



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE
STREPTOCOCCUS AISLADAS DEL POZOL Y SU EFECTO EN LA
INHIBICIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS PRESENTES EN
ALIMENTOS Y EN LA CAVIDAD ORAL”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ANDREA CELESTE LLANOS REYES



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Aurora Irma Ortegón Ávila
VOCAL: Gloria Díaz Ruiz
SECRETARIO: Francisco Ruiz Terán
1er. SUPLENTE: Ma. Del Carmen Wachter Rodarte
2° SUPLENTE: Norma Angélica Camacho de la Rosa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 324, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA: GLORIA DÍAZ RUIZ

SUPERVISOR TÉCNICO: MA. DEL CARMEN WACHER RODARTE

SUSTENTANTE: ANDREA CELESTE LLANOS REYES

AGRADECIMIENTOS

A LA DRA. GLORIA DÍAZ RUIZ Y A LA DRA. MA. DEL CARMEN WACHER RODARTE POR PERMITIR INTEGRARME A SU GRUPO DE TRABAJO; DONDE HE PODIDO CRECER EN DISTINTOS ÁMBITOS, ADEMÁS DE PROPORCIONARME SU APOYO, PACIENCIA Y MÚLTIPLES ENSEÑANZAS.

A TERESA FLORES, POR SU APOYO, CONSEJOS Y AYUDA EN TODO MOMENTO PARA REALIZAR ESTE PROYECTO.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO POR DARME EL ORGULLO Y HONOR DE PERTENECER A UNA DE LAS MEJORES UNIVERSIDADES DE IBEROAMÉRICA.

A LA BECA DE TITULACIÓN UNAM POR EL APOYO ECONÓMICO BRINDADO.

A CONACYT, POR SU APOYO PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO CB-131615. Y A DGAPA-UNAM, PROYECTO PAPIIT IN 218714.

TODO LO QUE OCURRE, OCURRE.

**TODO LO QUE, AL OCURRIR, ORIGINA OTRA COSA,
HACE QUE OCURRA ALGO MÁS.**

**TODO LO QUE, AL OCURRIR, VUELVE A ORIGINARSE,
OCURRE DE NUEVO.**

**AUNQUE TODO ELLO NO OCURRE NECESARIAMENTE
EN ORDEN CRONOLÓGICO.**

“FRACASAR NO ES UNA OPCIÓN.”

- ED HARRIS, APOLO 13-1995

**“ALLÍ ESTÁ TODO LO QUE NECESITAS, SOL Y LUNA Y ESTRELLAS, PUES LA LUZ QUE RECLAMAS HABITA EN
TU INTERIOR.”**

- HERMANN HESSE

“YO NO ESTUDIO PARA SABER MÁS, SI NO PARA IGNORAR MENOS.”

-SOR JUANA INÉS DE LA CRUZ

**“UNA VEZ QUE HAS PROBADO EL VUELO POR SIEMPRE CAMINARÁS LA TIERRA ALZANDO LA
MIRADA AL CIELO, PUESTO QUE HAS ESTADO AHÍ, Y ALLÁ SIEMPRE QUERRÁS VOLVER.”**

- LEONARDO DA VINCI

“HAY QUE INYECTARSE CADA DÍA DE FANTASÍA PARA NO MORIR DE REALIDAD.”

-RAY BRADBURY

“LOS ÁRBOLES ESPERAN: TÚ NO ESPERES, ESTE ES EL TIEMPO DE VIVIR, EL ÚNICO.”

- JAIME SABINES

“LA VIDA ES LINDA, LO MALO ES QUE MUCHOS CONFUNDEN LO LINDO CON FÁCIL.”

-MAFALDA

-ALICIA: ESTO ES IMPOSIBLE

-SOMBRERERO: SÓLO SI TÚ CREES QUE LO ES

-ALICIA EN EL PAÍS DE LAS MARAVILLAS, LEWIS CARROLL-1865

DEDICATORIAS

A MI FAMILIA, CUYO APOYO HA SERVIDO DE PILARES PARA SUPERAR DISTINTOS RETOS A LO QUE ME HE ENFRENTADO.

A MIS PADRES, MA DEL SOCORRO REYES Y CELESTINO LLANOS QUIENES A BASE DE ESFUERZOS Y SACRIFICIOS SIEMPRE ME HAN APOYADO EN TODO MOMENTO, GRACIAS POR LO QUE HEMOS LOGRADO JUNTOS.

A MI HERMANO DANIEL, AUNQUE SIEMPRE TENEMOS ALGUNA DIFERENCIA, SÉ QUE TU APOYO NUNCA ME FALTARÁ.

A MIS TÍAS LILIA Y MARÍA ISABEL, POR SU APOYO Y ESFUERZO QUE HAN PUESTO EN NOSOTROS DESDE PEQUEÑOS.

A MI TÍO GONZALO, GRACIAS POR CREER SIEMPRE EN MÍ.

A MI TÍO PANCHO, POR HABER DESPERTADO EN MÍ CON SUS PLÁTICAS E HISTORIAS LA CURIOSIDAD POR LA QUÍMICA.

A MIS ABUELITOS FELIX FRAGOSO Y ROBERTO REYES, NO TENGO PALABRAS PARA AGRADECER TODO LO QUE NOS DIERON, SÉ QUE DESDE DONDE ESTÁN NOS SIGUEN CUIDANDO.

A MIS PERROS, ODIE Y BORO, POR SER LOS GUARDIANES EN MIS NOCHES DE DESVELO

A RUBÉN, GRACIAS POR TODO TU APOYO Y COMPRESIÓN.

A TODOS MIS AMIGOS; PORQUE SIEMPRE ESTUVIERON AHÍ EN TODO MOMENTO, POR TODOS LOS MOMENTOS QUE PASAMOS JUNTOS GRACIAS TOTALES.

A MIS AMIGOS DEL LABORATORIO 324: MARISOL, BÁRBARA, LILA, CAROLINA, TERE, EMMANUEL, RICARDO Y ALEJANDRO; POR SUS CONSEJOS Y APOYO TODO ESTE TIEMPO, GRACIAS.

Índice

1. Introducción.....	17
2. Antecedentes.....	19
2.2 El Pozol.....	19
2.1.1 Elaboración del pozol.....	20
2.2 Microbiología del pozol.....	21
2.2 Bacterias ácido lácticas.....	23
2.2.1 Metabolismo.....	23
2.2.1.1 Fermentación homofermentativa.....	23
2.2.1.2 Fermentación heterofermentativa.....	24
2.2.3 Patógenos presentes en alimentos.....	28
2.2.3.1 <i>Escherichia coli</i>	28
2.2.3.2 <i>Bacillus cereus</i>	31
2.2.3.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
2.2.3.4 <i>Proteus mirabilis</i>	33
2.2.3.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	34
2.2.3.6 <i>Listeria monocytogenes</i>	35
2.2.4 Patógenos de Cavidad Oral.....	36
2.2.4.1 <i>Streptococcus oralis</i>	37
2.2.4.2 <i>Streptococcus sanguinis</i>	38
2.2.4.3 <i>Streptococcus mutans</i>	38
2.2 Bacteriocinas.....	41
2.2.1 Clasificación.....	42
2.2.2 Biosíntesis y modo de acción.....	46
2.2.2.1 Biosíntesis.....	47
2.2.2.2 Modo de acción.....	48
2.2.3 Determinación de la actividad antimicrobiana.....	50
2.2.4 Aplicación en alimentos.....	52
3. Justificación.....	54
4. Hipótesis.....	55
5. Objetivos.....	56

5.2	Objetivo general	56
5.2	Objetivos particulares	56
6.	Metodología	57
6.2	Inhibición de Bacterias patógenas presentes en alimentos y en cavidad oral.....	57
6.2.1	Reactivación de cepas.....	57
6.2.2	Efecto de los sobrenadantes concentrados, neutralizados y con tratamiento térmico (CNTT) de las cepas de <i>Streptococcus</i> aisladas del pozol sobre la viabilidad de patógenos presentes en alimentos y cavidad oral	58
6.2.2.1	Preparación de los sobrenadantes de las cepas de <i>Streptococcus</i>	58
6.1.2.1.1	Concentración de los sobrenadantes de las cepas de <i>Streptococcus</i>	59
6.2	Actividad antimicrobiana de las cepas de <i>Streptococcus</i> sobre la viabilidad de los patógenos presentes en alimentos y en cavidad oral.....	62
6.2.1	Método de Difusión en agar.....	62
6.2.2	Preparación de placa de medio BHI	62
6.2.3	Preparación de sobrecapa de medio BHI	62
6.2.4	Ensayo del método de difusión en agar	64
6.2.4.1	Prueba de difusión en agar con los sobrenadantes sin tratamiento, con tratamiento térmico, neutralización y concentrados	64
6.2.5	Pruebas enzimáticas (Proteasa de <i>Bacillus licheniformis</i>)	64
6.2.5.1	Prueba de difusión en agar con los sobrenadantes tratados enzimáticamente.....	65
6.2.6	Efecto de los SNTT sobre la viabilidad de <i>S. oralis</i>	67
6.2.6.1	Sobrevivencia de <i>S. oralis</i> en los sobrenadantes neutralizados y tratados térmicamente SNTT.....	67
6.2.6.2	Estandarización de las células viables de <i>S. oralis</i> a una cuenta de 10 ⁶ UFC/mL	67
7.	Resultados	70
7.2	Inhibición de bacterias patógenas presentes en alimentos y en cavidad oral.....	70
7.2.1	Reactivación de cepas.....	70
7.2.2	Pruebas de difusión en agar	70
7.2.2.1	Resultados prueba de difusión en agar con SNTT	75
7.2.2.2	Resultados prueba de difusión en agar con los Sobrenadantes neutralizados, tratados térmicamente y concentrados (SNTTC)	77
7.2	Prueba de difusión en agar con los sobrenadantes tratados enzimáticamente	78
7.2	Efecto de los SNTT (Sobrenadante neutralizado y tratado térmicamente) sobre la viabilidad de <i>S. oralis</i>	84

8. Conclusiones	87
9. Perspectivas.....	89
10. Anexos	90
11. Bibliografía	95

Índice de Tablas

1. Introducción.....	17
2. Antecedentes.....	19
Tabla 2.1. Ejemplos de algunos microorganismos aislados del pozol.	22
Tabla 2.2. División de las especies de <i>Lactobacillus</i> en Grupos I, II y III.....	24
Tabla 2.3 Características de los grupos de <i>Escherichia coli</i> causantes de diarrea.....	30
Tabla 2.4. Factores que influyen en la distribución de la microbiota de la cavidad bucal	37
Tabla 2.5. Especies del género <i>Streptococcus</i> aisladas de humanos y presentes en la cavidad oral.	40
Tabla 2.6. Clasificación de las bacteriocinas según Klaenhammer.....	44
Tabla 6.1 Cepas de <i>Streptococcus</i> aisladas del pozol y utilizadas para las pruebas de actividad antimicrobiana.....	58
Tabla 6.2 Condiciones para patógenos presentes en alimentos y cavidad oral	60
7. Resultados.....	70
Tabla 7.1 Sobrenadantes sin tratamiento de cepas de <i>Streptococcus</i> aisladas del pozol que presentaron actividad antimicrobiana sobre <i>Streptococcus oralis</i>	72
Tabla 7.2. Actividad antimicrobiana de cepas de <i>Streptococcus</i> aisladas del pozol con tratamiento térmico y neutralización frente a <i>Streptococcus oralis</i>	75
Tabla 7.3 Resultados para la prueba de difusión en agar contra <i>Listeria monocytogenes</i> usando los sobrenadantes sometidos a los diferentes tratamientos.....	76
Tabla 7.4 Sobrenadantes de las BAL Concentrados y tratados térmicamente (CNTT) o Neutralizados y tratados térmicamente (NTT) utilizados para la prueba enzimática frente a <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Streptococcus oralis</i>	79
10. Anexos.....	90
Tabla 10.1 Composición del medio MRS (55 gramos por litro).....	92
Tabla 10.2 Formulación de medio tamponado y sobrecapa de BHI (1000 mL).....	93
Tabla 10.3 Composición del medio BHI (37 gramos por litro)	93
11. Bibliografía.....	95

Índice de Figuras

2. Antecedentes	19
Figura 1. Pozol	19
Figura 2. Diagrama de elaboración del pozol	20
Figura 3. Fermentación homoláctica	26
Figura 4. Fermentación heteroláctica	27
Figura 5. <i>E. coli</i>	29
Figura 6. <i>Bacillus cereus</i>	31
Figura 7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
Figura 8. <i>Proteus mirabilis</i>	33
Figura 9. <i>Staphylococcus aureus</i>	34
Figura 10. <i>Listeria monocytogenes</i>	35
Figura 11. <i>Streptococcus oralis</i>	37
Figura 12. <i>Streptococcus sanguinis</i>	38
Figura 13. <i>Streptococcus mutans</i>	39
Figura 14. Cadena de eventos que pueden llevar a infección por <i>S. mutans</i>	40
Figura 15. Clasificación de bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas.	43
Figura 16. Estructura de la Plantaricina A, bacteriocina de la clase IA producida por <i>Lactobacillus plantarum</i> C11. ..	44
Figura 17. Estructura de la nisina A, bacteriocina de la clase IA producida por <i>Lactococcus lactis</i> ATCC11454.....	45
Figura 18. Estructura de la Lactococcina G, bacteriocina de la clase IIb producida por <i>Lactococcus lactis</i> LMG2081. .	46
.....	48
Figura 19. Mecanismo de acción de bacteriocinas frente a bacterias Gram positivas (a) y frente a Gram negativas (b)	48
.....	48
Figura 20. Modo de acción de las bacteriocinas. (A) Bacteriocinas clase I; (B) Bacteriocinas clase II y (C) bacteriocinas clase III.	50
6. Metodología	57
Figura 21. Esquematización de la metodología empleada para la obtención de los sobrenadantes concentrados y sin concentrar para su posterior utilización.	61
Figura 22. Esquematización de la metodología empleada para realizar el ensayo de difusión en agar utilizando los sobrenadantes Neutralizados y tratados térmicamente (NTT) o Concentrados neutralizados y tratados térmicamente (CNTT), empleando las diferentes cepas de patógenos indicadoras.	63
Figura 23. Esquematización de la metodología empleada para realizar el ensayo enzimático sobre los sobrenadantes Neutralizados y tratados térmicamente (NTT) o Concentrados, neutralizados y tratados térmicamente (CNTT).	66
Figura 24. Esquematización de la metodología empleada para la obtención del sobrenadante tratado térmicamente y neutralizado (NTT) para posteriormente usarlo al estudiar la sobrevivencia de <i>S. oralis</i> en presencia de ellos.	69
7. Resultados	70
Figura 25. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes sin tratamiento de cepas de <i>Streptococcus</i> frente a <i>Streptococcus oralis</i> (prueba de difusión en agar)	73
Figura 26. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes sin tratamiento de cepas de <i>Streptococcus</i> frente a <i>Streptococcus oralis</i> (prueba de difusión en agar)	74
Figura 27. Actividad antimicrobiana del sobrenadante con tratamiento térmico y neutralización frente a <i>Streptococcus oralis</i>	77
Figura 28. Prueba de difusión en agar tratando al sobrenadante con una proteasa proveniente de <i>Bacillus licheniformis</i>	78
Figura 29. Prueba de difusión en agar tratando los sobrenadantes con una proteasa proveniente de <i>Bacillus licheniformis</i>	80

Figura 30. Prueba de difusión en agar tratando los sobrenadantes de cepas de BAL con una proteasa proveniente de *Bacillus licheniformis*..... 81

Figura 31. Prueba de difusión en agar tratando los sobrenadantes de cepas de BAL con una proteasa proveniente de *Bacillus licheniformis*..... 81

Figura 32. Prueba de difusión en agar tratando los sobrenadantes de cepas de BAL con una proteasa proveniente de *Bacillus licheniformis*..... 83

Figura 33. Supervivencia de *Streptococcus oralis* en presencia de los SNTT de la cepa A45226.....84

1. Introducción

La fermentación es un proceso ampliamente utilizado desde la antigüedad como una forma de conservar los alimentos y brindarles características sensoriales especiales. En Latinoamérica son muy consumidas las papillas o masas de cereales fermentados, mismos que se elaboran a partir de una fermentación natural, la cual es considerada como una buena forma de aumentar la calidad nutritiva y la seguridad de los alimentos.

Registros de diversos métodos de conservación datan de tiempos remotos como 6000 años a.C. y entre ellos destacan la utilización de procesos de fermentación. Entre los alimentos que se han conservado a través de los tiempos mediante estas técnicas destacan los lácteos, vegetales y productos cárnicos (Caplice y col. 1999, Ross y col. 2002).

El pozol es una bebida no alcohólica, que se obtiene de la fermentación espontánea de masa de maíz nixtamalizado. La microbiota es bastante compleja, desde diversos tipos de bacterias hasta mohos y levaduras. Las principales bacterias encontradas durante todo el proceso de fermentación son las bacterias lácticas, dentro de este grupo de bacterias predominan bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. En el pozol se han encontrado bacterias ácido lácticas amilolíticas, las cuales fueron identificadas por ribotipificación y análisis de secuencias de rRNA 16S, como: *Streptococcus bovis*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus* (Díaz-Ruiz *et al.* 2003).

Las sustancias antagónicas que las bacterias ácido lácticas producen para dominar en su hábitat son muy diversas, y entre ellas se incluyen los ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno, el diacetilo y las bacteriocinas (Savadogo *et al.* 2006), las cuales se definen como proteínas biológicamente activas contra bacterias Gram positivas, aunque se han encontrado algunas capaces de inhibir también bacterias Gram negativas.

La conservación de alimentos así como la prevención de enfermedades causadas por éstos es un tema que ha motivado la investigación científica. El empleo de aditivos de origen

natural es uno de los campos más ampliamente estudiados. Las bacteriocinas son compuestos de naturaleza peptídica sintetizadas ribosomalmente por diferentes bacterias y con propiedades antimicrobianas. Las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas son generalmente reconocidas como seguras y por lo tanto son de gran interés para su uso como aditivo en alimentos. En los últimos años se han descubierto y caracterizado nuevas bacteriocinas de bacterias ácido lácticas, que permiten aprovechar al máximo su potencial antimicrobiano (Lugo, 2013).

En un estudio previo (Morales-Rodríguez, 2015), se investigó la capacidad inhibitoria de la colección de cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol frente a *Listeria monocytogenes*, en el cual se observó que un alto número de cepas presentaron una actividad antimicrobiana frente a dicho microorganismo, probablemente debido a compuestos tipo bacteriocinas.

La inhibición de esta bacteria es de gran interés debido al estricto control que la industria alimentaria debe tener con ella, ya que es un microorganismo que afecta gravemente la salud y la economía mundial por su alta letalidad (OMS, 2004; WHO, 2005). Como esta no es la única bacteria que puede presentar efectos negativos en los alimentos y en la salud, este estudio se enfoca en la inhibición de cinco patógenos presentes en alimentos y en tres patógenos pertenecientes a la cavidad oral.

En el presente proyecto se realizan pruebas para conocer la capacidad antimicrobiana de las cepas de *Streptococcus* aisladas, de tal forma que se pueda saber que métodos específicos son los que favorecen la inocuidad de productos fermentados como el pozol, además de dar pauta a la posible aplicación tecnológica de estas sustancias antimicrobianas, especialmente las bacteriocinas, en la preservación de alimentos, por lo cual se pretende determinar si las cepas de *Streptococcus* son eficaces para el control de bacterias patógenas presentes en alimentos y en la cavidad oral, así mismo estudiar el efecto de los sobrenadantes sin tratamiento, neutralizados, con tratamiento térmico y concentrados de las cepas de *Streptococcus* y así finalmente realizar pruebas enzimáticas para comprobar la naturaleza proteica de las sustancias antimicrobianas presentes en los sobrenadantes.

2. Antecedentes

2.2 El Pozol

El pozol viene del vocablo náhuatl *pozolli*, que significa espumoso. Es un alimento fermentado tradicional del sureste de México, que se elabora a partir de masa de maíz nixtamalizado, a la que se le puede o no adicionar algún saborizante, ya sea sal, azúcar, miel, cacao o chile (Nuraida *et al.* 1995).

Es una bebida ácida, no alcohólica, consumida principalmente en los estados de Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo y Yucatán como parte de la dieta diaria entre los indígenas y mestizos de dichas regiones (Ampe *et al.*, 1999 Méndez-Albores *et al.* 2004), en donde, debido a la dificultad para almacenar productos alimenticios se han desarrollado procesos tradicionales en los que las fermentaciones espontáneas han sido la clave para conservar y consumir alimentos diariamente (Ben Omar *et al.* 2000).

La preparación del pozol comprende varias etapas, pero es la fermentación la más importante de todas ellas, debido a que ésta es la responsable de las características sensoriales del producto final, así como del valor nutricional del mismo y de su potencial para ser conservado por varios días (Figura 1).



Figura 1. Pozol. Tomado de www.nutricionsas.com

2.1.1 Elaboración del pozol

El pozol se elabora a partir de granos de maíz, de preferencia blanco, que se hierve en agua con cal (aprox. 1%-3% máximo de $\text{Ca}(\text{OH})_2$), durante 1h, o hasta que los granos se hinchan y los pericarpios se separan fácilmente. Posteriormente se enfría y se enjuagan con agua; a los granos resultantes se les llama nixtamal. El nixtamal se transfiere a un molino metálico del cual se obtiene una masa martajada a la que se le da forma de bola manualmente. Estas bolas se envuelven en hojas de plátano para evitar la desecación y se dejan fermentar a temperatura ambiente de 1 a 14 días, dependiendo de las preferencias del consumidor y de las circunstancias prevalecientes (Sainz y col., 2001).

Según el tipo de productor, la elaboración del pozol puede llevar o no una segunda cocción (Figura 2). El pozol indígena no comprende ésta última, mientras que el pozol mestizo sí. Esta segunda cocción consiste en cocer el nixtamal en agua durante 3-8 horas hasta que el grano de maíz “reviente”, con la finalidad de que el producto final adquiriera una textura más tersa (Cañas *et al.*, 1993). Finalmente se obtiene un producto con características sensoriales muy especiales, debido a los atributos que otorga el proceso de fermentación a los alimentos; asimismo, permite su conservación por varios días, así como un aumento en su valor nutritivo.

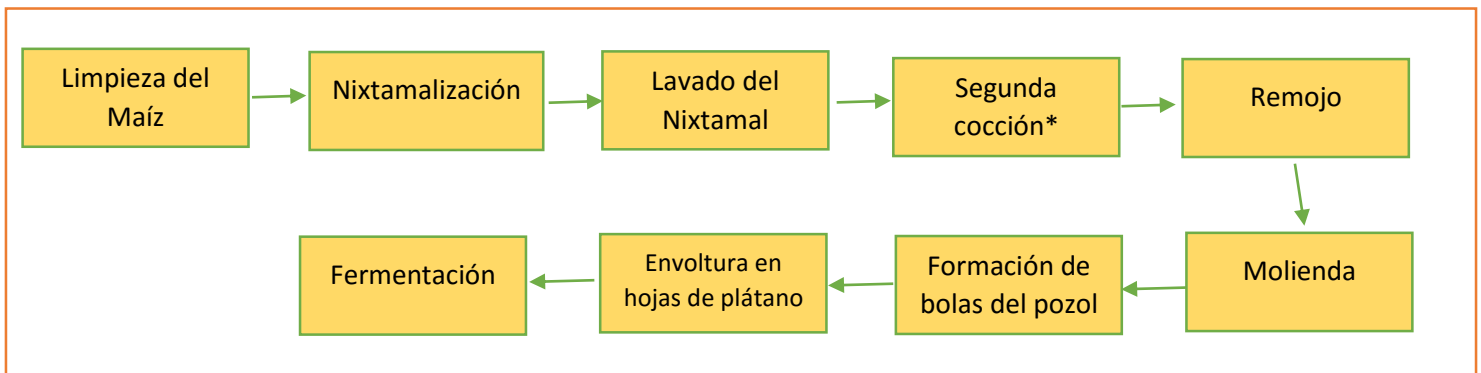


Figura 2. Diagrama de elaboración del pozol. *Solo la realizan los productores mestizos (Cañas *et al.*, 1993; Wachter *et al.* 1993).

El proceso de fermentación del pozol es llevado a cabo por una microbiota mixta que incluye bacterias lácticas, enterobacterias, levaduras, así como varios hongos filamentosos (mohos). Es común la presencia de enterobacterias al inicio de las fermentaciones en las que interviene una microbiota mixta, así como la transmisión de estos microorganismos por contaminación fecal directa o a través del agua utilizada. El pozol es un alimento muy

manipulado, sobre todo durante la molienda, el amasado y el moldeado. Procedimientos que se realizan en condiciones poco higiénicas, hecho que muestra porque es probable que se aíslen de la masa enterobacterias con propiedades patógenas (Wacher, 1993).

2.2 Microbiología del pozol

Es evidente que la carga microbiana inicial del pozol, así como el tipo de microorganismos, cambian a través el proceso de elaboración del mismo. Se ha visto que después de proceso de nixtamalización, la cantidad de microorganismos presentes es de menos de 1×10^1 UFC/mL para el caso de enterobacterias y bacterias ácido lácticas, mientras que para los mesófilos aerobios aumenta, siendo dicho aumento aún más considerable tras la molienda. Al finalizar el proceso, el pozol posee una variedad de microorganismos, entre los que se encuentran tanto mohos y levaduras, como mesófilos aerobios, enterobacterias y bacterias ácido lácticas, siendo éstas últimas las más abundantes (aproximadamente 2×10^9 UFC/mL) (Wacher *et al.* 1993; Nuraida *et al.* 1995). Además, se ha visto, que respecto a la población bacteriana, las bacterias lácticas tienen una participación importante (más del 70%) durante todo el proceso de fermentación (Ben Omar *et al.* 2000).

Se ha logrado establecer que la molienda del grano, una vez nixtamalizado, es la operación clave para que el pozol adquiriera el inóculo que lo llevará a tener una microbiota compleja al final del proceso. La cantidad de masa que se va acumulando tras cada lote en el molino es la responsable de dicho inóculo, ya que, además de que la masa permanece ahí todo un día, los microorganismos logran mantenerse en el molino los días subsecuentes por lo tanto existe una fuente de microorganismos para los nuevos granos de maíz nixtamalizados que entran para ser molidos (Wacher *et al.* 1993).

Como se mencionó con anterioridad, las bacterias ácido lácticas son el grupo microbiano dominante en el pozol durante todas las etapas de fermentación. En trabajos previos se han logrado encontrar bacterias ácido lácticas no amilolíticas: *Weissella confusa*, *Lactobacillus delbrueckii*, entre otras (Ben Omar *et al.* 2000), bacterias lácticas amilolíticas como *Streptococcus bovis*, *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus* (Díaz-Ruiz *et al.* 2003); así como de *Bacillus lentus*, *Bacillus cereus* y *Bacillus mycoides* como

bacterias no lácticas amilolíticas (Rivera, 2001). En este sentido, hay que resaltar que el maíz está compuesto principalmente por el almidón como fuente de carbono, mientras que los azúcares libres (sacarosa principalmente) se encuentran en una baja concentración (2g/100g de grano entero), lo que implica que se requiere de bacterias ácido lácticas amilolíticas en el pozol, que permitan la degradación de almidón, así como la fermentación láctica del mismo. Se ha reportado que el 40% de las bacterias ácido lácticas presentes en la masa inicial son amilolíticas, siendo predominantes las bacterias del género *Streptococcus* (Díaz-Ruiz *et al.* 2003). Asimismo, las bacterias ácido lácticas juegan un rol muy importante en la inhibición de microorganismos indeseables, como son las bacterias patógenas.

Dado que, como ya se ha dicho, el pozol se elabora a través de un proceso artesanal, es común y de cierta manera, esperado, que el producto final pueda verse contaminado con bacterias patógenas, como se ha corroborado con la presencia de diversos serogrupos de *Escherichia coli* enterohemorrágicos (Tabla 2.1) (Sainz *et al.* 2001).

Tabla 2.1. Ejemplos de algunos microorganismos aislados del pozol.

Bacterias ácido lácticas	Enterobacterias	Hongos y Levaduras
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Escherichia coli</i> O88:H25	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Streptococcus macedonicus</i>	<i>Escherichia coli</i> O22:H2	<i>Trichosporon cutaneum</i>
<i>Streptococcus infantarius</i>	<i>Escherichia coli</i> O30:H45	<i>Candida krusei</i>
<i>Streptococcus suis</i>	<i>Escherichia coli</i> OR:H45	<i>Hansenula fabiani</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Escherichia coli</i> O8:H7	<i>Candida guilliermondi</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Escherichia coli</i> O8:H8	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Escherichia coli</i> O92:H6	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Escherichia coli</i> O1:H6	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Escherichia coli</i> O18:H53	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Escherichia coli</i> H20:HNM	<i>Fusarium sp.</i>
<i>Lactococcus lactis</i>		<i>Penicillium</i>
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>		
<i>Lactobacillus alimentarius</i>		
<i>Weissella confusa</i>		

Tomada y modificada de Rodríguez (2011).

2.2 Bacterias ácido lácticas

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son clasificadas dentro del grupo de las mesofílicas (pero pueden crecer en rangos entre 4 y 45 °C) y crecen en un pH mayormente ácido (Caplice, 1994). La característica primordial de este grupo de bacterias es la producción de ácido láctico a partir del metabolismo de hexosas, obteniendo su energía por una fosforilación a nivel de sustrato al carecer de un ciclo de Krebs funcional, obteniendo así ácidos orgánicos, alcohol y dióxido de carbono a partir de carbohidratos. Dependiendo del tipo de metabolismo por el cual se obtiene el ácido láctico, estas pueden clasificarse en homofermentativas que solamente producen lactato como producto final de la vía Embden-Meyerhoff y heterofermentativas por producir lactato y etanol como productos finales mediante la vía de las Pentosas; siendo las primeras las de aplicación en la industria alimentaria. Como resultado de estas vías metabólicas, también se producen sustancias que le dan características deseables a los alimentos fermentados, tal es el caso del diacetilo, acetaldehído y algunos compuestos que pueden tener implicaciones positivas en la salud de los consumidores como algunas vitaminas, antioxidantes y péptidos bioactivos. También se les considera como bajamente proteolíticas aunque existen algunas excepciones (Caplice, 1999; Ross, 2002).

A lo largo de los últimos años, el uso de estos cultivos iniciadores y sus metabolitos ha sido reconocido como apto en los alimentos de consumo humano. La denominación GRAS (Generally Recognized As Safe) otorgada por la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos de Norteamérica es una característica importante que les permite ser una alternativa viable en la obtención de alimentos inocuos (Caplice, 1999).

2.2.1 Metabolismo

Como se dijo anteriormente, según los productos finales de la fermentación, las bacterias ácido lácticas pueden dividirse en homofermentativas y heterofermentativas.

2.2.1.1 Fermentación homofermentativa

Cuando la lisis de carbohidratos se lleva a cabo a través de la vía Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) para producir dos moléculas de lactato a partir de una molécula de glucosa, se denomina fermentación homofermentativa. Los géneros de bacterias que llevan a cabo este tipo de

fermentación son: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* así como el grupo I y II de *Lactobacillus* (Tabla 2.2) (Todar, 2011). Este género de bacterias posee la enzima fructosa-difosfato aldolasa, que es necesaria para hidrolizar hexosas y convertirlas en dos moléculas de tres carbonos cada una.

En la vía EMP, con una glucosa como sustrato, dos moléculas de ATP son utilizadas para convertir la glucosa a fructosa-1,6-difosfato. La hidrólisis de esta última, genera dos moléculas de tres carbonos, la cual sufre de una deshidrogenación para formar dos moléculas de NADH+. Posteriormente hay una fosforilación a nivel de sustrato para producir dos moléculas de ATP y fosfoenolpiruvato (PEP), el cual es convertido a piruvato y finalmente a lactato por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa. La reacción global comprende la producción de dos moléculas de lactato y dos de ATP a partir de una molécula de glucosa (Figura 3) (Ray y Bhunia, 2008).

Tabla 2.2. División de las especies de *Lactobacillus* en Grupos I, II y III

Características	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Tipo de Fermentación	Homofermentador obligado	Heterofermentador facultativo	Heterofermentador obligado
Productos Finales de fermentación	Lactato	Lactato y/o acetato, etanol, CO ₂ y formiato	Lactato, acetato, etanol y CO ₂
Especies representativas	<i>L. curvatus</i> <i>L. sake</i> <i>L. delbrueckii ssp. delbrueckii</i> , <i>bulgaricus</i> , <i>lactis</i>	<i>L. casei ssp. casei</i> , <i>ramnosus</i> <i>pseudoplantarum</i> <i>L. divergens</i> <i>L. kefir</i> <i>L. consuses</i> <i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>

Tomado y modificado de Ray y Bhunia (2008).

2.2.1.2. Fermentación heterofermentativa

Este tipo de fermentación, las hexosas son metabolizadas para producir una mezcla de ácido láctico, CO₂ y acetato o etanol. Los géneros reconocidos como heterofermentadores son *Leuconostoc*, el grupo III de *Lactobacillus* (Tabla 2.2), el género *Oenococcus* y *Weissella* (Todar, 2011). Estas bacterias no poseen la enzima fructosa-difosfato adolasa, requerida en la vía EMP

para formar las dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato; sin embargo, poseen a la glucosa-fosfato-deshidrogenasa y a la xilulosa- fosfocetolasa, que les permite metabolizar a las hexosas a través de la vía de las pentosas-fosfato para generar energía.

La vía de las pentosas-fosfato consta de una fase inicial oxidativa, seguida de una fase no oxidativa. En la primera fase, la glucosa es oxidada a 6-fosfogluconato por la glucosa-fosfato-deshidrogenasa, y luego descarboxilada para producir una molécula de CO₂, y una de ribulosa-5-fosfato. En la segunda fase (no oxidativa), este último compuesto es convertido a xilulosa-5-fosfato, mismo que, a través de una hidrólisis, produce una molécula de gliceraldehído-3-fosfato y una acetil-fosfato. El gliceraldehído-3-fosfato es subsecuentemente convertido en lactato, mientras que el acetil-fosfato puede ser oxidado para producir acetato, o reducido para generar etanol, dependiendo del potencial de óxido-reducción que se encuentre en el ambiente (Figura 4) (Ray y Bhunia, 2008).

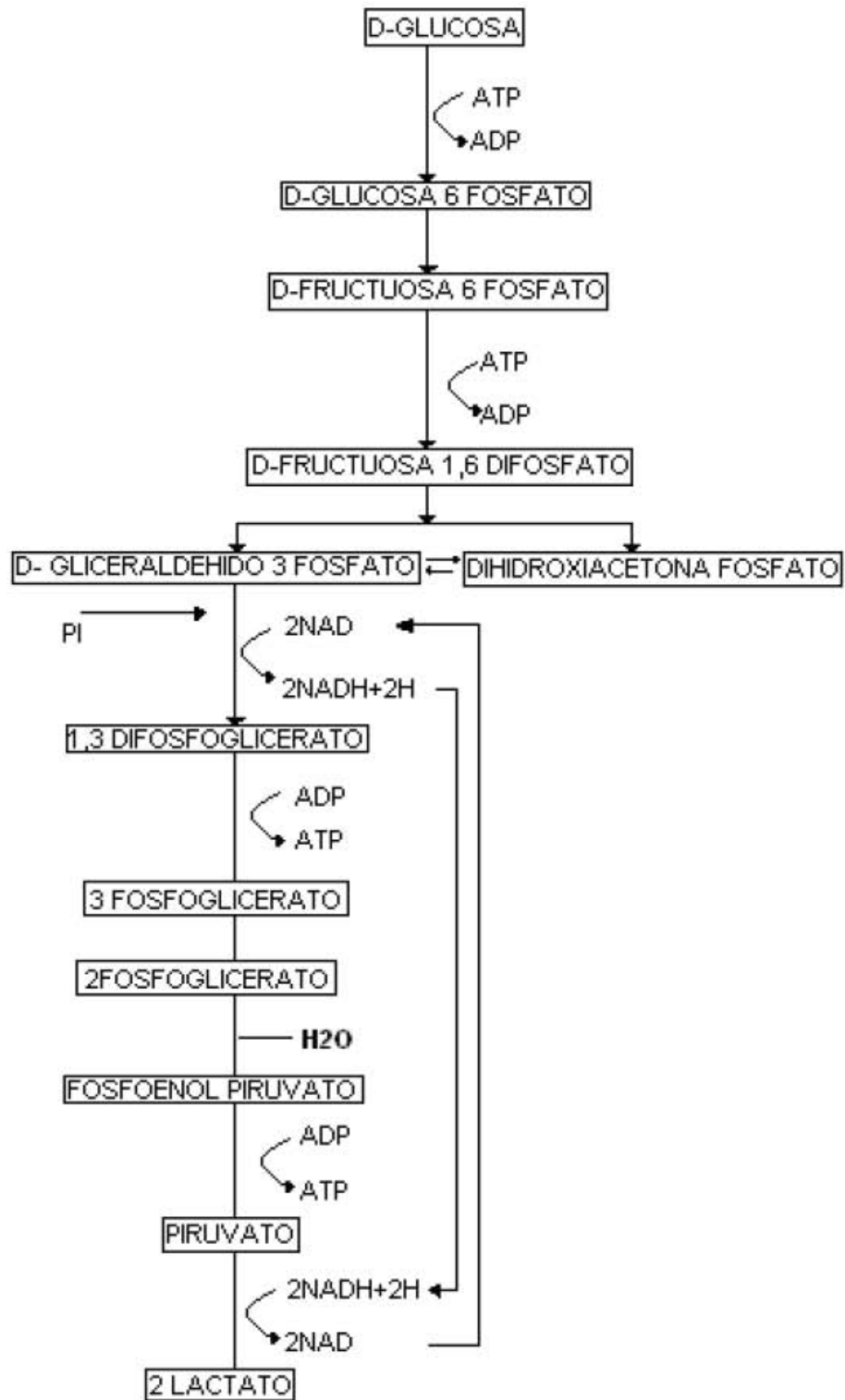


Figura 3. Fermentación homoláctica (Parra, 2012)

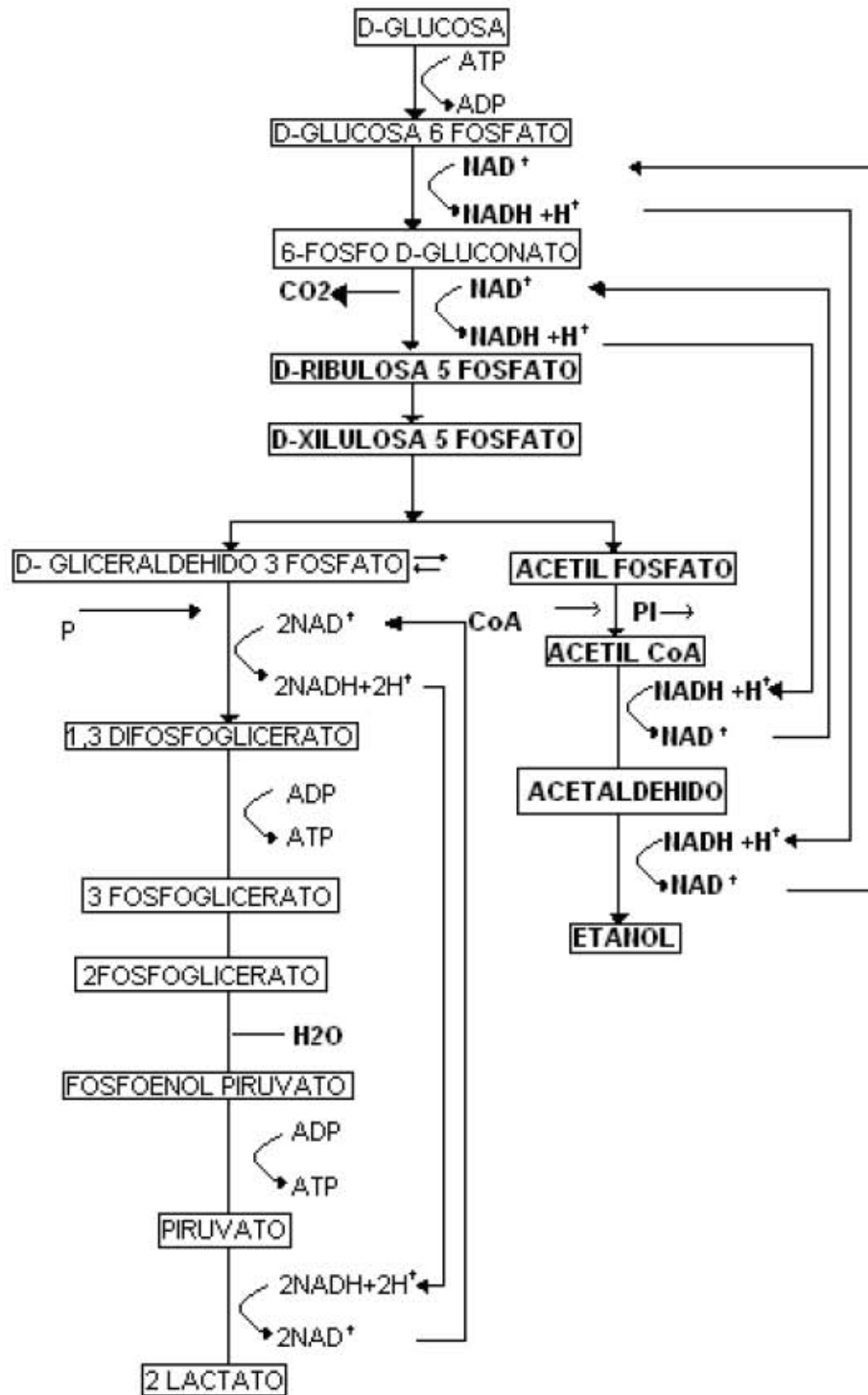


Figura 4. Fermentación heteroláctica (Parra, 2012)

2.2.3 Patógenos presentes en alimentos

Las bacterias patógenas son microorganismos que causan daño al hospedero. Mientras que la patogenicidad es una forma de versatilidad que posee un patógeno para causar daño en el hospedero, produciendo cambios fisiológicos y anatómicos (Brock, 2009).

Una de las características más significativas de los alimentos fermentados es que durante su proceso fermentativo se inhiben microorganismos indeseables, como son los patógenos, esta inhibición puede darse como consecuencia del crecimiento de las BAL que compiten por los nutrientes (consumidos preferentemente por quienes llevan a cabo la fermentación, al crecer en forma masiva) y a que sintetizan sustancias antimicrobianas, como ácidos orgánicos, bacteriocinas u otras sustancias inhibidoras (Wacher, 1993).

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

Una de las propiedades que tienen algunos patógenos presentes en el pozol y en otros alimentos, es la capacidad de sobrevivir en condiciones ácidas (Sainz *et al.* 2005). Esta resistencia a un bajo pH es importante para patógenos transmitidos por alimentos, ya que requieren sobrevivir el paso por el estómago, que se encuentra a valores de pH bajos (2-3). Entonces, al incrementar su resistencia al pH bajo podría aumentar su virulencia.

2.2.3.1 *Escherichia coli*

Este microorganismo es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, móvil por flagelos y no tiene la capacidad de formar esporas (Figura 5). Las cepas de *E. coli* llegan a causar dos síndromes generales: (i) infección en el tracto urinario, (ii) enfermedades entéricas y diarreicas (Miliotis y Bier, 2003).

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

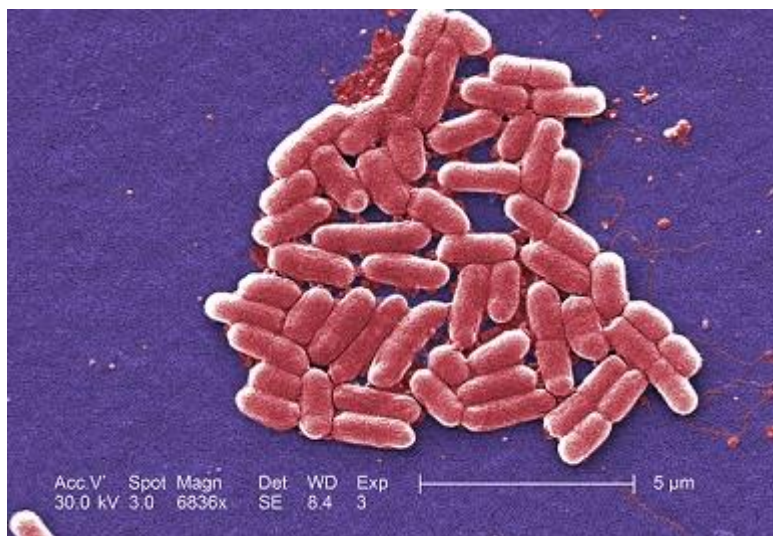


Figura 5. *E. coli*, tomado de www.extension.org

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

Como se mencionó existen diferentes cepas de *E. coli* patógena las cuales se dividen en 6 diferentes grupos, a continuación se presenta un cuadro resumiendo las características de cada tipo (Tabla 2.3).

Tabla 2.3 Características de los grupos de *Escherichia coli* causantes de diarrea

Grupo	Síntomas clínicos	Epidemiología	Serogrupos y serotipos más comunes	Factores de patogenicidad
ETEC <i>E. coli</i> enterotoxigénica	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de 2 años y diarrea del viajero	O8:H9, O15:H11, O20:H-, O25:H-, O27:H7, O78:H12, O148:H28, O159:H20	ST y LT CFA
EHEC <i>E. coli</i> enterohemorrágica	SUH, CH, diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre, vomito	Niños y adultos que la adquieren por comer carne cruda o mal cocida	O157:H7, O26:H11, O103:H2, O113:H21, O119, O128, O145	STX A/E Intimina pO157
EIEC <i>E. coli</i> enteroinvasiva	Diarrea con moco y sangre o diarrea acusa, también se presenta cuadro disentérico	Niños menores de 6 meses	O28:H, O112acH-, O144:H-, O152:H-, 164:H-O167:H-	Invasividad Plásmido de 140 MDa
EPEC <i>E. coli</i> entero patogénica	Diarrea aguda, dolor abdominal, vomito, fiebre baja	Niños menores de seis meses hasta dos años	O55, O86, O142, O111:H-O127	A/E, BFP Plásmido EAF de 50-70 MDa
EAEC <i>E. coli</i> enteroagregativa	Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre, diarrea persistente hasta 20 días	Recién nacidos y niños menores de 2 años	044:H18	Fimbria AAFI y II EASTI Proteínas Pet y Pic OMP Plásmido de 60 MDa Citotoxina
DAEC <i>E. coli</i> de adherencia difusa	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años	O126:H27	Fimbria F1845 OMP

Tomado y modificado de Eslava C. *et al.* 1994

2.2.3.2 *Bacillus cereus*

Es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, esporulado y móvil (Figura 6). Es una bacteria que causa intoxicación por consumo de alimentos contaminados. Produce dos tipos de síndromes: el diarreico y el emético. El tipo diarreico de intoxicación alimentaria es provocado por una(s) enterotoxina(s) producidas(s) durante el crecimiento vegetativo de *Bacillus cereus* en el intestino delgado, mientras que la toxina emética es producida por células que crecen en el alimento (Doyle y Beuchat, 2007).

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

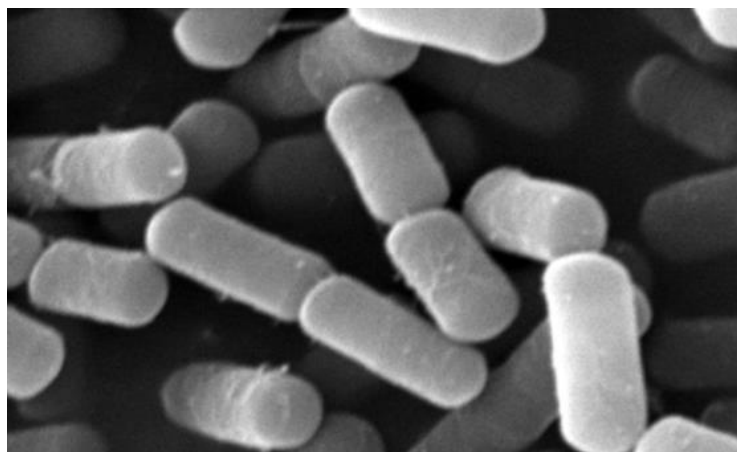


Figura 6. *Bacillus cereus*, tomado de www.phys.org

Además, algunas cepas de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. lentus*, *B. thuringensis*, *B. polymixa*, *B. carotarum* y *B. pasteurii* han sido reportadas como patógenas (Miliotis y Bier, 2003; Jay, 1992; Wachter, 1993). Se ha encontrado la presencia de *Bacillus* en masas de pozol recién elaboradas, como son *B. lentus* (Rivera, 2001).

Bacillus cereus está muy difundido en la naturaleza, aislándose frecuentemente en la tierra y en las plantas en crecimiento, por ello normalmente se encuentra en alimentos como

aquellos con alto contenido de almidón (tubérculos), productos lácteos y vegetales (Miliotis y Bier, 2003; Brock, 2009; Doyle y Beuchat, 2007).

2.2.3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la rama de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias (Figura 7) (Pace, 1997; Woese, 1987). Dentro del género *Pseudomonas* se encuentran algunas otras especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. alcaligenes*, las cuales están ampliamente distribuidas en la naturaleza (Costerton, 1980; Hardalo, 1997). Se pueden aislar de muestras de suelo y aguas contaminadas, así como de plantas y animales. Todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre, en el caso específico de *Pseudomonas aeruginosa* afecta especialmente a individuos inmuno suprimidos y a pacientes críticos, se suele asociar a infecciones relacionadas con dispositivos invasivos como es el caso de neumonías asociadas a ventilador (Montell, 2012).



Figura 7. *Pseudomonas aeruginosa*, tomado de www.fineartamerica.com

Pseudomonas aeruginosa tiene gran importancia para el hombre ya que así como representa problemas de salud, es útil en el tratamiento de contaminación ambiental. Contrariamente a lo que parece, el ser humano está en contacto diariamente con este microorganismo, ya que se encuentra en bajas cantidades en alimentos y en algunos artículos

de limpieza (Hardalo, 1997). Para esta bacteria se reportan aislamientos entre el 2 y el 8% de heces pertenecientes a personas sanas (Hardalo, 1997).

Este microorganismo coloniza especialmente sitios con alta humedad, su habilidad de formar biofilms le confiere la capacidad de permanecer por largo tiempo en los sitios que coloniza (Montell, 2012).

De igual forma, *P. aeruginosa* presenta problemas en la industria alimentaria ya que puede descomponer los alimentos que se mantienen en refrigeración, ya que la bacteria al mantener un metabolismo basal en estas condiciones produce enzimas hidrolíticas (Soberó y Palmeros, 1994).

2.2.3.4 *Proteus mirabilis*

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

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



**Figura 8. *Proteus mirabilis*,
tomado de www.gefor.4t.com**

2.2.3.5 *Staphylococcus aureus*

Los miembros de género *Staphylococcus* son cocos Gram positivos que se agrupan regularmente en racimos, inmóviles, no esporulados, dan positiva la reacción de la catalasa y por lo general producen microcápsula de naturaleza polisacárida (Figura 9) (Banneman, 2003). Algunos de los miembros del género *Staphylococcus* forman parte de la microbiota de la piel en humanos.

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



Figura 9. *Staphylococcus aureus*, tomado de www.medciencia.com

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

Los síntomas de intoxicación alimentaria estafilocócica suelen ser los siguientes: náuseas, vómito, retortijones abdominales intensos, diarrea, sudoración, cefalalgia, abatimiento y un eventual descenso de la temperatura corporal. Estos síntomas, que generalmente duran de 24 a 49 horas, suelen aparecer dentro de las 4 horas siguientes a la ingestión del alimento

contaminado. Este microorganismo se encuentra frecuentemente en productos lácteos y cárnicos (Brock, 2009).

2.2.3.6 *Listeria monocytogenes*

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

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

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



Figura 10. *Listeria monocytogenes*, tomado de www.abcnews.go.com

2.2.4 Patógenos de Cavidad Oral

En la boca se desarrollan muchos microorganismos (se llega a niveles de 10^{10} UFC/g en el sarro). Así mismo, se encuentra una gran diversidad de microorganismos colonizando los diferentes ambientes bucales.

La presencia de elevados números de microorganismos anaerobios estrictos se debe a la alta tasa metabólica que tiene lugar en la boca, lo que genera los ambientes anaerobios necesarios para estos microorganismos. En la cavidad oral se producen biopelículas. Entre estos son especialmente importantes los de *Streptococcus mutans* (estreptococo del grupo viridans) que es el agente productor de la caries dental (Sisto *et al*, 2012).

La microbiota oral normalmente está constituida por microorganismos que suelen estar presentes en la saliva y en las superficies de la cavidad oral. En las personas sanas la microbiota normal consta de especies aerobias, como cocos Gram-positivos (principalmente *Streptococcus*), bacterias anaerobias y especies de *Candida*, habitualmente estos microorganismos no causan ningún daño, excepto cuando se permite su excesiva acumulación, formando la placa dental o cuando se desplazan desde la boca a tejidos más profundos como a la pulpa dental o a otras zonas del organismo, por ejemplo la corriente sanguínea.

La microbiota de la cavidad oral es compleja, hasta el año 2001 se conocían 500 especies, actualmente se calcula que serían unas 700 las que habitan (Negroni, 2009). Los primeros y más numerosos microorganismos en instalarse son los estreptococos (*Streptococcus* del grupo *salivarius*) en la lengua, las mucosas y otros microorganismos presentes en la saliva (Negroni, 2009). La microbiota presente al completarse la dentición primaria y más tarde la dentición permanente conforma la comunidad microbiana total. La calidad y la cantidad de microorganismos que componen la comunidad clímax varían durante la vida de los individuos de acuerdo con los factores que influyen en su distribución, promoviendo o limitando su desarrollo (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Factores que influyen en la distribución de la microbiota de la cavidad bucal

Causas que promueven el desarrollo microbiano	Causas que limitan el desarrollo microbiano
Temperatura	Disponibilidad limitada de nutrientes
Humedad	Factores antimicrobianos salivales
Potencial redox	Aumento de pH
Disminución de pH	Exfoliación de células epiteliales

Tomado y modificado de Vázquez, 2013.

2.2.4.1 *Streptococcus oralis*

Streptococcus oralis es un microorganismo Gram positivo, se encuentra en alta proporción en la boca y la garganta (Figura 11). Este microorganismo que pertenece al grupo *Streptococcus viridans* causa endocarditis y también está implicado en la formación de placa dental.

Estos estreptococos son residentes de la cavidad oral, tractos respiratorio superior, genital femenino y gastrointestinal. Aunque se considera que son bacterias de poca virulencia, se ha demostrado su importancia clínica en procesos como bacteremias, endocarditis y, en menor grado, en meningitis y neumonía (Johnson *et al.* 2005).

Comparte algunas características con *S. sanguinis* y *S. mutans*. tiene actividad neuraminidásica y de IgA1 proteasas. Ciertas propiedades de *S. oralis* se asemejan a las de *S. sanguinis* y otras recuerdan a *S. mutans* (Negroni, 2009).

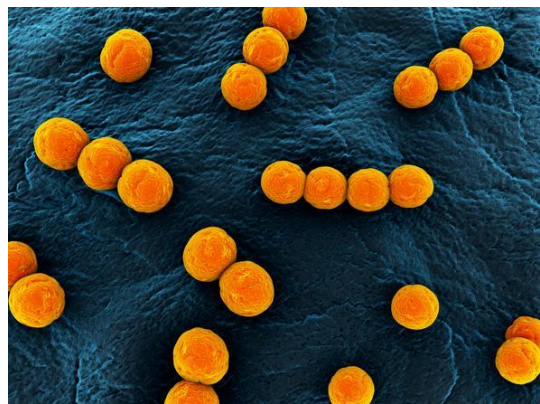


Figura 11. *Streptococcus oralis*, tomado de www.healthtap.com

2.2.4.2 *Streptococcus sanguinis*

Streptococcus sanguinis es una bacteria de morfología cocoide, Gram positivo que coloniza la cavidad bucal de los niños después de la erupción dentaria y se ha demostrado que es el primer microorganismo que se instala en las superficies dentarias limpias. Pueden ser aislados a partir de la sangre de las válvulas cardíacas, en bacteremias y endocarditis infecciosa. Producen glucanos solubles a partir de sacarosa, generan peróxido de hidrógeno, fermentan la inulina y tienen actividad de IgA1 proteasa y así pueden inhibir el desarrollo y la adherencia de otros microorganismos (Figura 12) (Negroni, 2009).

Los receptores superficiales de *Streptococcus sanguinis* promueven la agregación bacteriana. Se unen a la película adquirida y a superficies epiteliales a través de ácidos lipoteicoicos (Negroni, 2009).



Figura 12. *Streptococcus sanguinis*, tomado de www.uark.edu

2.2.4.3 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans es una bacteria Gram positiva, en forma de coco, se considera el microorganismo más cariogénico de la placa bacteriana, teniendo un papel activo en el desarrollo de la caries, siendo importante en las primeras etapas de desarrollo de la lesión; éstos son eficientes fermentadores de glúcidos, además son microorganismos acidúricos (tolerantes al ácido) y acidógenos (productores de ácido); por lo que son capaces de reducir el pH de la placa bacteriana (Figura 13) (Menaker *et al*, 1986). La mayoría son alfa hemolíticos (hemólisis parcial) en agar sangre (Philips y cols., 2010).

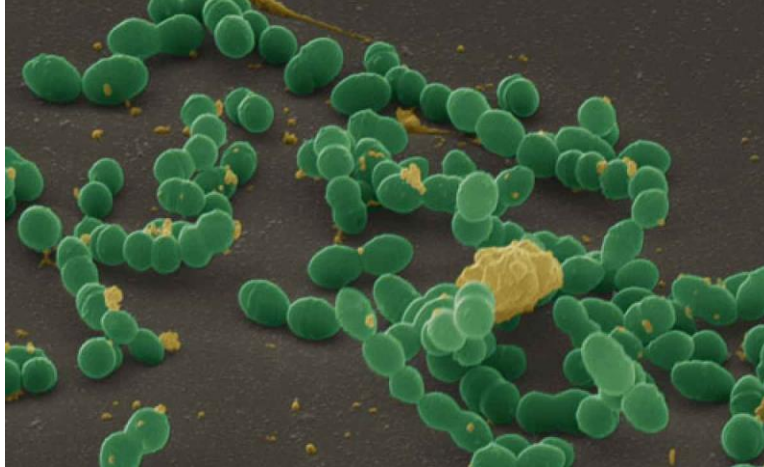


Figura 13. *Streptococcus mutans*, tomado de www.popsci.com

Streptococcus mutans, es una de las especies bacterianas encontradas con mayor frecuencia en los humanos, siendo las cepas de serotipo c las más frecuentemente aisladas, seguidas por la d y la e. *S. mutans* es conocida como una de las principales causas en la formación de la placa dental y de las caries (Abdus Salam y cols., 2004).

Cuando el *Streptococcus mutans* está presente en la placa, el mutano contribuye a la matriz orgánica; los restos bacterianos suministran ácido murámico, lípidos y algunas proteínas de la matriz que son procedentes de las glicoproteínas salivales. Ahora bien, los *Streptococcus* de la placa bacteriana pueden pertenecer a 13 cepas diferentes, inclusive existen dos cepas diferentes de *Streptococcus mutans* (Tabla 2.5). La supervivencia de éste es favorecida por las condiciones predominantes de sacarosa elevada, pH bajo y relación alta de carbono a nitrógeno en la placa natural sujeta a estancamiento y dieta cariogena (Carranza, 1986; Newman, 1982).

La habilidad de *S. mutans* para adherirse y acumularse en la superficie del diente, por la síntesis de polisacárido extracelular, junto con la sacarosa, le confiere las propiedades acidogénicas y acidúricas, que son clave en los factores de virulencia, que involucran el desarrollo de la placa dental y de la caries (Yatsuda y cols., 2005). La adherencia específica e inespecífica de *S. mutans* y otros microorganismos a los glucanos adherentes e insolubles juega un papel importante en el desarrollo de la placa dental (Figura 14).

Tabla 2.5 Especies del género *Streptococcus* aisladas de humanos y presentes en la cavidad oral (Sakamoto y cols., 2005).

Grupo de estreptococos	Bacterias	Serotipos
Mutans	<i>S. mutans</i>	Serotipos c,e,f,k,d
	<i>S. sobrinus</i>	Serotipos d,g
	<i>S. criceti</i>	Serotipos a
	<i>S. ratti</i>	Serotipos b
Salivarius	<i>S. salivarius</i>	
	<i>S. vestibularis</i>	
Anginosus	<i>S. constelatus</i>	
	<i>S. intermedius</i>	
	<i>S. anginosus</i>	
Mitis	<i>S. sanguinis</i>	
	<i>S. gordonii</i>	
	<i>S. oralis</i>	
	<i>S. mitis</i>	
	<i>S. infantis</i>	

Tomado y Modificado de Vázquez, 2013

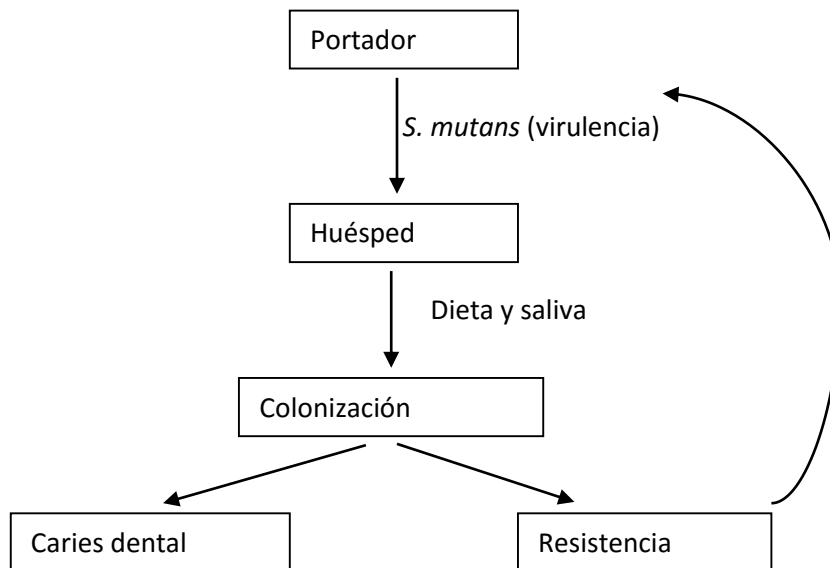


Figura 14. Cadena de eventos que pueden llevar a infección por *S. mutans*.

2.2 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son sustancias deseables producidas por bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales controlan el crecimiento de poblaciones microbianas en alimentos fermentados, lo cual le confiere al alimento una mayor vida de anaquel e inocuidad.

Las bacteriocinas, producidas por las BAL, son péptidos antimicrobianos, sintetizados ribosomalmente, que tienen actividad contra otras bacterias (Rea *et al*, 2011). Las bacteriocinas producidas por BAL, incluyendo las de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* y *Streptococcus* han sido las más estudiadas debido a que podrían ser potencialmente usadas para la preservación y seguridad de los alimentos, en medicina humana y veterinaria (Cotter *et al*, 2005). La acción de las bacteriocinas depende de la composición de la membrana citoplasmática, la estructura y la expresión de la proteína además de la composición química del medio (Monroy *et al*, 2009).

Las bacterias Gram-positivas poseen un alto contenido de lípidos aniónicos en su membrana, en este caso, las bacteriocinas se unen a la membrana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y la carga neta positiva de las bacteriocinas, localizada en uno de sus extremos, formando poros en la membrana bacteriana, la cual se permeabiliza y la célula comienza a perder iones y algunos metabolitos, los cuales son fundamentales para su desarrollo y supervivencia, causando, eventualmente, la muerte bacteriana. Otro modo de acción es la inhibición de la síntesis del ADN, este se considera un mecanismo secundario de las bacteriocinas (Brötz, *et al*, 2009).

Son además, como ya se había comentado, compuestos catiónicos cuya carga neta positiva es mayor a pH ácido. Asimismo, sus propiedades bactericidas se acentúan a valores de pH bajos, permanecen estables a temperaturas relativamente altas y no se ven afectadas por solventes orgánicos. En este sentido, son las enzimas proteolíticas las que logran hidrolizarlas y, por tanto, inhibir su actividad. Son bastantes estables bajo condiciones de refrigeración y congelación, pero si contienen metionina, ésta puede oxidarse a sulfóxido de metionina, el cual reduce el poder antimicrobiano (Chen y Hoover, 2003; Savadogo *et al*, 2006; Ray y Bhunia, 2008).

2.2.1 Clasificación

Existen diferentes clasificaciones para las bacteriocinas producidas por BAL, los primeros intentos de clasificarlas se basaban en su resistencia al calor, sensibilidad a tripsina y grado de reactividad cruzada entre diferentes combinaciones de bacteriocinas y huéspedes (Kozak et al, 1978, Zouhir et al., 2010) (Figura 15).

Una clasificación hecha por (Klaenhammer, 1993) divide a las bacteriocinas en 4 grupos:

- Clase I o lantibióticos (Bacteriocinas modificadas post traducción), definidos como pequeños péptidos activos de membrana (<5 kDa) que contienen los aminoácidos lantionina o β -metil lantionina (de ahí el nombre de lantibioticos) y residuos deshidratados.
- Clase II (Péptidos no modificados), definida como pequeños péptidos activos de membrana de hidrofobicidad variable y estabilidad al calor de moderada a alta. Esta a su vez se divide en 3 subgrupos:
 - Subclase IIa, subclase IIb, subclase IIc.
- Clase III (Proteínas no modificadas), proteínas grandes, termolábiles, algunas con actividad enzimática.
- Clase IV, proteínas complejas con uno o más grupos de lípidos o carbohidratos.

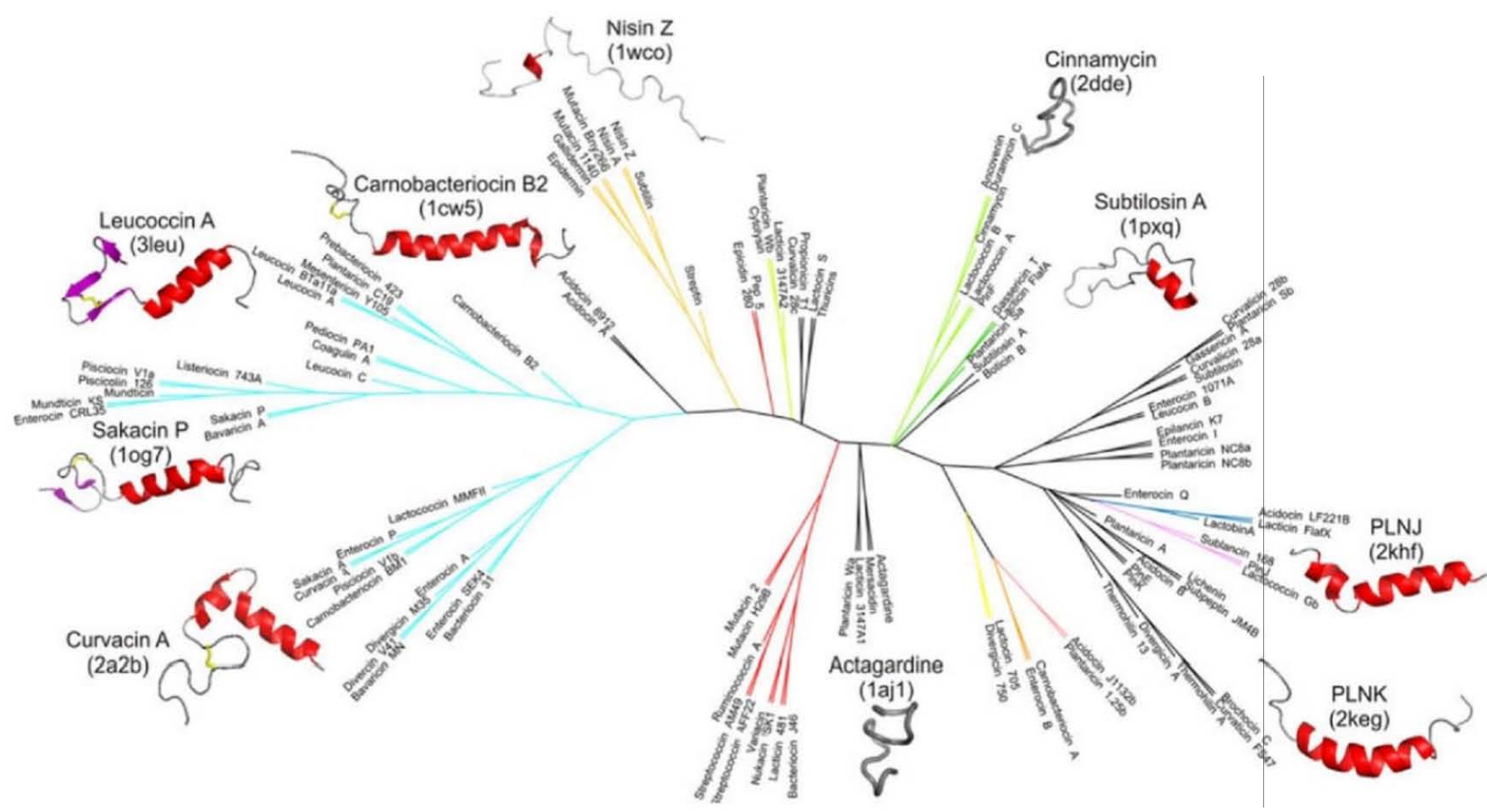


Figura 15. Clasificación de bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas (Zouhir el at., 2010).

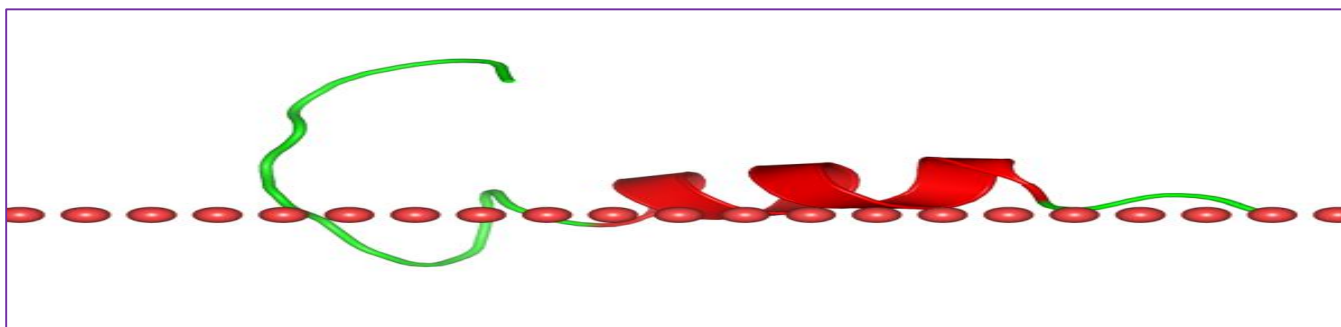


Figura 16. Estructura de la Plantaricina A, bacteriocina de la clase IA producida por *Lactobacillus plantarum* C11. Tomada de OPM Database

Tabla 2.6. Clasificación de las bacteriocinas según Klaenhammer.

Clase	Características	Ejemplos representativos	BAL productora
Clase I:	< 5 KDa		
Lantibióticos	Estables al calor		
IA	Péptidos alargados. Forman poros en la membrana celular blanco	Nisina A Plantaricina A	<i>Lac. lactis</i> ATCC11454 <i>Lb. plantarum</i> C11
IB	Péptidos globulares. Inhibición a nivel enzimático	Mersacidicina	<i>Bacillus</i> sp. HILY-85.54728
Clase II: No lantibióticos	<10 KDa Estables al calor		
Ila:	Secuencia N-terminal: -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys	Pediocina AcH	<i>Ped. acidilactici</i> H
Cistibióticos	Forman poros en la membrana celular	Sakacina A	<i>Lb. sake</i> Lb706
	Actividad contra <i>Listeria</i>	Leucocina A	<i>Leu. gelidum</i> UAL 187
Llb	Necesitan dos péptidos para generar actividad	Lactacina F	<i>Lb. acidophilus</i> 11088
Llc	Sec-Dependientes	Lactococcina G Acidocina G	<i>Lac. lactis</i> LMG2081 <i>Lb. acidophilus</i> M46
Clase III	>30 KDa Lábiles al calor	Helveticina J	<i>Lb. helveticus</i> J
		Lactacina B	<i>Lb. Acidophilus</i> N2
Clase IV	Glicopéptidos y lipopéptidos	Leucocina S Lactocina 27	<i>Leu. paramesenteroides</i> Ox <i>Lb. helveticus</i> LP27

Tomado y Modificado de Rodríguez, 2011.

Esta clasificación ha sido retomada y modificada por varios autores. Rea y colaboradores (2011) presentan una clasificación actualizada en base a los diferentes esquemas de clasificación anteriores (Figuras 15, 16, 17 y 18).

- Clase I: Bacteriocinas modificadas post traducción. Este grupo se divide en:
 - Clase Ia: Lantibióticos.
 - Clase Ib: Labirintopéptidos, nombrados en consecuencia de su estructura de “laberinto”, se distinguen por la presencia de labionina, un aminoácido modificado post traducción.
 - Clase Ic: Sactibióticos.
- Clase II: Bacteriocinas no modificadas. Este grupo se divide en cuatro subgrupos.
 - Clase IIa: Bacteriocinas similares a pediocina.
 - Clase IIb: Bacteriocinas no modificadas de dos péptidos.
 - Clase IIc: Bacteriocinas circulares.
 - Clase IId: Bacteriocinas no similares a pediocina, sin modificar, lineales.
- Bacteriolisinas, anteriormente Bacteriocinas Clase III, variables de hidrofobicidad y estabilidad al calor de moderada a alta. Esta a su vez se divide en 3 subgrupos: subclase IIa, subclase IIb, subclase IIc.
- Clase III (Proteínas no modificadas), proteínas grandes, termolábiles, algunas con actividad enzimática.
- Clase IV, proteínas complejas con uno o más grupos de lípidos o carbohidratos.

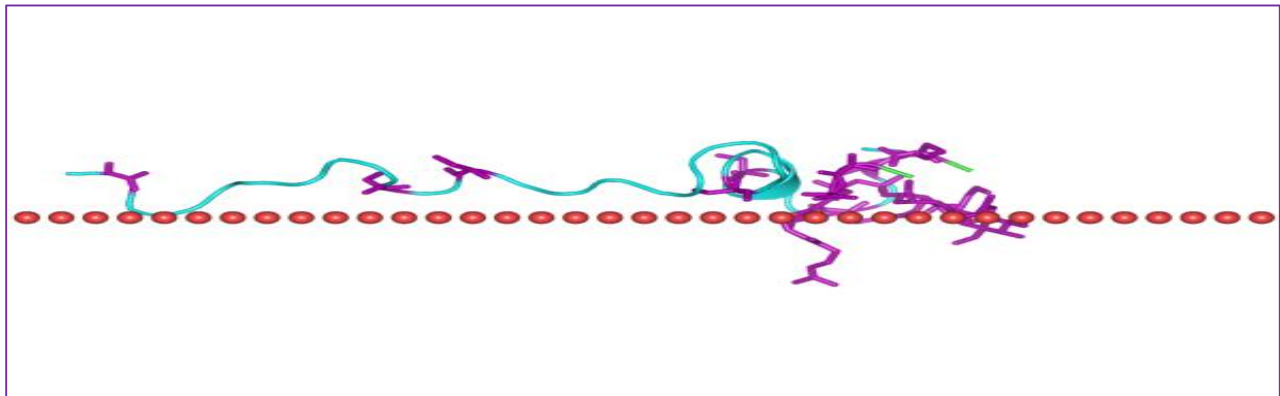


Figura 17. Estructura de la nisina A, bacteriocina de la clase IA producida por *Lactococcus lactis* ATCC11454. Tomada de OPM Database.

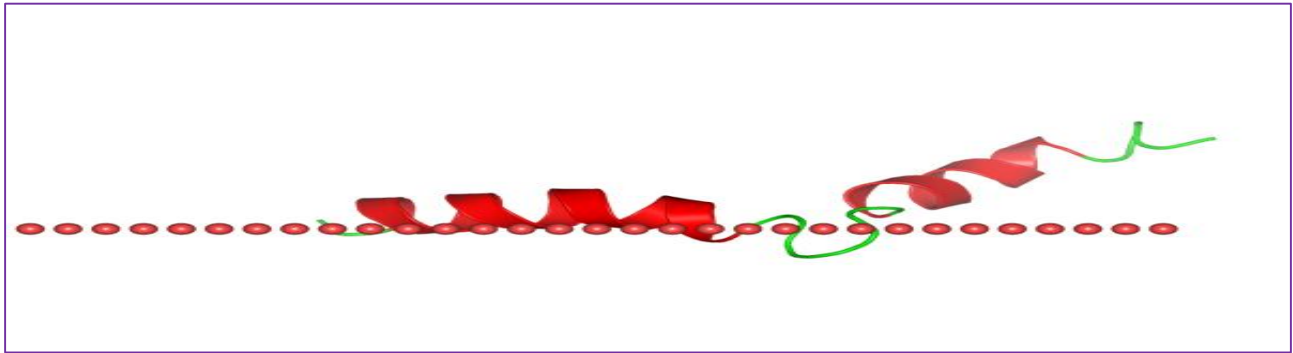


Figura 18. Estructura de la Lactococcina G, bacteriocina de la clase IIb producida por *Lactococcus lactis* LMG2081. Tomado de OPM Database.

2.2.2 Biosíntesis y modo de acción

Las bacteriocinas son sintetizadas como pre-propéptidos, los cuales son procesados y excretados mediante la maquinaria celular de transporte. En las bacterias ácido lácticas, la producción de bacteriocinas está asociada con el crecimiento: generalmente que se da en la fase exponencial y se detiene al término de la misma, aunque existen casos, como el de la nisina en los que la producción ocurre a la mitad de la fase log, llegando a su máximo cuando las células entran en la fase estacionaria (Riley y Wertz, 2002).

Por otro lado, la síntesis se puede ver afectada por el tipo y cantidad de las fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato, así como de cationes surfactantes (como el Tween 80). Si bien las bacteriocinas pueden sintetizarse a través del uso de distintos azúcares (sacarosa y xilosa), se ha visto que, en general, la glucosa es la mejor fuente para una producción neta mayor (Muñoz-Rojas, 2003; Savadogo et al. 2006).

Se ha demostrado que la producción de bacteriocinas obedece al fenómeno de Quorum Sensing en el cual la llegada a un nivel de la población bacteriana produce el aumento en la producción de un inductor (en el caso de Gram positivos un péptido autoinductor) que activa o inhibe la expresión de genes. Los autoinductores utilizados por las BAL son en la mayoría de los casos las mismas bacteriocinas o péptidos tipo bacteriocina (Kuipers, 1998). Aunque no hay estudios específicos al respecto, la interacción de bacterias de otros géneros con estos autoinductores puede también ser un mecanismo de regulación e inhibición en las poblaciones de los microorganismos en los alimentos.

2.2.2.1 Biosíntesis

La mayoría de las bacteriocinas son sintetizadas como un pre-péptido inactivo con una secuencia N-terminal líder enlazada al extremo C-terminal del propéptido; sin embargo, existen ciertas diferencias en cuanto al tipo de genes que necesitan para su liberación. Para el caso de los lantibióticos, los genes necesarios son los siguientes:

- ✓ Un gen estructural *lanA*, que codifica para el pre-propéptido
- ✓ Genes de inmunidad: *lanI*, *lanE*, *lanF* y *lanG*, que codifican para proteínas que protegen a la célula productora del lantibiótico a formar
- ✓ Un gen *lanT*, que codifica para una proteínasa-serina encargada de remover la secuencia terminal líder del pre-propéptido
- ✓ Dos genes, *lanB* y *lanC* (y en algunos casos, solo *lanM*), que codifican para enzimas responsables de la formación de la lantionina y metil-lantionina.
- ✓ Dos genes, *lanK* y *lanR*, que codifican para las proteínas regulatorias encargadas de transmitir la señal extracelular que induce la producción de lantibióticos (Chen y Hoover, 2003; Savadogo *et al*, 2006).

El sistema de regulación de la producción de bacteriocinas se compone de tres componentes: un péptido inductor (o factor de feromona de activación), la histidina cinasa transmembranal (receptor de feromona) y un regulador de respuesta. El péptido inductor se sintetiza en el ribosoma en niveles de baja concentración como un prepéptido, que se escinde y se excreta al medio. Cuando este compuesto alcanza una concentración umbral, se activa la histidina cinasa transmembranal, lo que conduce a la autofosforilación del residuo de histidina, por lo tanto, se produce la transferencia de fosfato a una proteína reguladora de respuesta. El regulador fosforilado activa la transcripción de la bacteriocina, además de los elementos que componen el sistema de regulación, iniciando una retroalimentación positiva.

Tagg, *et al.*, (1976) señalaron que la acción de las bacteriocinas sobre las células sensibles ocurre en dos etapas. En la primera fase, la bacteriocina se adsorbe en receptores específicos de la célula hospedera. En una segunda fase, irreversible, la bacteriocina origina alteraciones celulares en las células sensibles de acuerdo con cada tipo de bacteriocina. No obstante, no está suficientemente claro que este modo de acción, descrito de una manera

general para las bacterias Gram-positivas, sea aplicable a las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas (Balciunas *et al.*, 2013).

2.2.2.2 Modo de acción

En general, el modo de acción de una sustancia inhibitoria frente a alguna célula puede ser de tres tipos; bacteriolítico, bacteriostático o bactericida. El primero implica la muerte celular seguida de lisis, representado por la disminución de la absorbancia. El segundo no produce muerte celular pero detiene el crecimiento, por lo cual, sin muerte celular el conteo de colonias y la absorbancia se mantienen constantes. Y finalmente el bactericida produce muerte celular que se manifiesta por la disminución de colonias pero sin lisis y por consiguiente la absorbancia se mantiene constante (Jaramillo *et al.*, 2010).

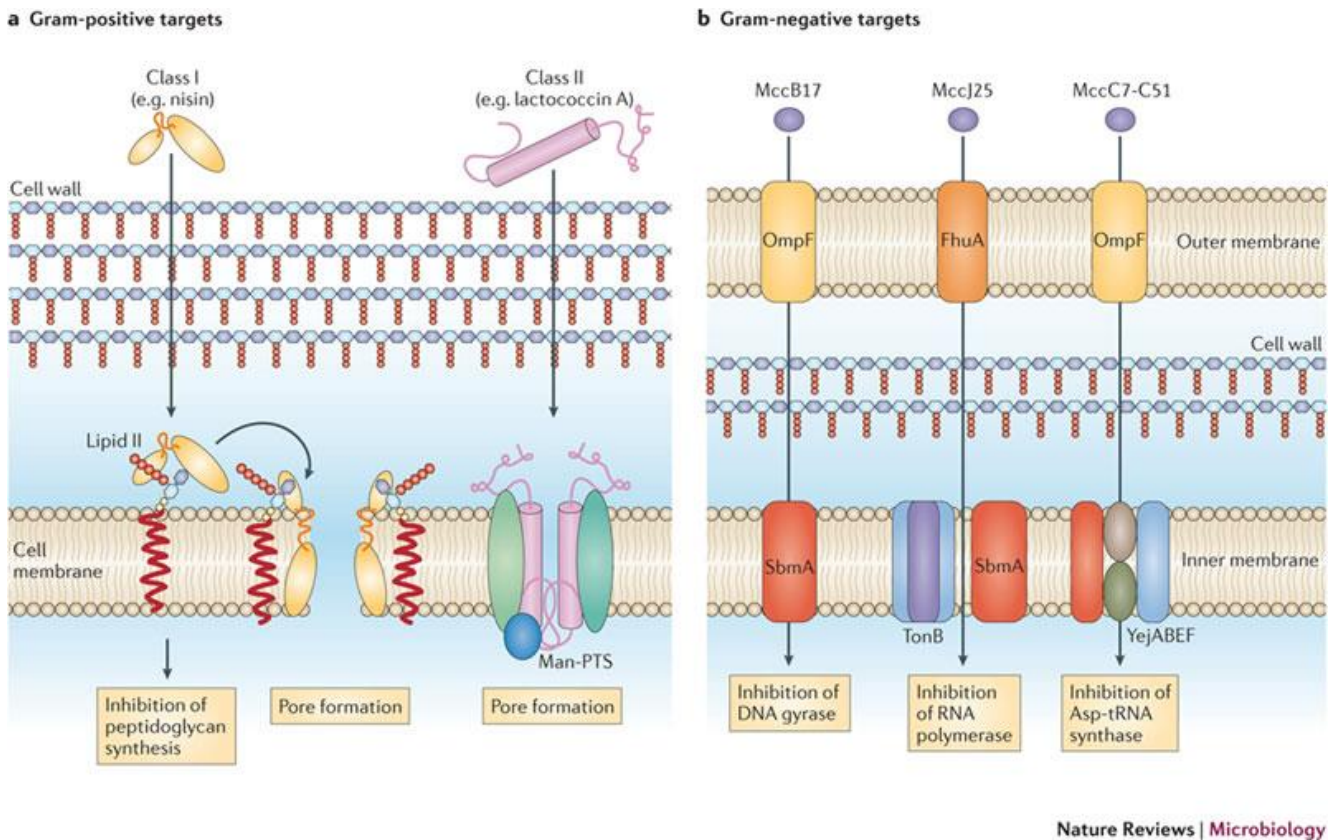


Figura 19. Mecanismo de acción de bacteriocinas frente a bacterias Gram positivas (a) y frente a Gram negativas (b) (Cotter, 2013)

La mayoría de las bacteriocinas de las BAL ejercen su acción antimicrobiana desestabilizando y permeabilizando la membrana citoplasmática de las células sensibles por medio de la formación de poros o canales iónicos que provocan la disipación de la fuerza protón motriz. Las bacterias lácticas bacteriocinogénicas se autoprotegen de los efectos tóxicos de sus bacteriocinas mediante la expresión de una proteína de inmunidad específica codificada generalmente por el mismo operón que la bacteriocina (Cintas *et al.*, 2001).

El poder que ejercen las bacteriocinas sobre otros microorganismos patógenos puede tener diferentes comportamientos. Algunos microorganismos pueden ser sensibles mientras que otros son resistentes, inclusive una cepa que parece ser sensible puede tener células que presentan resistencia. Las mismas bacterias productoras de compuestos antimicrobianos pueden ser sensibles a la acción de otra bacteriocina (Cintas *et al.*, 2001).

En cuanto al modo de inhibición utilizado por las bacteriocinas, existen diferencias por su clase, en este caso la clase I y II que se describen en la Figura 19, se sugiere que existe una unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada fundamentalmente en uno de los extremos. Luego se produce la inserción de la bacteriocina en la bicapa lipídica (Jaramillo *et al.*, 2010).

La formación de poros en la membrana citoplasmática de las células sensibles parece ser un mecanismo de acción común presentado por las bacteriocinas producidas por las BAL. La estructura de estos péptidos, α -hélice o β -laminar, presenta dos caras, una hidrofílica y otra hidrofóbica, creando oligómeros que atravesarían la membrana formando poros, el lado apolar de la molécula se ubicaría próximo a los lípidos de la membrana, mientras que el lado polar miraría al centro del poro. Como consecuencia se observa, en general, una pérdida de iones K, ATP y, en algunos casos aminoácidos y moléculas pequeñas. La pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida del potencial de membrana, el consumo de las reservas energéticas celulares, descenso en la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Vázquez y Suárez, 2008). En el intento de mantener o restablecer la fuerza motriz de protones, hay aceleración en el consumo de ATP y en consecuencia la muerte celular (Kaiser y Montville, 1996).

Las bacteriocinas de la clase III tienen un modo de acción y una estructura compleja. Su mecanismo de acción es diferente al de otras bacteriocinas. Su porción N-terminal es homóloga a una endopeptidasa implicada en la síntesis de la pared celular, mientras que la parte C-terminal es responsable del reconocimiento de la célula blanco (Figura 20) (Lai et al., 2002).

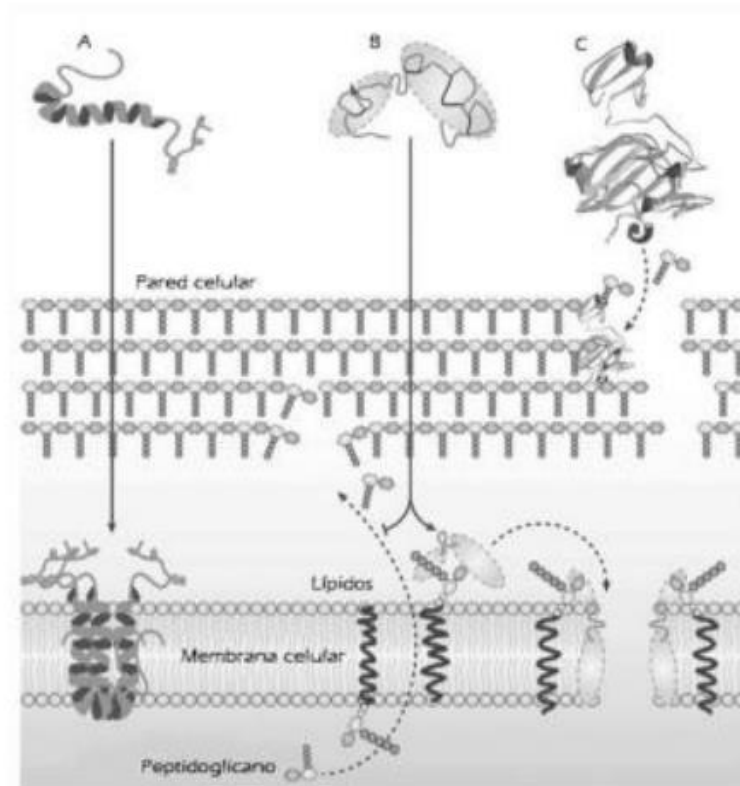


Figura 20. Modo de acción de las bacteriocinas. (A) Bacteriocinas clase I; (B) Bacteriocinas clase II y (C) bacteriocinas clase III (Cotter et al., 2005).

2.2.3 Determinación de la actividad antimicrobiana

Las técnicas empleadas en la identificación, detección y cuantificación de las bacteriocinas pueden dividirse en tres grandes grupos (Martínez, 2000).

- **Pruebas biológicas**

Las pruebas biológicas constituyen, habitualmente, el punto de partida en la búsqueda de bacterias productoras de bacteriocinas. Los bioensayos más empleados son la prueba de difusión en agar y los métodos turbidimétricos, basados en la inhibición del desarrollo de un microorganismo indicador inoculado en una placa microtituladora (Cintas *et al*, 2000).

La cuantificación de la actividad antimicrobiana se realiza empleando “unidades arbitrarias” (UA), en la prueba de difusión de placas de agar, o “unidades de bacteriocina” (UB), cuando el bioensayo utilizado es la prueba turbidométrica. No obstante, a pesar de su utilidad, sensibilidad y sencillez, ambas pruebas presentan inconvenientes que las convierte en poco reproducibles y fiables. La cuantificación de la actividad antimicrobiana es subjetiva y depende de la sensibilidad de la cepa indicadora y son pruebas inespecíficas, pues no permiten discriminar otros posibles compuestos o componentes con actividad antimicrobiana.

Debido a que las bacteriocinas son compuestos extracelulares (sección 2.3.2.), el uso de medios líquidos libres de las células es recomendado para su estudio (Vignolo *et al.* 1993, Alvarado *et al.* 2006; Vallejo *et al.* 2009).

- **Pruebas genéticas**

Las técnicas de a reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o de hibridación DNA-DNA, (*Southern blotting*) son pruebas genéticas de uso rutinario que permiten determinar si una bacteria posee el potencial genético de codificar una determinada bacteriocina (Martínez, 2000). Estas pruebas tienen entre sus ventajas su elevada especificidad y sensibilidad y son de utilidad para determinar la presencia del gen estructural de una bacteriocina conocida en un gran número de cepas. Sin embargo, la detección del gen estructural de una bacteriocina en un organismo hospedador no implica conocer y cuantificar su producción.

- **Pruebas inmunológicas**

Las pruebas inmunológicas constituyen métodos útiles para la detección y cuantificación de bacteriocinas. La mayoría de estas pruebas se basan en la transferencia del antígeno a una superficie inerte para que, una vez fijado a la superficie, pueda ser reconocido por un anticuerpo específico; el complejo antígeno-anticuerpo formado se detectará enzimáticamente. En general, estos ensayos permiten la detección y cuantificación de estas sustancias en diferentes sustratos, ya sean los sobrenadantes de los cultivos de los microorganismos productores o los alimentos en lo que se encuentran.

En función del tipo de muestra utilizada para detectar el antígeno, en este caso la bacteriocina, las técnicas que se llevan a cabo pueden dividirse en dos grandes grupo:

- a) Ensayos de transferencia de células y su posterior reconocimiento inmunológico, como la prueba de “*Colony immunoblotting*”.
- b) Ensayos basados en la transferencia de bacteriocinas semipurificadas como la prueba “*Western blotting*”.

Hasta ahora las pruebas inmunológicas más utilizadas han sido las basadas en la detección y cuantificación directa de las bacteriocinas.

El uso de sobrenadantes concentrados es recomendable en la mayoría de los métodos debido a que las bacteriocinas son compuestos extracelulares. Por otro lado, la eliminación de agua de dichos sobrenadantes permite una mayor eficiencia en la inhibición, así como en la apariencia visual de la misma.

Es importante tomar en cuenta que deben hacerse diversos tratamientos para eliminar la inhibición debida a otros metabolitos o agentes antagónicos. La neutralización de los medios o del sobrenadante, así como la adición de catalasa es importante para descartar la acción de ácidos orgánicos y del peróxido de hidrógeno respectivamente; por otro lado, la exposición del sobrenadante a un tratamiento térmico es importante para determinar la termo-estabilidad de las posibles bacteriocinas presentes. Asimismo, realizar ensayos con enzimas proteolíticas permite saber si la naturaleza de los compuestos antagónicos es proteínica. Todo lo anterior permite sugerir la posible presencia de una bacteriocina o de una sustancia tipo bacteriocina (Lewus *et al*, 1991; Hernández López, 2002; Rodríguez, 2011).

2.2.4 Aplicación en alimentos

Los consumidores hoy en día, muestran una tendencia hacia productos más naturales y frescos, debido a que han crecido las preocupaciones y creencias de que los aditivos químicos presentes en los alimentos pueden tener efectos negativos en la salud. Como resultado, la industria de los alimentos y la investigación científica se han ocupado de buscar opciones que interesen a la población consumidora y que además sirvan efectivamente como conservadores para una variedad importante de alimentos (Rodríguez, 2011).

La bioconservación se refiere al uso de microorganismos antagónicos o sus productos metabólicos para inhibir o destruir bacterias indeseables en los alimentos, para que de esta manera la inocuidad del alimento aumente y su periodo de vida se prolongue (Chen y Hoover, 2003). En este sentido, las bacteriocinas pueden ser vistas como bioconservadores que cumplen con los requerimientos de los consumidores. Además, su estabilidad ante tratamientos térmicos, así como la prevalencia de su actividad inhibitoria a bajas temperaturas y a diferentes valores de pH, las hacen una herramienta muy útil en la industria de alimentos (Ray y Bhunia, 2008).

Debido a la complejidad de los alimentos y la dificultad que genera la cuantificación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas en los mismos, existe la posibilidad de hacer estudios *in vitro* para simular y estudiar la funcionalidad y capacidad inhibitoria de diversos cultivos productores hacia otras bacterias, especialmente aquellas que han generado mayores problemas en la salud de la población (De Vuyst y Leroy, 2007).

3. Justificación

Las BAL juegan un papel importante en la producción de alimentos fermentados, como lo son el yogurt, quesos, embutidos entre otros alimentos tradicionales fermentados como lo es el pozol. Las BAL no sólo son importantes desde un punto de vista organoléptico, sino también por presentar efectos antimicrobianos frente a bacterias patógenas y de descomposición.

El antagonismo entre BAL y las bacterias patógenas se debe a la disminución del pH, la competencia por sitios de adhesión a los receptores epiteliales, los nutrientes y la producción de otros metabolitos con efecto antibacteriano. Las bacteriocinas son uno de los metabolitos mayormente estudiados en la actualidad debido a que, por su naturaleza peptídica, se inactivan enzimáticamente y no resultan tóxicas para el ser humano; además de que estas pueden ser utilizadas como conservadores en alimentos, con la ventaja de no ser antibióticos (Balciunas *et al.*, 2013).

En el pozol se han logrado encontrar bacterias ácido lácticas capaces de inhibir dichas bacterias patógenas, por lo que es importante profundizar en el estudio de estas con la finalidad de saber si la inhibición que ejercen es debido a posibles bacteriocinas que pueden llegar a ser útiles para mejorar la inocuidad del pozol, así como de otro tipo de alimentos.

4. Hipótesis

Si las cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol son capaces de producir sustancias antimicrobianas, las cuales podrían ser posibles bacteriocinas, entonces será posible que inhiban a diversas bacterias patógenas presentes en alimentos y en cavidad oral.

Por otro lado, si las cepas de *Streptococcus* pueden inhibir a estas bacterias produciendo sustancias antimicrobianas, las cuales pueden ser de naturaleza proteínica, estas se inactivarán al realizar un tratamiento enzimático con una proteasa e indicar la posible presencia de bacteriocinas.

5. Objetivos

5.2 Objetivo general

- ☞ Determinar si las cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol son productoras de sustancias antimicrobianas, que podrían ser usadas para el control de bacterias patógenas indeseables presentes en alimentos y patógenos de cavidad oral.

5.2 Objetivos particulares

- ☞ Estudiar el efecto de los sobrenadantes con diferentes tratamientos obtenidos de las cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol; cuando se utilizan cepas indicadoras de patógenos presentes en alimentos y patógenos de cavidad oral por el método de difusión en agar.
- ☞ Comprobar la naturaleza proteica de las sustancias antimicrobianas presentes en los sobrenadantes obtenidos de las cepas de *Streptococcus* al ser tratados con una proteasa de *Bacillus licheniformis*.

6. Metodología

6.2 Inhibición de Bacterias patógenas presentes en alimentos y en cavidad oral

En un estudio previo (Morales, 2015), se evaluó la producción de probables bacteriocinas producidas por cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol. En dicho estudio, se demostró el efecto de inhibición hacia *Listeria monocytogenes*, provocado por dichas bacterias. Se observó que 17 cepas (Tabla 6.1) inhibieron a esta bacteria.

6.2.1 Reactivación de cepas

Tanto las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol (Tabla 6.1), como las bacterias patógenas (Tabla 6.2), se mantuvieron conservadas en glicerol a -70°C .

Para la reactivación de las bacterias lácticas aisladas del pozol, se tomaron 20 μL de cada una, se llevaron a 5 mL de caldo MRS (De Man-Rogosa-Sharpe) marca Difco®, se agitó con un vórtex Bx BarnStead Thermolyne Maxi Mix II, y se incubaron a 30°C para posteriormente usarlas tras 24 horas de crecimiento.

En el caso de las bacterias patógenas, se llevaron a 5 mL de caldo BHI (infusión cerebro-corazón) marca BBL® tomando de 40-50 μL de cada una y agitando con vórtex. Se incubaron a 37°C por 18-24 horas, dependiendo de la bacteria, las condiciones específicas se muestran en la Tabla 6.2

Tabla 6.1 Cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol y utilizadas para las pruebas de actividad antimicrobiana

1° lote de cepas	2° lote de cepas	3er lote de cepas	4to lote de cepas
15133	A46116	15430	25318
15220	25245	25421	25109
15124	25113	15125	25148
25124	25139	A57103	25233
A56203	25137	A12203	15414
A57206	A45208	A46112	A45212
A37202	A37103	A46113	A36202
A56101	A36111	A47212	
A56208	A56201	A56202	
A45226	15319	A45201	

6.2.2 Efecto de los sobrenadantes concentrados, neutralizados y con tratamiento térmico (CNTT) de las cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol sobre la viabilidad de patógenos presentes en alimentos y cavidad oral

Para observar el poder antimicrobiano de las cepas de *Streptococcus*, las cuales posiblemente produzcan sustancias antimicrobianas como lo son las bacteriocinas, se estudió la viabilidad de *S. aureus*, *E. coli* 0157: H10, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis* al usar los sobrenadantes neutralizados, concentrados y con tratamiento térmico de cada una de las cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol.

6.2.2.1 Preparación de los sobrenadantes de las cepas de *Streptococcus*.

Para obtenerlos, se reactivaron las cepas de *Streptococcus* según lo escrito en la sección 6.1.1. Tras 24 horas de crecimiento se tomó una alícuota de 1 mL de cada cultivo y se colocó en un microtubo, se centrifugó a 8000 rpm en una centrifuga Modelo 5417 R Eppendorf durante 10 minutos, esto para separar las células del medio de cultivo. Se separó el sobrenadante,

transfiriéndolo a otro microtubo para poder conservarlo. Posteriormente, el sobrenadante de cada cepa se ajustó a un valor de pH de 6.5-7.0 con NaOH 1M y utilizando un potenciómetro marca Jenway, modelo 3020; esto con el fin de eliminar el efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos producidos por las cepas de *Streptococcus*. Finalmente para verificar la termoestabilidad de la posible bacteriocina, los sobrenadantes se sometieron a un tratamiento térmico de entre 100-105°C durante 10 minutos, en autoclave.

La Figura 21 muestra un esquema para obtener los sobrenadantes.

6.1.2.1.1 Concentración de los sobrenadantes de las cepas de *Streptococcus*

Para concentrar los sobrenadantes de las cepas de *Streptococcus* neutralizados y con tratamiento térmico, se eliminó el 50% de agua con el uso de un rotavapor marca Buchi, modelo R-215 y una bomba de vacío marca Buchi, modelo V-710.

Cada uno de los sobrenadantes tratados como se describe en la sección 6.1.3.1.1, fue transferido a un matraz de bola estéril de 500 mL para colocarlo en el rotavapor y así eliminar aproximadamente el 50% de agua de cada uno. El agua se extrajo a 65 rpm, 65°C y bajo 90-100 mbar de presión.

Después de su concentración, los sobrenadantes se enfriaron y se mantuvieron a -4°C hasta su uso.

Tabla 6.2 Condiciones para patógenos presentes en alimentos y cavidad oral

Microorganismo indicador	Condiciones				
	Reactivación μL	Tiempo de incubación al reactivar (h)	Dilución al realizar la prueba	Inoculo en sobrecapa μL	Tiempo de incubación de la prueba (h)
<i>Proteus mirabilis</i> P13 ^A	40	18	10 ⁻³	20	18
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 ^A	50	24	10 ⁻²	30	18
<i>Escherichia coli</i> 0157 : H10 ^B	50	18	10 ⁻³	25	18
<i>Bacillus cereus</i> 11778 ^A	50	24	10 ⁻²	30	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^A	50	18	10 ⁻²	25	18
<i>Listeria monocytogenes</i> ^A	50	24	10 ⁻¹	40	24
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC10449 ^D	40	24	10 ⁻²	40	24
<i>Streptococcus sanguinis</i> ^C	50	24	10 ⁻¹	50	24
<i>Streptococcus oralis</i> ^A	100	24	-	100	24

A Clave de la colección de microorganismos de la Facultad de Química, UNAM

B Clave de la colección de microorganismos del Laboratorio 324

C Clave de la colección de microorganismos de la Facultad de Medicina

D Clave de la colección de microorganismos, Lab. 324 del Conjunto E, Facultad de Química

Obtención y tratamiento de sobrenadantes de las BAL'S

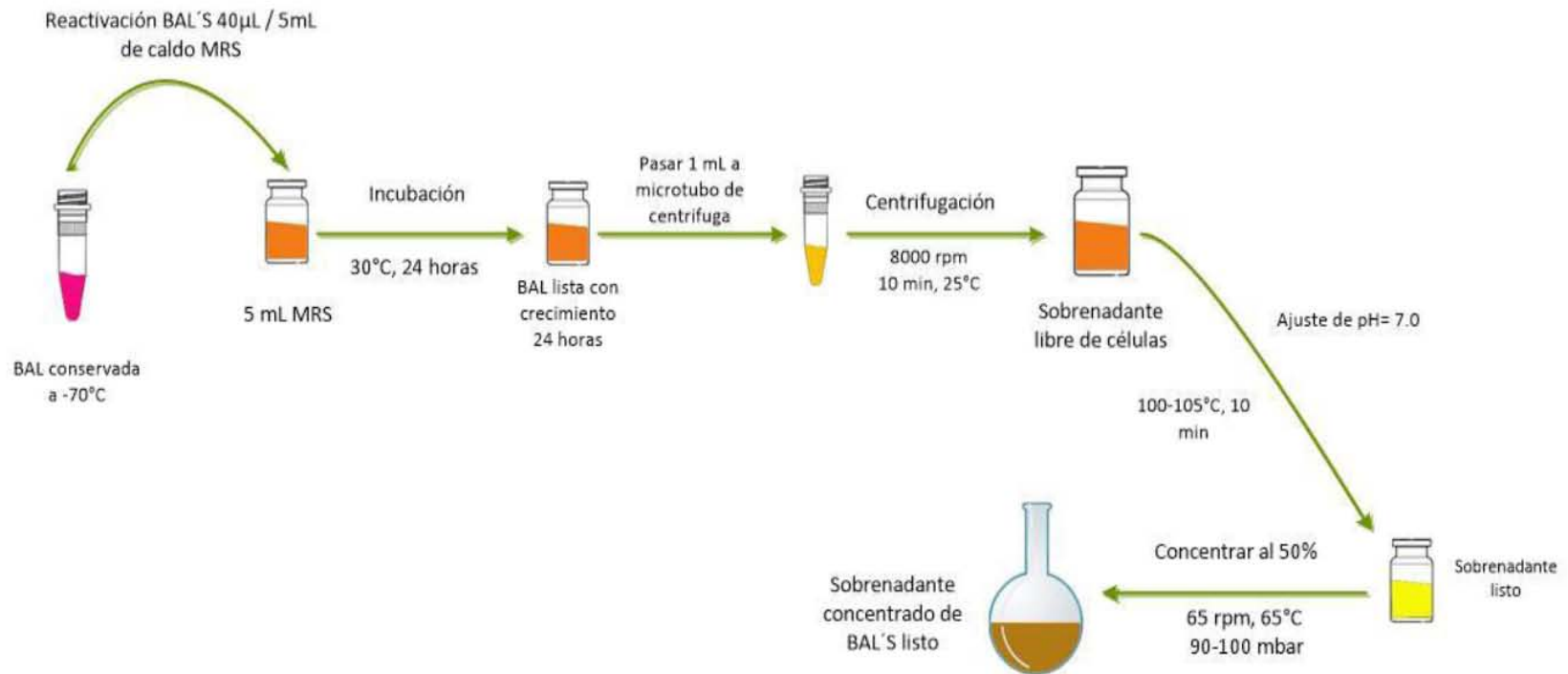


Figura 21. Esquematación de la metodología empleada para la obtención de los sobrenadantes concentrados y sin concentrar para su posterior utilización.

6.2 Actividad antimicrobiana de las cepas de *Streptococcus* sobre la viabilidad de los patógenos presentes en alimentos y en cavidad oral.

Para observar el efecto antimicrobiano que ejerció cada uno de los sobrenadantes sobre las bacterias patógenas en estudio se realizaron pruebas de difusión en agar para conocer su espectro de inhibición y de esta forma seleccionar los sobrenadantes de las bacterias que presentan actividad antimicrobiana sobre bacterias patógenas indicadoras y así poder realizar ensayos con enzimas para conocer la naturaleza de la sustancia que presenta este efecto.

6.2.1 Método de Difusión en agar

Para analizar si existe inhibición sobre alguna de las bacterias patógenas en estudio, se llevó a cabo el método de difusión en agar mencionado en la sección 2.3.3, utilizando para ello una placa con medio BHI tamponado, una sobrecapa tamponada también de medio BHI y torres de vidrio con un diámetro aproximado de 5 mm, las cuales se usan para la formación de pozos en la sobrecapa de medio BHI.

Los reactivos y medios de cultivo utilizados se detallan en los Anexos I y II.

6.2.2 Preparación de placa de medio BHI

Para realizar las placas de medio BHI, en un matraz se pesó la cantidad adecuada para preparar caldo BHI siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo II). Se le adicionó, 1.5% de agar marca Bacto ®

Se esteriliza a 121°C y 1 atm durante 15 minutos. Una vez que este se enfría aproximadamente a 40°C, se distribuye en cajas Petri, colocando 20 mL en cada una y dejando enfriar a temperatura ambiente. Para comprobar la esterilidad del medio, las placas de BHI tamponado se incubaron a 30°C durante 24 horas, esto como prueba de esterilidad.

6.2.3 Preparación de sobrecapa de medio BHI

Se preparó caldo BHI según las instrucciones del fabricante. Se le adicionó 0.8% de agar marca Bacto ® y un buffer de fosfatos para regular el pH del medio. Se homogenizan todos los componentes con ayuda de una parrilla con agitación marca Thermolyne, para después distribuir 10 mL de medio en tubos con tapón de rosca. Finalmente, los tubos con medio se esterilizan a 121°C y a 1 atm por 15 minutos.

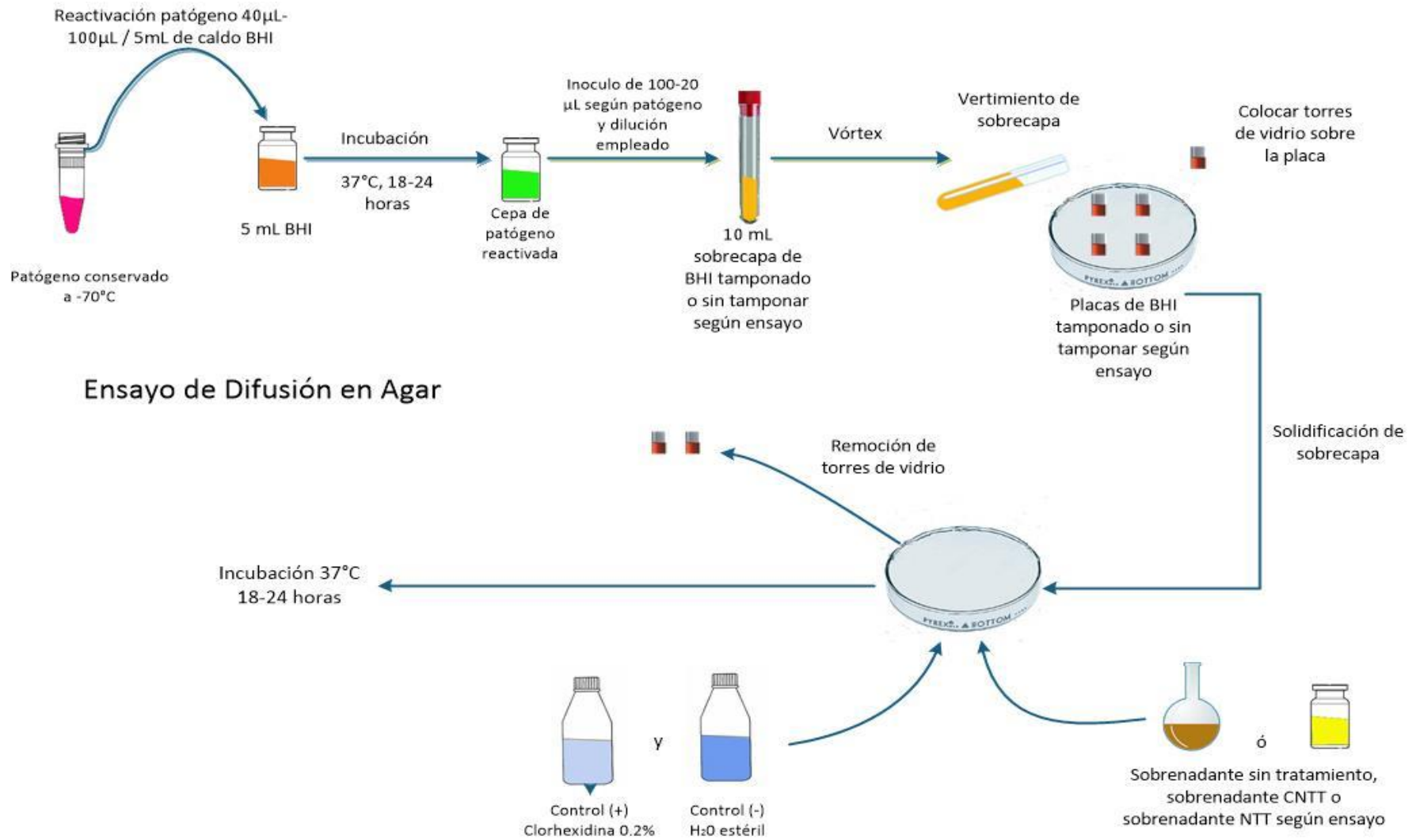


Figura 22. Esquematzación de la metodología empleada para realizar el ensayo de difusión en agar utilizando los sobrenadantes Neutralizados y tratados térmicamente (NTT) o Concentrados neutralizados y tratados térmicamente (CNTT), empleando las diferentes cepas de patógenos indicadoras.

6.2.4 Ensayo del método de difusión en agar

Este ensayo se realiza por secciones, según el sobrenadante a usar, ya sea el sobrenadante sin ningún tratamiento, con tratamiento térmico y neutralización y el sobrenadante con tratamiento térmico, neutralización y concentrado.

6.2.4.1 Prueba de difusión en agar con los sobrenadantes sin tratamiento, con tratamiento térmico, neutralización y concentrados

Se obtienen los sobrenadantes como se describe en la sección 6.1.3.1.1., para llevar a cabo la prueba se colocaron las torres en el medio tamponado, posteriormente se fundió la sobrecapa tamponada y se inoculó con la dilución correspondiente al microorganismo en estudio (0.5 mL del cultivo en 4.5 mL de solución salina al 8%) (Tabla 6.2). La sobrecapa ya inoculada se vertió sobre la placa de medio tamponado, cuidando de no derramar el medio de cultivo en el centro de las torres, para asegurar que los pozos quedaran bien definidos. Una vez que la sobrecapa se enfrió y solidificó, se procedió a retirar las torres. Una vez que se retiraron las torres, se colocó en cada pozo 80 μ L del sobrenadante de cada cepa de BAL que se prepararon previamente. Como controles, se usaron Clorhexidina al 0.2% (control positivo) y agua destilada estéril (control negativo).

Las cajas se incubaron durante 24-28 horas a 37°C, según lo descrito en la Tabla 3, transcurrido ese tiempo se observó si había halos de inhibición, en caso de haberlos, se midieron y se observó si eran transparentes u opacos. Esta misma metodología se empleó para cada uno de los sobrenadantes ya sea sin ningún tratamiento, con tratamiento térmico, neutralización y concentrados. Las pruebas se realizaron por duplicado.

La metodología empleada se resume en la Figura 22.

6.2.5 Pruebas enzimáticas (Proteasa de *Bacillus licheniformis*)

A partir de los sobrenadantes de las cepas que aun presentaban actividad antimicrobiana después del tratamiento térmico, neutralización y concentrados (Tablas 7.2 y 7.3) frente a *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus oralis*, para comprobar la naturaleza proteica del agente antimicrobiano en los sobrenadantes y así poder confirmar la presencia de posibles

bacteriocinas se realizó una prueba utilizando una proteasa de *Bacillus licheniformis* (Sigma P3910).

6.2.5.1 Prueba de difusión en agar con los sobrenadantes tratados enzimáticamente

Para llevar a cabo este ensayo se utilizó un buffer de Glicina-NaOH con pH de 9.00, el cual es el pH óptimo para esta enzima, en el cual se suspenden 5 mg/ mL de dicha enzima. Para la prueba, se mezclaron 0.5 mL de sobrenadante con 0.5 mL de la solución de proteasa, se incubó a 37°C durante 2 horas con agitación en un Thermomixer comfort para Eppendorf 1.5 mL antes de realizar la prueba de difusión en agar.

La prueba de difusión en agar se realizó, tal como se describió en la sección 6.2.3

Se utilizó el sobrenadante no tratado con enzima para poder diferenciar la actividad antes y después del tratamiento enzimático. A los sobrenadantes ya concentrados que perdieron actividad después de este tratamiento no se les realizó la prueba con enzima, por lo cual la prueba se llevó a cabo con los sobrenadantes tratados térmicamente y neutralizados, para de esta forma poder decir que la sustancia inhibitoria sea de tipo proteínico.

Las cajas se incubaron de 18 a 24 horas según el microorganismo correspondiente (Tabla 6.2) a 37°C, transcurrido ese tiempo se observó si había halos de inhibición después de este tratamiento, en caso de haberlos, se midieron y se observó si eran transparentes u opacos. El resumen del ensayo se muestra en la Figura 23.

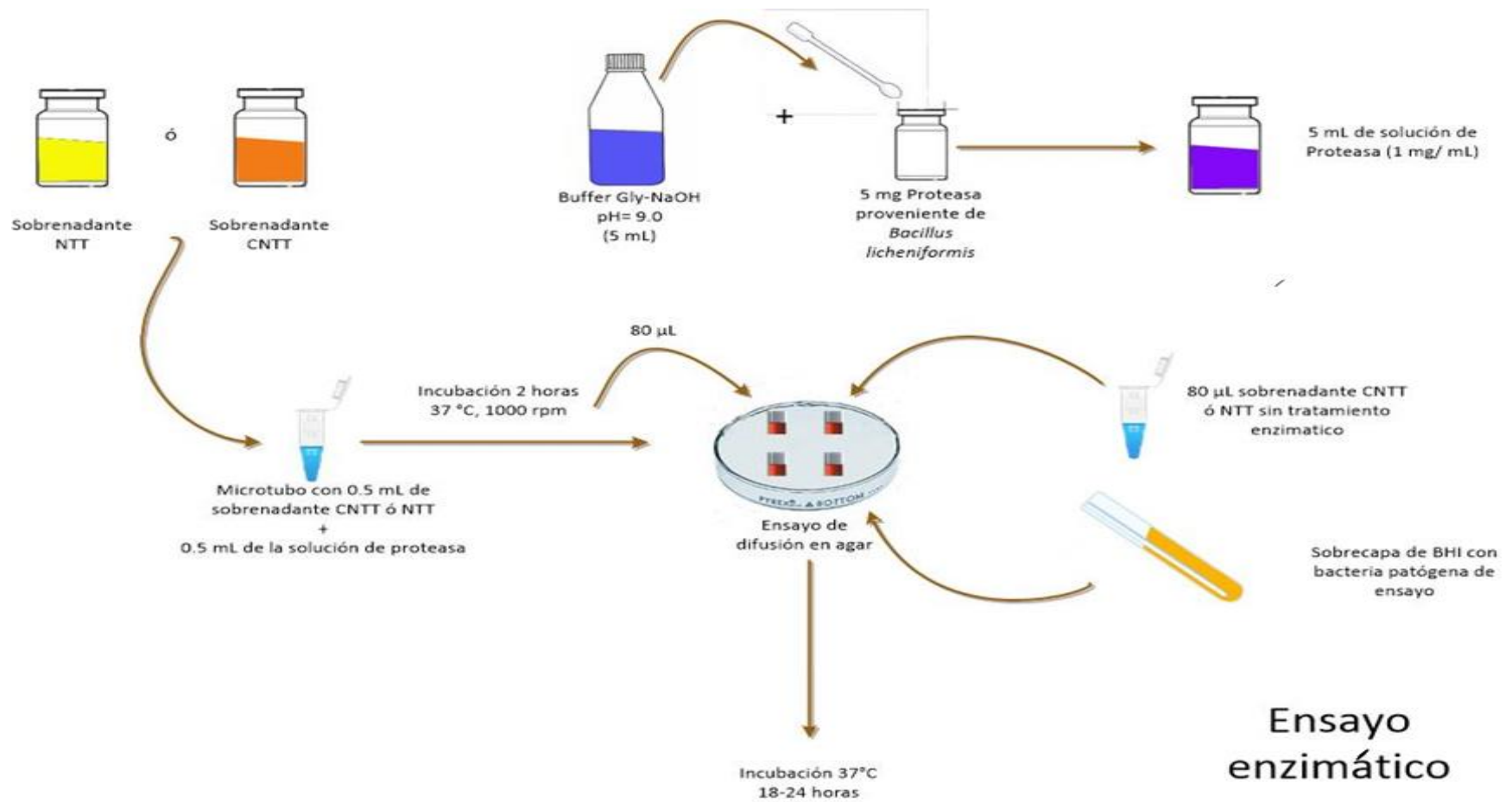


Figura 23. Esquematización de la metodología empleada para realizar el ensayo enzimático sobre los sobrenadantes Neutralizados y tratados térmicamente (NTT) o Concentrados, neutralizados y tratados térmicamente (CNTT).

6.2.6 Efecto de los SNTT sobre la viabilidad de *S. oralis*

Se realizó una curva de crecimiento para esta bacteria durante 48 horas, tomando muestras a las 0, 24 y 48 horas de crecimiento. Para ello se procedió de la manera que se describe en la siguiente sección. La Figura 24 resume gráficamente la metodología empleada para estos muestreos.

6.2.6.1 Sobrevivencia de *S. oralis* en los sobrenadantes neutralizados y tratados térmicamente SNTT

Para llevar a cabo el monitoreo de la viabilidad *Streptococcus oralis* en los SNTT se utilizaron, para el SNTT, dos matraces: un matraz como control positivo de la bacteria patógena (*S. oralis* +), en el que se inoculó al patógeno en estudio en caldo MRS estéril, con el fin de observar su crecimiento normal sin la presencia de los SNTT; y un matraz más en el que se colocó, la mitad del SNTT para inocular a *S. oralis*.

La bacteria patógena se reactivó según lo descrito en la sección 6.1.1. Transcurrido el tiempo, se inoculó el matraz de prueba (SNTT) y el control positivo (medio MRS sin tratar) con los cultivos diluidos de cada bacteria patógena en una relación de 0.1 mL de bacteria patógena por cada 20 mL de caldo, con el fin de obtener una cuenta inicial de 10^6 UFC/mL. Cada matraz se incubó a 37°C durante 48 horas. El conteo de células viables se realizó a las 0, 24 y 48 horas. Para el conteo de sobrevivientes se hicieron las diluciones sucesivas necesarias con solución salina a 0.85%. De las diluciones preparadas se tomaron 100 μ L y se colocaron en placas de medio BHI (Infusión Cerebro-Corazón) marca Difco®. Las colonias que se consideraron en el conteo fueron, colonias blancas y pequeñas.

6.2.6.2 Estandarización de las células viables de *S. oralis* a una cuenta de 10^6 UFC/mL

Para realizar la prueba de sobrevivencia fue necesario estandarizar las células viables de la cepa de *Streptococcus oralis* a una cuenta microbiana de 10^6 UFC/mL, ya que se sabe que a esta concentración se encuentra dicho microorganismo en la cavidad oral en estado de enfermedad (Darout *et al.*, 2002). Se reinoculó el patógeno como se describió en la sección 6.1.1., de dicho cultivo se tomaron 100 μ L y se inocularon nuevamente en 5 mL de caldo BHI, el cual se incubó a 37°C, durante 4 horas (Tiempo 0).

Pasado este tiempo se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm, y de acuerdo a la lectura se realizaron las diluciones necesarias para llevar el cultivo a un DO de 0.01 con el objetivo de estandarizar la cuenta microbiana ya que esta densidad se asocia con una concentración de bacterias de 10^6 UFC/mL.

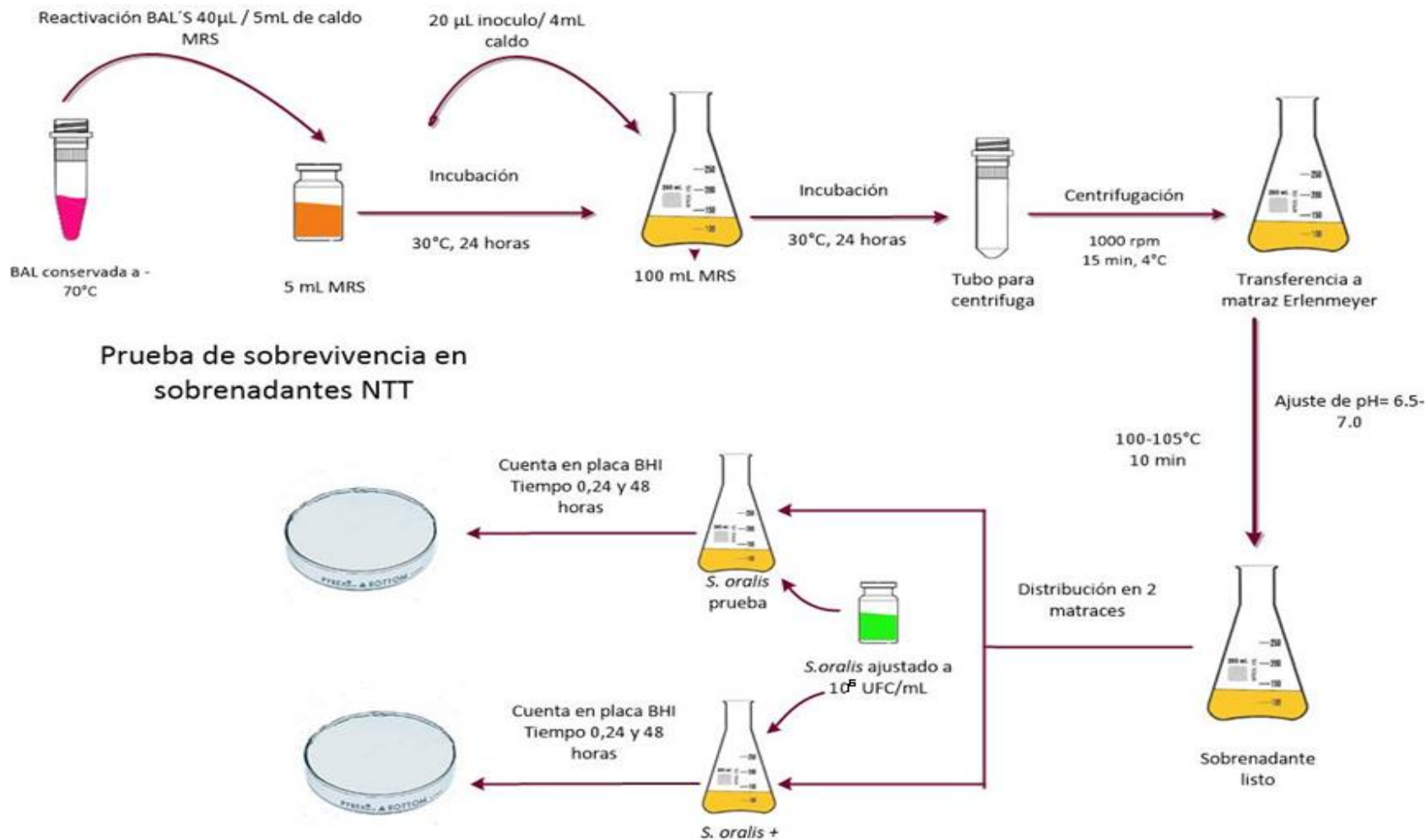


Figura 24. Esquematzación de la metodología empleada para la obtención del sobrenadante tratado térmicamente y neutralizado (NTT) para posteriormente usarlo al estudiar la sobrevivencia de *S. oralis* en presencia de ellos.

7. Resultados

7.2 Inhibición de bacterias patógenas presentes en alimentos y en cavidad oral

7.2.1 Reactivación de cepas

Se reactivaron satisfactoriamente las 37 cepas de *Streptococcus* (Tabla 6.1). Las cepas reactivadas fueron Gram-positivas, de morfología cocoide, colonias convexas de color blanco y cremosas, y utilizadas en las primeras pruebas de actividad antimicrobiana.

De igual forma se reactivaron y conservaron a los patógenos orales y de alimentos utilizados como cepas indicadoras en cada una de las pruebas.

7.2.2 Pruebas de difusión en agar

Los resultados de la prueba de difusión para las 37 cepas de *Streptococcus* se muestran en la Tabla 7.3 para *Listeria monocytogenes*, y en las Tablas 7.1 y 7.2 para los patógenos presentes en alimentos y cavidad oral y en las Figuras 26 y 27 se muestran los halos para algunas de estas pruebas. Con los resultados de esta prueba se observaron halos de inhibición translucidos, lo cual indicó que la actividad antimicrobiana de las BAL fue de tipo bactericida. Ya que un halo opaco indicaría actividad bacteriostática (Daba *et al.* 1991).

La inhibición solo se observó frente a *Listeria monocytogenes* (Rodríguez-Morales, 2015) y *Streptococcus oralis*. De los sobrenadantes de las 37 cepas, 19 (51.35%) de ellos presentaron inhibición frente a *Listeria monocytogenes*. De esas 19 cepas, dos presentaron halos opacos. El halo de mayor radio fue de 1.55 cm perteneciente a la cepa A45208, y el halo más pequeño, de 0.55 cm, perteneciente a las cepas 25233 y 15133.

Del total de cepas que presentaron inhibición, el 42.10% presentaron halos de entre 0.50 cm y 1.00 cm. El resto presentaron halos mayores a 1.00 cm. En comparación con trabajos previos (Tavera, 2010), se observa que las cepas del género *Streptococcus* presentaron una mayor inhibición de la cepa indicadora, *Listeria monocytogenes*.

Ninguna cepa de *Streptococcus* aislada del pozol inhibió el crecimiento de *S. aureus*, *E. coli* 0157: H10, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y de *B. cereus*, siendo estas las bacterias patógenas y de descomposición presentes en alimentos. Sin embargo, anteriormente se reportó inhibición

frente algunas de estas bacterias (Tavera, 2010) como lo fue para *S. aureus*, la cepa 30 de BAL inhibió su crecimiento con un tamaño de halo entre 0.1 y 0.3 cm, para *B. cereus*, el mismo autor reportó inhibición por parte de otra cepa de BAL, reportando de igual forma un halo entre 0.1 y 0.3 cm, estas dos cepas: *S. aureus* y *B. cereus* pertenecen al grupo de las bacterias Gram positivas. En cuanto a las bacterias pertenecientes al grupo de las Gram negativas 4 cepas de BAL (4, 58, 60 y 62) presentaron actividad antimicrobiana frente a *P. mirabilis* presentando un halo entre 0.1 y 0.3 cm. Finalmente para *E. coli*, 0157: H10 no se presentó actividad antimicrobiana por parte de las BAL probadas en ese estudio.

De igual forma para *P. aeruginosa*, al igual que las bacteria anteriores no se observó inhibición por parte de los sobrenadantes de las BAL aisladas del pozol; esto puede deberse a que dicha bacteria posee diversos mecanismos de resistencia a antimicrobianos, estos pueden ser divididos en intrínsecos y adquiridos, entre los intrínsecos se encuentran la impermeabilidad relativa de su membrana celular, la cual es de 12 a 10 veces menos permeable que la membrana celular de *E. coli*, lo anterior está dado por el reducido número de porinas que permiten el paso de moléculas con peso molecular elevado, siendo la mayoría de sus porinas impermeables a las moléculas grandes (Montell, 2012).

Son pocos los casos en los que se da una inhibición hacia bacterias Gram negativas, como lo es el caso de la bacteriocina L23 producida por *Lactobacillus fermentum* L23, que logró inhibir el crecimiento de *E. coli*, *P. vulgaris* y *K. pneumoniae* (Pascual *et al.* 2008); así como el caso de la nisina A y mutacina B-Ny266, con actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter*, *Haemophilus* y *Neisseria* (Riley y Wertz, 2002).

En cuanto a los patógenos de cavidad oral, de las 37 cepas probadas, 11 cepas (29.72%) (Tabla 7.1) inhibieron a *Streptococcus oralis* (Figura 25 y 26) siendo ésta utilizada como bacteria indicadora para las siguientes pruebas cuando se dio tratamiento a los sobrenadantes. Para esta bacteria se presentaron halos de inhibición entre 0.60 cm y 1.50 cm y halos transparentes que indican actividad bactericida (Dabba *et al.* 1991).

El crecimiento de las cepas sensibles se observó como un césped en todo el medio de cultivo, lo cual facilitó la observación de los halos de inhibición bien definidos, además de que dichos halos no presentaron ningún tipo de crecimiento dentro de ellos. Por otra parte, de las

cepas probadas ninguna inhibió a *Streptococcus mutans* ni a *Streptococcus sanguinis* esto pudo deberse a que estas bacterias producen una biopelícula la cual ayuda a que se fijen y que sean resistentes a ciertos antimicrobianos (Herzberg et al, 1982; Little et al, 1978.).

Las posibles bacteriocinas de las cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol no presentaron inhibición frente a las bacterias pertenecientes al grupo de las Gram negativas, debido a que la gran mayoría de las bacteriocinas solo presentan actividad frente a bacterias similares a las que las producen (Monrroy et al, 2009; Zacharof et al, 2012). La actividad antimicrobiana de las posibles bacteriocinas dependerá de qué clase de bacteriocina se trate, ya que de acuerdo a las clasificaciones hay bacteriocinas que requieren de alguna otra sustancia para aumentar su actividad, así como hay otras que solo tienen actividad frente a bacterias de la misma especie o género (Monrroy et al, 2009; Zacharof et al, 2012). Por otro lado, cabe resaltar que las bacteriocinas son sensibles a enzimas proteolíticas que pueden ser sintetizadas tanto por las cepas productoras, como por la bacteria sensible (el cual puede ser caso para *P. aeruginosa*). La evidencia sugiere que existe degradación proteolítica de bacteriocinas, y que ésta es causante de que las bacterias sensibles “renazcan” (Kouakou et al. 2010).

Tabla 7.1 Sobrenadantes sin tratamiento de cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol que presentaron actividad antimicrobiana sobre *Streptococcus oralis*

<i>Cepa</i>	<i>Clave</i>	<i>Halo (cm)</i>	<i>Observaciones</i>
15220	X	1.05±0.07	Halo transparente
25124	β	0.72±0.10	Halo transparente
A45226	Y	0.67±0.10	Halo transparente
25245	L	0.80±0.28	Halo transparente
25137	Ñ	0.97±0.17	Halo transparente
A37103	P	0.85±0.07	Halo transparente
15125	V	1.29±0.05	Halo transparente
A57103	W	1.2±0.07	Halo transparente
A46113	Z	1.07±0.10	Halo transparente
A47212	.	1.10±0.07	Halo transparente
A45201	*	1.45±0.07	Halo transparente

Cepa 25137 (Ñ)

Cepa A37103 (P)



Cepa 15125 (V) y Ceba A57103 (W)

Cepa A46113 (Z) y Ceba A47212 (.)

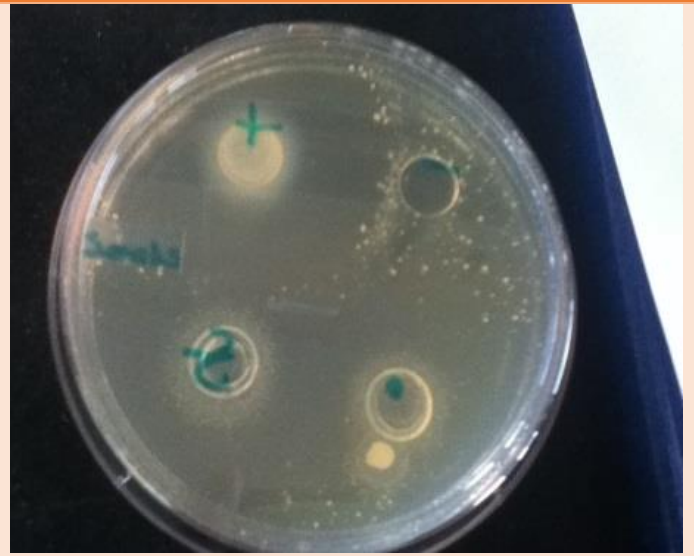


Figura 25. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes sin tratamiento de cepas de *Streptococcus* frente a *Streptococcus oralis* (prueba de difusión en agar). Para todos los casos Arriba-izq: control positivo + (antibiótico), Arriba-der: control - (agua destilada estéril).

Cepa A45201 (*)



Cepa 15220 (X) y Ceba A45226 (Y)



Cepa 25124 (β)

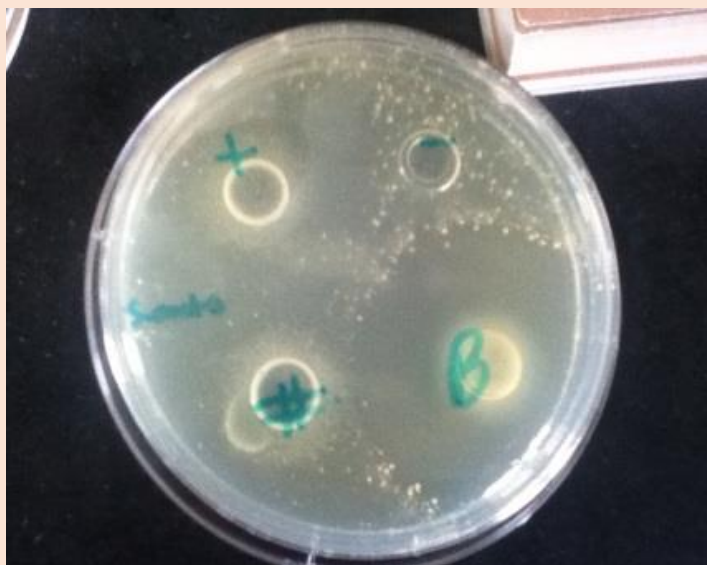


Figura 26. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes sin tratamiento de cepas de *Streptococcus* frente a *Streptococcus oralis* (prueba de difusión en agar). Para todos los casos Arriba-izq: control positivo + (antibiótico), Arriba-der: control - (agua destilada estéril).

7.2.2.1 Resultados prueba de difusión en agar con SNTT

De los sobrenadantes de las 19 cepas que presentaron inhibición frente a *Listeria monocytogenes* en la prueba con el sobrenadante sin tratamiento, solo 17 (89.47%), después de ser neutralizados y sometidos a un tratamiento térmico, presentaron halo de inhibición translúcido (Tabla 7.3). En cuanto a los patógenos presentes en alimentos no se tiene inhibición para ninguna bacteria indicadora, en cuanto a los patógenos de cavidad oral, de las 11 cepas (29.72%) que presentaron actividad antimicrobiana solo 1 (9.09 %) presentó actividad después de este tratamiento (Tabla 7.2). Esto indica que los compuestos liberados por las BAL al medio, sean posibles bacteriocinas, son termoestables y además, la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* y *S. oralis* no se debe a los ácidos orgánicos ni a la acidez del medio (Tavera, 2010).

Tabla 7.2. Actividad antimicrobiana de cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol con tratamiento térmico y neutralización frente a *Streptococcus oralis*

Cepa	Clave	pH inicial	pH final	Halo (cm)	Observaciones
15220	A	4.10	7.20	-	-
25124	B	4.28	8.00	-	-
A45226	C	4.33	7.61	0.64±0.01	Halo transparente
25245	D	4.40	6.83	-	-
25137	E	4-40	7.45	-	-
A37103	F	5.65	7.70	-	-
15125	G	4.36	7.23	-	-
A57103	H	4.24	7.72	-	-
A46113	I	4.32	6.96	-	-
A47212	J	4.30	7.17	-	-
A45201	K	4.34	7.26	-	-

- Sin presencia de actividad

Tabla 7.3 Resultados para la prueba de difusión en agar contra *Listeria monocytogenes* usando los sobrenadantes sometidos a los diferentes tratamientos

Cepa	Sobrenadante sin neutralizar y sin tratamiento térmico			Sobrenadante neutralizado (pH aprox. 7.0) y sometido a tratamiento térmico (110°C, 10 min)				Sobrenadante neutralizado (pH aprox. 7.0) y sometido a tratamiento térmico (110°C, 10 min) y concentrado aprox. 60%			
	Halo (Radio en cm)	Halo (Radios en cm)	Observaciones	pH	Halo (Radios en cm)	Halo (Radios en cm)	Observaciones	pH	Halo (Radios en cm)	Halo (Radios en cm)	Observaciones
Control positivo (cepa 1)	1.55	1.55	Halo transparente	-	1.40	1.45	Halo transparente	-	1.55	1.55	Halo transparente
15133	0.60	0.55	Halo transparente	7.03	1.00	1.00	Halo transparente	7.09	1.00	1.00	Halo transparente
15124	0.75	0.70	Halo transparente	7.33	0.75	0.75	Halo transparente	7.21	0.85	0.85	Halo transparente
25124	0.80	0.80	Halo transparente	7.34	0.60	0.65	Halo transparente	7.02	-	-	-
A56203	1.25	1.05	Halo transparente	7.29	1.10	1.10	Halo transparente	7.00	0.90	0.90	Halo transparente
A57206	0.80	0.80	Halo transparente	7.65	0.60	0.60	Halo transparente y presencia de algunas colonias	7.00	-	-	-
A56208	1.30	1.30	Halo transparente	7.05	1.00	1.00	Halo transparente y presencia de algunas colonias	7.03	1.05	1.10	Halo transparente y presencia de algunas colonias
A45226	1.15	1.10	Halo transparente	7.09	1.00	0.95	Halo transparente y presencia de algunas colonias	7.00	0.90	0.95	Halo transparente
A45208	1.55	1.55	Halo transparente	7.90	1.40	1.40	Halo transparente y presencia de algunas colonias	7.05	1.45	1.50	Halo transparente
A37103	1.25	1.25	Halo transparente	8.2	1.30	1.35	Halo transparente y presencia de algunas colonias	7.03	1.45	1.40	Halo transparente
A57103	1.00	0.90	Halo transparente	7.80	0.95	0.95	Halo transparente y presencia de algunas colonias	7.00	-	-	-
A36111	1.35	1.35	Halo transparente	6.92	1.20	1.25	Halo transparente y presencia de algunas colonias	7.00	1.25	1.25	Halo transparente
A56201	1.15	1.20	Halo transparente	7.14	1.10	1.10	Halo transparente y presencia de algunas colonias	7.02	1.00	1.00	Halo transparente
15319	1.30	1.25	Halo transparente	7.28	1.25	1.25	Halo transparente y presencia de algunas colonias	7.05	1.00	1.00	Halo transparente
25109	0.60	0.60	Halo opaco y presencia de algunas colonias	6.97	0.65	0.70	Halo opaco	7.00	-	-	-
25233	0.55	0.60	Halo transparente	6.90	0.80	0.75	Halo opaco	7.00	-	-	-
A45212	1.35	1.35	Halo transparente	7.75	1.40	1.35	Halo transparente	7.00	1.30	1.30	Halo transparente
A36202	1.00	1.00	Halo transparente	6.91	1.00	0.95	Halo transparente	7.00	1.00	1.00	Halo transparente

Tomado y modificado de Morales-Rodríguez, 2015.

7.2.2.2 Resultados prueba de difusión en agar con los Sobrenadantes neutralizados, tratados térmicamente y concentrados (SNTTC)

Los resultados utilizando los SNTTC para la prueba de difusión en agar contra *Listeria* se muestran en la Tabla 7.3, los 17 SNTTC que fueron probados, 12 (70.58%) de ellos mostraron actividad antimicrobiana bactericida. Algunas de las cepas presentaron un aumento en los halos de inhibición, esto debido al efecto de la concentración. En trabajos previos se ha observado que cepas del género *Lactococcus lactis* producen bacteriocinas capaces de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* al igual que algunas cepas de *Streptococcus* sp, utilizando sus compuestos antimicrobianos en una película comestible a base de caseinato (Macwana, 2012; Mendoza-Mendoza, 2013; Gómez, 1997).

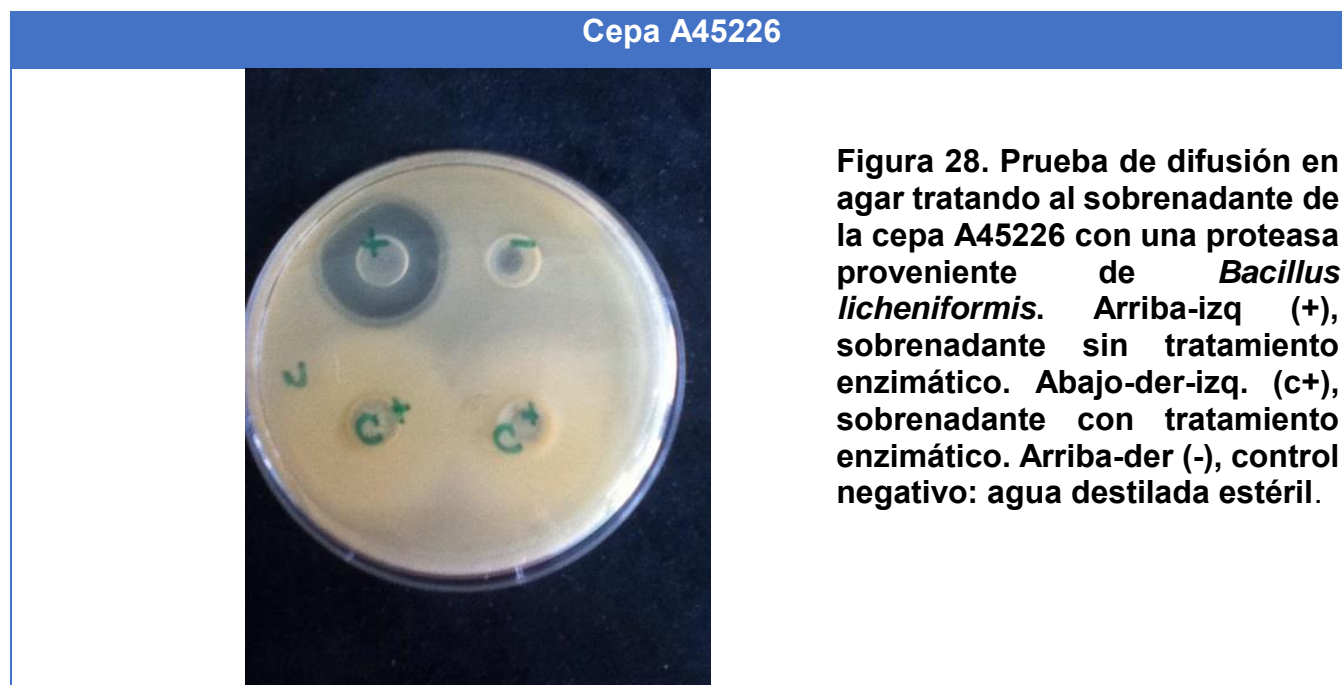
Después de concentrar el sobrenadante de la cepa A45226 que inhibió a *Streptococcus oralis* se perdió la acción antimicrobiana ya que posiblemente se trate de una bacteriocina que no es estable a diversos tratamientos térmicos y por este motivo, después de concentrar, se pierde la actividad deseada (Figura 27).



Figura 27. Abajo-izq (C).Actividad antimicrobiana del sobrenadante con tratamiento térmico y neutralización frente a *Streptococcus oralis*. Abajo-der: control negativo, Arriba-der: control positivo (antibiótico) (prueba de difusión en agar).

7.2 Prueba de difusión en agar con los sobrenadantes tratados enzimáticamente

Para llevar a cabo esta prueba se siguió con la metodología anteriormente descrita en la sección 6.2.3.1 para las prueba de difusión en agar, se utilizaron los sobrenadantes de las BAL que tienen actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus oralis*, los sobrenadantes a tratar enzimáticamente fueron los concentrados, y en el caso de que se perdiera la actividad antimicrobiana después de este tratamiento como se reporta en le Tabla 7.4 se realizaría la prueba en los sobrenadantes únicamente tratados térmicamente y neutralizados para corroborar actividad, esto debido a que al concentrar se expone por un largo periodo de tiempo el sobrenadante a un tratamiento térmico, el cual puede afectar la estructura de las posibles bacteriocinas presentes.



Una vez realizada esta prueba se obtuvo que de los 17 sobrenadantes, los cuales presentaron actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* se encontraron sustancias antimicrobianas de origen proteico, ya que se observó la inactivación completa del agente antimicrobiano después del tratamiento enzimático (Bayoub *et al*, 2010) (Figuras 29 a 32).

Para el sobrenadante que presentó actividad antimicrobiana frente a *S. oralis*, de igual forma se corroboró la presencia de una sustancia antimicrobiana de origen proteínico que inhibió el crecimiento de este microorganismo (Figura 28), el sobrenadante utilizado en esta prueba únicamente se le trató térmicamente y se neutralizó.

Tabla 7.4 Sobrenadantes de las BAL Concentrados y tratados térmicamente (CNTT) o Neutralizados y tratados térmicamente (NTT) utilizados para la prueba enzimática frente a *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus oralis*

Sobrenadante	Sobrenadante NTT	Sobrenadante CNTT
15133		✓ *
15124		✓ *
25124	✓ *	
A56203		✓ *
A57206	✓ *	
A56208		✓ *
A45226		✓ *, +
A45208		✓ *
A37103		✓ *
A57103	✓ *	
A36111		✓ *
A56201		✓ *
15319		✓ *
25109	✓ *	
25233	✓ *	
A45212		✓ *
A36202		✓ *

✓ indica que tratamiento realizado al sobrenadante y frente a que microorganismo indicador presento actividad antimicrobiana, se marca con el símbolo * la actividad frente a *Listeria monocytogenes*, y con el símbolo + la actividad frente a *Streptococcus oralis*

Esto nos permite indicar que las cepas 15133, 15124, 25124, A56203, A57206, A56208, A45208, A37103, A57103, A36111, A56201, 15319, 25109, A45212, pertenecientes a la especie *S. bovis*, *S. infantarius*, producen sustancias antimicrobianas de origen proteínico, las cuales posiblemente se traten de bacteriocinas, al igual que las cepas A45226, A45212 y A36202 que

corresponde a las especies *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus*, respectivamente.

La clasificación de Kemperman, *et al*; (2003) para las bacteriocinas indica que la clase II, son péptidos activos contra *Listeria*, por lo cual podemos decir que los sobrenadantes de las cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol, que producen sustancias antimicrobianas de origen proteico e inhiben a *Listeria monocytogenes*, pueden pertenecer a este grupo de bacteriocinas.

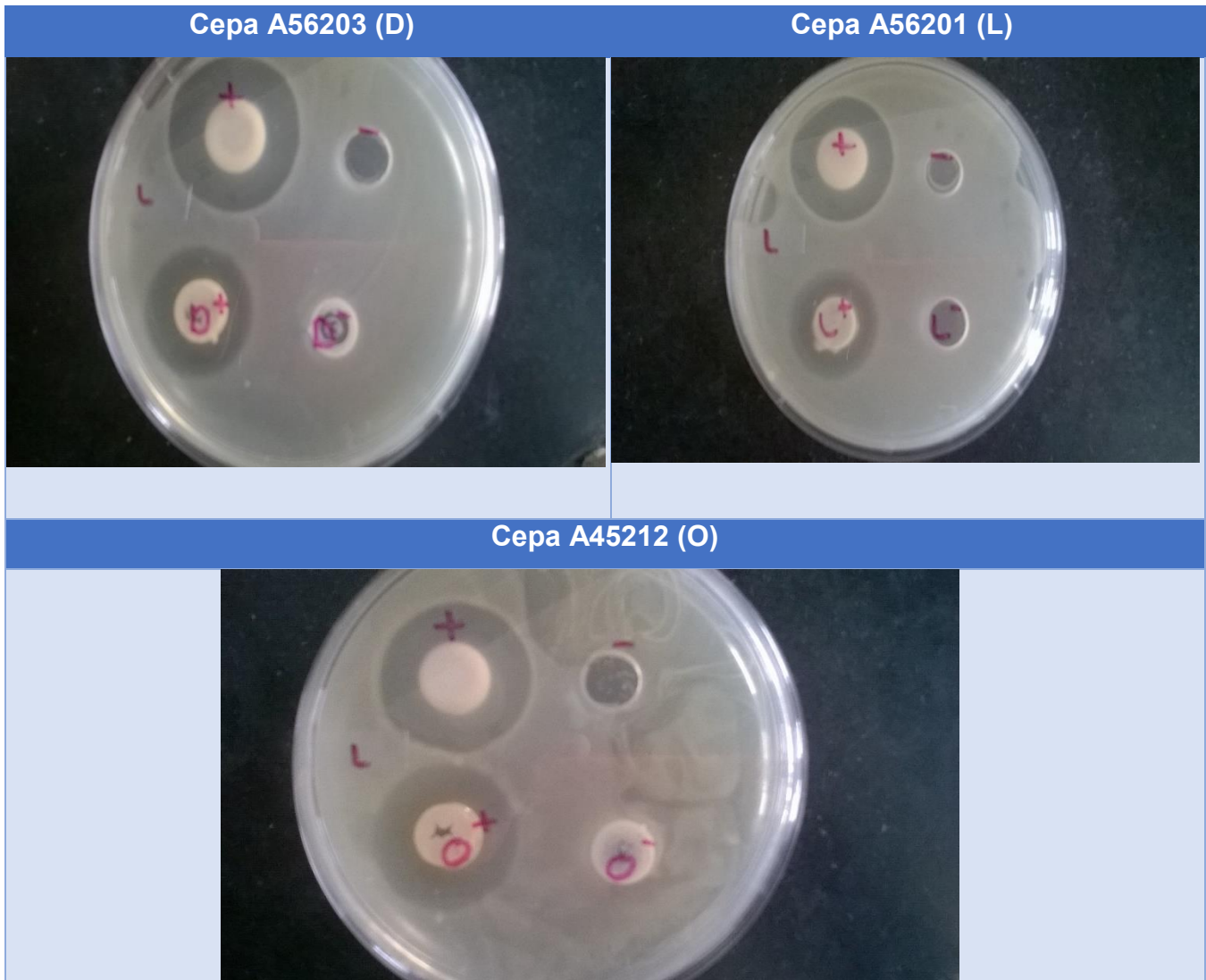


Figura 29. Prueba de difusión en agar tratando los sobrenadantes con una proteasa proveniente de *Bacillus licheniformis*. Para todos los casos Arriba-izq: control positivo + (antibiótico), Arriba-der: control – (agua destilada estéril), Abajo-der: sobrenadante con tratamiento enzimático, Abajo-izq: sobrenadante sin tratamiento enzimático.

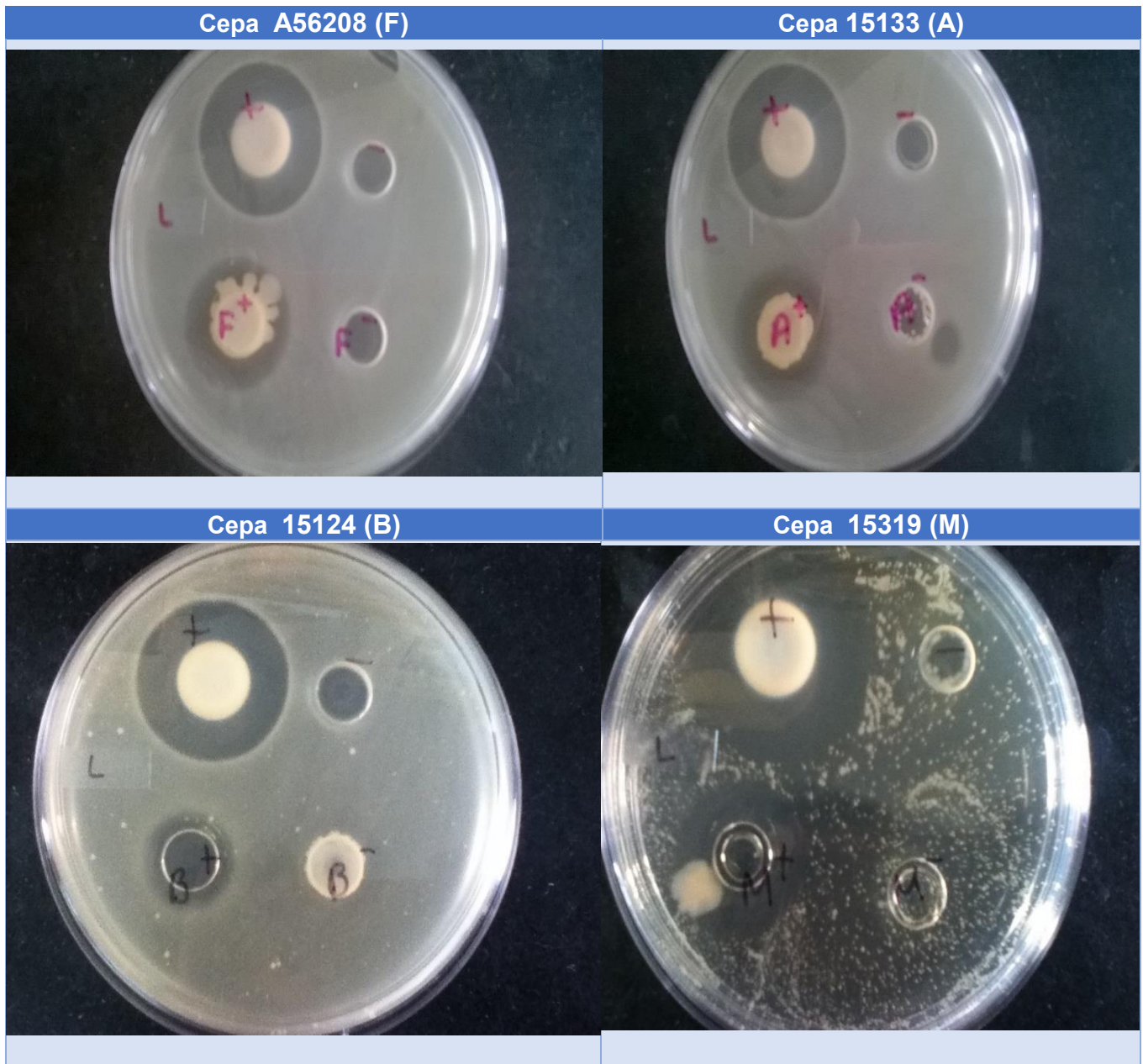


Figura 30. Prueba de difusión en agar tratando los sobrenadantes de cepas de BAL con una proteasa proveniente de *Bacillus licheniformis*. Para todos los casos Arriba-izq: control positivo + (antibiótico), Arriba-der: control – (agua destilada estéril), Abajo-der: sobrenadante con tratamiento enzimático, Abajo-izq: sobrenadante sin tratamiento enzimático.

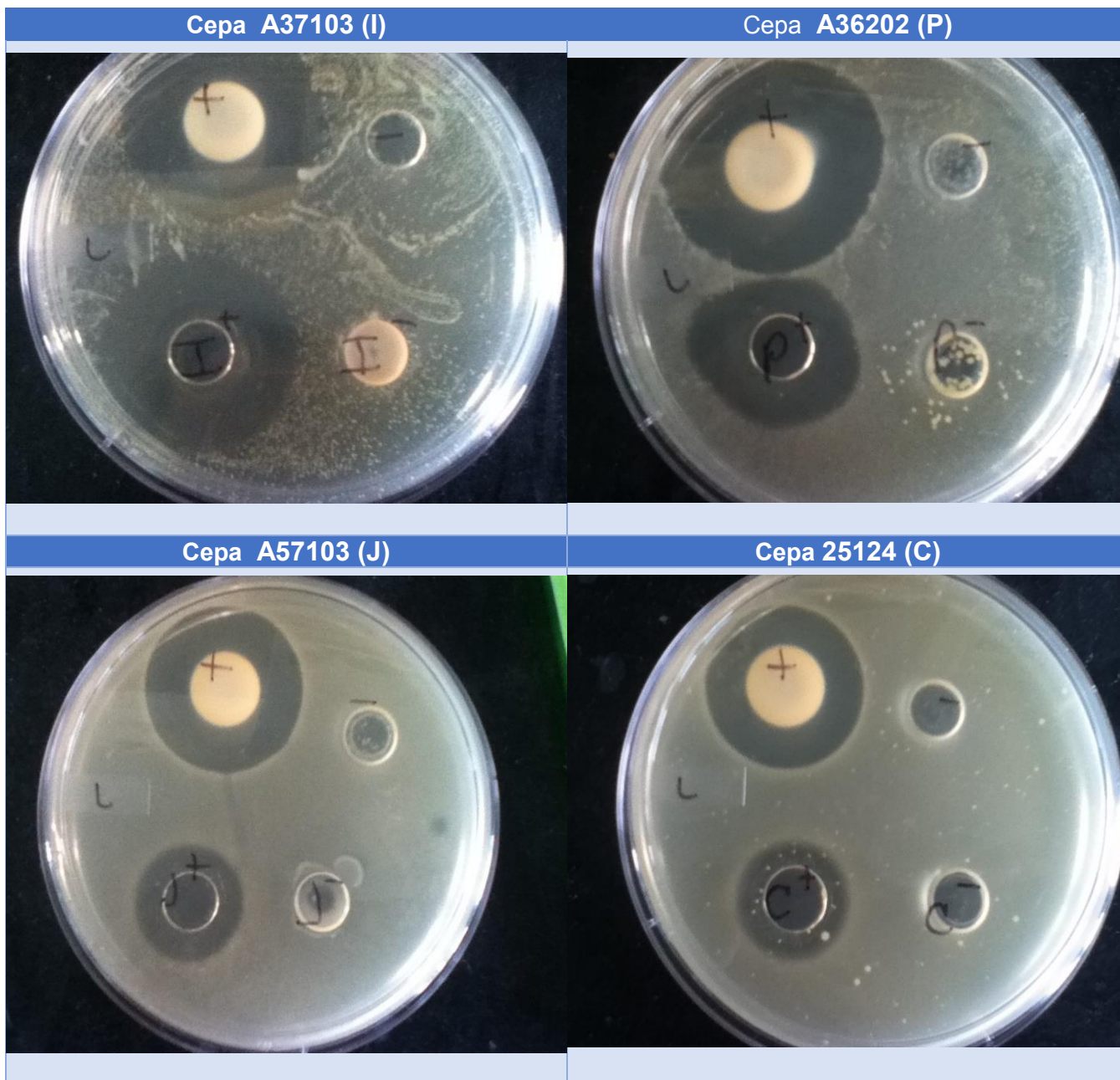


Figura 31. Prueba de difusión en agar tratando los sobrenadantes de cepas de BAL con una proteasa proveniente de *Bacillus licheniformis*. Para todos los casos Arriba-izq: control positivo + (antibiótico), Arriba-der: control - (agua destilada estéril), Abajo-der: sobrenadante con tratamiento enzimático, Abajo-izq: sobrenadante sin tratamiento enzimático.

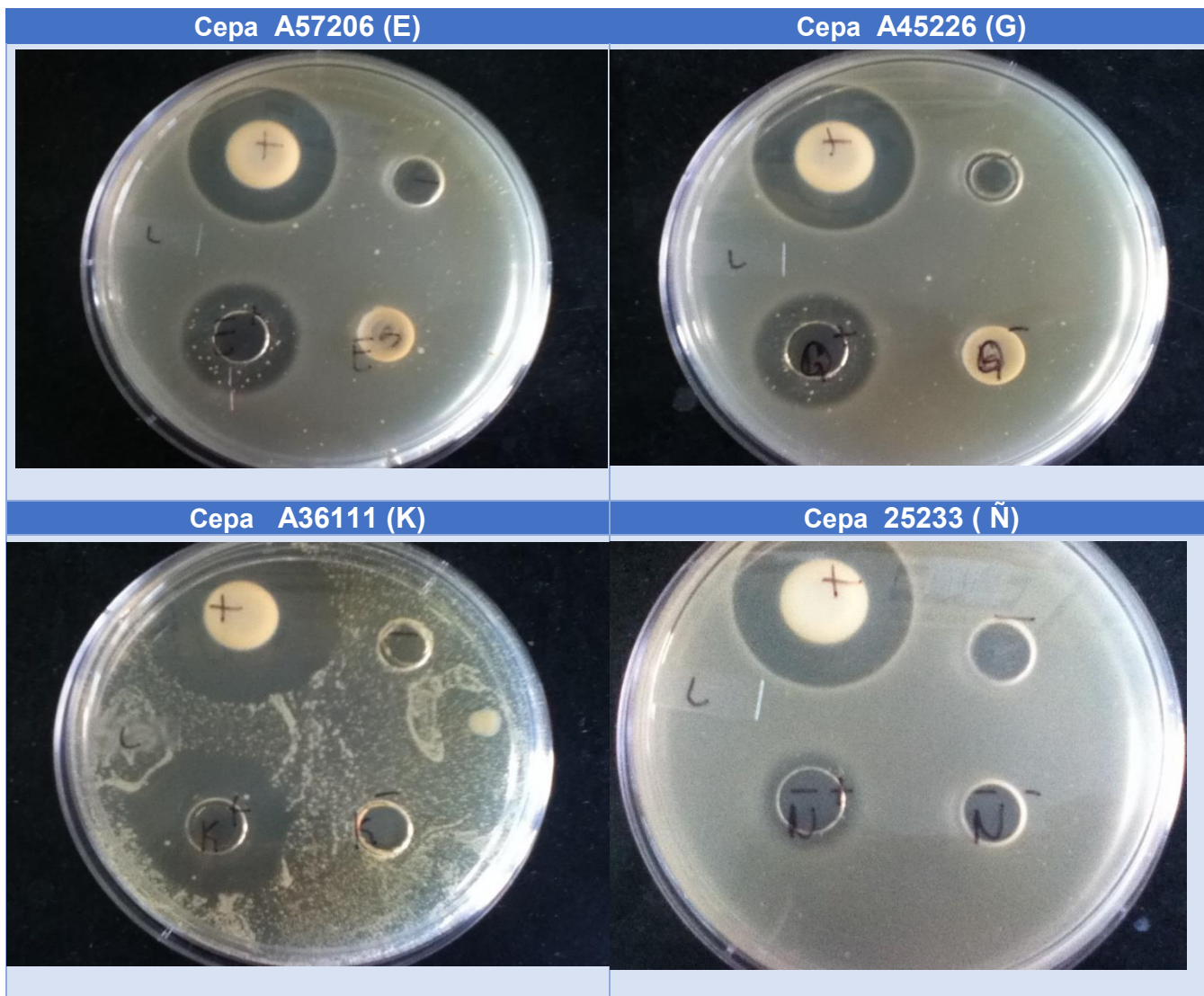


Figura 32. Prueba de difusión en agar tratando los sobrenadantes de cepas de BAL con una proteasa proveniente de *Bacillus licheniformis*. Para todos los casos Arriba-izq: control positivo + (antibiótico), Arriba-der: control - (agua destilada estéril), Abajo-der: sobrenadante con tratamiento enzimático, Abajo-izq: sobrenadante sin tratamiento enzimático.

7.2 Efecto de los SNTT (Sobrenadante neutralizado y tratado térmicamente) sobre la viabilidad de *S. oralis*

La bacteria patógena a probar, en este caso *S. oralis* con 4 horas de incubación fue utilizada como se indicó en las secciones 6.2.4.1 y 6.2.4.2.

Las curvas de crecimiento obtenidas para *S. oralis* utilizando el SNTT de la cepa 45226 se muestra en la Figura 34.

Como se puede observar en la curva de crecimiento de *S. oralis* (Figura 34), el sobrenadante correspondiente a la cepa A45226 no inhibió por completo el desarrollo de esta bacteria patógena. Lo que se observa es una inhibición parcial, es decir que el crecimiento del patógeno en los sobrenadantes es de aproximadamente tres ciclos logarítmicos más bajos con respecto al control positivo, lo cual podría indicar un efecto bacteriostático.

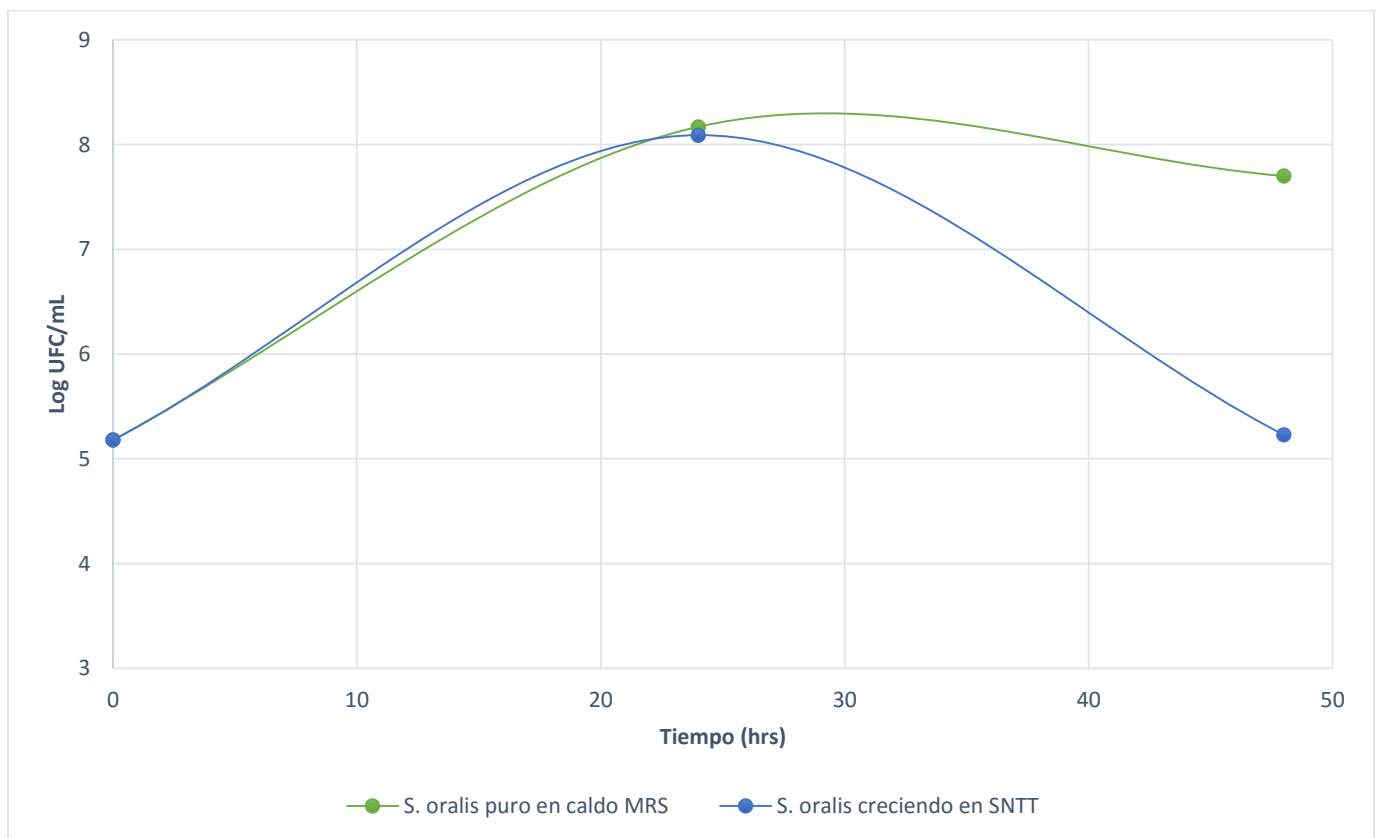


Figura 33. Sobrevivencia de *Streptococcus oralis* en presencia de los SNTT de la cepa A45226.

- La curva verde representa a la bacteria patógena creciendo en caldo MRS (*S. oralis* +)
- La curva azul representa a *S. oralis* creciendo en los SNTT de la cepa 45226

Podría pensarse que este efecto bacteriostático es debido a posibles bacteriocinas. Por lo cual, se debe recordar que el pH del sobrenadante una vez libres de células se ajustó con NaOH 1M a un valor de pH 6.5-7.0, para así poder descartar un posible efecto de los ácidos orgánicos como posibles inhibidores del crecimiento bacteriano (Vignolo *et al.* 1993; Vallejo *et al.* 2009). Aunque no fue total, se presentó una reducción en el crecimiento de dicha bacteria patógena, este efecto bacteriostático no está inducido por los ácidos orgánicos producidos por esta bacteria ácido láctica (cepa A45226). Cabe mencionar, que el tratamiento térmico realizado al sobrenadante no perjudicó dicha actividad.

La cepa A45226 pertenece a la especie *Streptococcus macedonicus*, el cual es un microorganismo productor de bacteriocinas (Georgalaki *et al.* 2012), ya que presentan una acción bacteriostática o bactericida contra otras bacterias Gram-positivas (De Vuyst y Vandamme, 1994). Se tienen reportes de que la cepa de *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 (Georgalaki *et al.* 2012), produce la bacteriocina denominada macedovicina perteneciente al grupo de los lantibióticos la cual presenta actividad antimicrobiana frente a dos diferentes especies de *Clostridium* (*Clostridium tyrobutyricum* y *Clostridium sporogenes*) y cuatro especies que causan infecciones en la cavidad oral: *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus salivarius*, lo cual coincide con los resultados mostrados previamente para la cepa de *Streptococcus macedonicus* aislada del pozol, ya que tiene actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus oralis*.

Dentro de la reducción del crecimiento producido por el sobrenadante NTT de la BAL en estudio sobre *S. oralis* (Figura 33) se puede observar que tuvo un efecto a las 48 horas, en el que logra reducir el crecimiento del patógeno a un valor mínimo, cabe recordar que el inóculo inicial se trata de ajustar a una cuenta microbiana de 10^6 UFC/mL, ya que se sabe que a esta concentración se encuentra dicho microorganismo en la cavidad oral en estado de enfermedad (Darout *et al.*, 2002).

Como ya se mencionó anteriormente, el sobrenadante NTT de la cepa A45226 parece ejercer un efecto bacteriostático sobre el patógeno de prueba. Este tipo de efectos (bacteriostáticos), aunque no son comunes, son también propios de las bacteriocinas. Se tienen reportes de algunas bacteriocinas, como lo es la ET05 y ET12 producidas por *Enterococcus faecium*, así como la ET06 sintetizada por *Lactobacillus curvatus*, que tienen la capacidad de

disminuir el crecimiento de diferentes especies de *Listeria* y *Enterococcus*, pero no los inhibe totalmente, e incluso, se observa reversibilidad entre las 24 y las 48 horas (Tomé *et al.* 2009).

8. Conclusiones

- ☪ De las 37 cepas estudiadas, 11 producen sustancias antimicrobianas, las cuales inhiben en cierta medida a *Streptococcus oralis* y no inhiben el crecimiento de *Streptococcus mutans* ni de *Streptococcus sanguinis*.
- ☪ De los 11 sobrenadantes de *Streptococcus* que tuvieron efecto antimicrobiano sobre *S. oralis* que se neutralizaron y que se les dio un tratamiento térmico, solo uno de ellos, el de la cepa A45226, mostró un efecto bactericida sobre el crecimiento de *Streptococcus oralis* después de 24 horas de incubación, en la prueba de difusión en agar.
- ☪ Las 37 cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol no inhiben el crecimiento de *S. aureus*, *E. coli* 0157: H10, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* ni de *B. cereus*.
- ☪ La mitad de las bacterias ácido lácticas de la colección evaluada y aisladas del pozol producen compuestos antimicrobianos, posibles bacteriocinas, los cuales inhiben el crecimiento de *Listeria monocytogenes*
- ☪ La mayoría de las posibles bacteriocinas liberadas por las cepas de *Streptococcus* sp. son estables a tratamiento térmico y presentan actividad antimicrobiana a pH entre 7.00 y 8.00.
- ☪ Se comprueba la naturaleza proteínica del sobrenadante de las cepas A45226, 15133, 15124, 25124, A56203, A57206, A56208, A45208, A37103, A57103, A3611, A56201, 15319, 25109, A45212, A45212 y A36202 al observar la pérdida de actividad antimicrobiana después del tratamiento del sobrenadante frente a una proteasa usando a *Listeria monocytogenes* como microorganismo sensible.
- ☪ De acuerdo con lo observado experimentalmente, con el método de difusión en agar se determinó la capacidad de producir sustancias antimicrobianas similares a bacteriocinas por las cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol.

☛ La cepa A45226 perteneciente a la especie *Streptococcus macedonicus* presenta un efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de *S. oralis* después de 48 horas, en el que logra reducir el crecimiento del patógeno a un valor mínimo, siendo éste solo un efecto bacteriostático y no bactericida ya que no lo inhibe completamente.

9. Perspectivas

- ☞ Ahondar en el estudio de las posibles bacteriocinas producidas por las BAL aisladas del pozol, ya sea por medio de otro tipo de pruebas con alguna otra enzima, así como pruebas genéticas, ensayos inmunológicos y diferentes pruebas biológicas.
- ☞ Buscar la concentración mínima inhibitoria de los sobrenadantes ya sea concentrados, neutralizados y con tratamiento térmico de las bacterias lácticas del pozol, suficientes para inhibir a *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus oralis*, con el propósito de observar si, de esta manera, el efecto bacteriostático y bactericida encontrado en este proyecto no es reversible a las 48 horas.
- ☞ Caracterizar, aislar y purificar las posibles bacteriocinas producidas por las BAL aisladas del pozol, con las cuales se observó un efecto antimicrobiano frente a los patógenos utilizados como bacterias indicadoras, y estudiarse fuera de una matriz tan compleja como lo es un alimento o un medio de cultivo.
- ☞ Las bacteriocinas aisladas, después de los debidos estudios toxicológicos, podrían utilizarse en la industria de los alimentos para mejorar la inocuidad y la calidad de los alimentos, desde productos lácteos hasta productos cárnicos.

10. Anexos

Anexo I. Reactivos

I.a. Solución salina 0.85%

Para preparar 100 mL de solución salina al 0.85% se pesaron 0.85 g de cloruro de sodio de la marca J.T. Baker®, en seguida, se colocaron en un matraz aforado de 100 mL y se agregó agua destilada hasta el aforo. Se homogenizó y posteriormente se llenaron viales con 4.5 mL de la solución preparada, en seguida se procedió a esterilizarlos con autoclave a 121°C y 1 atm de presión por 15 minutos. Finalmente, los viales con solución salina se sometieron a prueba de esterilidad a 30° durante 24 horas.

I.b. Hidróxido de sodio (NaOH) 1 M

Se prepararon 50 mL pesando 1.972 g de lentejas de hidróxido de sodio grado analítico de la marca Mallinckrodt AR®. Se colocaron en un matraz aforado de 50 mL y se homogenizó lentamente con agua destilada hasta total disolución. Se siguió agregando agua hasta el aforo, se agitó y finalmente se colocó la solución en un frasco ámbar etiquetado.

I.c. Clorhexidina al 0.2%

Se prepararon 50 mL tomando 5 mL de una solución de Clorhexidina en agua de la marca SIGMA al 20%. Se colocaron en un matraz aforado de 50 mL y se homogenizó lentamente con agua destilada. Se siguió agregando agua hasta el aforo, se agitó y finalmente se colocó la solución en un frasco debidamente etiquetado.

I.d. Enzima proveniente de *Bacillus licheniformis*

Proteasa de *Bacillus licheniformis* de la marca SIGMA P3910, usada para la determinación de fibra dietética.

I.e. Buffer Gly-NaOH (pH 9.0)

Se prepararon 50 mL de NaOH 0.2 M pesando 0.394 g de lentejas de hidróxido de sodio grado analítico de la marca Mallinckrodt AR®. Se colocaron en un matraz aforado de 50 mL y se homogenizó lentamente con agua destilada hasta total disolución. Se siguió agregando agua hasta el aforo, se agitó y finalmente se colocó la solución en un frasco ámbar etiquetado.

De igual forma se preparó 1 L de solución de Glicina 0.2 M pesando 15.01 g de Glicina para buffer grado analítico de la marca Mallinckrodt AR®. Se colocaron de igual forma en un matraz aforado de 50 mL y se homogenizó lentamente con agua destilada hasta total disolución. Se siguió agregando agua hasta el aforo, se agitó y finalmente se colocó la solución en un frasco etiquetado.

De las dos soluciones anteriores se toman 50 mL de la solución de Glicina y 8.8 mL de la solución de NaOH 0.2 M, las cuales se colocan en un matraz aforado de 200 mL y se lleva al aforo con agua destilada, se agita y se vierte en un frasco debidamente etiquetado, se mide el pH y se ajusta el pH a 9.0 con NaOH.

Anexo II. Medios de Cultivo

A continuación se enlistan los medios de cultivo empleados en la metodología (Sección 6) por orden de aparición.

II.a. Caldo de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) Difco®

Medio de cultivo base para el crecimiento, aislamiento y cuenta de lactobacilos.

Para prepararlo se suspendieron 55 g del polvo en 1 L de agua destilada. Se calentó con agitación frecuente hasta llegar a ebullición durante 1 minuto, con el fin de homogenizar perfectamente. Posteriormente se esterilizó a 121°C por 15 minutos. Finalmente, el medio se mantuvo en prueba de esterilidad a 30°C por 24 horas antes de usarlo (Tabla 10.1).

Tabla 10.1 Composición del medio MRS (55 gramos por litro)

Componente	Contenido (g)
Peptona de proteasa No. 3	10.0
Extracto de res	10.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	20.0
Polisorbato 80	1.0
Citrato de amonio	2.0
Acetato de sodio	5.0
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotásio	2.0

II.b. Medio tamponado placa (BHI)

Para preparar el medio BHI-T se disolvieron los componentes descritos en la Tabla 10.2 en 1L de agua destilada. El medio se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos, y posteriormente se colocaron aproximadamente 15 mL del medio en placas. Conservándolas a 30 °C durante 24 horas para comprobar la esterilidad del medio.

II.c. Sobrecapa tamponada (BHI)

El medio para la sobrecapa se preparó disolviendo los componentes mencionados en la (Tabla 10.2) en 1L de agua destilada. Una vez disueltos completamente en el agua, se colocaron 9 mL en tubos de ensaye con tapón de rosca y se esterizaron a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente se conservaron durante 24 horas a 30 °C para comprobar su esterilidad.

Tabla 10.2 Formulación de medio tamponado y sobrecapa de BHI (1000 mL)

Medio	Sobrecapa
BHI 37g.	BHI 15g.
Agar bacteriológico 17g.	Agar bacteriológico 8g.
Fosfato monobásico de potasio 4.3g.	Fosfato monobásico de potasio 4g.
Fosfato dipotásico 10g.	Fosfato dipotásico 10g.
Agua destilada 1000 mL.	Agua destilada 1000 mL.

II.d. Infusión-cerebro corazón (Brain-heart infusión, BHI) BBL®

Base para el cultivo de bacterias como *Estreptococos* y *Neumococos*, así como para el aislamiento de hongos.

Para preparar 1 L de medio se suspendieron 37 g del polvo y se mezclaron con agua destilada en un matraz Erlenmeyer. Se llevó a ebullición con agitación frecuente durante 1 minuto para disolver todos los componentes y posteriormente se esterilizó a 121°C por 15 minutos y 1 atm de presión (Tabla 10.3). El medio se sometió a prueba de esterilidad a 30°C por 24 horas antes de ser usado en las pruebas.

Tabla 10.3 Composición del medio BHI (37 gramos por litro)

Componente	Contenido (g)
Infusión de sólidos de cerebro	12.5
Infusión de sólidos de corazón de res	5.0
Peptona de proteasa	10.0
Glucosa	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato Di-sódico	2.5

II.f. Agar Bacto®

Agente solidificante con material extraño, partes pigmentadas y sales reducidas al mínimo.

Higroscópico

Para usar en la preparación de medios de cultivo sólidos.

11. Bibliografía

- ✓ Abdus M, Matsumoto N, Matin K, Tsuha Y, Nakao R, Hanada N, Senpuku H. (2004) Establishment of an animal model using recombinant NOD. B10. D2 mice to study initial adhesión of oral streptococci. *Clinic Diagnostic Laboratory Immunology*; 11: 379-386.
- ✓ Achi, O. K. (1990) Microbiology of “oiolor”: a Nigerian fermented non-alcoholic beverage. *Journal of Applied Bacteriology*. 69. 321-325.
- ✓ Alvarado C.: García Almendárez, B.E.; Martín, S.E. y Regalado, C. (2006) *Food-associated lactic acid bacteria with antimicrobial potential from traditional Mexican foods*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 48, Nos. 3-4, pp. 260-268
- ✓ Ampe, F.; Ben Omar, N.; Moizan, C.; Wachter, C. y Guyot, J.P. (1999) *Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexico Pozol, a Fermented Maize Dough, Demonstrates the Need for Cultivation-Independent Methods To Investigate Traditional Fermentations*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 12 pp. 5464-5473.
- ✓ Balciunas, E. M., Castillo, F.A., & Dimtrov Todorv, S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food control*, 32, 134-142.
- ✓ Bannerman T.L. (2003) *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase positive cocci that grow aerobically. En: Murray PR, Baron EJ, Jirgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of clinical microbiology*. 8th edition. *American and Environmental Microbiology*. 66:9, 3664-3673.

- ✓ Bayoub K., Mardad I., Ammar E., Serran A., Soukri A., (2010) Isolation and Purification of two Bacteriocins 3D Produced by *Enterococcus faecium* with Inhibitory Activity Against *Listeria Monocytogenes*. *Current Microbiology*.
- ✓ Ben Omar, N., y F. Ampe. (2000). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (9), 3664-3673.
- ✓ Brock T.D., Madigan M.T., Martinko J.M. y Parker J. (2003) *Biología de los microorganismos*. Ed. Pearson, Prentice Hall. 399, 738, 944, 948, 952-954.
- ✓ Brötz, H., Sahl, H. G., (2009) New insights into the mechanism of action of lantibiotics- diverse biological effects by binding to the same molecular target. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46 (1), 1-6.
- ✓ Cañas Urbina, A.O.; Bárzana García, E.; Owens, D.J; Wachter Rodarte, M.C. (1993) “Estudio de la variabilidad en los métodos de producción del pozol en los altos de Chiapas” en *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. Compilado por Wachter Rodarte, M. C y Lappe, P. Universidad Nacional Autónoma de México. Dirección Ggeneral de Publicaciones, pp. 69-74.
- ✓ Caplice E, Fitzgerald GF. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation *International Journal of Food Microbiology*. 50: 131-149.
- ✓ Carranza FA. *Periodontología Clínica*. 6 a. Ed. México: Interamericana; (1986), p. 383-92 17.

- ✓ Chen, H. y Hoover, D.G. (2003) Bacteriocins and their foods applications *Comprehensive Reviews in Food Science And Food Safety*, Vol. 2, Institute of Food Technologist.
- ✓ Cintas, L., Casaus, M., Herranz, C., Nes, L.F., & Hernández, P. (2001). Review. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*, 7(4), 281-305.
- ✓ Costerton, J. W. (1980) *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease, p. 15-24. In C. D. Sabath (ed.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland.
- ✓ Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3. 777–788.
- ✓ Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2013) Bacteriocins – A viable alternative to antibiotics?. *Nature Reviews of Microbiology*. 11: 95-105.
- ✓ Cox Lynton J. (1989) A perspective on listeriosis. *Institute of Food Technologists*. 43:12. 52-59
- ✓ Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J. F., Huang, J., Lacroix, C. (1991), Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (12), 3450-3455.
- ✓ Darout I. Albandar J, Skaug N, Ali R. (2002). Salivary microbiota levels in relation to periodontal status, experience of caries and miswak use in Sudanese adults. *Journal Clinical Periodontal*; 29: 411-420.

- ✓ De Vuyst L. y Leroy, F. (2007). *Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology; Vol. 13, pp.194-199
- ✓ De Vuyst L. y Vandame, E.J. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. Chapman & Hall, Ltd London, pp.91-142
- ✓ Deetae, P., Mounier, J., Bonname, P., Spinner, H.E., Irlinger, F. y Helinck S. (2009) Effects of *Proteus vulgaris* growth on the establishment of a cheese microbial community and on the production of volatile aroma compounds in a model cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1404-1413.
- ✓ Díaz-Ruiz, G., Guyot, J. P., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyot, J. and Wachter, C. (2003) Microbial and physiological characterization of weakly amyolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in Pozol, a Mexican fermented maize dough. *Applied and Environmental Microbiology* 69(8), 4367-4374.
- ✓ Doyle M.P. and Beuchat L.R. (2007) *Food Microbiology*. 3a Edition. ASM Press. Washington, DC. 249-250.
- ✓ Eslava C, Mateo J, Cravioto A. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Secretaria de Salud. México, 1994: 251.

- ✓ Jaramillo, D., Meléndez, A., & Sánchez, O. (2010). Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos y Bifidobacterias. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2, 193-209.
- ✓ Jay J.M. (1992) Microbiología Moderna de los alimentos. 3ra edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. 153-155, 299-335, 441-449, 462-465. 537-564 y 590-593.
- ✓ Johnson C, Tunkel A. Viridans Streptococci, Groups C and G Streptococci, and Gemella morbilorum (2005). En: Mandell Douglas, Bennett's, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; p. 2434–51.
- ✓ Georgalaki, M., Papadimitriou, K., Anastasiou, B., Pot, B., Van Driessche, G., Devreese, B. and Tsakalidou, E. (2012) Macedovicin, the second food-grade lantibiotic produced by Streptococcus macedonicus ACA-DC 198. *Food Microbiology*. 33. 124-130.
- ✓ Gomez, S., Cosson, C., Deschamps, A.M. (1997) Evidence for a bacteriocin-like substance produced by a new strain of Streptococcus sp., inhibitory to Gram-positive Food-borne pathogens. *Research in Microbiology*. 148: 757-766.
- ✓ Hardalo, C. & S. C. Edberg (1997). Pseudomonas aeruginosa: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23: 47-75.
- ✓ Hernández López, J.C. (2002) Caracterización parcial de la bacteriocina producida por Pediococcus parvulus MXVK133. Tesis de Maestría Universidad Nacional Autónoma de México.

- ✓ Herzbergz Marck C., Brinteenhafa L. K., Clausen C. C. (1983) Aggregation of Human Platelets and Adhesion of *Streptococcus sanguinis*. Infection and Immunity. 39 (3). p. 1457-1469.

- ✓ Kaiser, A. L., & Montville, T. J. (1996). Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. Applied and Environmental Microbiology, 62, 4529- 4535.

- ✓ Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O. & Kok, j. (2003). Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574, Appl Environ Microbiol, 69, 1589-1597.

- ✓ Klaenhammer T. R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 12 (1-3). 39–85.

- ✓ Kozak W., Bardowski J., Dobrzanski W. T. (1978) Lactostrepcins – acid bacteriocins produced by lactic streptococci. Journal of Dairy Research. 45 (2). 247–257.

- ✓ Kouakou, P.; Dortu, C.; Dubois-Douphin, R., Vandenbol, M. y Thonart, P. (2010) Plasmid associated bacteriocin production by *Lactobacillus* LMG21688 suppresses *Listeria monocytogenes* growth reborn in a food system. FEMS Microbiology Letters Vol. 306, pp.37-44

- ✓ Kuipers, O.P., Rollema, H.S., Beerthuyzen, M.M., Siezen, R.J. y de Vos, W.M. (1995) Proteins engineering and biosynthesis of nisin and regulation of the transcription of the structural *nisA* gene. International Dairy Journal., 5: 785-795.

- ✓ Lai, A. C., Tran, S., & Simmonds, R. S. (2002). Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *FEMS Microbiology Letters*, 215, 133 - 138.
- ✓ Lewus C.B., Sun S. and Montville. (1991). Production of an Amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 143-149
- ✓ Little Wayne A., Thompson A. Lynn., Biwen H. W. (1978) Antibiotic Susceptibility of *Streptococcus mutans*. Comparison of Serotype Profiles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 15 (3). p. 440-443
- ✓ Lugo, O. (2013). Caracterización de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus helveticus*. Tesis de Maestría. UAM Iztapalapa 74 páginas.
- ✓ Macwana, S., Muriana, P.M. (2012) Spontaneous bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* as a susceptibility screen for identifying different mechanism of resistance and modes of action by bacteriocins of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 88: 7-13.
- ✓ Menaker L, Morhart RE, Navia JM. Bases biológicas de la caries dental. España: Salvat; 1986. p.223-27.
- ✓ Mendez-Albores, J.A; Arámbula-Villa, G; Preciado-Ortiz, R.E y Moreno.Martinez E. (2004) Aflatoxins in pozol, a nixtamalized, maize-base food. *International Journal of Food Microbiology* Vol. 94, pp. 211-125
- ✓ Mendoza-Mendoza, B., Rodríguez-Hernández, A.-I., Vargas-Torres, A., Díaz-Ruiz, G., Montiel, R., Ramos-Aboites, H.-E., Castro-Rosas, J., Chavarría-Hernández, N. (2013)

Characterization of the effects on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in solid culture in contact with caseinate base edible films added with antilisterial activity from *Streptococcus* sp. ABMX isolated from Pozol, an indigenous Mexican beverage. *International Food Research Journal*. 20: 2917-2925.

- ✓ Miliotis Marianne D. y Bier Jeffrey W. (2003). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, Inc.
- ✓ Monroy M. C., Castro Barrera, T., Fernandez Oerrinom F. J., Mayorga Reyes, L. (2009) *Revision bibliografica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas*. *ContactoS*. 73. 63-72.
- ✓ Montell, M. (2012). *Prevalencia de infecciones por Pseudomonas aeruginosas y resistencia antimicrobiana en el Hospital General de México en el periodo 2010-2011*. Tesis de especialista en Infectología. Hospital General de México 25 páginas.
- ✓ Morales E. (2015), *Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género streptococcus aisladas del pozol*. Tesis de Licenciatura en revisión. Fac. Química. UNAM. 104 páginas.
- ✓ Muñoz-Rojas, J. (2003) *Bacteriocinas: una Estrategia de Competencia Microbiana Propuesta como alternativa de Antibioticos Dirigidos para el Futuro Humano*. Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México.

- ✓ Nuraida, L.; Wachter, M.C. y Owens, J.D. (1995) *Microbiology of pozol, a mexican fermented maize dough*. Word Journal of Microbiology and Biotechnology Vol. 11, pp. 567-571.
- ✓ Negroni M. (2009) *Microbiología estomatológica y guía práctica*, 2ª ed, Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 228.
- ✓ Newman HT. *La placa dental, placa y enfermedad*. 6 a. Ed. México: El manual moderno; 1982 .p. 59-71.
- ✓ Ogunmodede, F., Jones, J.L., Scheftel, J, Kirkland, E, Schulkin, J. y Lynfield, R. (2005) *Listeriosis prevention knowledge among pregnant women in the USA*. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology, March; 13(1): 11-15.
- ✓ Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 276: 139-144.
- ✓ Parra, R. A., (2012), Review. Bacterias acido lácticas: papel funcional los alimentos. Facultad De Ciencias Agropecuarias, Vol 8. No 1: 93-105. Colombia. pp. 93-105
- ✓ Pascual, L.M.; Giordano, W.; Pájaro, M.C. y Barberis, I.L. (2008) Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology* Vol. 56, pp. 397-402.
- ✓ Philips D, Martin M, Lewis M, Williams D. (2010) *Oral Microbiology*. Ed. Churchill Livingstone Elsevier, Quinta edición. Gran Bretaña. pp. 5-40.
- ✓ Ray, B. y Bhunia, A. (2008) “Microorganisms used in food fermentations”, “Biochemistry of some beneficial traits” “Food biopreservatives of microorganisms” y “Foodborne

infections” en *Fundamental Food Microbiology*, 4ª ed. CRC Press Estados Unidos, pp.99-106, 107-112, 178-185 y 283-293

- ✓ Rea M. C., Ross R. P., Cotter P. D., Hill C. (2011) Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. En: D. Drider y S. Rebuffat eds. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. New York:Springer. 29-53.
- ✓ Riley, M.A y Wertz, J.E (2002) Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annual Reviews of Microbiology* Vol. 56. Pp. 117-137
- ✓ Rivera Noriega, A. (2001) *Efecto de la acción de microorganismos amilolíticos en la fermentación del pozol*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- ✓ Rodríguez, C. (2011), Estudio sobre interacciones negativas de bacterias lácticas del pozol. Tesis de Licenciatura. Fac. Química. UNAM. 142 páginas.
- ✓ Ross RP, Morgan S y Hill C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*. 79: 3-16.
- ✓ Sainz, T; Wachter, C; Espinoza, J; Centurión, D.; Navarro, A.; Molina, J.; Cravioto, A.; Eslava, C. (2001) *Survival and characterization of Escherichia coli strains in a typical Mexican acid-fermented food*. *International Journal of Food Microbiology* Vol. 71, pp. 169-176
- ✓ Sainz, T., Perez, J., Villseca, J., Hernandez, U., Eslava, C., Mendoza, G., Wachter C. (2005) Survival to different acid challenges and outer membrane protein profiles of

pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pozol, a Mexican typical maize fermented food. *International Journal of Food Microbiology*. 105, 357-367.

- ✓ Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. (2005) Molecular analysis of human oral microbiota. *Journal Periodontal Research*; 40: 277-285.
- ✓ Savadogo, A., Ouattara C. A.T, Bassole I. H. N, Traore S. A. (2006), Bacteriocins and lactic acid bacteria- a mini review. *African Journal of Biotechnology*. 5 (9), 678-683.
- ✓ Soberón-Chávez G. & B Palmeros. (1994) *Pseudomonas* lipases: Molecular genetics and potential industrial applications. *Critical Rev. Microbiol*. 20: 95-105.
- ✓ Sosa V. y Zunino P. (2009). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat, *Applied and Environmental Microbiology*. 55, 1901-1906.
- ✓ Tagg, J. R., Dajani, A. S., & Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriology Reviews*, 40(3), 722–756. .
- ✓ Tavera, F. (2010), Producción de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol para la inhibición de bacterias patógenas. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química. UNAM. 105 páginas.
- ✓ Todar, K. (2001) “Lactic acid bacteria” en *Todar’s Online Textbook Of Bacteriology* (En línea) Estados Unidos. Disponible en:

<http://textbookofbateriology.net/lactics.html> (Consultado el 9 de Julio 2015)
- ✓ Tomé, E.; Todorov, S.D.; Gibbs, P.A. y Teixeira, P.C. (2009) Partial characterization of nine bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from cold-smoked salmon with activity against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnology* Vol. 23, No. 1 pp. 50-73

- ✓ Vallejo M, Etchechoury V, Horiszny C y Marguet E. (2009). Inhibición de *Escherichia coli* O157:H7 por cepas de *Lactobacillus* aisladas de queso Ovino, *Analecta Veterinaria*. 29; 1: 15-19.
- ✓ Vallejo, M.; Olivera, N.; Sequeiros, C. y Marguet, E. (2009) Actividad antilisteria de bacterias ácido lácticas aisladas de peces marinos. *Analecta Veterinaria* Vol.29, No. 2 pp. 19-23
- ✓ Vásquez, M., & Suárez, H. (2008). *Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne.*
- ✓ Vignolo, G.M.; Suriani, F.; Pesce de Ruiz Holgado, A. y Oliver, G. (1993) Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology* Vol. 75, pp. 344-349
- ✓ Vazquéz, G. (2013), Efecto antimicrobiano de ésteres de α -amirina y del ácido betulínico contra bacterias de la cavidad oral. Tesis de Licenciatura. Fac. De Química. UNAM. 129 páginas
- ✓ Wachter, C.; Cañas, A.; Cook, P.E.; Bárzana, 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. 269-27
- ✓ Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. Vol.51: pp.221-271.
- ✓ Zacharof, M. P. and Lovitt, R.W. (2012), Bacteriocins produced by lactic acid bacteria, a review article. *APCBEE Procedia* 2: 50-56.

- ✓ Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I., & Hamida, J. (2010). A New Structure-based Classification of Gram-positive Bacteriocins. *The Protein Journal*, 29(6), 432-439