani., 1986). *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica* y *Weissella viridescens* se han asociado comúnmente con carne o productos cárnicos (Niven et al., 1957; Milbourne, 1983; Collins et al., 1993), mientras que el hábitat natural de *Weissella kandleri* es desconocido (Hammes & Vogel., 1995). La cepa *Weissella kandleri* proviene de un manantial del desierto y las plantas del desierto se han sugerido como el principal hábitat de esta especie (Holzapfel et al., 1982). *Weissella confusa* se ha aislado de una variedad de fuentes, tales como: La caña de azúcar, el jugo de zanahoria, leche de fila y de aguas residuales (Björkroth et al. 2002), embutidos fermentados (Collins et al, 1993.), alimentos de Malasia (Leisner et al, 1999). Asimismo se ha visto presente en el intestino humano, como parte de la microbiota normal (Nam et al., 2002). Así como también en el pozol (Ampe et Al., 1999).

El género *Weissella* uno de los predominantes en la fermentación del pozol (Bolaños, 2004). Pero como todas las BAL también es una de los responsables de la acidificación del pozol y algunos atributos sensoriales. Así como también de erradicar la presencia de microorganismos patógenos. Sin embargo, las cepas de *Weissella* aisladas del pozol, no han sido estudiadas muy ampliamente en cuanto a sus propiedades probióticas o como productores de bacteriocinas. En un estudio previo realizado en el grupo de trabajo (Rodríguez, 2010), demostró que una cepa de este género aislada del pozol, era capaz de producir un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus infantarius* (bacterias que también forman parte de la microbiota del pozol) siendo la posible causa de este efecto la producción de compuestos proteicos llamados bacteriocinas.

Dentro del género *Weissella* ha sido ya investigado su potencial como productor de bacteriocinas mostrando inhibición contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* (Chavasirikunton et al., 2007). Se han reportado cepas capaces de inhibir la adherencia de *Helicobacter pylori* a las células del intestino humano (Nam et al., 2002).

## 2.6. BACTERIOCINAS

El término bacteriocina fue usado inicialmente por Jacob en 1953 para designar proteínas con actividad antibacteriana (Chen y Hoover, 2003). Sin embargo, una definición más completa las clasifica como péptidos biológicamente activos que tienen propiedades bactericidas o bacteriostáticas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora. Son de naturaleza proteica, difieren de los antibióticos, ya que son producidas ribosomalmente, mientras que los antibióticos son producidos por el metabolismo celular (Sablón et al., 2000).

Se describieron por primera vez en *Escherichia coli* y, posteriormente, en bacterias Gram positivas. Sin embargo el nombre asignado a cada bacteriocina deriva del género o especie de la bacteria productora, solamente agregando “cina”. Por ejemplo, pediocina de *Pediococcus acidilacti* (Chen y Hoover, 2003). Su producción se da en una gran gama de bacterias que pueden servir como barreras antimicrobianas y ayudar a reducir los niveles de microorganismos patógenos (Fernández, 2005). Estos polipéptidos son termoestables, así como activos contra otras bacterias, no obstante la cepa productora tiene un mecanismo específico de inmunidad (Cotter et al., 2005).

Se cree que el 99% de las bacterias pueden producir cuando menos una bacteriocina y la única razón de que no se hayan aislado es debido a que han sido muy poco estudiadas (Gordon & O'Brien, 2006).

Entre las bacterias Gram positivas, las bacterias ácido lácticas son un grupo especialmente rico en cepas productoras de bacteriocinas. A partir del descubrimiento de la nisina hasta nuestros días, la producción de bacteriocinas se ha descrito en organismos de todos los géneros de las bacterias lácticas. De Vuyst y Vandame (1994) citan hasta 89 bacteriocinas diferentes en función de sus características bioquímicas, estructura primaria, determinantes genéticos, rango de microorganismos inhibidos, modo de acción, etc.



Las bacteriocinas que son sintetizadas por bacterias ácido lácticas han despertado un gran interés en la microbiología de alimentos, debido a que poseen un efecto bactericida hacia una gran cantidad de bacterias Gram positivas patógenas como *Listeria monocytogenes* entre otras o algunas relacionadas al deterioro de los alimentos, además han demostrado actividad hacia bacterias Gram negativas en las cuales se observa un mayor efecto bajo ciertas condiciones de estrés (Ray & Bhunia, 2008).

**Tabla 5. Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (Monroy et al., 2009).**

Microorganismo productor	Bacteriocina
<i>L. lactis</i> WNC20	Nisina Z la
<i>L. sakei</i> 148	Lactocina S
<i>L. sakei</i> L45	Lactocina S
<i>L. sakei</i> LTH673	Sakacina K
<i>L. sakei</i> l151	Sakacina P
<i>L. sakei</i> Lb706	Sakacina A
<i>L. sakei</i> CTC494	Sakacina K
<i>L. brevis</i> SB27	Brevicina 27
<i>L. curvatus</i> LTH1174	Curvacina A
<i>L. curvatus</i> FS47	Curvaticina FS47
<i>L. curvatus</i> L442	Curvaticina L442
<i>L. plantarum</i> CTC305	Plantaricina A
<i>L. carnosum</i> TA11a	Leucocin a
<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	Pediocina PA
<i>P. acidilactici</i> L50	Pediocina L50
<i>P. pentosaceus</i> Z102	Pediocina PA-1
<i>C. piscicola</i> LV17B	Carnobacteriocina B2
<i>C. piscicola</i> V1	Piscicocina v1a
<i>C. piscicola</i> LV17A	Carnobacteriocina
<i>C. piscicola</i> JG126	Piscicolina 126 I
<i>C. piscicola</i> KLV17B	Carnobacteriocina B1/B2
<i>C. divergens</i> 750	Divergician 750
<i>C. divergens</i> LV13	Divergicina A

### 2.6.1. Clasificación de las bacteriocinas

Como se desprende de su propia definición, las bacteriocinas son compuestos inhibidores de naturaleza peptídica. De hecho, la inactivación por proteasas es uno de los primeros criterios para definir una sustancia antimicrobiana como bacteriocina.

Una gran cantidad de investigadores han buscado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo con sus características bioquímicas y genéticas. A continuación se presenta la clasificación de estos compuestos propuesta por Kemperman et al, (2003).

A diferencia de otros investigadores, Kemperman, propone 5 diferentes clases de bacteriocinas las cuales subdivide también de acuerdo a sus diferentes características, tamaños, inhibición, entre otras propiedades (tabla 6).

**Clase I:** Lantibióticos.- Son péptidos activos pequeños a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. Con poca estabilidad al calor, péptidos policíclicos (< 5 KDa) con aminoácidos modificados. 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. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina. A su vez, en función de su estructura y modo de acción, los lantibióticos se subdividen en 2 grupos:

**Clase I A:** Péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana y que engloban a los lantibióticos de un solo péptido y a aquéllos que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total.

**Clase I B:** Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos.

**Clase II:** No lantibióticos.- bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente. Son péptidos pequeños (< 10 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. El representante más característico de este grupo es la pediocina PA-1, la bacteriocina más estudiada después de la nisina. En este grupo se pueden identificar tres subclases:

**Clase II a:** Péptidos activos contra listeria, sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.

**Clase II b:** Formadores de complejos para la formación de poros que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.

**Clase II c:** péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

**Clase III:** bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles. Las bacteriocinas más conocidas de esta clase son helveticina J, V, acidofilicina Ay lactacinas A y B.

**Clase IV:** bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Por tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas (lactocina S) o como lipoproteínas (mesenterocina 52).

**Clase V:** bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gasericina A.

Tabla 6: Clasificación y características de bacteriocinas por grupo (Kemperman et al., 2003).

Clase de Bacteriocina	Características	Sub grupos	Características de subdivisión	Ejemplos
<b>Clase I lantibióticos</b>	Péptidos termoestables (<5KDa)	Ia	Inhiben a células sensibles por despolarización de la membrana citoplasmática.	Nisina
		Ib	Tienen una estructura secundaria más globular y no exceden los 19 aminoácidos.	Mersadicina
<b>Clase II no lantibióticos</b>	Su tamaño va de 30 a 60 aminoácidos (<10 KDa), además de que son estables al calor.	Iia	Es el grupo de mayor tamaño y se distinguen de las demás por tener actividad contra <i>Listeria monocytogenes</i>	Pediocina PA-1
		Iib	Son formadores de complejos que consisten en dos péptidos diferentes, pero ambos péptidos son necesarios para la actividad anti microbiana	Lactococina A y B
		Iic	Presentan estructuras cíclicas, debido a una unión covalente entre sus extremos C y N	Divergicina
<b>Clase III</b>	Son péptidos grandes mayores de 30 KDa , bacteriocinas complejas en cuanto a su actividad y o estructura proteínica son sensibles al calor			Helveticinas J y V
<b>Clase IV</b>	Se caracterizan por incorporar carbohidratos o lípidos en la molécula para tener actividad. Estas bacteriocinas incluyen glicoproteínas, lipoproteínas y glicolipoproteínas.			Lactocina S
<b>Clase V</b>	Poseen una estructura circular además de que poseen la particularidad de que no son modificadas postraduccionalmente			Enterocina AS-48

### 2.6.2. Características de las bacteriocinas

La clase I y II de las bacteriocinas poseen una característica realmente importante ya que son usualmente estables al calor y a pH ácidos, aunque ambas propiedades están estrechamente relacionadas: un incremento de pH reduce la estabilidad al calor (Chen & Hoover, 2003). No obstante, algunas características importantes están relacionadas con su carga neta ya que muchas de las bacteriocinas tienen mayor actividad bacteriana a valores

de pH menores a 5 y la segunda es que su adsorción a la superficie de la pared celular de las bacterias sensibles es dependiente del pH, siendo este un factor muy importante ya que dependiendo del alimento su pH influirá en la actividad o absorción de la bacteriocina (tabla 7).

**Tabla 7. Propiedades de algunas bacteriocinas de la clase I y II (Chen & Hoover, 2003).**

<b>Clase I</b>		
<b>Bacteriocinas</b>	<b>PM</b>	<b>Propiedades</b>
<b>Lactacina 3147 A</b>	2847	Estable a 100°C durante 10 min. a pH 5 o 90°C durante 10 min a pH 7.
<b>Nisina</b>	3488	Estable a 121°C y calentamiento prolongado a pH 2, llega a ser menos estable a pH 5-7. Sensible a $\alpha$ -quimotripsina, resistente a tripsina, elastasa, carboxipeptidasa A, pepsina y erepsina.
<b>Plantaricina C</b>	3500	Estable en almacenamiento a bajas temperaturas, estable a 100°C durante 60 min o 121°C durante 10 min. Muy estable a pH ácido y neutro. Sensible a pronasa, tripsina, $\alpha$ -quimotripsina, resistente a pepsina, proteinasa K, $\alpha$ -amilasa y lipasa.
<b>Clase II</b>		
<b>Bacteriocinas</b>	<b>PM</b>	<b>Propiedades</b>
<b>Pediocina MXVK133</b>	5000	Estable a 121°C durante 15 min. Estable a pH 6 y al almacenamiento a -20°C.
<b>Bavaricina A</b>	3500-4000	Estable a 100°C durante 60 min. Es estable en un intervalo de pH de 2.0 a 9.7. Sensible a pepsina, tripsina, pronasa E, proteinasa K y quimotripsina A4, resistente a catalasa.
<b>Piscicolina 126</b>	4416	Estable a pH 2 después de 2 meses de almacenamiento a 4°C, estable a 100°C durante 120 min a pH 2-3. Puede ser menos estable con un incremento de pH. Sensible a $\alpha$ -quimotripsina, $\beta$ quimotripsina, proteasas tipo I, XIV, XXIII y tripsina. Resistente a catalasa, lipasa y lisozima.

### **2.6.2.1. La termorresistencia**

Es una propiedad privilegiada de algunas bacteriocinas, misma que permite que permanezcan activas después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización de la leche (63°C, 30 min) siendo ésta la principal ventaja de algunas bacteriocinas producidas por BAL. Dicha estabilidad térmica puede ser debida a la formación de estructuras globulares pequeñas y a la presencia de regiones fuertemente hidrofóbicas y formación de enlaces cruzados estables (Chen & Hoover, 2003).

### **2.6.2.2. Espectro de inhibición.**

Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas se han clasificado en 3 grupos, de acuerdo con su espectro de inhibición. El primero incluye a las bacteriocinas con un espectro inhibitorio estrecho, cuyos productos inhiben el desarrollo o bien el crecimiento de diversas bacterias pertenecientes al mismo género (diplococcina, lactocina 27, lacticina B o helveticina J por ejemplo); el segundo se compone por bacteriocinas con un espectro inhibitorio intermedio, mismas que producen compuestos que inhiben además a otros géneros de BAL y otras bacterias, sin embargo solo Gram positivas, incluyendo patógenos presentes en alimentos (lactacina F, lacticina 481, plantacina C y plantacinas S y T); el tercero contiene las bacteriocinas con amplio espectro inhibitorio, que actúan contra un gran número de bacterias Gram positivas (nisina A y Z, pediocina AcH/PA1, leucocina S y enterocina L50) (Chen Y Hoover 2003; Cotter et al., 2005).

### **2.6.2.3. Incremento del espectro de inhibición.**

Se ha observado que un gran número de bacteriocinas aumenta su espectro de inhibición contra bacterias sensibles mediante la combinación con agentes químicos. Entre los agentes químicos ampliamente usados resaltan ácido etilen diaminotetraacético (EDTA), el citrato, el lactato, el sorbato de potasio, el diacetato de sodio, el ácido láctico y el ácido poliláctico, entre otros. Si bien esta combinación proporciona excelentes resultados también se han logrado observar un efecto similar realizando combinaciones de distintas bacteriocinas (Padgett et al., 1998; Schillinger et al., 1998; Barbuddhe et al., 1999; Gänzle et al., 1999; Chen & Hoover, 2003; Chikindas et al., 2004).

### **2.6.3. Biosíntesis y regulación**

Los genes que codifican la producción de las bacteriocinas y generan la inmunidad a las mismas están usualmente organizados en grupos de operones localizados en el cromosoma o en plásmidos (Chen & Hoover, 2003; Yin et al., 2003).

La producción de bacteriocinas parece depender de una gran cantidad de factores de la cepa productora, sin embargo, las principales causas son: el crecimiento y actividad fisiológica. De hecho, la gran mayoría de las bacteriocinas que se han estudiado hasta el momento presentan una cinética de metabolito primario y, en consecuencia, su producción está correlacionada con el aumento de la biomasa. Por otro lado, el control del pH a lo largo de la fermentación provoca un alza en la actividad de las bacteriocinas (de Vuyst & Vandame, 1994).

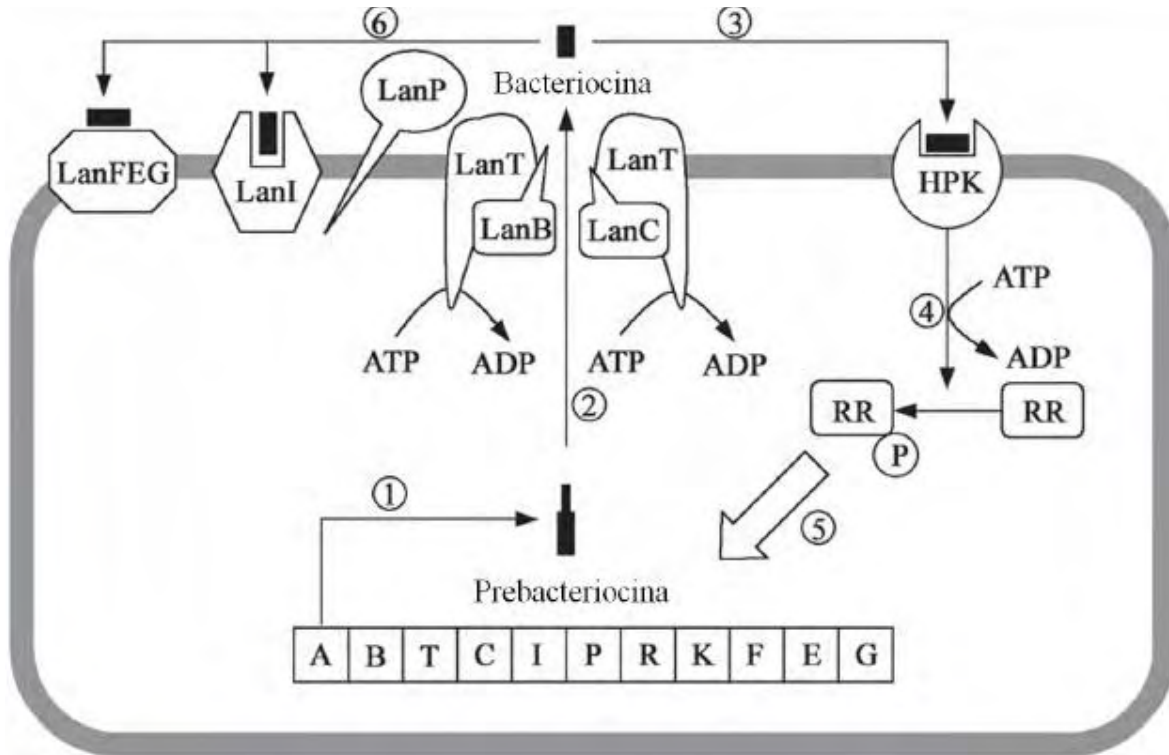
La síntesis de las bacteriocinas se da a partir de transcritos procedentes de la expresión del correspondiente gen estructural. Mismos que se traducen como pre péptidos inactivos con una extensión aminoterminal de 24 a 30 residuos, sin embargo, las secuencias líder de las bacteriocinas no exhiben habitualmente las características propias de los péptidos señal involucrados en los procesos de secreción (Von Heijne, 1983). El péptido líder actúa como sistema protector ya que mantiene a la bacteriocina inactiva en el interior de la célula productora. La secuencia líder puede tener otra función, como en el caso de la nisina, cuya presencia es necesaria para que ocurra una biosíntesis correcta (Van Der Meer *et al.*, 1994).

#### **2.6.3.1. Biosíntesis y regulación de la clase I (lantibióticos)**

El mecanismo de la síntesis de los lantibióticos se lleva en seis pasos que son:

- Formación del propéptido
- Reacciones de modificación de los aminoácidos
- Formación de lantionina y metil-lantionina
- Escisión del péptido líder
- Traslado del lantibiótico maduro

El traslado del lantibiótico maduro se realiza mediante un transportador del tipo ABC; este transportador posee entre 500 y 600 aminoácidos y su principal característica es que posee dos dominios asociados a la membrana (figura 6) (Chen & Hoover, 2003).



**Figura 6 Biosíntesis de lantibióticos: 1) Formación de la prebacteriocina; 2) La prebacteriocina es modificada por la LanB y LanC, trasladadas por LanT a través de un sistema de transporte ABC y procesada por LanP para eliminar la secuencia terminal líder y así obtener la bacteriocina madura; 3) La histidin-protein-cinasa (HPK) percibe cierta concentración de bacteriocina y se autofosforila; 4) El grupo fosfato (P) es transferido al regulador de la respuesta (RR); 5) El regulador de respuesta (RR) los genes de regulación; 6) Proteínas de inmunidad LanI, LanE, LanF, LanG atrapan a la proteína madura para dar protección a la célula productora (Rodríguez, 2011)**

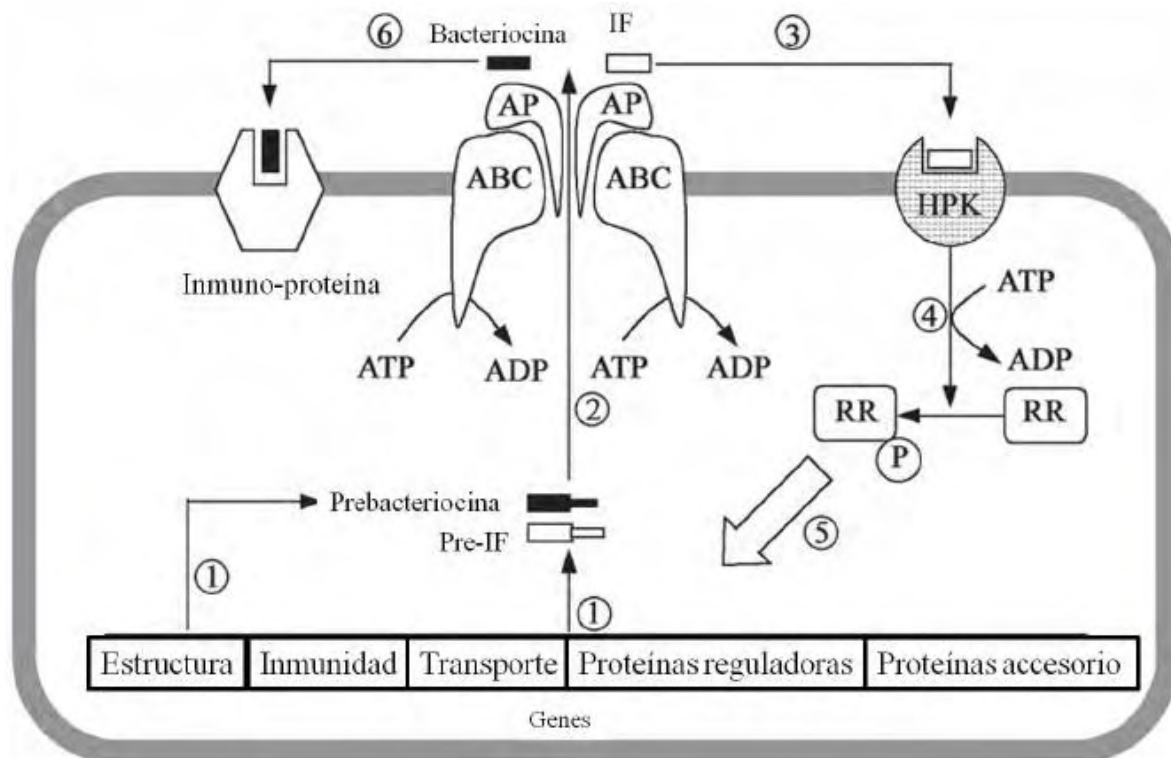
### 2.6.3.2. Biosíntesis y regulación de bacteriocinas de clase II

La síntesis de bacteriocinas de la clase II comparte una gran cantidad de similitudes con los lantibióticos en su organización genética. Ambas consisten en un gen estructural, el cual codifica para el pre-péptido (secuencia terminal Gly-Gly), posteriormente un gen de inmunidad, genes para el transporte del tipo ABC y genes que codifican para proteínas accesorias (estas dos últimas son esenciales para el transporte de la bacteriocina al exterior de la célula) (Chen & Hoover, 2003).



Por su parte la clase II no necesita modificaciones en sus aminoácidos para estar activas, a diferencia de la clase I lantibióticos. Sin embargo tras la formación del pre-péptido, la secuencia terminal se remueve, para ser llevada hacia un transportador ABC junto con sus proteínas. Sin embargo, su transportador ABC se caracteriza por tener un dominio N-terminal, que consta de 150 aminoácidos, mismo que posee naturaleza proteolítica y que al llevarse la excreción de la bacteriocina se elimina de la secuencia líder.

Para la clase II, la regulación de la síntesis de bacteriocinas esta mediada por la producción de un péptido similar a la bacteriocina, el cual se diferencia de esta porque no posee actividad biológica, no obstante sirve como factor de inducción (IF) para activar la transcripción de genes de regulación (Figura 7) (Rodríguez 2011).



**Figura 7. Biosíntesis de las bacteriocinas Clase II. 1) Formación de la pre-bacteriocina y de un pre-factor de inducción (pre-IF); 2) la pre-bacteriocina y el Pre-IF son procesados y trasladados mediante un sistema de transporte ABC, resultando en la formación de la bacteriocina madura y el factor de inducción (IF); 3) La histidina-proteína-cinasa percibe la presencia del IF y se autofosforila; 4) El grupo fosfato (P) es transferido al regulador de respuesta (RR); 5) El RR activa la transcripción de los genes reguladores; 6) La inmuno-proteína secuestra la bacteriocina para impedir su actividad mientras se encuentra en la membrana celular de la célula productora (Rodríguez, 2011).**

## **2.7. MECANISMO DE ACCIÓN**

Existen diversas teorías sobre los mecanismos de acción de las bacteriocinas sobre la bacteria sensible, pero una hipótesis para explicar el modo de acción de las bacteriocinas es un mecanismo en dos pasos, involucrando la adsorción de la bacteriocina a receptores específicos o no específicos (lípidos aniónicos) en la superficie de la membrana celular. En general su forma de acción se basa en destruir la integridad de esta membrana a través de la formación de poros, provocando la salida de compuestos pequeños como potasio, fósforo inorgánico y, en algunos casos, aminoácidos y moléculas pequeñas necesarios para la producción de energía y la síntesis de proteínas o ácidos nucleicos, originando una pérdida del potencial electroquímico ( $\Delta\psi$ ) de las membranas, el consumo de las reservas energéticas y un descenso en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, lo que finalmente origina la muerte celular (Chen & Hoover, 2003).

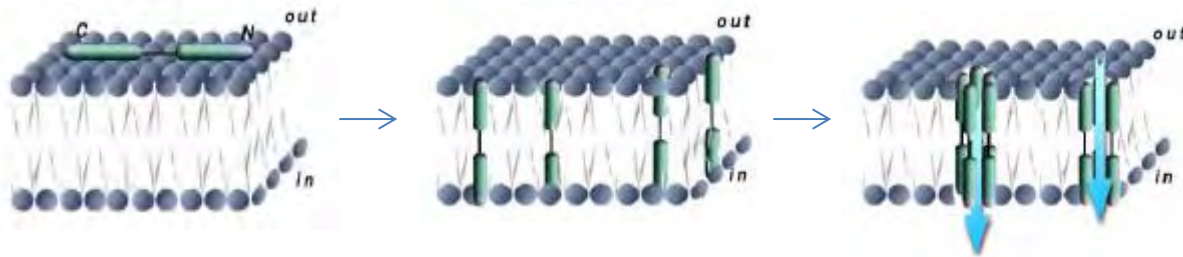
Las bacteriocinas de la clase Ia y IIa se han investigado con mayor fuerza ya que han generado un gran interés científico.

### **2.7.1. Bacteriocinas de la clase IA**

Esta clase requiere un potencial de umbral en la membrana para formar los poros. No obstante dicho potencial puede verse incrementado por diversos factores, entre los que destaca el pH (como se mencionó en la sección 2.6.2 el pH puede incrementar la actividad de una bacteriocina), así como el tipo de fosfolípidos que se encuentran en la membrana (Bierbaum & Sahl, 2009).

La unión de la bacteriocina a la membrana se da debido a las interacciones entre la membrana y la bacteriocina ya que los residuos de lisina de la bacteriocina cargados positivamente interactúan con los grupos fosfatos aniónicos de la membrana (Abee, 1995). Tras dicha unión se necesita que exista una diferencia de potencial en esta, que también sea negativa para que la introducción de la bacteriocina a la membrana pueda darse, así como también las interacciones electrostáticas entre los péptidos de la bacteriocina y los grupos fosfato de la membrana obligan a estos últimos a permanecer unidos a la bacteriocina mientras esta se va introduciendo a la membrana. Pero la formación del poro se da cuando varios monómeros de bacteriocina actúan de la misma forma, uniéndose a la membrana,

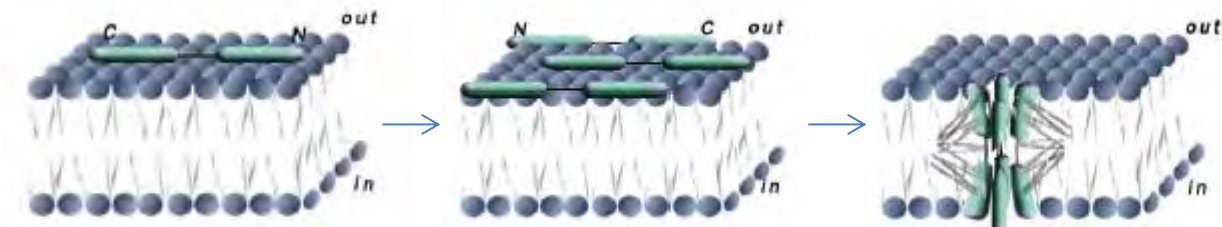
provocando la pérdida de la capacidad de despolarizarse y permeabilidad de la membrana (figura 8) (Abee, 1995).



**Figura 8 Mecanismo de acción de las bacteriocinas clase I. La formación de poros en la membrana de la célula sensible consta de tres pasos los cuales son: 1) La unión de la bacteriocina a la membrana, 2)  $\Delta\Psi$  (interior negativo) Inserción de la bacteriocina en la membrana, 3) La agregación de monómeros en la membrana, dando como resultado la formación del poro.**

### 2.7.2. Bacteriocinas de la clase IIA

Una de las principales diferencias entre la clase I y la II es que las últimas logran generar poros en la membrana celular sin la necesidad de un potencial de umbral en la misma (membrana). Sin embargo, esta clase actúa mediante receptores proteicos en la membrana capaces de unirse a la bacteriocina. Pero el anclaje de la bacteriocina a la membrana se debe a la reestructuración de algunos residuos de la bacteriocina para formar una hélice cuya hidrofobicidad es mucho mayor a la de la molécula completa permitiéndole a la bacteriocina introducirse a la membrana, pero lo que resulta letal es la unión de varias bacteriocinas ancladas a la membrana ya que esto permite la formación del poro, provocando que la funcionalidad de la membrana se vea comprometida llevando así a la muerte celular (Abee, 1995)



**Figura 9. Mecanismo de acción de las bacteriocinas clase II. Al igual que con la clase I la formación de poros en la membrana de la célula sensible de las bacteriocinas de la clase II consta de tres pasos los cuales son: 1) La unión de las moléculas a la membrana, 2) Los monómeros están asociados en la superficie de la membrana, 3) Posteriormente la inserción de la bacteriocina dentro de la membrana por las cabezas de fosfolípidos polares (aniónicos) provoca la polarización de la membrana.**

Las bacteriocinas regularmente actúan sobre bacterias que están estrechamente relacionadas con la cepa productora, sin embargo, en estudios previos (Tavera, 2010; Rodríguez, 2011) se ha demostrado que las bacterias ácido lácticas aisladas del pozol son productoras de bacteriocinas, que no solo ejercen un efecto sobre otras bacterias ácido lácticas sino que también presentan actividad sobre diversas bacterias patógenas de gran importancia en los alimentos.

### **2.7.3. Bacterias indeseables en los alimentos**

Existen una gran cantidad de bacterias que descomponen los alimentos, o bien pueden contaminar el alimento y provocar una enfermedad en el consumidor, por lo que se han estudiado a fondo para poder eliminarlas de los alimentos.

#### **2.7.3.1. *Escherichia coli***

*E. coli* es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Neidhardt, 1999). Ella está integrada por bacilos Gram negativos, no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin cloruro de sodio (NaCl) agregado, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos, y poseedores de una proporción G+C de 39 a 59% en su DNA. Se clasifican en más de 170 serogrupos según las características antigénicas y en serotipos por la combinación de antígenos somáticos (O) y flagelares (H). Otros antígenos presentes en distintas cepas (capsulares, fimbriales y otros) han sido empleados para su clasificación o identificación.

#### **2.7.3.2. *Listeria monocytogenes***

Esta bacteria es la responsable de la listeriosis en los humanos y animales, por lo que se ha convertido en uno de los patógenos más estudiados. Es una bacteria Gram positiva, catalasa positiva, pero su movilidad esta mediada por flagelos, es capaz de crecer en un rango bastante amplio de pH que va desde 5 a 9, es capaz de resistir concentraciones muy elevadas de NaCl (>10%), es anaerobia facultativa. Sin embargo una de sus principales

características es que no es una bacteria exigente por lo que puede crecer en cualquier medio, su temperatura óptima es de 35-37°C, pero si bien se ha demostrado que puede mantener su crecimiento en un rango de temperatura de 2.5-44°C (Datta, 2003). Además en mujeres embarazadas provoca aborto espontáneo, muerte fetal, meningitis, parto prematuro y septicemia neonatal severa (Ogunmodede, 2005).

### **2.7.3.3. *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis***

*Staphylococcus aureus* es una bacteria muy importante para la ciencia y ha sido estudiada a profundidad las últimas décadas. Sus principales características son: cocos Gram positivos, inmóviles, pueden presentar diversas agrupaciones (diplococo, streptococos y racimos), catalasa positivos, no esporulados y por lo general producen una microcápsula (Bannerman, 2003). *Staphylococcus*, puede producir infecciones en la piel y tejidos blandos, así como cuadros tóxicos. Sin embargo, una de sus principales características es que es capaz de generar toxinas termorresistentes las cuales actúan sobre el intestino delgado.

Los síntomas de la intoxicación de esta bacteria son: náuseas, vómitos, retortijones abdominales, diarreas, sudoración, abatimiento y un descenso en la temperatura corporal, estos son síntomas que tardan 4 horas en aparecer después de ingerir un alimento contaminado, pero tardan entre 24 y 48 horas en desaparecer (Brock, 2003).

En los últimos años, *Staphylococcus epidermidis* se ha convertido en la principal causa de infecciones relacionadas con dispositivos médicos permanentes tales como catéteres vasculares, prótesis de articulaciones y válvulas cardíacas artificiales (Raad, 1992). La patogenicidad de *Staphylococcus epidermidis* se atribuye a su capacidad para formar una biopelícula en la superficie de los dispositivos médicos, escapando de este modo a los antibióticos y a las defensas del huésped (Vadyvaloo, 2005). En general, la formación de la biopelícula es un proceso de cuatro pasos, unión reversible, unión irreversible, maduración y salida de células para formar más películas (Gotz, 2002).

#### 2.7.3.4. *Salmonella Typhimurium*

El género *Salmonella* recibió su nombre en honor al bacteriólogo y veterinario D.E. Salmon quien fue el encargado en estudiar esta bacteria en animales (Hu & kopecko, 2003). *Salmonella* es una bacteria Gram-negativa, su apariencia en el microscopio es de bacilos, o cilindros con puntas redondeadas. Son bacterias entéricas, que se alojan en el intestino, y su taxonomía es compleja. Actualmente, el género *Salmonella* contiene dos especies, *S. enterica*, la especie tipo, y *S. bongori* (Brenner F. W. et al., 2000). *S. enterica* se compone de seis subespecies I, *S. enterica subsp. enterica*; II, *S. enterica subsp. salamae*; IIIa, *S. enterica subsp. arizonae*; IIIb, *S. enterica subsp. diarizonae*; IV, *S. enterica subsp. houtenae*, y VI, *S. enterica subsp. indica*. Esta subdivisión se ha comprobado mediante diversos métodos de hibridación ADN/ADN y métodos serológicos. No obstante cada subespecie, a su vez, está subdividida en serotipos, de acuerdo al tipo de antígeno H (flagelar: del alemán *hauch*, "por el halo producido en un medio de cultivo a raíz del movimiento") u O (somático: del alemán *ohne hauch*, "sin movimiento"). El antígeno H está conformado por la proteína más abundante del flagelo, que es la estructura que permite el movimiento. El antígeno O está conformado por una cadena repetida de polisacáridos, que forma parte del lipopolisacárido (LPS), que se genera y sobresale de la membrana externa y que actúa como una barrera de protección a agentes externos.

*Salmonella Typhimurium* es una bacteria anaeróbica facultativa, que puede en ocasiones sobrevivir en bajas condiciones de oxígeno, así como en un rango bastante amplio de temperatura que va desde 8 a 45°C así como en valores de pH de 4-9. Además, posee la capacidad de crecer en muchos tipos de alimentos sin afectar sus capacidades sensoriales (Hanes, 2003; Ray & Bhunia, 2008). De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS), la salmonelosis es una de las enfermedades más comunes transmitidas por alimentos a nivel mundial y sus principales síntomas son: dolor abdominal, diarrea, fiebre, náuseas y vómito (WHO, 2005).

#### 2.7.3.5. *Bacillus cereus*

Es un bacilo esporulado, responsable de intoxicaciones alimentarias, siendo su hábitat natural el suelo, contamina con frecuencia cereales, leche, budines, cremas pasteurizadas y especias, entre otros alimentos. La OMS estima que las enfermedades causadas por

alimentos contaminados constituyen uno de los problemas sanitarios más extendidos en la actualidad (FAO, 2002). Es un microorganismo Gram positivo en los cultivos jóvenes y a medida que envejece puede verse como Gram variable o Gram negativo. Las esporas aparecen claras en la tinción de Gram y verdes con la tinción de esporas; estas pueden estar dentro de la pared bacteriana o puede deformar la pared. La temperatura de crecimiento mínima está entre 15 a 20°C y la máxima entre 40 a 45°C con una óptimo de 37°C (Blanco et al., 2009).

*Bacillus cereus* puede producir dos enterotoxinas: la toxina diarreica y la toxina emética. Su período de incubación varía de 4 a 16 horas luego de la ingesta del alimento contaminado.

#### **2.7.3.6. *Enterobacter cloacae***

El género *Enterobacter* es uno de los más abundantes en el mundo y se encuentran ampliamente distribuidos en el mismo. Poseen una gran gama de ecosistemas, que van desde el suelo, la tierra, alimentos como frutas, granos, hasta plantas y árboles también forman parte de la flora gastrointestinal de todos los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre (Janda & Abbott, 2006). *Enterobacter cloacae* una bacteria fermentadora de glucosa y productora de CO<sub>2</sub>, así como ácido, poseen la cualidad de tener flagelos en la periferia, lo que les genera una gran movilidad. Una de sus principales características es que algunas cepas con el antígeno K poseen cápsula lo que les brinda una mejor resistencia a diversas adversidades en el medio. Esta bacteria ha sido aislada de diversos alimentos como son los productos lácteos, cárnicos, vegetales (Lund & Baid-Parker, 2000). Por lo regular, su presencia puede significar un mal procesamiento en los alimentos, y podría indicar una contaminación fecal.

#### **2.7.3.7. *Pseudomonas aeruginosa***

Esta bacteria se define como un grupo bacteriano perteneciente a la Familia Pseudomonadaceae, el cual está constituido por bacilos de forma alargada, Gram-negativos, no esporulados, aerobios obligados, sin embargo, aunque la gran mayoría son móviles existen algunas excepciones, poseen uno o más flagelos polares (en un extremo) y no son fermentadores (Soberón-Chávez, 2000).

*Pseudomonas aeruginosa* crece sobre diferentes sustratos naturales, la tierra, el agua, alimentos contaminados, produciendo en muchas ocasiones pigmentos de varios colores que difunden en el medio: piocianina, de color azul, *piorrubina* (rosa), *clororafina* (verde), *pioverdina*, de color verde amarillento que es fluorescente. *Pseudomonas fluorescens* también pueden producir coloraciones marrones o negras y en algunos casos olor característico (Lam et al., 1980).



### 3. Hipótesis

Si las bacterias lácticas del género *Weissella* aisladas del pozol producen bacteriocinas entonces será posible:

- Encontrar inhibición de bacterias patógenas y de descomposición de importancia en alimentos en presencia de sobrenadantes con y sin tratamiento termico que contengan bacteriocinas producidas por cepas del género *Weissella*.

Si las bacteriocinas producidas por *Weissella*, actúan también contra bacterias muy relacionadas entre sí, entonces:

- Es posible que existan interacciones negativas entre bacterias del género *Weissella* y otras bacterias lácticas predominantes durante la fermentación del pozol.

## 4. Objetivos

### Objetivos generales:

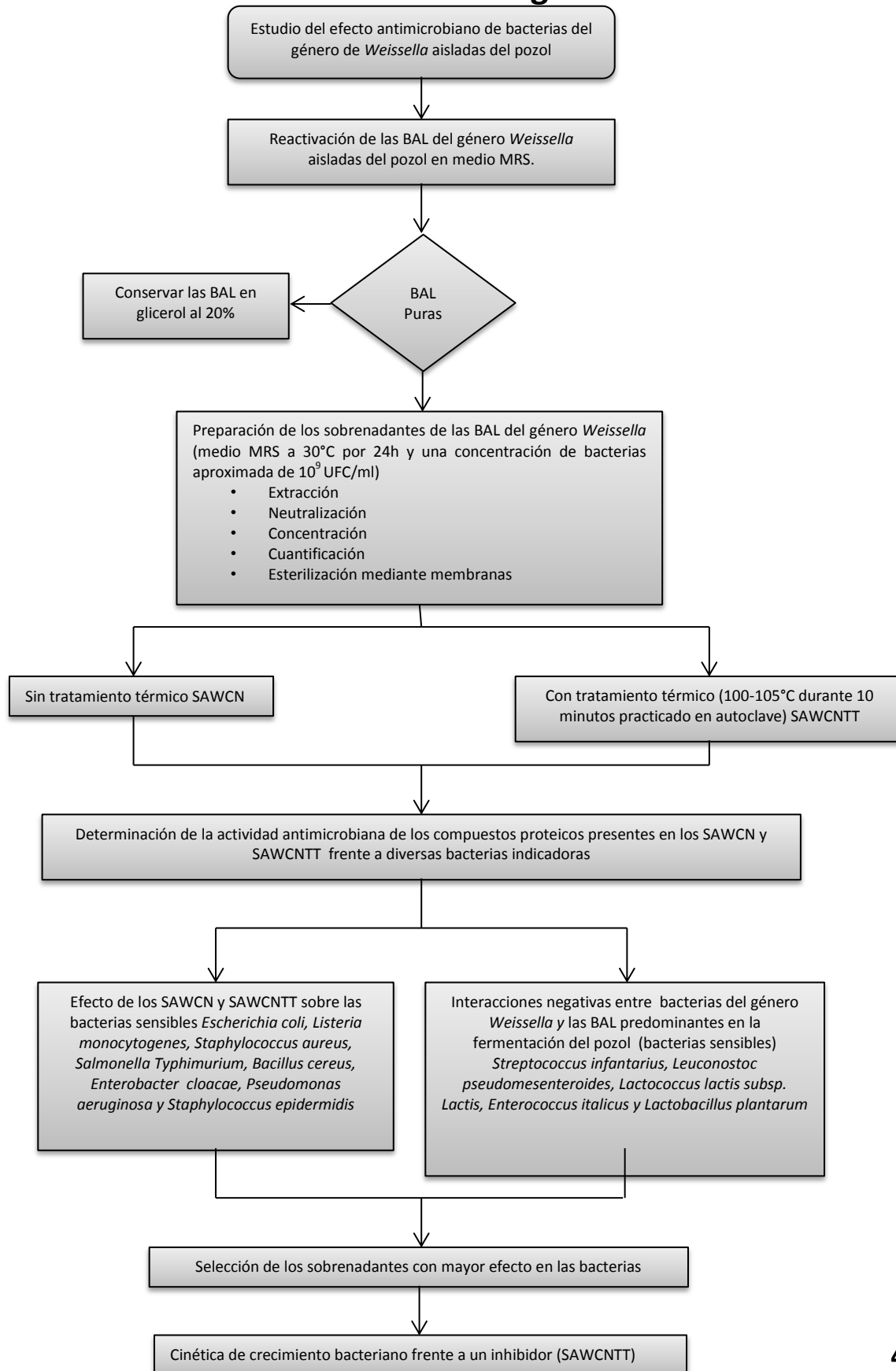
- Evaluar si las bacterias ácido lácticas del genero *Weissella* aisladas del pozol producen compuestos similares a bacteriocinas capaces de inhibir bacterias patógenas y de descomposición de importancia en los alimentos.
- Determinar si existen interacciones negativas entre las bacterias del genero *Weissella* y algunas de las bacterias ácido lácticas predominantes en el pozol (*Streptococcus infantarius*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *Enterococcus italicus* y *Lactobacillus plantarum*).

### Objetivos particulares:

- Obtener, neutralizar, concentrar y cuantificar los compuestos proteicos extracelulares con actividad biológica presentes en los sobrenadantes de cultivos de bacterias del género *Weissella* aisladas del pozol.
- Evaluar la capacidad de los compuestos proteicos similares a bacteriocinas de los sobrenadantes concentrados obtenidos de las bacterias del genero *Weissella* frente al desarrollo de diversas bacterias patógenas y de descomposición importantes en los alimentos mediante el método de difusión en agar y determinar si el efecto que estas ejercen es bactericida o bacteriostático.
- Analizar si los compuestos proteicos similares a bacteriocinas de los sobrenadantes concentrados obtenidos de bacterias del genero *Weissella* generan un efecto en el crecimiento de algunas bacterias ácido lácticas predominantes en la fermentación (*Streptococcus infantarius*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Enterococcus italicus*, *Lactobacillus plantarum*) del pozol y definir si este es un efecto bactericida o bacteriostático mediante la técnica de difusión en agar.

- Observar si la temperatura ejerce algún efecto sobre la actividad biológica de los compuestos similares a bacteriocinas presentes en los sobrenadantes concentrados al evaluar su acción frente a bacterias patógenas y de descomposición de importancia en los alimentos, así como en bacterias ácido lácticas predominantes del pozol.
- Determinar, mediante una prueba de reto, si los compuestos similares a bacteriocinas presentes en los sobrenadantes concentrados de los cultivos de *Weissella* pueden inhibir el crecimiento de bacterias ácido lácticas predominantes en la fermentación del pozol.

## 5. Metodología



## 5.1. MICROORGANISMOS

### Bacterias lácticas

Los microorganismos seleccionados pertenecen a una colección de bacterias ácido lácticas del género *Weissella* aisladas de diferentes muestras de pozol originario de Tabasco y Chiapas, dichas bacterias se mantenían conservadas en glicerol a  $-65^{\circ}\text{C}$  (Tabla 8).

**Tabla 8 Bacterias lácticas utilizadas en el presente trabajo.**

Clave	Origen de la muestra	Especie	Clave	Origen	Especie
3a	Tabasco	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Snc 5	Chiapas	<i>Weissella confusa</i>
6b	Tabasco	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Lilis 7	Chiapas	<i>Weissella confusa</i>
Lilis 9	Chiapas	<i>Weissella confusa</i>	Lilis 10	Chiapas	<i>Weissella confusa</i>
Lilis17	Chiapas	<i>Weissella confusa</i>	Lilis 13	Chiapas	<i>Weissella confusa</i>
Lilis19	Chiapas	<i>Weissella confusa</i>	Lilis 22	Chiapas	<i>Weissella confusa</i>
Lilis 20	Chiapas	<i>Weissella confusa</i>	Lilis 24	Chiapas	<i>Weissella confusa</i>
Snc 40	Chiapas	<i>Weissella confusa</i>	Lilis 42	Chiapas	<i>Weissella confusa</i>
Snc 45	Chiapas	<i>Weissella confusa</i>	Lilis 43	Chiapas	<i>Weissella confusa</i>
			3JAB	Tabasco	<i>Weissella cibaria</i>

**Tabla 9 Bacterias ácido lácticas indicadoras en el experimento. En la tabla se detalla el código de la cepa, así como su procedencia**

Cepa	Especie	Origen
Si	<i>Streptococcus infantarius</i>	Aislada del pozol
3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Aislada del pozol
9	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	Aislada del pozol
17	<i>Enterococcus italicus</i>	Aislada del pozol
152	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Aislada del pozol

- **BACTERIAS INDICADORAS.** Las bacterias indicadoras utilizadas en el presente estudio se muestran en la (Tabla 9 y la Tabla 10.)

**Tabla 10 Cepas y origen de bacterias indicadoras utilizadas en esta metodología. Colección de microorganismos de la Facultad de Química, UNAM.**

<b>Bacteria patógena</b>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Salmonella Typhimurium</i>
<i>Bacillus cereus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>

### **5.1.1. REACTIVACIÓN DE CEPAS**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) del género *Weissella* aisladas del pozol se mantuvieron conservadas a una temperatura de -65°C en glicerol. Para su reactivación se tomó una alícuota de 20µl de cada una, la misma que se llevó a 5 ml de caldo MRS estéril marca BD DIFCO, posteriormente se homogenizó, mediante agitación con un vortex BX BamStead Thermolyne Maxi Mix II y se incubaron a 30°C durante 24 horas.

Para el caso de las bacterias indicadoras, que también se conservaban en congelación a -64°C, se inoculó de igual forma 20 µl de cada una en 5 ml de caldo BHI (infusión cerebro corazón) estéril marca BD DIFCO, y homogenizando con vórtex BX BamStead Thermolyne Maxi Mix II. Se incubaron durante un periodo de 20 horas a 37°C.

### **5.1.2. CONFIRMACION DE LA PUREZA DE LAS CEPAS DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LACTICAS Y PATOGENAS**

Para que existiera la certeza de que las bacterias utilizadas en el presente estudio confirieran resultados reproducibles así como confiables, debía de comprobarse su pureza. Para ello, las 17 cepas utilizadas del género *Weissella* fueron inoculadas por estriado en cuadrante radial en placas de medio sólido MRS estéril marca BD DIFCO, las cuales se incubaron a 30°C durante 18 horas. Después de ese tiempo de incubación, se verificó la homogeneidad de las colonias (características macroscópicas) y de las células después de realizar una tinción de Gram a una colonia aislada (características microscópicas).

Para las bacterias indicadoras el procedimiento fue el mismo, a excepción de que estas fueron incubadas en placas de medio sólido BHI estéril marca BD DIFCO, durante 18 horas a 37°C.

### **5.1.3. CONSERVACION DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y PATOGENAS EN GLICEROL AL 20%**

Por lo que, para conservar las cepas iniciales intactas, se conservaron en caldo MRS o BHI estéril (para 17 cepas del *Weissella* las bacterias indicadoras respectivamente) con un 20% de glicerol a -65°C.

Las cepas se reactivaron como se menciona en la sección 6.1.1. Los cultivos obtenidos se centrifugaron a 10000rpm durante 15 minutos para poder separar las células del medio de cultivo eliminando el sobrenadante. Las células se lavaron con solución salina al 0.8%, este lavado se repitió dos veces para eliminar cualquier rastro del medio. Una vez limpia la masa celular se resuspendió en el medio correspondiente (MRS con glicerol al 20% estéril para bacterias del genero *Weissella* y BHI con glicerol al 20% para las bacterias indicadoras respectivamente), se homogenizó con el vortex (Bx BarnStead Thermolyne Maxi Mix II). Los cultivos se guardaron en un ultra congelador a -65°C para su posterior uso.

## **5.2. EFECTO ANTIMICROBIANO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS DEL GÉNERO WEISSELLA**

Preparación de los sobrenadantes de las bacterias ácido lácticas del genero *weissella*

Ya que las bacteriocinas son compuestos proteicos extracelulares, el uso de medios líquidos libres de células para su estudio es recomendado (Vignolio et al. 1993), además de que facilita su manejo, conservación y brinda un mayor control en cuanto a su cuantificación y a la concentración que puede utilizarse en cada prueba, permitiendo una mayor confianza en la repetitividad.

### **5.2.1. OBTENCIÓN Y NEUTRALIZACION DE LOS SOBRENADANTES**

Se reactivaron las 17 cepas de BAL del género *Weissella* como se muestra en la sección 5.1.1. Después del tiempo de incubación, los cultivos fueron reinoculados en matraces Erlenmeyer con 100ml de medio MRS estéril usando una relación de 20µl de inóculo por

cada 4ml de medio MRS, incubando a 30°C por 24 horas, tal como se reportó en estudios previos (Rodríguez, 2011). Una vez transcurrido el tiempo de incubación y teniendo una concentración de bacterias aproximada de 10<sup>9</sup> UFC/ml, se separó la masa celular del medio de cultivo mediante gravedad, para lo cual se transfirió a tubos de plástico y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C (Beckman modelo J2-21M/E).

Ya que el ácido láctico es el principal producto metabólico de las BAL (Stiles& Holzapfel et al. 1997), se neutralizaron los sobrenadantes de cada una de las cepas para así evitar que dicha condición pudiera interferir en los resultados. Se ajustaron a un valor de pH de 6.5-7.0 mediante el uso de un potenciómetro marca Jenway, modelo 3020, adicionando entre 5-10ml de NaOH 1M

### **5.2.2. CONCENTRACIÓN DE LOS SOBRENADANTES CON ROTAVAPOR Y BOMBA DE VACÍO**

Ya que los sobrenadantes contienen una gran cantidad de agua, era necesario eliminarla con el objeto de aumentar la concentración de la posible bacteriocina. Cada uno de los sobrenadantes ya neutralizados, se concentraron, con el uso de un rotavapor, y una bomba de vacío (BUCHI SWITZERLAND Rotavapor R-215, Heating Bath B-491, Vacuum Controller V-850). Para lo cual, cada uno de los sobrenadantes neutralizados, se transfirió a un matraz de bola de 500ml previamente desinfectado con alcohol al 70%, posteriormente, el matraz fue ensamblado en el rotavapor para extraer el agua a 65rpm, 65°C y sometido a una presión de 80-90mbar, de esta forma se eliminó aproximadamente el 50% de agua del medio.

Una vez terminado el proceso cada sobrenadante concentrado y neutralizado (SAWCN) se enfrió para después mantenerlos a -4°C hasta su uso.

### **5.2.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA DE LOS CONCENTRADOS**

Las bacteriocinas son compuestos proteicos con efecto antimicrobiano (Sabadogo et al. 2006), por lo cual la medición de proteínas en los SAWCN es necesaria. La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el método de Bradford, para lo cual se utilizó el sistema Quick Start<sup>TM</sup> Bradford 1x Dye Reagent Bio-Rad®



Para realizar las mediciones se tomaron, de manera aséptica, 20µl de cada SAWCN y se colocaron en microtubos de plástico. Asimismo se tomaron 20µl de caldo MRS estéril concentrado como control y 20µl de agua destilada estéril como blanco. Se hicieron diluciones de cada uno de los concentrados y se realizó una curva patrón que se llevó a cabo de acuerdo con la referencia según lo establecido en el protocolo (Anexo). A cada uno de los tubos, incluyendo el control y el blanco, se adicionó 1mL de reactivo de Bradford; se agitó con vórtex hasta homogenizar completamente y los tubos reposaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Enseguida se determinaron los valores de absorbancia (longitud de onda de 595 nm) con un espectrofotómetro Agilent 8453E.

#### **5.2.4. ESTERILIZACION DE LOS SOBRENADANTES CONCENTRADOS**

Debido a que los sobrenadantes concentrados contienen diversos nutrientes pueden ser una fuente de alimento para algún microorganismo que pudiera contaminarlo durante los procedimientos de neutralización y concentración. La eliminación de cualquier microorganismo contaminante se realizó mediante la filtración con membranas, esto debido a que mediante el uso de membranas con un poro de 0.45µ podrían permitir el paso de moléculas pequeñas como las posibles bacteriocinas, pero impedir el paso de bacterias.

Cada sobrenadante fue transferido a una jeringa de 5ml estéril, en una campana de flujo laminar, para poder conservar las condiciones asépticas. Se conectó la jeringa a una unidad de filtración con membrana (0.45µ) (Millipore), previamente esterilizada. Se filtró el sobrenadante a través de la membrana. El sobrenadante ya filtrado se depositó en tubos falcón previamente esterilizados y se mantuvieron a -4°C hasta su uso.

#### **5.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS PROTEICOS PRESENTES EN LOS SAWCN FRENTE A DIVERSAS BACTERIAS INDICADORAS**

Para identificar si un inhibidor (en este caso los compuestos SAWCN y SAWCNTT) posee un efecto bacteriostático se observa que su crecimiento se hace más lento de lo normal o bien este se detiene, en cambio el efecto bactericida el microorganismo muere. El efecto antimicrobiano de cada SAWCN se determinara frente a un grupo de bacterias indicadoras (tabla 3).

### **5.3.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR**

Se utilizaron placas de medio BHI (sobrecapa y base), para las bacterias patógenas, mientras que para las BAL se utilizó el medio MRS mientras que para crear los pozos se utilizaron torres de vidrio con un diámetro de aproximadamente 5 mm, así como pinzas estériles.

En seguida se detalla la preparación de los medios (placa y la sobrecapa), al igual que el ensayo de la prueba.

### **5.3.2. PREPARACIÓN DE PLACA DE MEDIO BHI**

El caldo BHI se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se le adicionó además 1.7% de agar marca Bacto® para tener un medio sólido. Homogeneizándolos en un matraz Erlenmeyer, una vez disueltos los componentes, se esterilizó el medio en autoclave a 121°C y 1atm de presión durante un periodo de 15 minutos, para después dejarlos enfriar a una temperatura de 40°C, una vez alcanzada dicha temperatura, se distribuyó el medio en cajas petri, adicionando alrededor de 15ml por caja, posteriormente se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente. Para finalizar se comprobó la esterilidad de las placas, incubándose a 30°C por 24 horas.

### **5.3.3. PREPARACIÓN DE SOBRECAPA DE MEDIO BHI**

Se prepararon las placas de BHI al igual que en el paso anterior variando solamente el porcentaje de agar a 0.8% marca Bacto®, para tener un medio sólido. Para homogenizar el medio se procedió a calentar la mezcla en una parrilla con agitación marca Thermolyne, se distribuyó el medio en tubos de ensayo con tapa de rosca, adicionando 7ml a cada tubo, para después ser esterilizados en autoclave a 121°C, 1 atm por 15 minutos. Finalmente se comprobó la esterilidad del medio incubando a 30°C por 24 horas.

El procedimiento para la placa y la sobrecapa de medio MRS fue básicamente el mismo, solo que en lugar de usar caldo BHI se usó caldo MRS (Difco ®).

### **5.3.4. ENSAYO DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR**

En la prueba se colocaron torres de vidrio (con un diámetro de 4mm, previamente esterilizadas), sobre cajas con medio BHI. Posteriormente, se adiciona el inóculo (20µl de

la bacteria sensible) en 7ml de la sobrecapa con medio BHI (fundida a temperatura de 40°C) una vez homogenizado, con la ayuda de un vortex, se vertió sobre la placa de BHI, cubriéndola por completo a excepción del área ocupada por las torres de vidrio. Una vez solidificado el medio fueron retiradas las torres, mediante el uso de pinzas estériles, dando lugar así a la formación de los pozos, en los cuales se colocó como control positivo 80 µl de clorhexidina como control negativo 80 µl de medio MRS concentrado estéril y en los pozos restantes 80µl de cada uno de los SAWCN. Finalmente las cajas se incubaron a 30°C por 24 horas. Después de ese tiempo, se registraron los diámetros de halos de inhibición (mm) midiendo el diámetro del círculo generado por la interacción entre el sobrenadante (SAWCN) y la bacteria indicadora, se indicó si los halos eran opacos o translúcidos. La prueba se realizó por triplicado y en una campana de flujo laminar para evitar la contaminación del medio y los SAWCN.

#### **5.4. TERMORESISTENCIA DE LAS POSIBLES BACTERIOCINAS**

Por lo que se sometieron los SAWCN a un tratamiento térmico de 100-105° C durante 10 minutos, practicado en autoclave. Dando lugar a Sobrenadantes aislados de BAL del genero *Weissella* concentradas neutralizadas y tratadas térmicamente (SAWCNTT) que fueron usados en las mismas pruebas que los SAWCN, cuantificación de proteína de los concentrados y método de difusión en agar, bajo las mismas condiciones establecidas en las secciones anteriores.

#### **5.5. SELECCIÓN DE LOS MEJORES SOBRENADANTES**

Ya que algunos de los sobrenadantes (SAWCNTT) presentaron un efecto escaso o nulo frente a las diversas bacterias sensibles (tanto patógenas como ácido lácticas) se seleccionaron los mejores compuestos, esto tuvo como objetivo reducir significativamente el número de compuestos a estudiar y hacer más específico el estudio. Tomando en cuenta diversos factores, entre los cuales destacaron que tipo de inhibición ejercía ya fuera bacteriostática o bactericida (la determinación de este efecto se explica en la sección 6.3), diámetro de inhibición (el halo que se generaba el SAWCNTT sección 6.3.4), el número de bacterias sensibles afectadas y la termoresistencia de los sobrenadantes. Por lo cual

valorando la combinación de cada factor es posible determinar la o las mejores posibles bacteriocinas presentes en los sobrenadantes.

### **5.5.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO FRENTE A UN INHIBIDOR**

Se observó el crecimiento de las bacterias indicadoras en presencia de los SAWCNTT o SAWCN, para lo cual, se reactivaron las bacterias indicadoras como se explica en la sección 6.1.1, una vez ya reactivada la bacteria indicadora se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 50ml con 20ml del SAWCNTT en condiciones asépticas, bajo la relación de 20 $\mu$ l de bacteria sensible/4ml de concentrado proteico tratado térmicamente (Rodríguez, 2011) posteriormente se homogenizó el medio con la ayuda de un vortex. Las bacterias también se inocularon en 20ml de MRS, dicho cultivo servirá de blanco para tener una relación en cuanto al crecimiento normal de la bacteria. Cada matraz se incubó durante 48 horas a 30°C.

Para observar el efecto de los SAWCNTT en las bacterias sensibles se determinó como se describe a continuación:

El efecto se determinó observando el crecimiento de la bacteria indicadora frente a un agente inhibidor, en este caso los sobrenadantes tratados térmicamente, teniendo como referencia un blanco, el cual sería la bacteria indicadora sin la presencia del agente inhibidor, para posteriormente realizar un conteo en determinados tiempos y así cuantificar el número de microorganismos vivos, tanto en el sistema con un agente inhibidor como en el sistema sin agente inhibidor, para finalizar por comparar ambas cuentas y así observar si el crecimiento se vio o no afectado.

Para determinar el número de bacterias vivas se utilizaron dos matraces, uno que contenía el blanco (la bacteria indicadora creciendo en condiciones normales sin la presencia de algún sobrenadante) que sería usado como referencia y otro que contenía la bacteria indicadora en presencia del sobrenadante seleccionado.

Para la cuantificación de sobrevivientes: tomó una alícuota de 0.5ml del medio, así como también del blanco, la cual se transfirió a un vial con 4.5ml de solución salina al 0.8% el cual fue marcado de acuerdo a la combinación SAWCNTT: bacteria indicadora estudiada y

la dilución que se tenía (en este caso  $10^{-1}$ ) posteriormente se realizaron diluciones a partir del vial hasta la dilución  $10^{-9}$ .

Posteriormente se tomaron las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  y se inocularon 0.1ml de cada vial bajo condiciones asépticas en una caja petri con medio MRS y distribuyéndola uniformemente sobre la caja mediante el uso de un asa de vidrio. Este procedimiento se realizó para ambos matraces tanto para el blanco y el que contenía cada SAWCNTT marcando de misma forma que los viales (combinación SAWCNTT: bacteria sensible estudiada y la dilución). Dichas cajas fueron marcadas como tiempo cero y posteriormente se incubaron a una temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  por un lapso de 24 horas. Este proceso se realizó al tiempo 0 horas, 12 horas 24horas y 48 horas registrando los valores de cada caja después de 24 horas de incubación.

El tipo de colonias que fueron consideradas debían de poseer las características de las cepas indicadoras las cuales son:

- Colonias circulares
- Elevación convexa
- Bordes enteros
- Color crema

Estas colonias fueron contadas y se determinó su número de acuerdo a lo citado en el anexo.

A partir de los resultados anteriores se procedió a seleccionar las mejores combinaciones (en las que los SAWCNTT ejercieran un efecto más marcado sobre las bacterias sensibles) para realizar un análisis aún más detallado bajo las mismas condiciones anteriormente establecidas, tomando una muestra partiendo del tiempo 0, posteriormente cada dos horas hasta llegar a las primeras 12 horas de crecimiento para luego hacerlo al tiempo 12, 24 y 48 horas. En algunos casos la toma de muestra se realizó cada dos horas desde el tiempo cero hasta las 12 horas y dos muestras finales de 24 y 48 horas. La toma de muestra y la cuantificación de bacterias sobrevivientes de cada tiempo se realizaron de la forma mencionada anteriormente.

## 6. Resultados

### 6.1. REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS E INDICADORAS A ESTUDIAR Y COMPROBACIÓN DE LA PUREZA.

Debido a que se están manejando microorganismos que previamente fueron conservados a una temperatura de  $-65^{\circ}\text{C}$  por un amplio periodo de tiempo, es necesario comprobar la viabilidad y la pureza de las cepas a estudiar.

#### 6.1.1. Determinación de la pureza de las cepas a estudiar.

Para determinar la pureza de una cepa se debe de observar homogeneidad del microorganismo tanto a nivel macroscópico (colonias formadas) como microscópico (después de hacer una tinción de Gram).

##### 6.1.1.1. Descripción macroscópica de las cepas

El análisis macroscópico es el primer parámetro para descartar una posible contaminación ya que las bacterias se agrupan en colonias las cuales son idénticas entre la misma cepa.

**Tabla 11 Características macroscópicas de las cepas a estudiar.** Las cepas de bacterias ácido lácticas se inocularon en medio MRS durante 18 horas a  $30^{\circ}\text{C}$

Clave de la cepa	Morfología de las colonias	Color	Pureza
3a	Circular, bordes enteros, elevación convexa	Crema	Se observan colonias homogéneas.
6b	Circular, bordes enteros, elevación plana	Crema	Se observan colonias homogéneas.
Lilis 9	Circular, bordes enteros, sin elevación	Crema	Se observan colonias homogéneas.
Lilis 17	Circular, bordes enteros, elevación convexa	Crema	Se observan colonias homogéneas.
Lilis 19	Circular, bordes enteros, elevación convexa	Crema	Se observan colonias homogéneas.
Lilis 20	Circular, bordes enteros, elevación plana	Crema	Se observan colonias homogéneas.
Snc 40	Circular, bordes enteros, elevación convexa	Crema	Se observan colonias homogéneas.


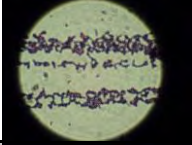
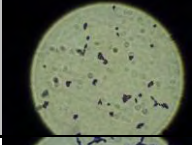
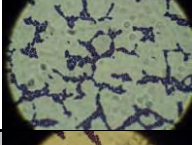
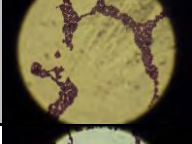
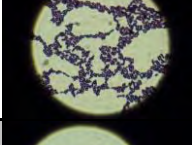
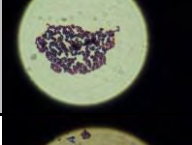
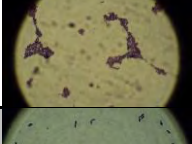
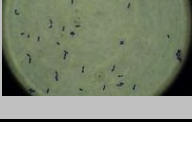
<b>Snc 45</b>	Circular, bordes enteros, elevación plana	Crema	Se observan colonias homogéneas.
<b>3JAB</b>	Circular, bordes enteros, elevación plana	Crema	Se observan colonias homogéneas.
<b>Snc 5</b>	Circular, bordes enteros, elevación convexa	Crema	Se observan colonias homogéneas.
<b>Lilis 7</b>	Circular, bordes enteros, sin elevación	Crema	Se observan colonias homogéneas.
<b>Lilis 10</b>	Circular, bordes enteros, sin elevación	Crema	Se observan colonias homogéneas.
<b>Lilis 13</b>	Circular, bordes enteros, elevación convexa	Crema	Se observan colonias homogéneas.
<b>Lilis 22</b>	Circular, bordes enteros, elevación convexa	Crema	Se observan colonias homogéneas.
<b>Lilis 24</b>	Circular, bordes enteros, elevación plana	Crema	Se observan colonias homogéneas.
<b>Lilis 42</b>	Circular, bordes enteros, elevación convexa	Crema	Se observan colonias homogéneas.
<b>Lilis 43</b>	Circular, bordes enteros, elevación convexa	Crema	Se observan colonias homogéneas.

Las cepas reactivadas del pozol fueron inoculadas por estriado radial como se describe en la sección 6.1.2. Como se observa en la tabla 11 todas las cepas poseen una morfología similar, así como homogeneidad entre las colonias y en el color. La descripción de las 17 cepas son características del género *Weissella* (Collins et al., 1993). Esto indica a simple vista que no existe contaminación por parte de otras bacterias, sin embargo aún no se puede concluir que sean puras.

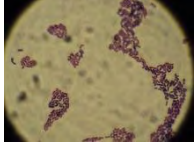
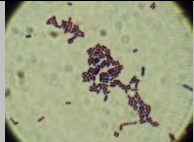
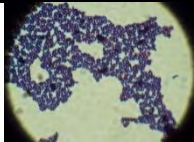
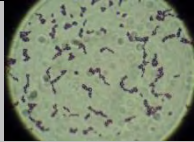



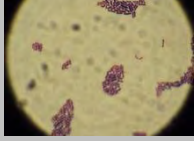
### 6.1.1.2. Descripción microscópica

En la tabla 12, se observa la morfología característica del género *Weissella*, cocos o cocobacilos Gram positivos (Collins et al., 1993), por lo que se puede comprobar que cada cepa se encuentra pura.

**Tabla 12 Características microscópicas de las cepas a estudiar.** Las cepas de bacterias ácido lácticas se inocularon en medio MRS durante 18 horas a 30°C

Clave de la cepa	Morfología	Imagen	Observaciones
3a	Coco bacilos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta
6b	Cocos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta
Lilis 9	Coco bacilos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta
Lilis 17	Coco bacilos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta
Lilis 19	Coco bacilos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta
Lilis 20	Coco bacilos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta
Snc 40	Coco bacilos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta
Snc 45	Cocos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta
3JAB	Cocos, Gram positivos sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta



<b>Snc 5</b>	Cocobacilos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta
<b>Lilis 7</b>	Cocobacilos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta
<b>Lilis 10</b>	Cocobacilos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta
<b>Lilis 13</b>	Cocos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta
<b>Lilis 22</b>	Cocobacilos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta
<b>Lilis 24</b>	Cocos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta
<b>Lilis 42</b>	Cocobacilos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta
<b>Lilis 43</b>	Cocobacilos, Gram positivos, sin agrupación		Se observa una sola morfología y la tinción es homogénea de color violeta

## 6.2. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Al conservar cada cepa se mantiene una mejor repetitividad en el experimento ya que se mantienen las características del microorganismo a estudiar. Todas las cepas se conservaron por duplicado (sección 6.1) se mantuvieron como se observa en las Figuras 10, 11 y 12.

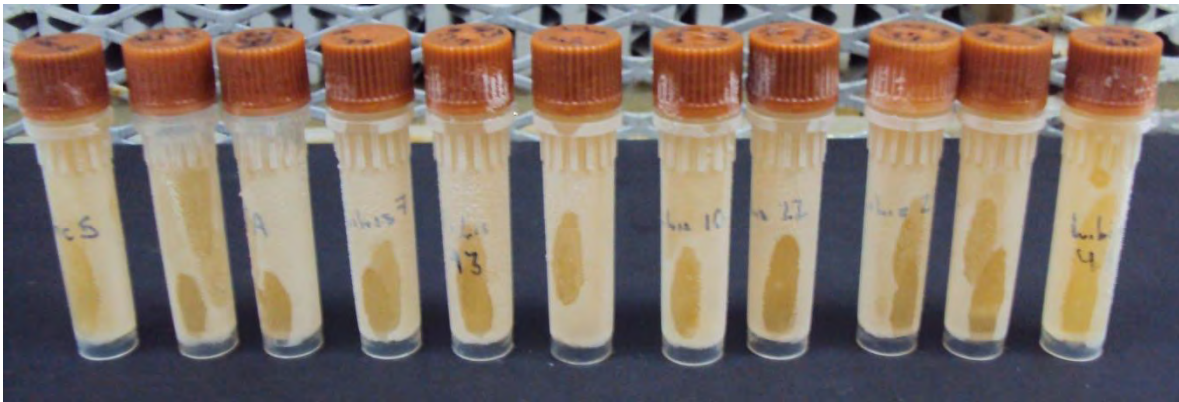


Figura 10 Bacterias ácido lácticas conservadas en glicerol al 20%.

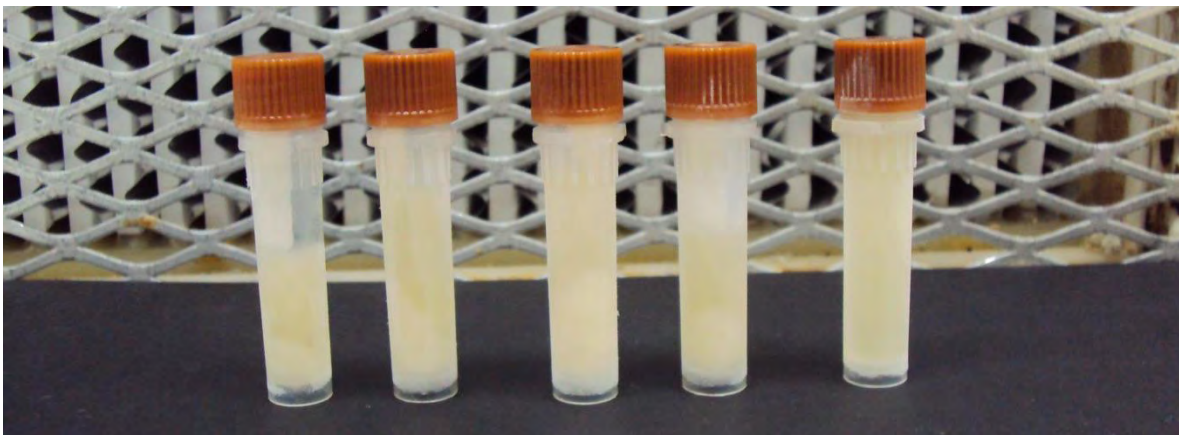
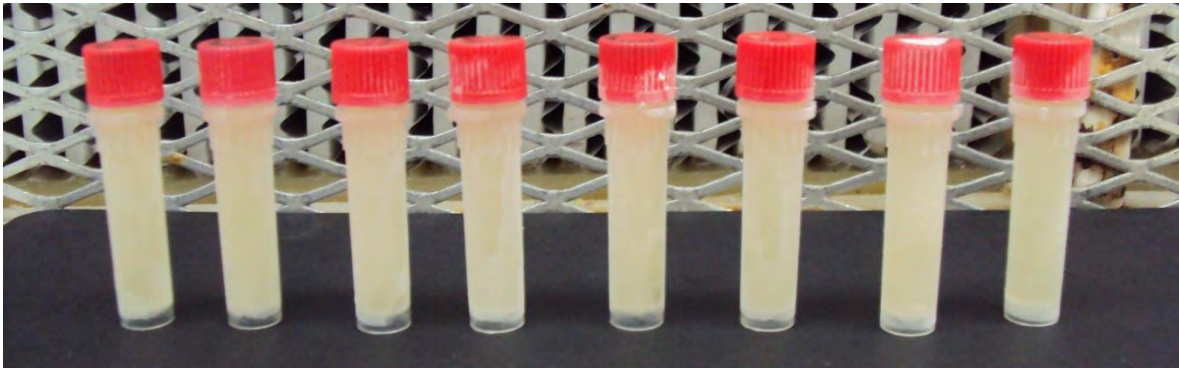


Figura 11 Bacterias ácido lácticas indicadoras conservadas en glicerol al 20%.



**Figura 12 Bacterias indicadoras, patógenas y de descomposición conservadas en glicerol al 20%.**

### **6.3. OBTENCIÓN, NEUTRALIZACIÓN, CUANTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS SOBRENADANTES OBTENIDOS A PARTIR DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DEL GENERO *WEISSELLA*.**

El volumen obtenido de SAWCN a partir de 30ml de medio MRS varió de acuerdo con pH del medio después de 24 horas de crecimiento (ya que como se observa en la Tabla 13 el pH no fue el mismo entre cada cepa) debido a que el volumen de NaOH utilizado para neutralizar el sobrenadante varió entre cada cepa. Sin embargo el volumen final de todas las cepas se encuentra entre 13 y 19ml.

#### **6.3.1. Neutralización de los sobrenadantes**

Se dividieron en dos grupos las cepas de BAL, primer y segundo grupo para un mejor manejo de las mismas.

Como se explica en la sección 6.2.1, después de incubar y separar la masa celular del medio de cultivo, éste posee un pH ácido determinado por su metabolismo, mismo que es tomado como el pH inicial, sin embargo como se ha descrito en estudios previos (Stiles et al., 1997) la presencia de ácidos orgánicos es un factor de inhibición que presentan las BAL. Por lo que para evitar que este factor interfiera se neutralizó el medio en un intervalo de valores de pH entre 6.5 y 7. Siendo el pH final, el valor obtenido después de neutralizar el medio de cultivo.

**Tabla 13 Valores de pH de los cultivos de BL incubadas durante 24 horas.**

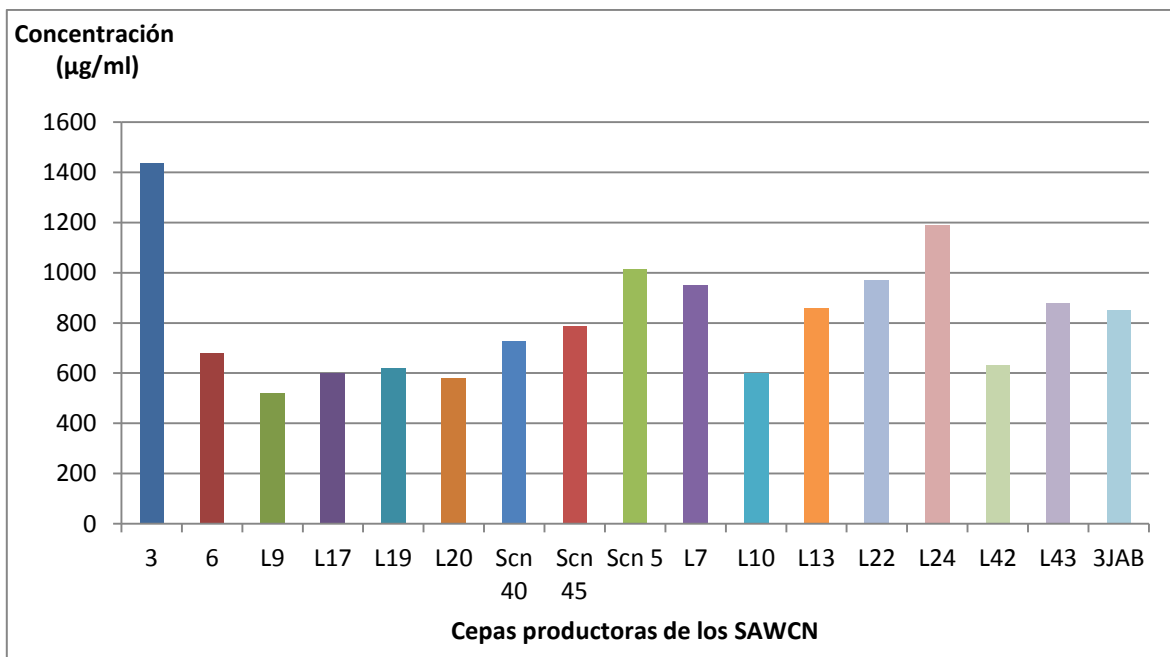
Primera tanda			Segunda tanda		
Bacteria	pH inicial	pH final	Bacteria	pH inicial	pH final
<b>3a</b>	4.05	6.75	<b>Snc 5</b>	4.16	6.78
<b>6b</b>	4.35	6.84	<b>Lilis 7</b>	4.66	7.00
<b>Lilis 9</b>	4.21	6.78	<b>Lilis 10</b>	4.28	6.57
<b>Lilis 17</b>	4.36	6.49	<b>Lilis 13</b>	4.46	6.69
<b>Lilis 19</b>	4.56	6.87	<b>Lilis 22</b>	4.51	6.72
<b>Lilis 20</b>	4.41	6.86	<b>Lilis 24</b>	4.09	6.64
<b>Snc 40</b>	4.12	6.97	<b>Lilis 42</b>	4.31	6.52
<b>Snc 45</b>	4.21	7.03	<b>Lilis 43</b>	4.50	6.89
<b>3JAB</b>	4.30	6.54			

En la tabla 13 se presentan los valores de pH inicial que se obtiene del sobrenadante después de incubar, centrifugar y eliminar las células del medio por decantación y del pH final, obtenido después de neutralizar.

Como se observa en la Tabla 13 los valores de pH inicial, prácticamente en todas las muestras, se encuentran en un intervalo entre 4-4.5. El ajuste del pH del medio fue muy importante para determinar la presencia de bacteriocinas, por lo que los valores deben de estar en un rango de 6.5 y 7, para evitar que ahora la basicidad del medio pudiera influir, así como también conservar la integridad y actividad de las posibles bacteriocinas presentes en el medio. El mayor problema fue tener los valores más cercanos entre sí ya que se busca que también el pH final sea homogéneo entre cada cepa.

### **6.3.2. Cuantificación de proteína por el método de Bradford**

Ya que se está midiendo la posible producción de bacteriocinas por cada cepa, es fundamental comprobar la presencia de las mismas en el medio. La reacción de Bradford para cuantificar proteínas es un método que indirectamente nos indicaría la posible producción de las bacteriocinas, al cuantificarse las proteínas presentes en el medio de cultivo y las producidas durante el crecimiento del microorganismo.



**Figura 13 Concentración de proteína en el SAWCN.** La concentración de proteína está dada en ( $\mu\text{g/ml}$ ), la cual fue medida mediante el kit Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent Bio-Rad®. Para los cálculos de concentración de proteína al valor obtenido mediante el método de Bradford de cada cepa se restó el valor del blanco ( $3290\mu\text{g/ml}$ ) obteniendo los valores de la figura.

Todas las cepas presentaron una producción de proteínas superior a la ya existente en el medio puro ( $3290\mu\text{g/ml}$ ), sin embargo, aunque la producción es muy parecida en algunas de las cepas, como lo son las cepas 6, Lilis 9, Lilis 17, Lilis 19, Lilis 20, Snc 40, Snc 45, Lilis 10 y Lilis 42 ya que se encuentran alrededor de los  $600\mu\text{g/ml}$ , 8 de las cepas: 3a, snc5, Lilis 7, Lilis 13, Lilis 22, Lilis 24, Lilis 43 y 3JAB presentaron una concentración superior a  $800\mu\text{g/ml}$ . Este efecto puede ser debido a la variación entre las cepas, por lo cual es posible que no produzca la misma concentración de compuestos proteicos extracelulares, (Wescombe y Tagg, 2003; Svetoslav, et al., 2004; Chang et al., 2007).

### **6.3.3. Esterilización de los sobrenadantes mediante el método de filtración por membrana.**

Después de separar el medio de la masa celular, en este solo quedan moléculas de menor peso, como son proteínas entre otras, no obstante, el manejo durante el ajuste de pH, la concentración del medio, entre otros, pueden ser factores de contaminación del medio, ya que este sigue siendo un medio de cultivo en el cual diversos microorganismos podrían seguir desarrollándose.

Después de esterilizar con membranas cada sobrenadante se dejó 24 horas a temperatura ambiente, sin embargo en ningún sobrenadante se presentó crecimiento bacteriano, asimismo durante todo el estudio no existió crecimiento en ninguno de ellos.

Una vez comprobado que los SAWCN se encontraban estériles fueron almacenados en tubos falcón (previamente esterilizados) a 10°C hasta su uso. Cada tubo falcón contenía 25ml de SAWCN de las 17 cepas de BAL.

#### **6.4. EFECTO DE LOS COMPUESTOS PROTEICOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE DIVERSAS BACTERIAS SENSIBLES.**

Este ensayo tuvo como principal objetivo identificar que SAWCN poseían alguna actividad antimicrobiana y frente a que bacterias indicadoras por lo que **SOLO SE UTILIZARON LOS SAWCN EN ESTA SECCION** (sección 6.2.1).

#### 6.4.1. Método de difusión en agar, pruebas frente a microorganismos patógenos y de descomposición en alimentos.

El ensayo se realizó frente a una amplia gama de microorganismos patógenos y causantes de descomposición, Gram positivos y negativos presentes en los alimentos los cuales se encuentran enlistados en la tabla 3 de la sección 6.1.

**Tabla 14 Efecto de los sobrenadantes producidos por cepas del género *Weissella* hacia diversas bacterias patógenas.** Los diámetros de los halos obtenidos de cada sobrenadante están dados en cm, así como el efecto que cada uno de ellos ejerció sobre cada bacteria sensible se observa de acuerdo al color asignado bacteriostático o bactericida, mientras que las X indican que no existió ningún efecto en el crecimiento de la bacteria indicadora (no hubo halo).

Bacterias patógenas sensibles								
Cepa	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Listeria</i>	<i>Pseudomonas A.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Salmonella</i>
3	X	X	X	1.5	X	X	X	X
6	X	X	X	X	1.85	X	X	X
Lilis 9	X	X	X	X	X	X	X	X
Lilis 17	X	X	X	X	X	X	X	X
Lilis 19	X	1.88	X	X	1.75	X	X	X
Lilis 20	X	X	X	X	1.8	X	1.75	X
Snc 40	X	X	X	X	1.94	X	2.5	X
Snc 45	X	X	X	X	1.62	X	X	X
Snc 5	X	X	X	X	1.4	X	X	X
Lilis 7	X	X	X	X	1.63	X	X	X
Lilis 10	X	X	X	X	2	1.63	X	X
Lilis 13	X	1.5	X	1.86	2.1	X	X	X
Lilis 22	X	X	X	X	X	X	X	X
Lilis 24	X	X	X	X	X	X	X	X
Lilis 42	X	X	X	X	X	X	X	X
Lilis 43	X	X	X	X	X	X	X	X
3JAB	X	X	X	X	X	X	X	X

El color amarillo significa que se ejerció un efecto bacteriostático sobre la bacteria indicadora, mientras que el rojo es un efecto bactericida.

Como se observa en la tabla 14, la bacteria indicadora *Enterobacter cloacae* se vio afectada por los SAWCN obtenidos a partir de las cepas Lilis 19 y 13 generando un halo de 1.88 y 1.5cm respectivamente, mientras que *Listeria monocytogenes* se vio afectada por la cepa 3 y Lilis 13 generando halos de 1.5 y 1.86cm respectivamente, *Pseudomonas aeruginosa* se observó efecto en su crecimiento causado por los SAWCN obtenidos de las cepas 6, Lilis 19, 20, snc 40, snc 45, snc 5, Lilis 7, 10 y 13 dando lugar a halos con un diámetro de 1.85, 1.75, 1.8, 1.94, 1.62, 1.4, 1.63, 2 y 2.1cm respectivamente, *Staphylococcus aureus* solo se vio afectada por el SAWCN de la cepa lilis 10 con un diámetro de halo de 1.63cm finalmente *Staphylococcus epidermidis* se vio afectada por los SAWCN de las cepas Lilis 20 y snc 40 proporcionando halos de 1.75 y 2.5cm respectivamente, cabe resaltar que el efecto ejercido sobre las bacterias indicadoras solo fue bacteriostático (sección 6.3). Ningún sobrenadante ejerció algún efecto en tres de las bacterias sensibles *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli*.

Los SAWCN obtenidos de las cepas Lilis 9, 17, 22, 24, 42, 43 (cepas de la especie *Weissella confusa*) y 3JAB (*Weissella cibaria*) no demostraron ejercer algún efecto sobre el crecimiento de ninguna bacteria indicadora.

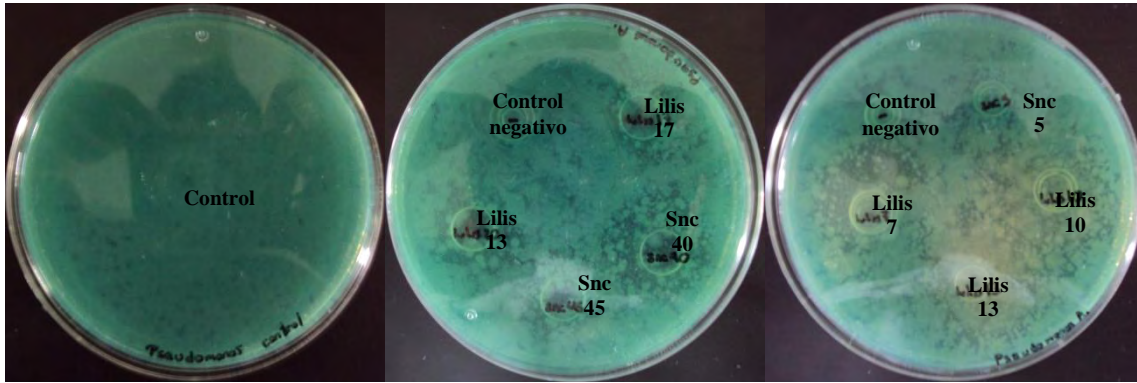
Solo 5 SAWCN mostraron efecto en el desarrollo de más de una bacteria indicadora, las cuales fueron obtenidos de las cepas de *Weissella confusa* marcados con las siguientes claves: Lilis 19 afectando el crecimiento de *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas aeruginosa*, Lilis 20 y snc 40 ejercieron efecto sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus epidermidis*, Lilis 10 afectó el incremento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, por último Lilis 13 afectó 3 bacterias indicadoras *Enterobacter cloacae*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. El indicador más sensible a los SAWCN fue la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* ya que como se menciona anteriormente 9 SAWCN demostraron ejercer un efecto en su desarrollo.

Estudios previos (Tavera 2010, Rodríguez 2011) han demostrado que antimicrobianos producidos por bacterias ácido lácticas aisladas del pozol han logrado inhibir a bacterias Gram negativas y positivas como son *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*,



por lo que su estrecha relación con el género *Weissella* pueda ser una explicación del por qué los SAWCN obtenidos a partir de esta BAL puede inhibir tanto bacterias Gram positivas como negativas así como también los resultados anteriormente descritos pueden deberse a diversos factores. Uno de ellos es debido a que *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, son bacterias Gram positivas, al igual que *Weissella*. Las bacteriocinas poseen un efecto más marcado frente a bacterias estrechamente relacionadas a ellas o con características muy similares (De Vuyst & Leroy, 2007), miembros de la misma especie o especies muy relacionadas con la misma especie, actuando en la membrana celular, ya que en general actúan destruyendo la integridad de esta membrana a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños como potasio, fosfato inorgánico y, en algunos casos, aminoácidos y moléculas pequeñas necesarios para la producción de energía y la síntesis de proteínas lo que finalmente origina la muerte celular (Chikindas y col., 1993; Montville y Chen, 1998; Chen y Hoover, 2003; González Martínez y col., 2003; Cotter y col., 2005; Chatterjje y col., 2005) este puede ser el motivo por el que estas bacterias fueron susceptibles a su efecto. Siendo *Staphylococcus epidermidis* en la que el efecto fue mayor.

No obstante, *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas aeruginosa* son bacterias Gram negativas cuya distinción es que este género presenta dos membranas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, aun así en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*; 9 sobrenadantes ejercieron efecto bacteriostático muy marcado contra estas bacterias. Esto se puede deber al efecto de compuestos proteicos biológicamente activos, como bacteriocinas ya que estudios han demostrado que también puede existir acciones bactericidas o bacteriostáticas en microorganismos distanciados biológicamente de la cepa productora (Dolz, 2000). Estudios recientes afirman que las bacteriocinas pueden actuar frente a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos (Eijsink et al., 1998; Cotter et al., 2005; Svetoch et al., 2008).



**Figura 14** Efecto de los sobrenadantes producidos por cepas del género *Weissella* en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. Después de 24 horas de incubación, el efecto de diversos sobrenadantes sobre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, el orden de izquierda a derecha es: caja 1 control negativo, caja dos con los sobrenadantes de las cepas Lilis 19, Lilis 20, Snc 40 y Snc 45 y la tercera caja con los sobrenadantes de las cepas Snc 5 Lilis 7, Lilis 10 y Lilis 13.

El efecto que se observa en la figura 14 es bacteriostático, debido a que el crecimiento de la bacteria sensible se sigue observando aunque en menor cantidad tomando como referencia el pozo que está marcado como negativo, así mismo, se observa también que se pierde la coloración verde característica de la bacteria sensible, esto debido a que la difusión del sobrenadante en el medio genera un gradiente de concentración en el cual mientras más cercano al pozo mayor será la concentración y viceversa cabe resaltar que también se observa que en los extremos del halo la forma no es totalmente circular y se presenta irregular, siendo las diferencias en la difusión del sobrenadante una posible explicación de este hecho.

#### **6.4.2. Método de difusión en agar, pruebas frente a bacterias ácido lácticas aisladas del pozol**

Como se ha descrito anteriormente, el género *Weissella* es uno de los géneros predominantes en la fermentación del pozol, dicha circunstancia puede deberse a que estas bacterias para sobrevivir son capaces de secretar compuestos que afecten el desarrollo de las otras bacterias ácido lácticas presentes en este alimento. Por lo que se realizó un ensayo de actividad microbiana de los SAWCN en BAL presentes en la fermentación del pozol (tabla 9 sección 6.1) teniendo como objetivo encontrar una posible explicación a la dominancia de *Weissella* en la fermentación del pozol.

**Tabla 15 Efecto de los sobrenadantes producidos por cepas del género *Weissella* hacia diversas bacterias ácido lácticas aisladas del pozol.** Los diámetros de los halos obtenidos de cada sobrenadante están dados en cm, así como el efecto que cada uno de ellos ejerció sobre cada bacteria sensible se observa de acuerdo al color asignado bacteriostático o bactericida, mientras que las X indican que no existió ningún efecto en el crecimiento de la bacteria indicadora (no hubo halo), el número entre paréntesis es la clave de cada cepa indicadora.

<b>Bacterias ácido lácticas indicadoras aisladas del pozol</b>					
<b>Cepa</b>	<i>Enterococcus italicus</i> (17)	<i>Lactococcus lactis</i> (9)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (152)	<i>Leuconostoc P.</i> (3)	<i>Streptococcus infantarius</i> (SI)
3	X	1.85	X	1.72	1.6
6	X	X	X	X	0.8
Lilis 9	X	X	X	X	X
Lilis 17	X	X	1.65	1.72	X
Lilis 19	1.5	X	X	X	X
Lilis 20	1.63	X	1.75	X	X
Snc 40	X	X	X	X	1.71
Snc 45	X	X	X	X	1.64
Snc 5	X	1.65	X	X	1.6
Lilis 7	1.53	X	X	X	X
Lilis 10	1.63	X	X	X	X
Lilis 13	1.72	1.83	X	2.5	1.4
Lilis 22	X	X	1.4	X	X
Lilis 24	X	1.4	X	X	0.9
Lilis 42	X	1.6	1.4	X	1
Lilis 43	X	X	X	X	X
3JAB	X	X	X	X	X

El color amarillo significa que se ejerció un efecto bacteriostático sobre la bacteria indicadora, mientras que el rojo es un efecto bactericida.

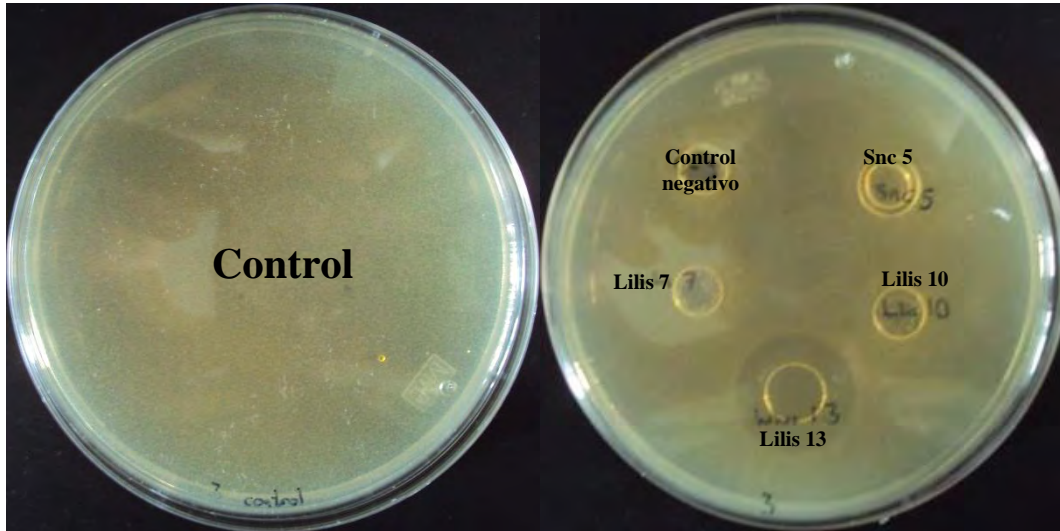
Como se observa en la tabla 15, un gran número de SAWCN ejerció un efecto antimicrobiano sobre las BAL indicadoras aisladas del pozol. Siendo la BAL *Streptococcus infantarius* la más sensible a los SAWCN ya que 8 de estos compuestos generaron halos de inhibición siendo los SAWCN siguientes: 3, 6, (obtenidos a partir de *Weissella paramesenteroides*), snc 40, snc 45, snc 5, Lilis 13, 24 y 42 (obtenidos a partir de *Weissella confusa*), cabe destacar que el efecto ejercido sobre esta bacteria indicadora solo fue bacteriostático (sección 6.3). La cepa indicadora *Leuconostoc pseudomesenteroides* fue

la menos sensible a los SAWCN ya que solo 3 SAWCN presentaron actividad sobre esta bacteria indicadora, siendo el SAWCN: 3, (obtenido a partir de *Weissella paramesenteroides*), Lilis 17, ambos ejerciendo un efecto bacteriostático (sección 6.3) y Lilis 13 siendo este el único SAWCN que ejerció un efecto bactericida (sección 6.3) con un diámetro de halo de 1.72, 1.72 y 2.5cm respectivamente, estas dos últimas obtenidas a partir de *Weissella confusa*.

Los SAWCN que ejercieron efecto en un mayor número de cepas indicadoras fueron el 3a afectando el desarrollo de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Streptococcus infantarius*, mientras que Lilis 42 influyó en el desarrollo de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus infantarius*. Por último, lilis 13 mostró efecto en un mayor número de bacterias indicadoras las cuales son: *Enterococcus italicus*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Streptococcus infantarius*, así como también fue el único SAWCN que ejerció un efecto bactericida.

Finalmente los SAWCN obtenidos a partir de las cepas Lilis 9, Lilis 43 y 3JAB no ejercieron ningún efecto sobre las bacterias indicadoras.

Aunque no existió una cepa que ejerciera un efecto sobre todas las bacterias sensibles, todas fueron afectadas ya sea por uno u otro sobrenadante. *Enterococcus italicus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Streptococcus infantarius*, bacterias ácido lácticas aisladas del pozol, inhibieron su crecimiento en presencia de los SAWCN, lo que explicaría la predominancia de *Weissella* en la fermentación del pozol (De Vuyst & Leroy, 2007).



**Figura 15 Efecto de los sobrenadantes aislados de *Weissella*, en el crecimiento de *Leuconostoc pseudomesenteroides*.** Después de 24 horas de incubación, el efecto de diversos sobrenadantes sobre la bacteria *Leuconostoc pseudomesenteroides*, el orden de izquierda a derecha es: caja 1 control negativo y caja dos con los sobrenadantes de las cepas Snc 5 Lilis 7, Lilis 10 y Lilis 13.

Al observar ambas cajas podemos ver que el único SAWCN que genero un efecto sobre la bacteria sensible *Leuconostoc pseudomesenteroides*, fue el de la Lilis 13 ejerciendo un efecto bactericida, el cual se aprecia en la ilustración, ya que el crecimiento es nulo en un halo de diámetro de 2.2cm, dicho efecto se explica mediante la presencia de un compuesto proteico biológicamente activo.

Al observar que existe un efecto de los sobrenadantes, tanto bacteriostático y bactericida, frente a las bacterias patógenas y ácido lácticas aisladas del pozol, es claro que estos presentan compuestos biológicamente activos que, debido a la preparación de cada sobrenadante se puede determinar que son de carácter proteico, como lo son las bacteriocinas, ya que no puede deberse al pH o bien la presencia de otro microorganismo. Sin embargo, en las bacterias ácido lácticas aisladas del pozol el efecto fue mayor en comparación con las bacterias patógenas, dado esto se podría deber a diversas cuestiones que van desde la que son bacterias estrechamente relacionadas, ya que todas son ácido lácticas, Gram positivas y en especial fueron aisladas del mismo alimento, además de que la producción de dichas bacteriocinas puede deberse a una estrategia de *Weissella* para sobrevivir en la fermentación del pozol.

En cuanto a las bacterias patógenas, se observa que el efecto se dio tanto en bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Listeria monocytogenes*, así como en bacterias Gram negativas: *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se ha mencionado el hecho de que se han encontrado acciones bactericidas contra cepas distanciadas fisiológicamente de la cepa productora (Dolz, 2000), por lo que el efecto bacteriostático ejercido en dichas cepas se atribuye a compuestos proteicos biológicamente activos, como lo son las bacteriocinas, ya que no existe otro factor en los sobrenadantes al que pueda atribuirse. Se podría esperar que el efecto sobre las bacterias Gram positivas pudiera ser mayor, ya que estas comparten este rasgo con las bacterias ácido lácticas, sin embargo *Pseudomonas aeruginosa* fue la bacteria en la que más sobrenadantes ejercieron efecto.

#### **6.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA HACIA LOS SOBRENADANTES Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Existen diversos tipos de bacteriocinas, las cuales se pueden clasificar en 5 clases (Klaenhammer, 1993 y Cotter et al., 2005). Kemperman a diferencia de otros investigadores propone 5 diferentes clases de bacteriocinas las cuales subdivide también de acuerdo a sus diferentes características, tamaños, inhibición, entre otras propiedades. El grupo II, no lantibióticos, poseen diversas características como un tamaño que va desde 30 a 60 aminoácidos (<10KDa), siendo su principal rasgo que son estables al calor. Esta propiedad exclusiva de este grupo es de gran valor (Zapata et al. 2009) ya que el ser compuestos proteicos biológicamente activos los vuelve susceptibles al efecto del calor, además de que la gran mayoría de los procesos alimenticios requieren que estos compuestos sean resistentes al calor, lo que genera que el uso de estos compuestos se expanda tanto en la industria como la investigación.

El objetivo de repetir el ensayo de actividad antimicrobiana con los sobrenadantes sometidos a un tratamiento térmico es determinar si alguno de los SAWCN que presentaron actividad frente a las bacterias indicadoras (tanto patógenas, de descomposición y BAL aisladas del pozol) siguen conservando esta actividad biológica.

**6.5.1. Influencia de la temperatura en la actividad biológica de los sobrenadantes de las cepas de *Weissella* frente a microorganismos patógenos y bacterias ácido lácticas aisladas del pozol.**

**Tabla 16 Efecto antimicrobiano de los SAWCNTT hacia diversas bacterias patógenas.** Los diámetros de los halos obtenidos de cada sobrenadante están dados en cm, así como el efecto que cada uno de ellos ejerció sobre cada bacteria sensible se observa de acuerdo al color asignado **bacteriostático** o **bactericida**, mientras que las X indican que no existió ningún efecto en el crecimiento de la bacteria indicadora (no hubo halo).

<b>Bacterias patógenas sensibles</b>								
<b>Cepa</b>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Listeria</i>	<i>Pseudomonas A.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Salmonella</i>
3	X	X	X	X	X	X	X	X
6	X	X	X	X	1.8	X	X	X
Lilis 9	X	X	X	X	X	X	X	X
Lilis 17	X	X	X	X	X	X	X	X
Lilis 19	X	X	X	X	X	X	X	X
Lilis 20	X	X	X	X	1.5	X	1.6	X
Snc 40	X	X	X	X	X	X	X	X
Snc 45	X	X	X	X	X	X	X	X
Snc 5	X	X	X	X	X	X	X	X
Lilis 7	X	X	X	X	1.5	X	X	X
Lilis 10	X	X	X	X	1.8	1.6	X	X
Lilis 13	X	1.9	X	X	2.2	X	X	X
Lilis 22	X	X	X	X	X	X	X	X
Lilis 24	X	X	X	X	X	X	X	X
Lilis 42	X	X	X	X	X	X	X	X
Lilis 43	X	X	X	X	X	X	X	X
3JAB	X	X	X	X	X	X	X	X

En la tabla 16 se observan las actividades antimicrobianas de los sobrenadantes ya tratados térmicamente (SAWCNTT). Solo 5 de los 10 sobrenadantes que habían manifestado

actividad biológica sobre las cepas sensibles conservaron su actividad biológica frente a las bacterias sensibles. Esto indica que solo la mitad de los compuestos producidos por las cepas son termoresistentes, de acuerdo a la clasificación de las bacteriocinas solo el grupo 2 presenta estas características, debido a la gran estabilidad de su estructura proteica que está ligada a su actividad. Sin embargo, el rango en que una proteína o enzimas (incluyendo a las bacteriocinas) tienden a desnaturalizarse oscila entre los 50°C en adelante ya que es cuando la estructura se ve comprometida, por lo que el hecho de que la actividad haya resistido una temperatura entre 100-110 °C indica una gran estabilidad. No obstante se observa que aunque las muestras conservaron su actividad biológica el halo de inhibición en 4 de los 5 sobrenadantes disminuyo su diámetro, sugiriendo que este resultado pudo ser producido debido a diversos factores como son el efecto de la temperatura, que si bien no desnaturalizo los compuestos (bacteriocinas) si afecto tenuemente su actividad, siendo esta una posible prueba de que los sobrenadantes no hayan generado un efecto tan fuerte como los sobrenadantes no tratados térmicamente, aunque también pudo deberse al periodo o condiciones de almacenamiento de los sobrenadantes.

**Tabla 17 Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de las cepas de *Weissella* tratados térmicamente frente a diversas bacterias ácido lácticas aisladas del pozol.** Los diámetros de los halos obtenidos de cada sobrenadante están dados en cm, así como el efecto que cada uno de ellos ejerció sobre cada bacteria sensible se observa de acuerdo al color asignado **bacteriostático** o **bactericida**, mientras que las X indican que no existió ningún efecto en el crecimiento de la bacteria indicadora (no hubo halo).

<b>Bacterias ácido lácticas sensibles</b>					
<b>Cepa</b>	<i>Enterococcus italicus</i> (17)	<i>Lactococcus lactis</i> (9)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (152)	<i>Leuconostoc P.</i> (3)	<i>Streptococcus infantarius</i> (SI)
3	X	1.5	X	1.2	1
6	X	X	X	X	0.8
Lilis 9	X	X	X	X	X
Lilis 17	X	X	X	X	X
Lilis 19	X	X	X	X	X
Lilis 20	1.3	X	1.5	X	X
Snc 40	X	X	X	X	X



Snc 45	X	X	X	X	X
Snc 5	X	X	X	X	X
Lilis 7	1.3	X	X	X	X
Lilis 10	1.3	X	X	X	X
Lilis 13	1.3	1.3	X	2.2	0.8
Lilis 22	X	X	X	X	X
Lilis 24	X	X	X	X	X
Lilis 42	X	1.6	1.4	X	1
Lilis 43	X	X	X	X	X
3JAB	X	X	X	X	X

El efecto antimicrobiano que se observó de los sobrenadantes de *Weissella* contra las bacterias patógenas, fue similar al observado contra las bacterias ácido lácticas aisladas del pozol, ya que en este caso se tenían 14 sobrenadantes que demostraron poseer actividad biológica frente a estas cepas (tabla 16), sin embargo solo 7 pudieron conservar esta capacidad 3a, 6b, Lilis 20, 7, 10, 13 y 42 (siendo las primeras 2 obtenidas a partir de *Weissella paramesenteroides* y las demás de *Weissella confusa*) después del tratamiento térmico.

En la tabla 17 se puede observar que las bacterias indicadoras más sensibles fueron *Enterococcus italicus* y *Streptococcus infantarius*, en este caso *Enterococcus italicus* se vio afectada por los SAWCNTT obtenidos a partir de las cepas Lilis 20, 7, 10 y 13 todas bacterias de la especie *Weissella confusa*, mientras que *Streptococcus infantarius* se vio influida por 3a, 6b, (ambas obtenidas a partir de *Weissella paramesenteroides*) Lilis 13 y 42 (ambas obtenidas a partir de *Weissella confusa*). Por su parte, *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc pseudomesenteroides* fueron las bacterias indicadoras menos sensibles ya que solo se vieron afectadas por dos SAWCNTT cada una. El desarrollo de *Lactobacillus plantarum* se vio influido por los sobrenadantes Lilis 20 y 42 (ambos obtenidos a partir de *Weissella confusa*), mientras que *Leuconostoc pseudomesenteroides* fue influida por el

sobrenadante obtenido de 3a y Lilis 13 (obtenidos de *Weissella paramesenteroides* y *Weissella confusa* respectivamente).

El SAWCNTT obtenido de la cepa Lilis 13 fue el que tuvo un mayor efecto sobre las bacterias indicadoras, ya que afectó del desarrollo de 4 de las 5 bacterias indicadoras las cuales fueron *Streptococcus infantarius*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Enterococcus italicus*, siendo la segunda la única en la que se generó un efecto bactericida (sección 6.3) de todo este ensayo, ya que los demás fueron bacteriostáticos. Finalmente los SAWCNTT obtenidos de las cepas Lilis 9, 17, 19, 22, 24, 43, snc 40, snc 45, snc 5 y 3JAB no ejercieron ningún efecto sobre las bacterias indicadoras.

Podemos observar que fueron las mismas cepas que presentaron actividad frente a las bacterias patógenas, a excepción de los sobrenadantes marcados como 3 y Lilis 42, exceptuando a la Lilis 42 ya que ésta no presentó actividad frente a ninguna bacteria patógena, por tanto no podemos demostrar esto, sin embargo el sobrenadante 3 presentó un halo de 1.5cm de diámetro frente a *Listeria monocytogenes*, pero al exponerla a altas temperaturas perdió esta actividad, ya que no presentó halo de nuevo frente a *Listeria monocytogenes*, dando señal de que dicho compuesto se había desnaturalizado; sin embargo al estar frente a las bacterias ácido lácticas dicho efecto no se observó, pero si una disminución en el halo de inhibición. Se ha demostrando que la actividad de este sobrenadante no se perdió con la temperatura, no obstante el hecho de que frente a *Listeria* la actividad se viera afectada y frente a las bacterias ácido lácticas no, puede deberse a que dentro de una especie podrían producirse diferentes tipos de bacteriocinas (Ennahar et al., 2000; Cintas et al , 2001; Joerger, 2003). Por lo que no podemos descartar la posibilidad de que la cepa 3 pueda liberar al medio más de un tipo de bacteriocinas, entre las cuales pueden existir tanto termolábiles, como termorresistentes.

Por último, se confirma la resistencia a la temperatura de los compuestos proteicos de las cepas 6, Lilis 20, Lilis 7, Lilis 10 y Lilis 13, así como también las cepas 3 y Lilis 42 que solo mostraron actividad frente a las bacterias aisladas del pozol. Estos resultados (la

termoresistencia de los SAWCNTT) pueden ser explicados por lo que reportaron Schneider et al., (2006) caracterizando la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133, reportando que la resistencia al calor de dicha bacteriocina depende del pH. La bacteriocina fue sometida a un tratamiento térmico a 121°C durante 15 min, mostrando una pérdida del 84% de su actividad a pH 6 (aunque a pH mayor a 7 se inactivó completamente). Sin embargo, a pH 4 mostró sólo una pérdida moderada de su actividad del 11%. Larsen y col. (1993) encontraron que la bavaricina A es muy estable en un intervalo de pH de 2.0 a 9.7, pero almacenándola a pH 12.5 durante 4 horas pierde completamente su actividad; mientras que la piscicolina 126 al ser tratada térmicamente durante 120 minutos en un intervalo de pH de 2 a 3 mantiene la actividad bactericida; sin embargo, un calentamiento durante 15 minutos a pH 4-5 reduce su actividad en un 50%. Por lo que el pH final (sección 7.3.1) de los SAWCNTT pudo influir directamente en la termoresistencia de las bacteriocinas.

#### **6.6. CRECIMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL POZOL EN LOS SOBRENADANTES DE LAS CEPAS DE *WEISSELLA* TRATADOS TÉRMICAMENTE.**

La colonización de un microorganismo en el medio se debe a diversas características que posee, o bien su capacidad de adaptación frente a todos estos factores.

La mejor forma de visualizar el efecto biológico de un compuesto frente a un microorganismo es observando directamente como este afecta su crecimiento, así como el tiempo en que el compuesto llega a erradicar al microorganismo o bien si solo lo inhibe cuánto tiempo puede durar esta inhibición. Estos efectos se pueden ver directamente si se cuantifica el crecimiento frente a los compuestos a estudiar.

Este ensayo tiene como principal objetivo el observar de forma más concreta como es que los sobrenadantes concentrados (SAWCNTT) afectan el desarrollo de una BAL aislada del pozol (bacteria indicadora). Mismo que consiste en inocular la bacteria indicadora en medio líquido junto a un sobrenadante durante un periodo de 48 horas tomando distintas muestras durante los tiempos 0, 12, 24 y 48 horas y así observar a distintos tiempos su desarrollo en el medio (ya sea que la bacteria indicadora muera, se desarrolle más lentamente o no se vea afectada).

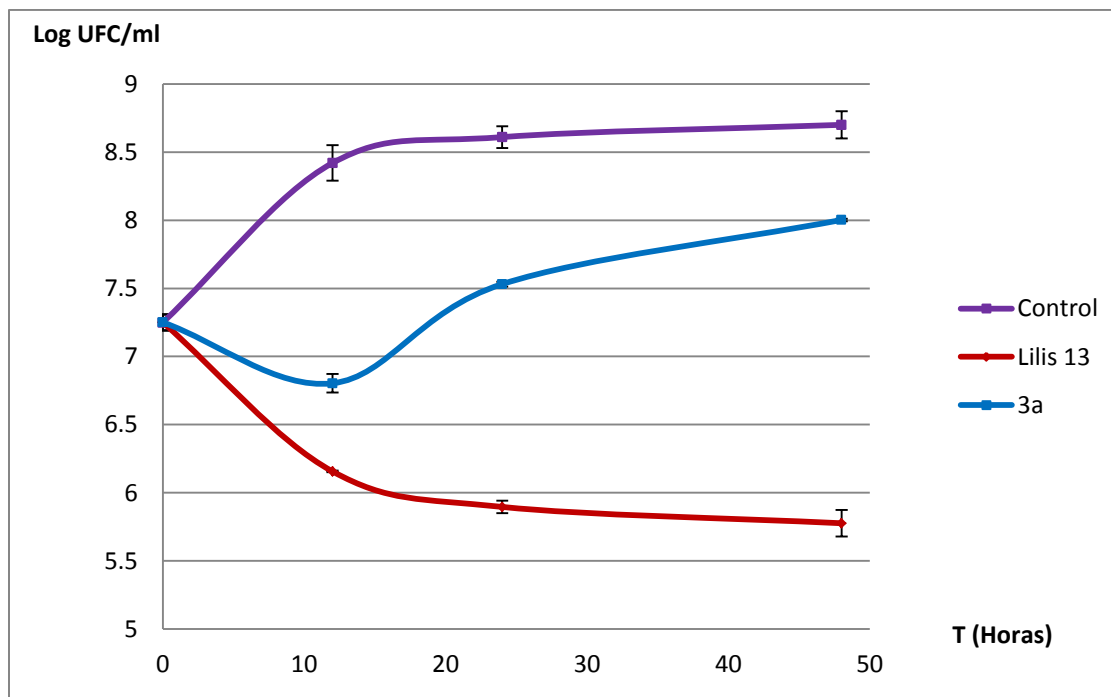
La selección tanto de las cepas indicadoras, así como de los sobrenadantes se realizó como se indica en la sección 6.5, tomando en cuenta el tipo de inhibición que ejercía, ya fuera bacteriostática o bactericida (la determinación de este efecto se explica en la sección 6.3), diámetro de inhibición (el halo que se generaba el SAWCNTT sección 6.3.4), el número de bacterias sensibles afectadas y la termorresistencia de los sobrenadantes. Dando las siguientes combinaciones.

**Tabla 18 Combinaciones entre SAWCNTT y Bacterias indicadoras.**

<b>SAWCNTT obtenido de la cepa</b>	<b>Clave de la bacteria indicadora</b>	<b>Bacteria indicadora</b>
<b>3a</b>	9	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
	3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
	SI	<i>Streptococcus infantarius</i>
<b>Lilis 13</b>	17	<i>Enterococcus italicus</i>
	9	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>
	3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
		<i>Streptococcus infantarius</i>
<b>Lilis 42</b>	9	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>
	152	<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Streptococcus infantarius</i>

#### **6.6.1. *Leuconostoc pseudomesenteroides***

Durante el método de difusión en agar *Leuconostoc pseudomesenteroides* fue la única bacteria ácido láctica en la que se observó un efecto bactericida, así como bacteriostático por los sobrenadantes de las cepas Lilis 13 y 3a respectivamente.



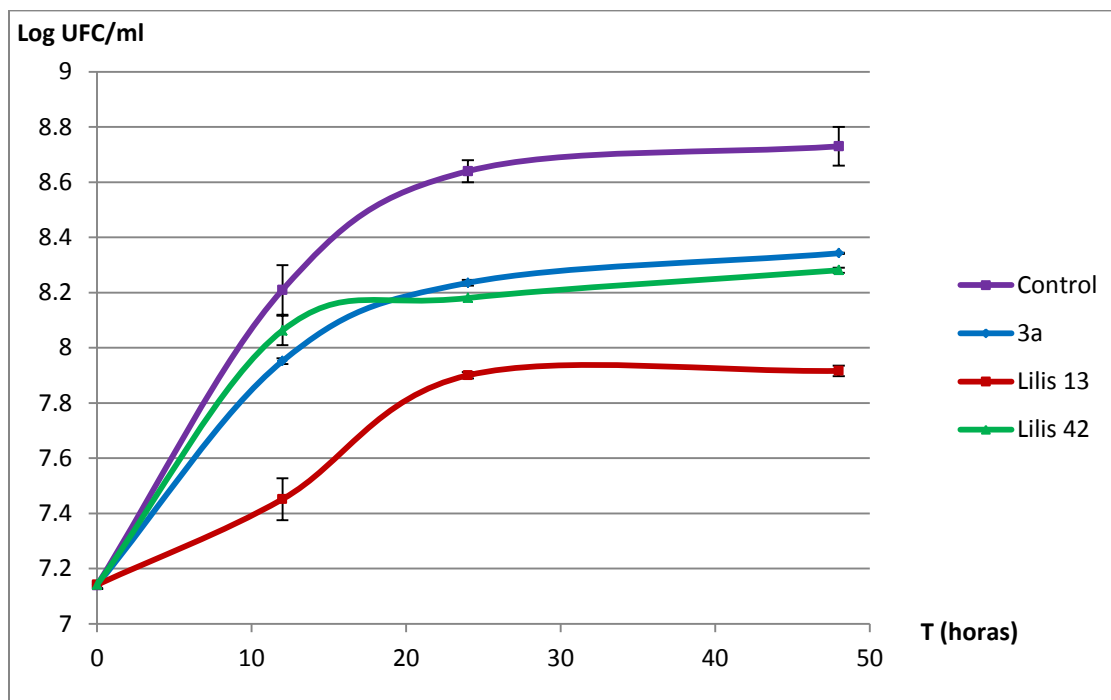
**Figura 16 Efecto de los SAWCNTT Lilis 13 y 3a en el crecimiento de *Leuconostoc pseudomesenteroides*.** Las muestras fueron incubadas a 30°C durante un periodo de 48 horas, el control es la bacteria sin ningún agente que pueda afectar su crecimiento y las mismas condiciones de tiempo y temperatura que las bacterias indicadoras.

Como se observa en el gráfico, podemos comprobar el efecto que también fue visto en la prueba de difusión en agar ya que como podemos ver el desarrollo del control se da en las primeras 24 horas que es donde alcanza un valor de 8.61UFC/ml a partir del cual la bacteria entra en la fase estacionaria, sin embargo, esta bacteria en presencia del sobrenadante tratado térmicamente de la cepa 3a muestra un desarrollo totalmente distinto al control, ya que después de las primeras 12 horas tiene un pequeño decremento de 7.12UFC/ml hasta 6.9UFC/ml, no obstante este efecto empieza a desaparecer ya que después de 24 horas de incubación la concentración de las bacterias empieza a incrementarse hasta un valor de 7.53UFC/ml y a las 48horas ya se ha alcanzado 8UFC/ml, no obstante este valor aún se encuentra muy por debajo del control y recordando el efecto que se vislumbró en la difusión en agar, no se erradicó por completo a la bacteria, pero si se observaba una menor concentración de la misma en el medio en comparación con el control, por lo que ambos sucesos comprueban que en el sobrenadante existe un agente o compuesto que está inhibiendo el desarrollo de la bacteria.

Por otro lado el efecto del sobrenadante tratado térmicamente de la cepa Lilis 13 es aún más interesante ya que este durante todo el tiempo disminuyó el número de UFC. En la prueba de difusión en agar se observó un efecto bactericida con un halo de 2cm de diámetro. Esto sugiere que existen bacteriocinas en el medio las cuales están eliminando a *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

### 6.6.2. *Lactococcus lactis*

Durante la prueba de difusión en agar, *Lactococcus lactis* mostró una amplia sensibilidad a diversos sobrenadantes, sin embargo, esta disminuyó cuando fueron tratados térmicamente. El efecto antimicrobiano de los sobrenadantes tratados térmicamente de la cepa Lilis 42 en presencia de *Lactococcus lactis* se presenta en la figura 5.



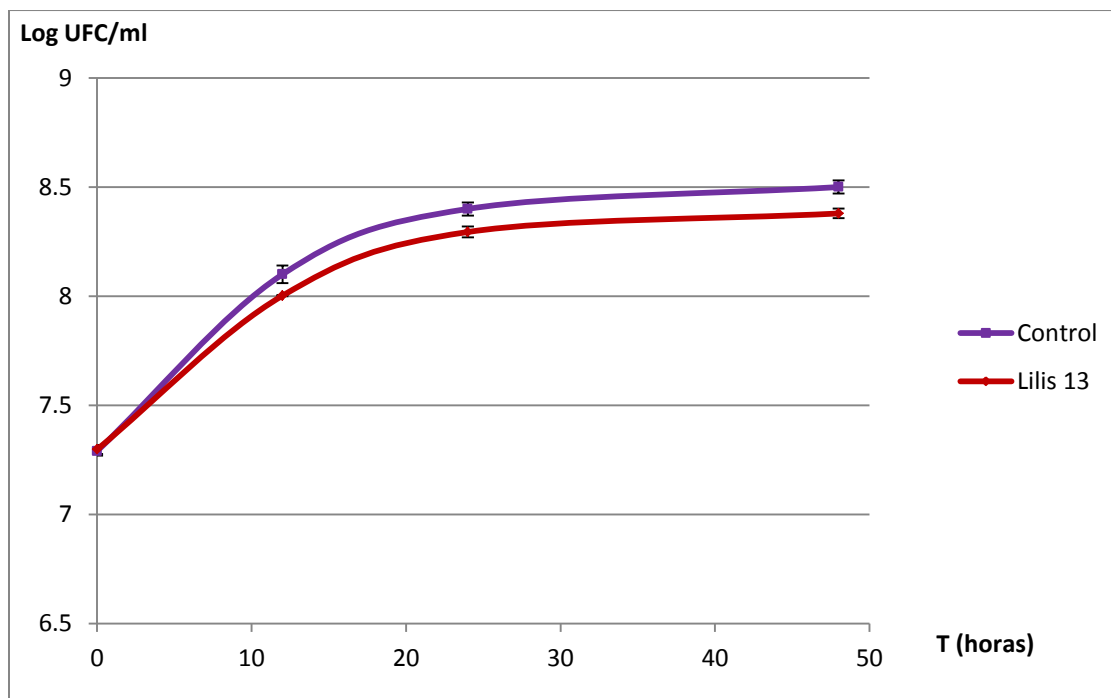
**Figura 17. Efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de *Weissella* tratados térmicamente en el crecimiento de *Lactococcus lactis*.** Las muestras fueron incubadas a 30°C durante un periodo de 48 horas, en el cual se tomaron alícuotas a diferentes tiempos tal y como se describe en la sección 6.5.1.

Como se observa en la figura 17, el desarrollo del control se da sin ningún problema hasta las 24 horas de incubación, tiempo en el que alcanza la fase estacionaria con una concentración de 8.64UFC/ml. Sin embargo el comportamiento de esta bacteria frente a los

sobrenadantes no varía mucho, ya que al igual que el control todas entran a la fase estacionaria a las 24 horas de incubación no obstante si se presenta un efecto en el desarrollo de la bacteria ya que presentan en todo momento concentraciones por debajo del control, aunque el sobrenadante 3a es el que presenta un menor efecto sobre el desarrollo de la bacteria, ya que el mayor número de UFC/ml es de 8.34, superior al 8.28 del sobrenadante tratado térmicamente marcado como Lilis 42, estas concentraciones se dan a las 24 horas de incubación. El sobrenadante marcado como Lilis 13 es el que ejerce un mayor efecto en el desarrollo de la bacteria, ya que éste llega a un máximo de 7.91 UFC/ml después de 48 horas de incubación, si bien este sobrenadante no ejerce un efecto bactericida si se aprecia que durante las primeras 24 horas de incubación en especial antes de las 12 horas de incubación, el desarrollo de la bacteria es menor en comparación con el control.

### 6.6.3. *Enterococcus italicus*

Esta bacteria mostró cierta sensibilidad a los diversos sobrenadantes estudiados, pero esta no disminuyó después del tratamiento térmico, si bien el diámetro de inhibición dio valores más pequeños en comparación con otras bacterias.

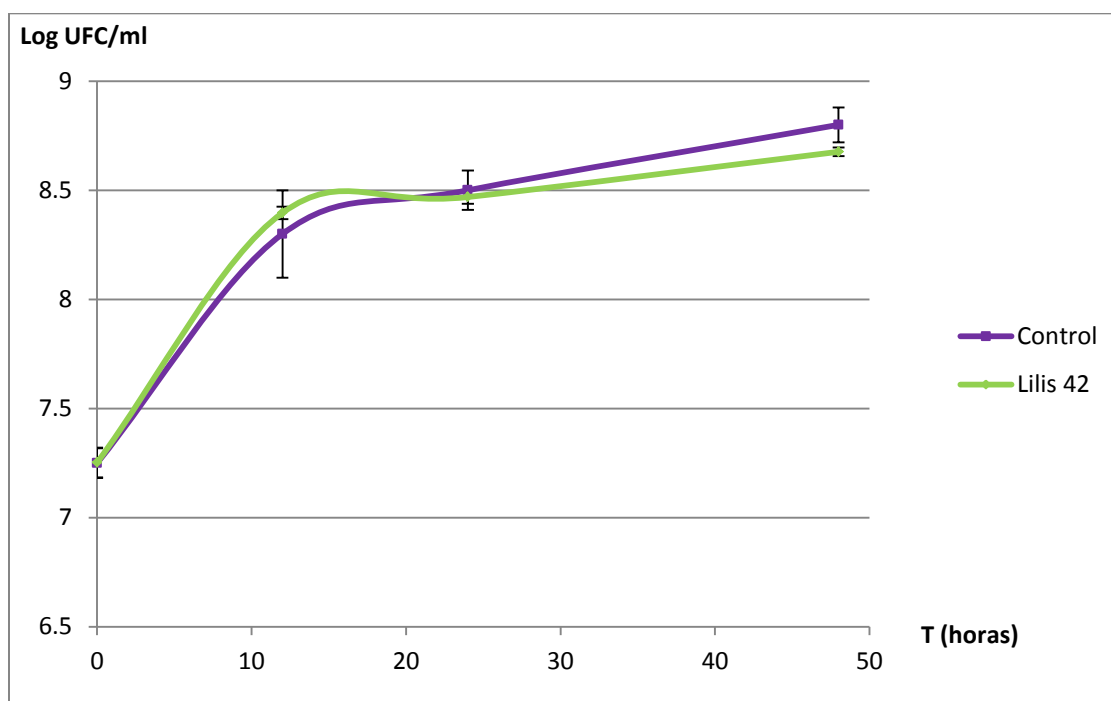


**Figura 18** Efecto de los sobrenadantes de *Weissella* tratados térmicamente en el crecimiento de *Enterococcus italicus*. Las muestras fueron incubadas a 30°C durante un periodo de 48 horas, en el cual se tomaron alícuotas a diferentes tiempos tal y como se describe en la sección 6.5.1

En la figura 18 se puede ver que el control llega a la fase estacionaria después de las 24 horas de incubación alcanzando un valor de 8.4UFC/, el efecto del sobrenadante marcado como Lilis 13 sobre el crecimiento de *Enterococcus italicus* es casi nulo ya que el desarrollo de la cepa sensible es prácticamente igual al control.

#### 6.6.4. *Lactobacillus plantarum*

Para esta bacteria el número de sobrenadantes que ejercieron un efecto en el desarrollo disminuyó después del tratamiento térmico, ya que solo la mitad de los sobrenadantes conservaron su actividad, en cuanto a halos de inhibición los valores no disminuyeron tan drásticamente como en otras bacterias, ya que incluso el sobrenadante marcado como Lilis 42 no disminuyó su halo.



**Figura 19 Efecto de los sobrenadantes de *Weissella* en el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*.** Las muestras fueron incubadas a 30°C durante un periodo de 48 horas, el control es la bacteria sin ningún agente que pueda afectar su crecimiento y las mismas condiciones de tiempo y temperatura que las bacterias indicadoras.

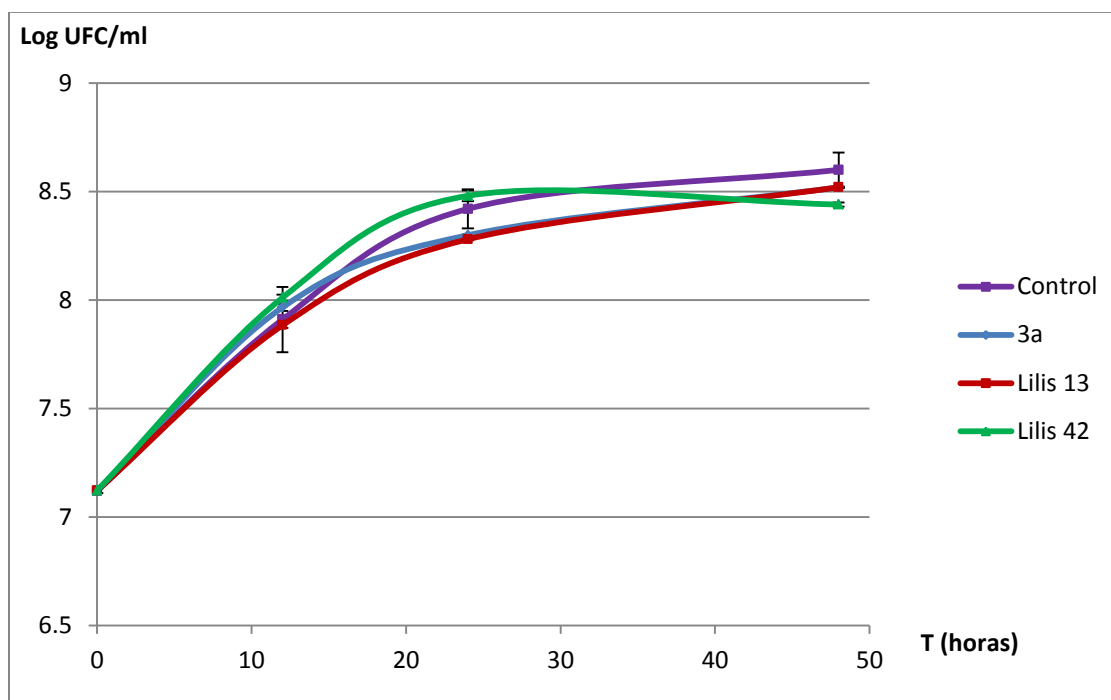
A diferencia de otras bacterias podemos ver que el control de *Lactobacillus plantarum* alcanza la fase estacionaria de su crecimiento a las 12 horas de incubación con un valor de 8.3 UFC/ml. También se puede visualizar que el efecto del sobrenadante (SAWCNTT



obtenido a partir de la cepa Lilis 42) es prácticamente nulo, ya que presenta valores idénticos a los del control, a excepción de las 48 horas donde posee un valor de 8.66UFC/ml frente a un 8.8UFC/ml del control, lo cual se debe a que este compuesto no ejerce un efecto sobre esta bacteria, ya sea por el tratamiento térmico o bien la concentración de las células sea muy elevada y la concentración de compuesto muy baja para ejercer un efecto en la bacteria indicadora.

#### 6.6.5. *Streptococcus infantarius*

Tal como se mostró previamente, *Streptococcus infantarius* fue la bacteria que presentó mayor sensibilidad a los sobrenadantes ya que fue inhibida por los sobrenadantes de 7 de las cepas productoras generando halos de inhibición, sin embargo después de que los sobrenadantes se expusieron a altas temperaturas, solo 4 conservaron dicha actividad, disminuyendo drásticamente el efecto.



**Figura 20 Efecto de los sobrenadantes de *Weissella* en el crecimiento de *Streptococcus infantarius*.** Las muestras fueron incubadas a 30°C durante un periodo de 48 horas, en el cual se tomaron alícuotas a diferentes tiempos tal y como se describe en la sección 6.5.1

En la figura 20 se observa el desarrollo de *Streptococcus infantarius* frente a los SAWCNTT obtenidos de las cepas 3a, Lilis 13 y 42; donde se observa que el sobrenadante

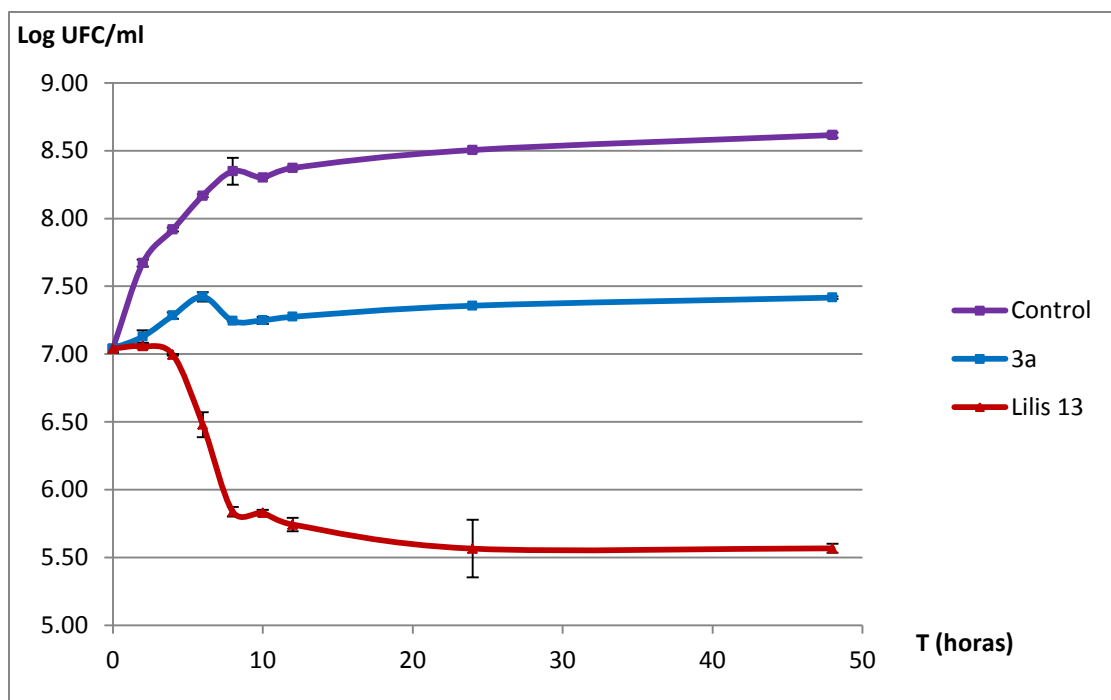
Lilis 13 siempre se encuentra por debajo de la cuenta del control, sin embargo la 3a durante las primeras 12 horas se encuentra por encima de la cuenta del control y después de este periodo la pendiente disminuye y la cuenta se encuentra por debajo del control. Por su parte el sobrenadante Lilis 42 durante las primeras 24 horas de incubación se encuentra por encima de la cuenta del control, pero después de este periodo la pendiente disminuye y está por debajo de la cuenta del control.

Todos los sobrenadantes ejercieron un efecto sobre el crecimiento de la cepa indicadora, sin embargo la sensibilidad de la cepa indicadora no fue la misma frente a los SAWCNTT siendo más alta (sensibilidad) frente al sobrenadante Lilis 13 y más baja frente a Lilis 42 y esto puede deberse al hecho de que el pH es un factor importante en la actividad de algunos compuestos antimicrobianos (bacteriocinas) (Bierbaum & Sahl, 2009) y al paso del tiempo, la cepa indicadora (BAL aislada del pozol) empezó a producir ácido láctico, lo que pudo aumentar la actividad de los compuestos en los sobrenadantes por lo que estos fueron más efectivos frente a la bacteria indicadora.

#### **6.6.6. Cinética y crecimiento de las bacterias ácido lácticas aisladas del pozol en un medios de SAWCNTT**

Después de observar los resultados obtenidos en las diversas combinaciones SAWCNTT y bacterias sensibles, podemos visualizar que no todos ejercen un efecto marcado sobre las bacterias sensibles, sin embargo existen combinaciones en las que se observó un efecto bacteriostático (como en algunas combinaciones con *Lactococcus lactis*), o bien un efecto bactericida como el que ejerció el SAWCNTT obtenido a partir de la cepa Lilis 13 sobre *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Para poder analizar mejor como los SAWCNTT afectan el crecimiento de estas bacterias sensibles es necesario observar cómo se desarrollan en intervalos de tiempo más cortos, los cuales fueron entre las 0 y 12 horas de crecimiento bacteriano con un intervalo de 2 horas para la toma de muestra en este periodo.

### 6.6.6.1. *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

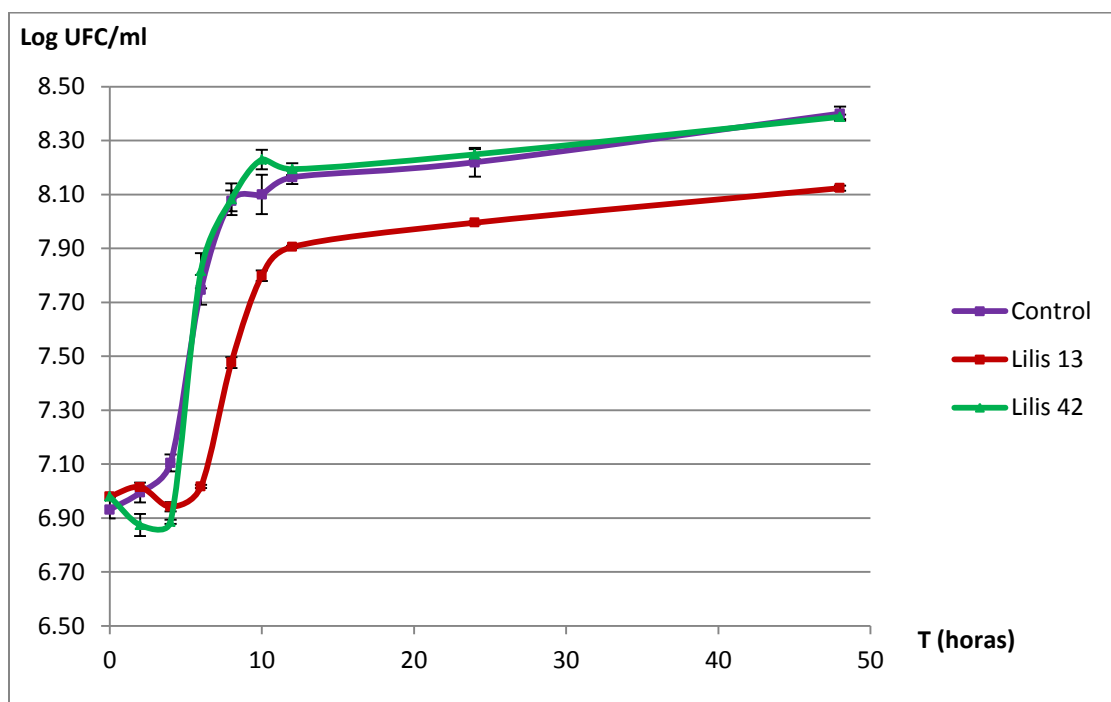


**Figura 21** Efecto de los sobrenadantes de *Weissella* en el crecimiento de *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Las muestras fueron incubadas a 30°C durante un periodo de 48 horas, en el cual se tomaron alícuotas a diferentes tiempos tal y como se describe en la sección 6.5.1

En la Figura 21 podemos visualizar con mayor detalle el mismo efecto que se vio en la figura 4. Pero ahora se observa que efectivamente el efecto que ejerció el SAWCNTT sobre la cepa control (*Leuconostoc pseudomesenteroides*) es bacteriostático, ya que no disminuyó el número de UFC/ml sino que solo lo mantuvo a un valor casi constante con respecto al control, el cual se observa que su desarrollo fue muy por encima de ambos SAWCNTT. Durante las primeras 6 horas de incubación podemos observar que el crecimiento de la cepa sensible fue más pronunciado pero a partir de este tiempo se observa que el número de UFC/ml disminuye de 7.42 a 7.24 UFC/ml y posteriormente vuelve a aumentar. Este evento puede deberse al hecho de que algunas de estas moléculas (bacteriocinas) están relacionadas con su carga neta: la primera es que muchas de estas bacteriocinas tienen mayor actividad antibacteriana a un pH menor a 5.0, y la segunda es que su adsorción en la superficie celular de las bacterias sensibles es pH dependiente, con una máxima adsorción a pH de 6.0 o mayor, y con muy pequeña adsorción a un pH cercano a 2.0 (Chen y Hoover, 2003) por lo cual, al haber pasado mayor tiempo de incubación la bacteria sensible al ser ácido láctica, produjo ácido láctico lo cual disminuyó el pH y esto potencializó el efecto

sobre la bacteria sensible. Mientras que el efecto del SAWCNTT sobre la bacteria sensible fue considerable, ya que prácticamente descendió 1.5 ciclos logarítmicos de UFC/ml, siendo que por cada ciclo logarítmico mueren el 90% de la población. A diferencia del SAWCNTT marcado como 3, el efecto del SAWCNTT Lilis 13 fue mayor a las primeras 12 horas de incubación dicho efecto también podría ser explicado por el pH del medio ya que este se encuentra a 7 al inicio, es posible que en este caso las bacteriocinas producidas por la cepa Lilis 13 actúen mejor a pH cercanos a 7 de ahí que su efecto fuese tan marcado en las primeras horas de crecimiento bacteriano.

#### 6.6.6.2. *Lactococcus lactis*



**Figura 22** Efecto de los sobrenadantes de *Weissella* en el crecimiento de *Lactococcus lactis*. Las muestras fueron incubadas a 30°C durante un periodo de 48 horas, en el cual se tomaron alícuotas a diferentes tiempos tal y como se describe en la sección 6.5.1

En la figura 22 podemos ver que el efecto del SAWCNTT producida por Lilis 42 sobre la bacteria sensible (*Lactococcus lactis*) prácticamente no existió, a diferencia de la figura 5 donde se observa que esta casi 1 ciclo logarítmico por debajo del control, aspecto que en este caso no se observó ni en el SAWCNTT obtenido a partir de la cepa marcada como Lilis 13, quien por su parte estaba prácticamente por debajo de 1 ciclo logarítmico del control. Dicho efecto pudo deberse a una posible pérdida en la actividad de la bacteriocina

durante su conservación, ya que de acuerdo con lo reportado por Hernández (2002), quien caracterizó la estabilidad de la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133 en diferentes condiciones de almacenamiento (congelación, refrigeración y temperatura ambiente a pH 6), la bacteriocina mantuvo el 100% de su actividad durante 15 semanas a -20°C, perdió su actividad hasta en un 50% durante 27 semanas de almacenamiento a 4°C y finalmente a temperatura ambiente perdió totalmente su actividad en la primera semana de almacenamiento. No obstante y de acuerdo a la sección 6.2.4 de la metodología, los SAWCNTT fueron guardados a -4°C lo que implicaría que su tiempo de actividad fuera mayor, pero al ser una bacteriocina diferente a la evaluada por Hernández y el volumen almacenado fue muy grande no podemos pensar que el periodo de actividad sea el mismo o bien se comporten igual, por lo que tampoco podemos afirmar la posibilidad de que esta haya perdido su actividad por estas cuestiones.

**Tabla 19** Resumen del efecto de los sobrenadantes de *Weissella* a determinados tiempos clave.

Cepa	Bacteriocina	Tiempo vs Log UFC/ml			
		0 horas	12 horas	24 horas	48 horas
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	3a	7.04	7.28	7.36	7.42
	Lilis 13	7.04	5.74	5.57	5.57
	Control	7.04	8.37	8.51	8.62
<i>Lactococcus lactis</i>	Lilis 13	6.98	7.91	8.00	8.12
	Lilis 42	6.98	8.19	8.25	8.39
	Control	6.98	8.16	8.22	8.40

## 7. Conclusiones

- Se realizó un procedimiento con el fin de obtener, neutralizar, concentrar y cuantificar los compuestos extracelulares presentes en los cultivos de las 17 cepas de *Weissella*.
- Solo los sobrenadantes concentrados y neutralizados obtenidos a partir de las cepas 3, 6, Lilis 19, Lilis 20, Snc 40, Snc 45, Snc 5, Lilis 7, Lilis 10 y Lilis 13 presentaron actividad biológica sobre las bacterias sensibles patógenas y de descomposición (*Enterobacter cloacae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*).
- Los obtenidos a partir de las cepas 3, 6, Lilis 17, Lilis 19, Lilis 20, Snc 40, Snc 45, Snc 5, Lilis 7, Lilis 10, Lilis 13, Lilis 22, Lilis 24 y Lilis 42 mostraron actividad biológica sobre las bacterias ácido lácticas sensibles (*Streptococcus infantarius*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *Enterococcus italicus* y *Lactobacillus plantarum*).
- Los sobrenadantes concentrados y neutralizados obtenidos a partir de las cepas Lilis 9, Lilis 43 y 3JAB no desarrollaron efecto alguno en las bacterias sensibles (patógenas, de descomposición y ácido lácticas).
- Solo los sobrenadantes concentrados, neutralizados y tratados térmicamente obtenidos a partir de las cepas 6, Lilis 20, Lilis 7, Lilis 10 y Lilis 13 conservaron su actividad frente a las bacterias sensibles (patógenas y de descomposición), entretanto los sobrenadantes obtenidos de las cepas 3, 6, Lilis 20, Lilis 7, Lilis 10, Lilis 13 y Lilis 42 conservaron esta actividad frente a las bacterias ácido lácticas sensibles. Sin embargo disminuye el halo de inhibición respecto a los sobrenadantes que no tenían tratamiento térmico.
- Todos los sobrenadantes, tanto los que fueron tratados térmicamente como los que no lo fueron, solo ejercieron efecto bacteriostático sobre las bacterias sensibles (patógenas, de descomposición y ácido lácticas), a excepción de la combinación del sobrenadante obtenido de la cepa Lilis 13 y la bacteria sensible *Leuconostoc pseudomesenteroides* que mostro un efecto bactericida.

- Las pruebas de reto realizadas con los sobrenadantes obtenidos de las cepas de *Weissella* y las bacterias ácido lácticas predominantes en la fermentación del pozol, confirman la presencia de interacciones negativas entre ellas.
- Se reveló que las bacterias ácido lácticas del genero *Weissella* son capaces de producir compuestos proteicos similares a las bacteriocinas, mismos que afectan el desarrollo de las bacterias sensibles (bacterias ácido lácticas, patógenas y de descomposición) ejerciendo un efecto bactericida o bacteriostático.

## 8. Perspectivas

- Realizar estudios en los cuales se varíe la concentración de los extractos proteicos, tanto los que fueron tratados térmicamente como los que no, para evaluar si este factor afecta la actividad biológica de los extractos frente a las cepas sensibles.
- Evaluar la actividad biológica de los extractos con un agente quelante (EDTA) y determinar si esta combinación puede aumentar el espectro de inhibición de los extractos.
- Realizar un ensayo en el cual se varíe el pH de los extractos y determinar si esto que efecto tiene en la actividad biológica de los extractos, TAL COMO SE HA REPORTADO EN LA LITERATURA.



## **9. Anexos**

### **9.1. ANEXO I: REACTIVOS**

#### **I.a. Hidróxido de sodio (NaOH) 1M**

Se prepararon 100 ml de solución. Se pesaron 4g de lentejas de hidróxido de sodio, grado analítico de la marca Mallinckrodt AR®, posteriormente se colocaron en un matraz aforado de 100ml, así mismo, se añadió agua destilada hasta la marca del aforo y finalmente se agito vigorosamente hasta homogenizar la solución. Se almaceno en un frasco y se etiqueto.

#### **I.b. Solución salina 0.8% (utilizada para realizar las diluciones)**

Se pesaron 0.80g de cloruro de sodio marca J.T. Barker®, después se transfirió a un matraz aforado de 100ml, posteriormente se adiciono agua destilada hasta la marca del aforo, seguido de una agitación vigorosa hasta homogenizar la solución. Posteriormente se transfirieron 4.5ml de la solución a viales, para esterilizarlos a 121°C y 1atm de presión por 15 minutos y finalmente los viales fueron almacenados a temperatura ambiente en un contenedor de plástico.

### **9.2. ANEXO II: MEDIOS DE CULTIVO.**

#### **II.a. Infusión cerebro corazón (Brain-heart infusion BHI) BBL®**

Medio empleado para el crecimiento de las bacterias sensibles (patógenas y de descomposición).

Se suspendieron 37g de polvo en un litro de agua destilada, agitando durante un minuto en caliente, una vez homogenizada la solución se esterilizo en autoclave a 121°C y 1atm de presión durante 15 minutos. Finalmente el medio se sometió a prueba de esterilidad a 30°C por 24 horas antes de utilizarlo.

#### **II.b. Caldo de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) Difco®**

Medio empleado para el crecimiento de bacterias ácido lácticas.

Se suspendieron 55g del polvo en un litro de agua destilada, enseguida se procedió a agitar durante un minuto en caliente, ya que la solución era homogénea se procedió a esterilizar

en autoclave a 121°C y 1atm de presión durante 15 minutos. Finalmente el medio se sometió a prueba de esterilidad a 30°C por 24 horas antes de utilizarlo.

#### II.c. Medio (BHI y MRS) con 20% de glicerol (v/v)

Medio empleado para conservar las bacterias ácido lácticas, patógenas y de descomposición.

El medio se preparó de la misma forma que se especifica en la sección II.a y II.b dependiendo de la bacteria a conservar (MRS para bacterias ácido láctica y BHI para bacterias patógenas y de descomposición) solo que la proporción indicada de agua se cambió a 80% agua y 20% glicerol.

#### II.d. Agar bacto.

Agente solidificante con material extraño, partes pigmentadas y sales reducidas al mínimo. Para uso del laboratorio. Se utilizó en aquellos casos que se requirieran medios sólidos.

### **9.3. ANEXO III: CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD**

Para cuantificar la proteína presente en las muestras se utilizó el sistema BioRad

Kit Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent Bio-Rad®, es un sistema rápido de detección de proteína en soluciones líquidas. Mismo que parte de principio del método de Bradford cuenta con:

- Reactivo de colorante
- Albumina de suero bovino (BSA) estándar (2000µg/ml)



**Figura 23 Kit Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent Bio-Rad®**

Para realizar la cuantificación de la proteína en el medio es necesario preparar una curva patrón por lo que esta se realizó de la siguiente manera:

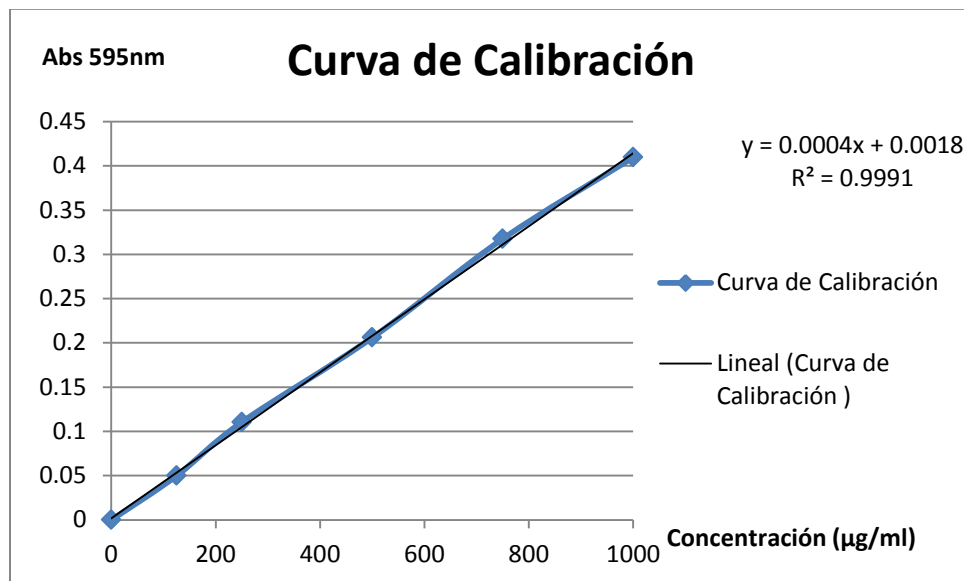
Se partió de un stock de albumina de suero bovino (BSA) Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent Bio-Rad® estándar de 2000µg/ml, de este se tomaron 0.25ml y se depositaron en un micro tubo de plástico estéril con 0.25ml de agua destilada estéril, así se obtuvo una solución con una concentración de 1000 µg/ml de BSA, posteriormente se realizaron las demás diluciones para preparar la curva patrón, como se observa en la tabla 19.

**Tabla 20 Preparación de la curva patrón de BSA a partir de una solución stock de 2000µg/ml.**

Tubo	Estándar (µg/ml)	Concentración (µg/ml)	V agua (ml)	V estándar (ml)	V total (ml)
	2000				
1		1000	0.25	0.25	0.5
2		750	0.125	0.375	0.5
3		500	0.17	0.33	0.5
4		250	0.25	0.25	0.5
5		125	0.25	0.25	0.5
6		0	0.5	0	0.5

A cada preparación de la curva patrón se añadieron 200µl de azul de Coomassie Bio Rad® y se procedió a mezclar mediante el uso de un vortex Bx Barnstead Thermolyne Maxi Mix II, una vez homogenizados se dejaron reposar durante 5 minutos, como especificaba el manual. Posteriormente la absorbancia de cada solución se midió a 595nm en un

espectrofotómetro Agilent 8453E y finalmente se registró dicha absorbancia. Todas las lecturas se realizaron por duplicado para obtener un promedio de las mismas y finalmente elaborar la gráfica de la curva patrón (figura 23).



**Figura 24 Curva patrón: Concentración de proteína en el estándar vs absorbancia. Mediante el método de Bradford.**

Para cuantificar la proteína presente en las diversas muestras evaluadas, se utilizó el protocolo descrito previamente y se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos en la ecuación de la recta (figura 22), en donde el valor de Y es el valor obtenido de la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro y X la concentración de proteína (µg/ml).

## 10. Bibliografía

Abee, T. (1995). Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organism. *FEMS Microbiology Letters*, Vol 129 pp. 1-10.

Ampe, F., Ben Omar. N., Moizan, C., Wachter C. y. Guyot, P. (1999). Polyphasic study of spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 65(9), pp. 5464-5473.

Axelsson, L. y Holck, A. (1998). The genes involved in the production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *Journal bacteriology*, Vol. 177 pp. 2125-2137.

Bannerman, T. L. (2003). *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. *In Manual of Clinical Microbiology*, pp. 384–404.

Barbuddhe S., Malik S. y Bhilegaonkar K. (1999). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by commercial nisin and lactic acid in raw buffalo meat mince. *Journal of Food Science and Technology*. Vol. 36 pp. 320 – 324.

Bierbaum, G. y Sahl, H. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology* Vol. 10 pp.2-18.

Björkroth, K., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel, W., Korkeala, H. y Vandamme, P. (2002). Taxonomic study of *Weissella confusa* and description *Weissella cibaria* sp., Nov detected in food and clinical samples. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, Vol. 52, pp. 141-148.

Blanco W., Arias M., Pérez C., Rodríguez C., Chavez C. (2009). Detección de *Bacillus cereus* toxigénicos en productos lácteos con especias y leches deshidratadas colectadas en Costa Rica. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. Vol. 59, pp. 402-406.

Bolaños S. (2004). Variabilidad en la microbiota de diferentes muestras del pozol, determinada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizantes (DGGE). Tesis para obtener el grado de maestrías en ciencias. Facultad de Química UNAM, pp. 15-24.

Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe R. y Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.38 pp. 2465-2467.

Brock, T.D., Madigan M.T., Martinko J.M. y Parker J. (2003). *Biología de los microorganismos*. Ed. Pearson, Prentice Hall. pp. 399, 738, 944, 948, 952-954.

Cabeza, E. (2006). Bacterias ácido lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. Departamento de microbiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona España. Consultado 01-12-2013. [http://www.academia.edu/992789/Bacterias\\_acido-lacticas\\_BAL\\_aplicaciones\\_como\\_cultivos\\_estarter\\_para\\_la\\_industria\\_lactea\\_y\\_carnica](http://www.academia.edu/992789/Bacterias_acido-lacticas_BAL_aplicaciones_como_cultivos_estarter_para_la_industria_lactea_y_carnica).

Camacho de la Rosa, N. A., Díaz Gutiérrez, K. M., Santillana Hinojosa, M. R. y Velázquez Madrazo, O. C. (2007). Nixtamalización” en *Manual de Practicas. Productos de cereales y leguminosas*. 4ª Ed. Comité editorial de la facultad de química. Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 95-97

Campbell-Platt, G. (1987). *Fermented foods of the world, a dictionary and guide*, London: Butterworths. pp. 108-115, 152-164

Cañas, A., Barzana, E., David, J. y Wachter-Rodarte, C. (1993). La elaboración del pozol en los altos de Chiapas”, *Ciencia* Vol. 44, pp. 219-229.

Candela, M., F. Perna, P. Carnevali, B. Vitali, R. Ciati, P. Gionchetti, F. Rizzello, M. Campieri y P. Brigidi. (2008). Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of Il-8 production. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 125 pp. 286–292.

Carr, F.J., Chill D. Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. Vol. 28 pp. 281-370.

Carrer, B., Gombossy, B. y Pereira, E. (2010). Dualistic aspects of *Enterococcus* spp. in foods. *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, pp. 1119-1125

Carvalho M., Steigerwalt A., Morey Shewmaker, R. Teixeira, P. Facklam R. (2004). Characterization of three new enterococcal species, *Enterococcus sp.* nov. CDC PNS-E1, *Enterococcus sp.* nov. CDC PNS-E2, and *Enterococcus sp.* nov. CDC PNS-E3, isolated from human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 42, pp. 1192–1198.

Chalón, M., Acuña, L., Moreno, R., Minahk, C., y Bellomio, A., (2011). Membrane-active bacteriocins to control *Salmonella* in foods are they the definite hurdle? *Food Research International*, Vol. 45(2), pp. 735–744.

Chatterjee C, Paul M, Xie L. y van der Donk W. (2005). Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Review*. Vol. 105, pp. 633 – 683.

Chavasirikinton, V., Vatanyoopaisarn, S. y Phalakornkule, C. (2007). Bacteriocin-like activity From *Weissella confusa* and *Pediococcus acidilactici* isolated from traditional Thai fermented sausages, *Journal of culture collection*, Vol. 5. pp. 64-72.

Chen, H. and Hoover, D. G., (2003). Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Institute of Food Technologist. Vol. 2, pp. 82-100.

Chenoweth, CE. *Enterococcus*. En: *APIC Text of infection control and epidemiology 2000*. Washington DC: APIC, pp. 941-947.

Chikindas M. L, García-Garcera M.J., Driessen A.J.M., Ledebøer M. A., Nissen-Meyer J., Nes I.F., Abee T., Konings W.N. y Venema G. (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 59 pp. 3577 – 3584.

Chen H. y Hoover D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 2 pp. 82 – 100.

Chikindas M. L, García-Garcera M.J., Driessen A.J.M., Ledebøer M. A., Nissen-Meyer J., Nes I.F., Abee T., Konings W.N. y Venema G. (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 59 pp. 3577 – 3584.

Cintas, L. M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I. F. y Hernández, P. E. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*. Vol. 74, pp. 281- 305.

Collins, D., Samelis, J., Metaxopoulos, J. y Wallbanks, S. (1993). Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology*. pp. 595-603.

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

Cruz, S. y Ulloa, M. (1993). Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y otros países latinoamericanos. *Revista de la Sociedad de Historia Natural*. Vol. 34, pp. 423-457.

Dalmasso, M., S. Prestoz, V. Rigobello, Demarigny, (2008). Behavior of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis* in a four *Lactococcus* strain starter during successive milk cultures. *Food Science and Technology International*. Vol. 14 pp. 469-477.

Datta, AR. (2003). "*Listeria monocytogenes*" en *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Editado y copilado por Miliotis, Marianne D. y Bier, Jeffery W. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos pp.116-132.

De Vuyst, L y Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification and food application. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. Vol. 13 pp. 194-199.

De Vuyst L. y Vandamme E. J. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. Blackie Academic and professional. London, England. pp. 143-151.

Dellaglio, F., Vescovo, M., Morelli, L. & Torriani, S. (1984). Lactic acid bacteria in ensiled high-moisture corn grain: physiological and genetic characterization. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 5, pp. 534-544.



Dellaglio, F. y Torriani, S. (1986). DNA–DNA homology, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria from maize silage. *Journal of Applied Bacteriology*. Vol. 60, pp. 83–93.

Diaz-Ruiz , G., Guyot, J.P., Ruiz-Terán F., Morlon, J., Wacher, C. (2003) Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69(9), pp. 4367-4374.

Dolz, M. 2000. Bacteriocinas de Probióticos. Nuevos enfoques bioterapéuticos. Centro de información de medicamento del colegio oficial de farmacéuticos de Zaragoza – España. 2p. Consultado el 12-12-2013. [http://www.nutricion.org/publicaciones/revistas/NUTRICION-28-3\\_20\\_37.pdf](http://www.nutricion.org/publicaciones/revistas/NUTRICION-28-3_20_37.pdf).

Eijsink, V.G.H., Brurberg, M.B., Middelhoven, P.H. y Nes, I.F. (1996). Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *Journal of Bacteriology*. Vol. 178, pp. 2232-2237.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto K. and Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity, *Federation of European Microbiological Societes (FEMS)*. Vol. 24, pp. 85-106.

Escamilla, M., y Escamilla, M. G. (2007). Los alimentos fermentados que comían nuestros abuelos. *En Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de la Ciencia*. Vol. 58, pp. 75-84.

Fernández, D. A. (2005). Producción inducible de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V e interleuquina-2 en cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina. Tesis para obtener el grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, pp.13-57.

Fortina, M.G., Ricci, G., Mora, D. y Manachini, P.L. (2004). Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol 54, pp. 1717–1721.

Gänzle M., Weber S. y Hammes W. (1999). Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 46, pp. 207 – 217.

Gervasio, E. (2012). Determinación de sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas identificadas como *Weissella* sp. Tesis de especialidad. UAM-I, División de ciencias biológicas y de la salud, pp.3-12.

Gilliland, S.E. (2000). The Streptococci: milk products en *Bacterial Starter Cultures for Foods*. CRC-Press, Florida, Estados Unidos pp. 5-8.

González Martínez B.E., Gómez Treviño M. y Jiménez Salas Z. (2003). Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*. Vol. 4(2).

Gordon, M. D. y O'Brien, L. C. (2006). Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 152, pp. 3239-3244.

Gotz, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*. Vol. 43, pp. 1367–1378.

Hammes WP & Vogel RF (1995) The genus *Lactobacillus*. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2. (Wood BJB & Holzapel WH, eds), pp. 19–54. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK

Hanes, D. (2003). “Nontyphoid Salmonella” en *international Handbook of Foodborne Pathogenes*. Editado y copilado por Miliotis, M.D. y Bier, J.W. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos pp. 146-158.

Herrera P, Min Kwon Y, Ricke SC. (2009). Ecology and pathogenicity of gastrointestinal *Streptococcus bovis*. *Anaerobe*, Vol. 15 pp. 44–54.

Herrera, T. (1993). Semblanza del estudio de las bebidas y los fermentados mexicanos. *Alimentos fermentados indígenas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 21-27.

Hikmate, A., Lucas, R. y Gálvez, A. (2008). La doble faceta del género *Enterococcus*, y su importancia en alimentos. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental. Vol. 21, pp. 65-84.

Holzappel, W. H. y Gerber, E. S. (1983). *Lactobacillus divergens* sp. nov., a new heterofermentative *Lactobacillus* species producing l(-)- lactate. Systematic and Applied Microbiology. Vol. 4, pp. 522-534.

Hu, L. y Kopecko, D.J. (2003). Typhoid Salmonella en International Handbook of Foodborne Pathogenes. Editado y copilado por Miliotis, M.D. y Bier, J.W. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos, pp. 159-173.

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

Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2006). The Enterobacteria, 2nd edn. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Jans C, Gerber A, Bugnard J, Njage PMK, Lacroix C, Meile L. (2012). Novel *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* variants harboring lactose metabolism genes homologous to *Streptococcus thermophilus*. Food Microbiology, Vol. 31 pp. 33-42.

Jaramillo, D. (2010). Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos y Bifidobacterias. Universidad de Los Andes, Facultad de Ingeniería, Bogotá D. C., Colombia, pp. 2-4.

Joerger, R. D. (2003). Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages, Poltry Science. Vol. 82, pp. 640-647.

Katikou P., Ambrosiadis, I., Georgantelis, D., Koidis, P., Georgakis, S. A. (2005). Effect of *Lactobacillus* protective cultures with bacteriocin like inhibitory substances producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum packaged sliced beef. Journal of Applied Microbiology. Vol. 99, pp. 1303-1313.

Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nau-*ta*, A., Kuipers, O. y Kok, J. (2003). Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69, pp. 1589-1597.

Klaenhammer, T. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 12, pp. 39-86.

Lam, J., R. Chan, K. Tam, 7 J. W. Costerton. (1980). Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infection and Immunity*. Vol. 28, pp. 546-556.

Larsen G., Vogensen F. y Josephsen J. (1993). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401. *Journal of Applied Bacteriology*. Vol. 75, pp. 113 – 122.

Lozano, T. (1997). “Mezcales pulques y chinguiritos”. En Long, J. (coord.) *Conquista y comida. Consecuencias del encuentro de dos mundos*. México: Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 421-435.

Leisner, J.J., B. Pot, H. Christensen, G. (1999). Identification of lactic acid bacteria from chilibo, a Malaysian food ingredient. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 65, pp. 599-605.

Lund, B., Baird-Parker, T. (2000). *The microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen: Springer.

Macwana, S. y Muriana, P. (2012). Spontaneous bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* as a susceptibility screen for identifying different mechanisms of resistance and modes of action by bacteriocins of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, Vol 88 pp. 7-13.

Milbourne, K., (1983). Thermal tolerance of *Lactobacillus viridescens* in ham. *Meat Science*. Vol. 9, pp. 113–119.

Monroy, MdC. Castro, T., Fernández, F. y Mayorga, L. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contactos* Vol. 73 pp. 63-72

Montville T.J. y Chen Y. (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 50 pp. 511 – 519.

Motta, S. A., y Brandelli, A. (2008). Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin like substance by *Bacillus* sp. Strain P34, *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 24, pp. 641-646.

Nam H. y Lee, Y. (2002). Effect of *Wiessella confusa* Strain PL9001 on the Adherence and Growth of *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 68(9), pp. 4642-4646.

Neidhardt FC. (1999). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular Biology. 2<sup>nd</sup> Edition. ASM Press, Washington. pp. 1310-1324.

Niven, C. F., Jr y Evans, J. B. (1957). *Lactobacillus viridescens* nov. spec., a heterofermentative species that produces a green discoloration of cured meat pigments. *Journal of Bacteriology*. Vol 73, pp. 758-759.

Ogunmodede, F., Jones, 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*, 13, pp. 11-15.

Padgett T, Han I. y Dawson P. (1998). Incorporation of Food-Grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *Journal of Food Protection*. Vol. 61 pp. 1330 – 1335.

Papagianni, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides and antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances*. Vol. 21, pp. 465-499.

Papagianni, M., Papamichael, E. (2011). Purification, amino acid sequence and characterization of the class IIa bacteriocin weissellin A, produced by *Weissella paramesenteroides* DX. *Bioresource Technology*, Vol. 102, pp. 6730-6734.

Poyart C, Quesne G, Trieu-Cuot P. (2002). Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of ‘*Streptococcus infantarius* subsp. *coli*’ as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype 11.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 52, pp. 1247–1255.

Raad I, Alarahwan A., Rolston K. (1998). *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clinical Infectious Diseases*. pp. 1182–1187.

Ray B. y Bhunia A. (2008). Microorganisms used in food fermentation, Biochemistry of some beneficial traits, Food biopreservatives of microorganisms y Foodborne infections en *Fundamental Food microbiology* 4th edition, CRC Press, Estados Unidos, pp. 99-106, 107-112, 178-185 y 283-293.

Rodríguez, C. (2011). Estudio sobre interacciones negativas de bacterias lácticas del pozol. Tesis para obtener el título de Química de alimentos, Facultad de Química UNAM. pp. 9-13, 20-30

Soberón-Chávez. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and biotechnology*. Vol. 54, pp. 625-633.

Sablon E., Contreras B. y Vandamme E. (2000). Antimicrobial peptides of Lactic Acid Bacteria: Mode of Action, Genetic and Biosynthesis. In *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 25, pp. 125-136.

Schillinger U., Cheng H., Keppler K. y Holzapfel W. (1998). Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutant of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology*. 85 pp. 657 – 663.

Schlegel, L., Grimont, F., Collins, M., Regnault, B., Grimont, P. y Bouvet A. (2000). *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 50 pp, 1425–1434.

Schleifer, KH., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins MD. y Fischer, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 6, No. 2, pp. 183-95.

Schneider R., Fernández F.J., Aguilar M.B., Guerrero I., Alpuche A. y Ponce E. (2006). Partial characterization of a class II pediocin produced by *Pediococcus parvulus* 133 strain isolated from meat (Mexican “chorizo”). *Food Control*. Vol. 17(11), pp. 909-915.

Serna, L., Valencia, L., y Campos R. (2010). Kinetic of fermentation and antimicrobial activity of *Weissella confusa* against *Staphylococcus aureus* K and *Streptococcus agalactiae*. *Revista de la facultad de ingeniería de la Universidad de Antioquia*, No 55, pp.55-65.

Stiles, M.E. and W.H. Holzapfel, (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 36, pp. 1-29.

Steinkraus K H, (1996). *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. Marcel Decker Inc, New York. Capitulo 1 Indonesian Tempe and Related Fermentations, pp 16-48, 59-85

Svetoch, E. A., Eruslanov, B., Perelygin, V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, P. I., Borzenkov, V., Levchuk, N. V., P.Svetoch, O. E., Kovalev, Y. N., Stepanshin, Y. G., Siragusa, N. G., Bruce, R. S., Norman, J. S. (2008). Diverse Antimicrobial Killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 Bacteriocin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 56, pp. 1942-1948.

Tavera, F. (2010). Producción de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol para la inhibición de bacterias patógenas. Tesis para obtener el título de Químico de alimentos, Facultad de Química UNAM. pp. 3-7, 30-36

Ulloa, M., Herrera, T. y Lappe, P. (1987). Fermentaciones tradicionales indígenas de México. Serie de investigaciones sociales. Instituto Nacional Indigenista. 16, pp. 13-20.

Vadyvaloo, V. y Otto, M. (2005). Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. *The International Journal of Artificial Organs*. Vol. 28, pp. 1069–1078.

Van der Meer, J.R., Rollema, H.S., Siezen, R.J., Berrthuyzen, M.M., Kuipers, O.P. y de Vos, W.M. (1994). Influence of the aminoacid substitutions in the nisin leader peptide on

biosynthesis and secretion of nisin by *Lactococcus lactis*. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 269 pp. 3555-3562.

Vargas, L. (1999). Bebidas mexicanas. En Cuadernos de Nutrición. 22, pp. 117-124.

Vallejo, M. Olivera, N. Sequeiros, C. y Marguet, E. (2009). Actividad antilisteria de bacterias ácido láctica aisladas de peces marinos. Analecta veterinaria. Vol 29, No 2 pp. 19-23.

Vignolio, G., Suriani, F., Pesce, A. y Oliver, J., (1993). Antibacterial activity of *Lactobacillus* strain isolated from dry fermented sausages. Journal of Applied Bacteriology. Vol. 9, pp. 269-274.

Von Heijne, G. (1983). Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. European Journal of Biochemistry. Vol. 133, pp. 17-21.

Wacher, C. Cañas, A. Cook, P. E. Barzana E. y Owens J.D. (1993). Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. World Journal of microbiology and biotechnology. Vol. 9, pp. 269-274.

Wacher, C., Cañas, A. Barzana, E. Lappe, P. Ulloa, M. y Owens J.D. (2000). Microbiology of indian and mestizo pozol fermentation. Food Microbiology, Vol. 17 pp. 251-256.

Wullschleger S, Lacroix C, Bonfoh B, Sissoko-Thiam A, Hugenschmidt S, Romanens E, Baumgartner S, Traoré I, Yaffee M, Jans C, Meile L. (2013). Analysis of lactic acid bacteria communities and their seasonal variations in a spontaneously fermented dairy product (Malian fènè) by applying a cultivation/genotype-based binary model. International Dairy Journal. Vol. 29, pp. 28–35.

Yin L., Wu C. y Jiang S. (2003). Bacteriocins from *Pediococcus pentosaceus* L and S from pork meat. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 51, pp. 1071 – 1076.

Zapata, S., Muños, J., Ruis, O. y Gutiérrez, P. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina, Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Vol. 16, pp. 75-82.