



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**PRESENCIA Y SOBREVIVENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS EN EL ATOLE  
AGRIO DE VILLAHERMOSA, TABASCO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Q.A. ALICIA KARINA ESQUIVEL MEDINA

TUTOR PRINCIPAL  
DRA. MA. DEL CARMEN WACHER RODARTE  
(Facultad de Química)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA  
(Facultad de Química)

DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO  
(Instituto de Fisiología Celular)

MÉXICO, D. F. mayo, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente tesis de Maestría se llevó a cabo en el Laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte.

Muchas gracias a la Dra. Carmen Wachter, por ser una guía, por permitirme vivir tantas experiencias durante estos 6 años. Por compartir el amor a la microbiología y a nuestros alimentos y tradiciones. A la Dra. Gloria Díaz Ruiz y a Biol. Teresa Flores Espinosa por todo el apoyo técnico y consejos durante el proyecto.

Quiero agradecer a mi Comité Tutor: Dra. Amelia Farrés González Sarabia y Dra. Bertha González Pedrajo, por sus consejos, apoyo y opiniones compartidas durante el desarrollo del proyecto.

Agradezco a todos los sinodales por el tiempo dedicado a la lectura y las opiniones de la tesis.

Se agradece por el financiamiento al proyecto de Ciencia Básica de CONACYT CB-2008-01 No. 101784 “Metagenómica funcional de alimentos fermentados tradicionales de maíz: Búsqueda de enzimas de interés biotecnológico y estudio de la diversidad microbiana” y a su coordinadora Dra. Dolores Reyes Duarte. Así como a las profesoras Dora Centurión y Judith Espinoza, al equipo de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por sus atenciones, hospitalidad y nuevamente realizar un excelente trabajo en conjunto.

Se agradece también, al Proyecto MicroAndes (Microbiota of Andean Food: tradition for healthy products). A su coordinador, Dr. Pier Sandro Cocconceli. Especialmente, quiero agradecer al Dr. Atte von Wright, por haberme recibido en su equipo de trabajo en la Universidad del Este de Finlandia. A Kati Väkeväinen por sus atenciones y a Carmen Plumed Ferrer, por su hospitalidad y facilidades otorgadas durante el desarrollo de mi estancia en su país.

Agradezco al CONACYT por el apoyo otorgado a través de la beca CVU 508655.

Doy gracias al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, especialmente a Leticia García y a Adelina González.

Finalmente, al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por su apoyo para realizar una estancia en la Universidad del Este de Finlandia, así como la asistencia al XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería del 23 al 28 de junio 2013.

## INDICE

<b><u>INDICE DE TABLAS</u></b>	<b><u>IV</u></b>
<b><u>INDICE DE FIGURAS</u></b>	<b><u>VIII</u></b>
<b><u>RESUMEN</u></b>	<b><u>X</u></b>
<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>1. ANTECEDENTES</u></b>	<b><u>3</u></b>
<b>1.1 ALIMENTOS FERMENTADOS</b>	<b>3</b>
1.1.1 ALIMENTOS FERMENTADOS ALREDEDOR DEL MUNDO	3
<b>1.2 ALIMENTOS FERMENTADOS A BASE DE CEREAL</b>	<b>4</b>
<b>1.3 ALIMENTOS FERMENTADOS DE MAÍZ</b>	<b>9</b>
1.3.1 POZOL	9
1.3.2 ATOLE AGRIO	9
<b>1.2 BACTERIAS PATÓGENAS PRESENTES EN ALIMENTOS FERMENTADOS</b>	<b>12</b>
1.2.1 BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS	12
1.2.2 BACTERIAS GRAM-POSITIVAS ESPORULADAS	14
<b>1.3 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POR MÉTODOS FENOTÍPICOS</b>	<b>16</b>
1.3.1 IDENTIFICACIÓN MEDIANTE EL SISTEMA API®20E	17
<b>1.4 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POR MÉTODOS GENOTÍPICOS</b>	<b>18</b>
1.4.2 AMPLIACIÓN DEL ADN POLIMÓRFICO AL AZAR (RAPD)	20
1.4.2 REACCIÓN DEL ESPACIADOR TRANSCRIPCIONAL INTERNO 16S-23S	22
<b>1.5 CONDICIONES DE ESTRÉS ÁCIDO Y TÉRMICO EN LOS MICROORGANISMOS</b>	<b>22</b>
1.5.1 ESTRÉS ÁCIDO	23
1.5.2 ESTRÉS TÉRMICO	28
<b><u>2.JUSTIFICACIÓN</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b><u>3.HIPÓTESIS</u></b>	<b><u>35</u></b>
<b><u>4. OBJETIVOS</u></b>	<b><u>36</u></b>

<b>4.1 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>36</b>
<b>4.2 OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>36</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>38</b>
<b>5.1 DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO</b>	<b>38</b>
<b>5.2 CEPAS UTILIZADAS DURANTE EL ESTUDIO</b>	<b>39</b>
<b>5.3 ELABORACIÓN DEL ATOLE AGRIO</b>	<b>40</b>
<b>5.3 DETECCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS</b>	<b>40</b>
5.3.1 <i>SALMONELLA</i> SPP.	40
5.3.2 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	42
5.3.3 BACILOS ESPORULADOS AEROBIOS	43
<b>5.4 CONSERVACIÓN DE CEPAS</b>	<b>44</b>
<b>5.5 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS</b>	<b>45</b>
5.5.1 <i>SALMONELLA</i> SPP.	45
5.5.2 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	49
5.5.3 BACILOS ESPORULADOS AEROBIOS	54
<b>5.6 SOBREVIVENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS EN EL ATOLE AGRIO</b>	<b>55</b>
5.6.1 INOCULACIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EN EL ATOLE AGRIO	55
5.6.2 PRUEBAS DE SOBREVIVENCIA DE <i>E. COLI</i> A PH Y TEMPERATURA	57
5.6.3 PRUEBAS DE RETO DE PATÓGENOS FRENTE A BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL ATOLE AGRIO	58
<b>6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>62</b>
<b>6.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS</b>	<b>62</b>
6.1.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SPP.	62
6.1.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	68
6.1.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACILOS ESPORULADOS AEROBIOS	77
<b>6.2 SOBREVIVENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS EN EL ATOLE AGRIO</b>	<b>85</b>
6.2.1 PRUEBAS DE RETO CON <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM EN EL ATOLE AGRIO	85
6.3.2 PRUEBAS DE SOBREVIVENCIA DE <i>E. COLI</i> A PH Y TEMPERATURA	89
6.2.3 PRUEBAS DE RETO DE PATÓGENOS CONTRA BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL ATOLE AGRIO	96

<b><u>7. CONCLUSIONES</u></b>	<b>112</b>
<b><u>8. BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>114</b>
<b><u>9. ANEXOS</u></b>	<b>136</b>
<b>ANEXO I: PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO II: TINCIÓN DE GRAM</b>	<b>138</b>
<b>ANEXO III: PRUEBAS Y REACCIONES DE LAS TIRAS API20E®</b>	<b>139</b>
<b>ANEXO IVA: REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN</b>	<b>139</b>
<b>ANEXO IVB: REACTIVOS PARA EL GEL DE AGAROSA</b>	<b>140</b>
<b>ANEXO V: GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b>	<b>140</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales grupos de alimentos fermentados que se producen en el mundo .....	4
Tabla 2: Alimentos y bebidas más comunes hechos a base de maíz .....	11
Tabla 3: Cepas utilizadas para el estudio de las bacterias patógenas en el atole agrio de Villahermosa, Tabasco. ....	39
Tabla 4: Características de <i>Salmonella</i> spp. en los medios selectivos. ....	41
Tabla 5: Cebadores utilizados para la reacción ITS .....	47
Tabla 6: Cóctel de la reacción, método ITS.....	48
Tabla 7: Cebadores utilizados para la reacción RAPD.....	51
Tabla 8: Cóctel de la reacción, método RAPD. ....	51
Tabla 9: Cebadores utilizados para la reacción rRNA 16S .....	52
Tabla 10: Cóctel de la reacción, rRNA 16S.....	52
Tabla 11: Cebadores utilizados para la reacción PCR de la región V1 del gen rRNA 16S .....	54
Tabla 12: Cóctel de la reacción, rRNA 16S.....	54
Tabla 13: Bacterias ácido lácticas utilizadas para la prueba .....	59
Tabla 14: Características morfológicas de las colonias aisladas del atole agrio ...	63
Tabla 15: Reasignación de claves para las cepas aisladas del atole agrio .....	64
Tabla 16: Resultados De La Prueba Api 20E .....	65



Tabla 17: Características morfológicas de las colonias aisladas del atole agrio en el medio EMB .....	70
Tabla 18: Resultados De La Prueba Api 20E® .....	71
Tabla 19: Concentración de ADN de <i>E. coli</i> medida con nanodrop.....	72
Tabla 20: Resultados del BLAST para la identificación de las cepas de <i>E. coli</i> ....	75
Tabla 21: Características morfológicas de las colonias de bacilos esporulados aislados de la fermentación sólida. ....	78
Tabla 22: Características morfológicas de las colonias aisladas de bacilos esporulados de la fermentación líquida.....	78
Tabla 23: Asignación de claves nuevas para las cepas aisladas como Bacilos esporulados aerobios .....	80
Tabla 24: Identidad de las cepas de <i>Bacillus</i> sp. Aisladas del atole agrio.....	82
Tabla 25: Cuentas de <i>Salmonella</i> Typhimurium inoculadas en muestras de atole agrio sólido y líquido con diferentes tiempos de la fermentación e incubadas a 37°C. ....	86
Tabla 26: Resultados cuentas de crecimiento de <i>E. coli</i> a 35 °C y 80 °C.....	90
Tabla 27: Cuenta de sobrevivientes de 4 cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas del atole agrio después de un tratamiento térmico de 45, 55, 65 y 75 °C durante 10 minutos.....	91
Tabla 28: Valor D (minutos) para las diferentes cepas de <i>E. coli</i> a diferentes temperaturas .....	92
Tabla 29: Valor Z (°C) para las diferentes cepas de <i>E. coli</i> .....	93
Tabla 30: Cuentas de <i>E. coli</i> de las cepas aisladas del atole agrio sólido, inoculadas en agar Trypticase Soya Agar con el pH ajustado en 2 con HCl e incubadas durante 24 h.....	94

Tabla 31: Crecimiento por cuenta en placa en Tripticasa Soya Agar de las cepas aisladas de <i>E. coli</i> a pH 4 con HCl y ácido láctico e incubadas a diferentes tiempos (0, 6 y 12 horas).....	95
Tabla 32: Crecimiento por cuenta en placa en Tripticasa Soya Agar de las cepas aisladas de <i>E. coli</i> a pH 6 con HCl y ácido láctico e incubadas a diferentes tiempos (0, 6 y 12 horas).....	95
Tabla 33: Especies de bacterias ácido lácticas utilizadas en las pruebas de reto de patógenos.....	97
Tabla 34: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre <i>Salmonella</i> Infantis.....	99
Tabla 35: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de Bacterias ácido Lácticas sobre <i>Listeria monocytogenes</i> .....	100
Tabla 36: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre <i>Candida albicans</i> .....	101
Tabla 37: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre <i>Bacillus cereus</i> .....	102
Tabla 38: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre <i>Kluyvera ascorbata</i> .....	103
Tabla 39: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre <i>Escherichia coli</i> .....	104
Tabla 40: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre <i>Escherichia coli</i> .....	105
Tabla 41: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre <i>Escherichia coli</i> .....	106
Tabla 42: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre <i>Shigella dysentirae</i> .....	107

Tabla 43: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre <i>Escherichia coli</i> .....	108
Tabla 44: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre <i>Shigella flexneri</i> .....	109
Tabla 45: Resumen de microorganismos patógenos estudiados con los sobrenadantes con los que se present mayor inhibición a pH 4 y 7.....	110

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fermentación homoláctica (Madigan et al., 2008).....	6
Figura 2: Fermentación heteroláctica (Madigan et al., 2008). .....	8
Figura 3: Maíz de dobla.....	9
Figura 4: Tira API®20E para la identificación de enterobacterias .....	17
Figura 5: Métodos de evaluación de las comunidades microbianas de los alimentos (Díaz y Wachter, 2003). .....	19
Figura 6: Mapa molecular de 9 regiones hipervariables y regiones conservadas presentes en el gen 16S rRNA. Imagen tomada de <a href="http://www.alimetrics.net">http://www.alimetrics.net</a> .....	20
Figura 7: Análisis de microorganismos por medio de la técnica RAPD (Díaz y Wachter, 2003).....	22
Figura 8: Metodología que se llevó a cabo para el estudio de las bacterias patógenas en el atole agrio de Villahermosa, Tabasco.....	38
Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN extraído de las cepas puras de: S1 <i>Enterobacter cloacae</i> , S3 <i>Raoultella ornithinolytica</i> , L1 <i>Serratia marcescens</i> , L2 <i>Serratia fonticola</i> , L8 <i>Enterobacter sakazakii</i> , L9 <i>Pseudomonas leuteola</i> , L13 <i>Serratia liquefaciens</i> , L19 <i>Serratia plymuthica</i> a 90V durante 30minutos; M= Marcador de peso molecular (Invitrogen ®).....	66
Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR de la reacción del espaciador transcripcional interno 16S-23S con los primers itsf e itsr a 70v durante 60minutos; m= marcador de peso molecular, sp: control positivo con <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	67
Figura 11: <i>E. coli</i> en agar Eosina Azul de Metileno (EMB).....	69
Figura 12: <i>E. coli</i> en agar McConkey con Sorbitol.....	69

Figura 13: Dendrograma generado a partir de RAPD-PCR de las diferentes cepas de <i>E. coli</i> aisladas de la fermentación sólida (S) y líquida (L) del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.....	74
Figura 14: Colonia de <i>Bacillus</i> aislados en agar Tripticasa Soya con sulfato de manganeso.....	77
Figura 15: Tinción de espora de colonias de <i>Bacillus</i> por medio de la técnica de Schaeffer-Fulton.....	79
Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN extraído de las cepas puras a 90V durante 30 minutos; M= Marcador de peso molecular (InvitroGen®). Carril 2 a 11= ADN de Bacilos esporulados aerobios.....	81
Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la reacción PCR del rRNA 16S con los primers pA y 3 a 70v durante 60minutos; m= marcador de peso molecular, CARRIL 2 a 11= PCR de Bacilos esporulados aerobios .....	81
Figura 18: Prueba de reto del desarrollo de <i>Salmonella</i> Typhimurium inoculada en muestras de atole agrio sólido fermentadas durante 0, 10 y 24 h e inoculadas a diferentes tiempos (0, 2 y 4 h). Los resultados son promedio de 3 muestras. Se indica la desviación estándar con líneas verticales .....	87
Figura 19: Prueba de reto del desarrollo de <i>Salmonella</i> Typhimurium inoculada en muestras de atole agrio sólido fermentadas durante 0, 6 y 24 h e inoculadas a diferentes tiempos (0, 2 y 4 h). Los resultados son promedio de 3 muestras. Se indica la desviación estándar en la gráfica con líneas verticales.....	88
Figura 20: Prueba de reto de patógenos ( <i>Bacillus cereus</i> ) frente a control negativo (MRS sin cultivo) .....	98
Figura 21: Prueba de reto de patógenos ( <i>Bacillus cereus</i> ) frente a sobrenadante de <i>Lactobacillus plantarum</i> en caldo MRS a pH 4 .....	98

## RESUMEN

El atole agrio es un alimento fermentado de maíz (de dobla o tierno), el cual es sometido a una molienda, que puede ser elaborado a partir de dos tipos de proceso: una fermentación sólida y una líquida; para la fermentación sólida se forman bolas de masa que llevan a cabo un proceso de fermentación de aproximadamente 12 horas, para después agregar agua. Por el contrario, para el proceso en líquido se agrega agua justo después de la molienda para después dejar fermentar durante 12 horas. Después de transcurrido este tiempo, es necesario colar ambos procesos para después someterlos a ebullición durante 30 minutos. El atole agrio es consumido en la zona Sureste de México, abarcando los estados de Tabasco, Chiapas y el sur de Veracruz. La microbiota de este alimento fermentado no ha sido estudiada, y debido a las precarias condiciones que conlleva su elaboración, ya que es un procedimiento manual, en el que la falta de higiene hace que la contaminación microbiana sea frecuente, es necesario estudiar la presencia de un grupo de microorganismos de suma importancia para la salud, debido a que causan enfermedades gastrointestinales. Se llevó a cabo el aislamiento, purificación e identificación de diferentes microorganismos patógenos provenientes de las etapas de la fermentación, tanto de la fermentación líquida como de la fermentación sólida del atole agrio elaborado en Villahermosa, Tabasco. De la cual no se logró identificar la presencia de *Salmonella*; por el contrario, si se identificaron diversas cepas de *E. coli* así como de *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*. Adicionalmente, se inoculó y observó el crecimiento de *Salmonella* en el atole agrio, observando su eliminación al final de la fermentación. También, el crecimiento de las cepas aisladas de *E. coli* en diferentes condiciones de acidez y temperatura. Finalmente, se estudió el crecimiento de *Salmonella*, *E. coli*, *B. cereus* y *Candida albicans* frente a los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas previamente aisladas del atole agrio con el fin de conocer el efecto de su interacción; y se obtuvo una disminución en el crecimiento de los microorganismos patógenos.

## INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de la civilización ha habido un íntimo acompañamiento entre los alimentos y las actividades fermentativas de los microorganismos. La fermentación de los alimentos surgió más por accidente que por esfuerzos guiados. Por miles de años los procesos de fermentación se llevaron a cabo sin el conocimiento del mecanismo microbiológico, fue hasta el siglo XIX cuando se desarrollaron los primeros estudios. En los últimos años el conocimiento de la diversidad microbiana de los alimentos fermentados se ha incrementado debido al uso de métodos moleculares.

La fermentación es uno de los métodos más viejos y económicos de producir y preservar alimentos; es una manera natural de realzar el valor nutritivo y la apariencia de los alimentos, así como su inocuidad. Se estima que los alimentos fermentados contribuyen aproximadamente con la tercera parte de la dieta mundial; sin embargo, actualmente, el propósito principal de la fermentación de los alimentos no es preservar, ya que se conocen otras técnicas de conservación, sino el objetivo es producir una variedad de productos fermentados con un sabor, aroma y textura específicos.

Los microorganismos responsables de la fermentación forman parte de la microbiota autóctona presente en el sustrato, o pueden ser añadidos como un cultivo iniciador.

Los alimentos fermentados son producidos alrededor del mundo utilizando diversas técnicas, materias primas y microorganismos. Se conocen cuatro procesos principales de fermentación: alcohólica, ácido láctica, ácido acética y alcalofermentación.

El atole agrio es un producto fermentado altamente consumido en la zona Sureste de México, abarcando los estados de Tabasco, Chiapas y el sur de Veracruz. La microbiota de este alimento fermentado no ha sido estudiada.

Los alimentos son una vía importante de transmisión de microorganismos que pueden causar infecciones e intoxicaciones que, en general tienen un tiempo de incubación corto y suelen causar síndromes gastrointestinales. Puesto que

algunas de estas patologías tienen una DMI (dosis mínima infectiva) muy baja es muy necesaria la higiene de los alimentos y de los procesos de elaboración. La incidencia real de las toxi-infecciones no está clara, debido a que sólo se declara un 10% de estas enfermedades entre las que se encuentran salmonelosis, shigelosis o disentería bacilar, gastroenteritis por *E. coli*, enteritis producidas por *Bacillaceae*, intoxicaciones alimentarias agudas como el botulismo (intoxicación por *Clostridium botulinum*) y la intoxicación estafilocócica. El análisis microbiológico de alimentos es una inspección que permite valorar la carga microbiana y conocer cuáles deberán de ser las medidas a tomar durante el proceso de elaboración del alimento con la finalidad de asegurar la inocuidad del alimento; por lo que debido a las condiciones de elaboración del atole agrio, no es posible garantizar su inocuidad, así que la incorporación y crecimiento de microorganismos no deseables es muy probable, por lo que su estudio y conocimiento es un acercamiento importante a la microbiota del atole agrio.



## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 ALIMENTOS FERMENTADOS

Los alimentos fermentados son aquellos alimentos que han estado sujetos a la acción de microorganismos, de tal forma que, los cambios originados en éstos, causan modificaciones significativas en los alimentos (Campbell-Platt, 1994).

Los alimentos fermentados son producidos alrededor del mundo, sus orígenes datan aproximadamente de hace 6000 años en China; por lo que es el tipo de procesamiento más antiguo que se conoce y el primer uso de la biotecnología.

De acuerdo con Steinkraus (1996), la fermentación tradicional de los alimentos tiene diversas funciones:

- Enriquecimiento de la dieta a través del desarrollo de diversos sabores, aromas y texturas en los sustratos alimenticios.
- Enriquecimiento de los alimentos con proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales y vitaminas.
- Disminución del tiempo de cocción.

#### **1.1.1 Alimentos fermentados alrededor del mundo**

En todo el mundo existe una gran producción de alimentos fermentados. En términos de mayor producción y consumo, los tres grupos de alimentos fermentados son los lácteos, las bebidas y los cereales (Tabla 1). Aunque también hay productos fermentados a partir de carne, leguminosas, frutas y vegetales (Campbell-Platt, 1994).

Tabla 1: Principales grupos de alimentos fermentados que se producen en el mundo (Adaptado de Campbell-Platt, 1994)

Grupo	Ejemplo de alimentos	Región donde se produce
Lácteos	Queso, yogurt, kéfir, kurut	Europa, América, Medio Oriente.
Bebidas	Cerveza, arak, café, té, cocoa, sake, vinos, sidra.	Todo el mundo
Cereales	Pan, panqueques, donas, tape, ketan, kenkey, ogi, pozol, chicha, dosa, papadam.	Todo el mundo

## 1.2 ALIMENTOS FERMENTADOS A BASE DE CEREAL

Los granos de cereal son considerados como uno de los más importantes grupos alimentarios ya que tienen un alto aporte de proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales y fibra (Esquivel, 2012).

En general, la fermentación natural de los cereales conduce a una disminución en el nivel de carbohidratos, así como algunos poli y oligosacáridos no digeribles. La fermentación provee también un pH óptimo para la degradación enzimática del fitato, que está presente en los cereales en la forma de un complejo polivalente catiónico de hierro, zinc, calcio, magnesio y proteínas; esta reducción del fitato puede incrementar la cantidad de hierro, zinc y calcio soluble. El efecto de la fermentación en los niveles de proteína y aminoácidos es un tema controvertido. Por ejemplo, durante la fermentación del maíz, las concentraciones de lisina, metionina y triptófano disponible aumentan (Haard *et al.*, 1999). Pero, por otro lado, durante la fermentación del mijo los niveles de lisina, arginina y glicina disminuyeron (Osman, 2011).

La fermentación origina un aumento general en la vida de anaquel, textura, sabor y aroma del producto final. Durante la fermentación de los cereales se forman muchos compuestos volátiles representativos: ácido láctico, etanol, ácido acético,

el ácido propiónico y el ácido butírico, el ácido diacetil acético, entre los ácidos grasos volátiles, además del ácido succínico, el metano, hidrógeno y CO<sub>2</sub>. Todos ellos se obtienen a partir de la glucosa o fructosa que se liberan de los distintos carbohidratos y que fermentan las bacterias siguiendo diferentes vías fermentativas (Blandino et al., 2003).

Los alimentos fermentados tradicionales son preparados con diferentes tipos de cereales, tales como arroz, trigo y maíz. Muchos son utilizados como especias, bebidas, bases para preparar otros platillos y desayunos o almuerzos ligeros (Steinkraus, 1996).

La microbiología de muchos de estos productos es complicada o no conocida. En la mayoría de estos productos la fermentación es natural e involucra cultivos mixtos de levaduras, bacterias y hongos. Algunos microorganismos pueden participar paralelamente, mientras otros actúan secuencialmente cambiando la biota dominante durante el transcurso de la fermentación. Las especies de bacterias más comunes de la fermentación de cereales son *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Weisella*. Los hongos son: *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichothecium*; las levaduras más comunes son las especies del género *Saccharomyces*. El tipo de microbiota desarrollada en cada alimento fermentado depende en la actividad del agua, pH, concentración salina, temperatura y composición de la matriz alimentaria (Blandino et al., 2003).

La mayoría de los alimentos fermentados dependen de la acción de las bacterias ácido lácticas (BAL) para llevar a cabo el proceso de fermentación (Conway, 1996). Este tipo de bacterias llevan a cabo una fermentación láctica; la fermentación láctica se puede dividir en dos tipos:

#### **a) Fermentación homoláctica**

También llamada glucólisis o vía de Embden-Meyerhoff, degrada a la glucosa y se divide en tres etapas principales. La primera es preparativa, con formación de dos intermediarios de tres átomos de carbono cada uno. En la segunda etapa, ocurren

reacciones de oxidación-reducción con liberación de energía, formación de ATP por fosforilación a nivel de sustrato y producción de dos moléculas de piruvato. En la tercer etapa, nuevamente ocurren reacciones de oxidación-reducción, el piruvato se reduce a ácido láctico por acción de la enzima lactato deshidrogenasa, actuando un NADH como donador de electrones (Varela y Grotiuz, 2008). La ecuación balanceada es la siguiente:



Los microorganismos *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* llevan a cabo este tipo de fermentación, para lo cual poseen la fructosa 1,6-bifosfatasa y la fosfato aldolasa. En este tipo de fermentación no se produce CO<sub>2</sub> (Figura 1).

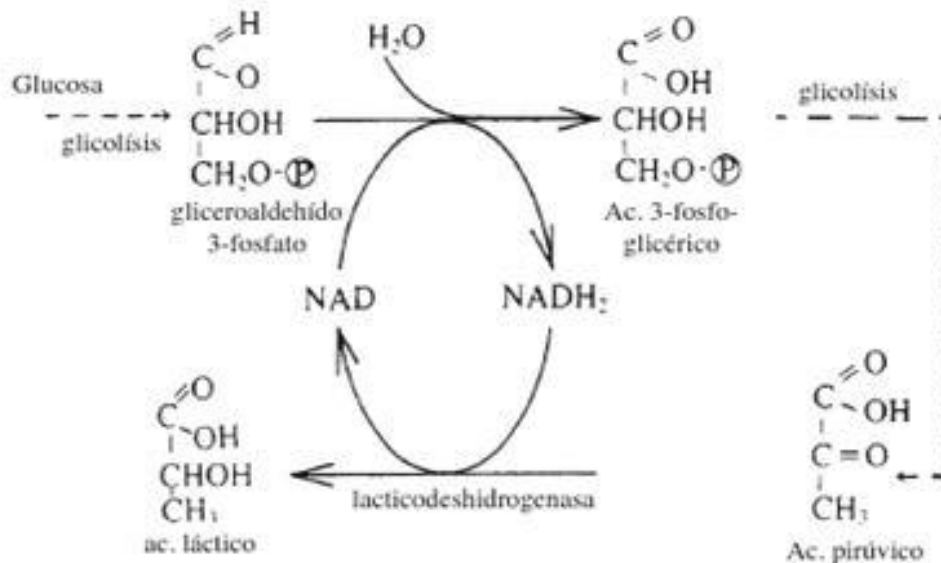
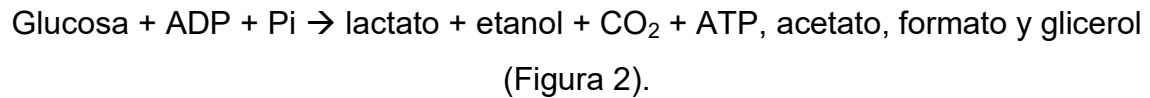


Figura 1: Fermentación homoláctica (Madigan et al., 2008).

### b) Fermentación heteroláctica

Como primer paso, la glucosa se transforma en xilulosa-5-fosfato; transformación en donde participa la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Después, por la adición de piruvato y con acción de la enzima fosfopentosa fosfocetolasa, la xilulosa-5-fosfato se transforma en gliceraldehído-3-fosfato y acetil-fosfato.

Posteriormente, el gliceraldehído-3-fosfato es transformado en lactato por la vía Embden-Meyerhof, la fosfotriosa isomerasa puede dar origen al glicerol como sistema de reoxidación de  $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ ; el acetil-fosfato puede dar origen a acetato y a etanol (McGilvery, 1977). Estas transformaciones se pueden expresar por medio de la reacción:



Los microorganismos *Leuconostoc* y *Lactobacillus* llevan a cabo este tipo de fermentación y no poseen la fructosa 1,6-bifosfatasa ni la fosfato aldolasa, pero sí la fosfocetolasa (Thompson y Gentry-Weeks, 1994).

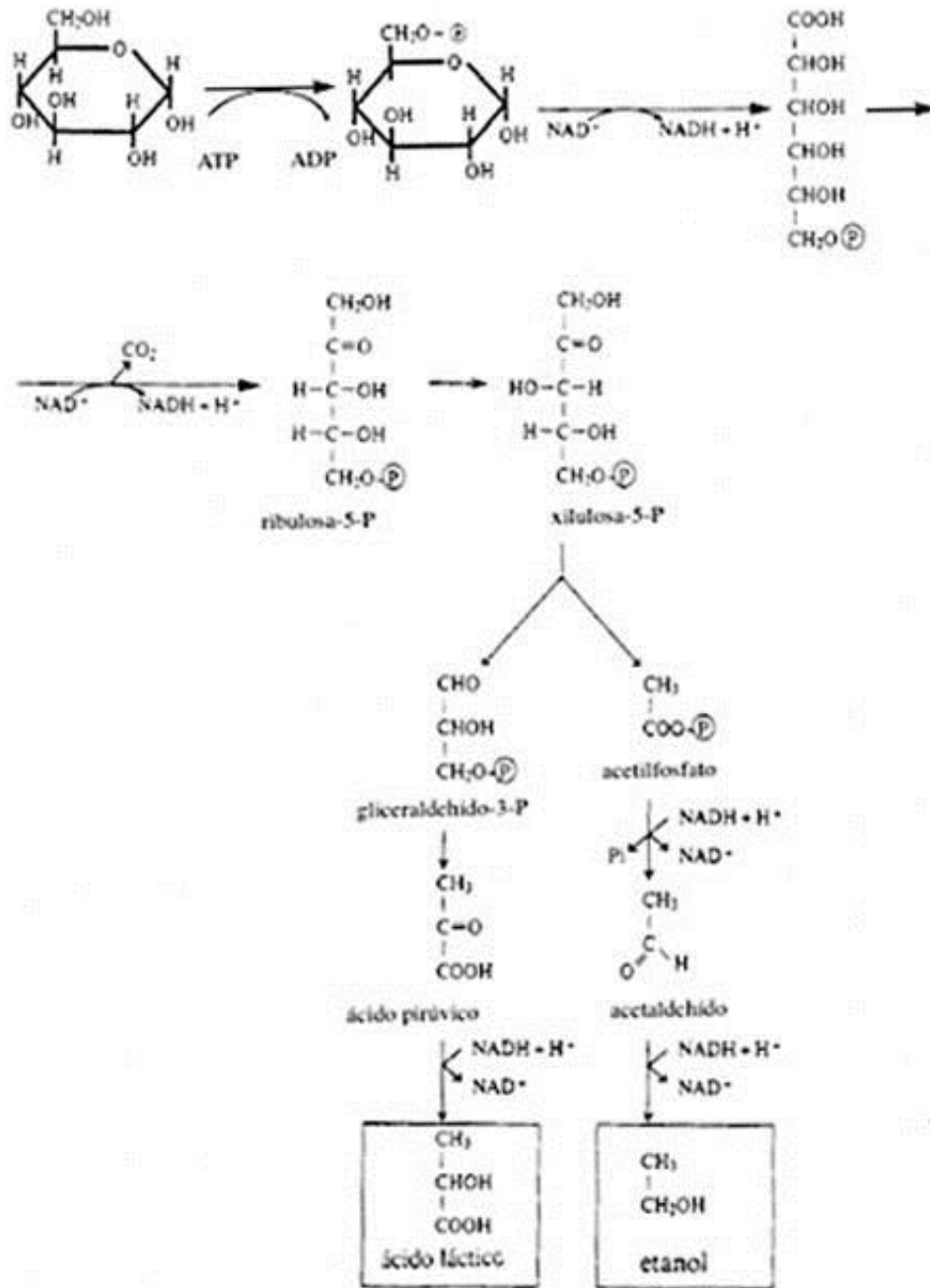


Figura 2: Fermentación heteroláctica (Madigan et al., 2008).

### 1.3 ALIMENTOS FERMENTADOS DE MAÍZ

En la Tabla 2 se encuentran los alimentos y bebidas más comunes hechos a base de maíz y consumidos en el mundo. Sin embargo, a continuación se profundizará en aquellos alimentos fermentados mexicanos a base de maíz no alcohólicos.

#### **1.3.1 Pozol**

El *pozol* es una bebida refrescante no alcohólica que se consume en el Sureste de México. Se prepara cocinando el maíz en aproximadamente 1 % (m/V) de solución de cal; después, se lava con agua y se muele para formar una masa conocida como nixtamal. Finalmente se divide la masa en bolas y se envuelven en hojas de plátano) dejándose fermentar a temperatura ambiente por 0.5 a 4 días (otra opción para envolver la masa es dejarla en bolsas de plástico donde se lleva a cabo la fermentación. La masa fermentada se suspende en agua y se bebe (Wacher et al., 2000). Los microorganismos encontrados en el pozol son: *L. lactis*, *Streptococcus suis*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. alimentarium*, *L. delbruekii*, *Clostridium* sp. (Escalante et al., 2001) *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter* spp., *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas* spp. (Sainz, 1998).

#### **1.3.2 Atole agrio**

El atole agrio es una bebida típica del Sureste de México, es consumido en Tabasco, Chiapas y el sur de Veracruz que no ha sido estudiado. Se prepara a partir de maíz, ya sea tierno o de dobla, para obtener el maíz de dobla (Figura 3), la mazorca se dobla dentro de la misma planta y se deja que pierda humedad (Valderrama, 2012).



Figura 3: Maíz de dobla

Una vez cosechado, el maíz se desgrana y muele; posteriormente, el proceso se puede llevar a cabo de dos diferentes maneras: para el proceso líquido se agrega agua a la masa y se deja fermentar por 6 horas a temperatura ambiente. En cambio, para el proceso sólido, se forman bolas con la masa obtenida y se deja fermentar durante 12 horas. Al final se tamiza el producto y se coloca en ebullición hasta que espese. Las bacterias encontradas en este alimento son: *L. delbrueckii*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *Serratia marcescens*, *Raoultella terrigena*, *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* spp. *sibonii*., *Pseudomonas luteola* y *Pseudomonas aeruginosa* (Esquivel, 2012; Valderrama, 2012).



Tabla 2: Alimentos y bebidas más comunes hechos a base de maíz (Adaptada de Blandino et al., 2003; Esquivel, 2012)

Producto	Uso y Características del producto	Microorganismos	Región
<b>Atole</b>	Bebida	BAL	Sureste de México.
<b>Chicha</b>	Bebida alcohólica no destilada	<i>Aspergillus, Penicillium</i> , levaduras y bacterias.	Perú
<b>Chikokivana</b>	Bebida alcohólica	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zimbabwe
<b>Jamin-bang</b>	Pan	Levaduras y bacterias	Brasil
<b>Kaanga-Kopuwai</b>	Suave, viscoso	Bacterias y levaduras	Nueva Zelanda
<b>Kaffir beer</b>	Bebida alcohólica	BAL, levaduras	Sudáfrica
<b>Kenkey</b>	Masa fermentada que se consume durante la cena	<i>L. fermentum, L. reuteri, Candida, Saccharomyces, Penicillium, Aspergillus, Fusarium</i>	Ghana
<b>Koko</b>	Potaje/ papilla	<i>E. cloacae, Acinetobacter, L. plantarum, L. brevis, Saccharomyces cerevisiae, Candida mycoderma</i>	Ghana
<b>Mawe</b>	Base para la preparación de diferentes platillos	BAL, levaduras.	Sudáfrica
<b>Ogi</b>	Pasta como alimento básico	<i>L. plantarum, Saccharomyces cerevisiae, Candida mycoderma, Corynebacterium, Aerobacter, Rhodotorula, Cephalosporium, Fusarium, Aspergillus, Penicillium.</i>	Nigeria, Oeste de África
<b>Pozol</b>	Bebida refrescante no alcohólica.	<i>L. lactis, Streptococcus suis, L. plantarum, L. casei, L. alimentarium, L. delbruekii y Clostridium sp.</i>	México
<b>Rabdi</b>	Puré semisólido	<i>Penicillium acidilactici, Bacillus, Micrococcus</i>	India
<b>Tesgüino</b>	Bebida alcohólica	Bacterias, hongos y levaduras.	Norte de México

## **1.2 BACTERIAS PATÓGENAS PRESENTES EN ALIMENTOS FERMENTADOS**

Los microorganismos patógenos son aquellos que al ingresar a un hospedero, son capaces de provocar una enfermedad o infección en ellos.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son términos que se aplican a todas las enfermedades que se adquieren por medio del consumo de alimentos contaminados. Las causas más comunes son intoxicaciones e infecciones.

Las infecciones son causadas por microorganismos como bacterias, virus o parásitos dentro de un organismo superior. Estas infecciones pueden ser invasivas, como las de *Salmonella* spp., en las cuales el microorganismo entra a la célula intestinal, o no invasivas, como las de *Vibrio cholerae*, que actúan desde fuera de la célula intestinal.

Las intoxicaciones alimenticias son enfermedades provocadas por alimentos contaminados o por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas o animales o de productos metabólicos de microorganismos en los alimentos.

### **1.2.1 Bacterias Gram-negativas**

#### **1.2.1.1 *Salmonella* spp.**

Es la principal bacteria causante de enfermedades gastrointestinales en el mundo, siendo la principal especie *Salmonella enterica*, los principales serotipos: Typhimurium, Enteritidis y Typhi. Ha sido aislada de una gran cantidad de alimentos, entre los que se encuentran productos de origen animal, como huevos contaminados, aves de corral, carnes rojas, leche, quesos; sin embargo actualmente los productos de origen vegetal son los que se encuentra esta bacteria más comúnmente. Estos incluyen jugos no pasteurizados, frutas y verduras crudas, especias y nueces (CDC, 2015).

La salmonelosis es una enfermedad de transmisión alimentaria provocada por la ingesta de alimentos que contienen *Salmonella*, el tamaño del inóculo requerido para causar enfermedad sintomática en adultos es aproximadamente entre  $10^5$  y

10<sup>6</sup> microorganismos (Romero y Herrera, 2002), pero se han reportado casos en los cuales se ingirieron cantidades muy bajas, como 1 o 10 UFC/g o mL.

Hasta el 21 de febrero de 2015, se han reportado en México 7,220 casos de salmonelosis y 1,377 de fiebre paratifoidea; así como 4,996 casos de fiebre tifoidea. En el estado de Tabasco se han reportado hasta el mes de febrero del presente año 337 casos de fiebre tifoidea, lo que representa el 6.71 % de los casos reportados en todo el país; también, se reportaron 167 casos de fiebre paratifoidea y otras salmonelosis, es decir el 12.13 % (Boletín epidemiológico, 2015).

Se ha reportado la presencia de *Salmonella* en alimentos fermentados como en el poto poto, en el salami, en el chorizo de cebolla, salchichón, tempeh, durante la fermentación de la leche, etc. (Casquete et al., 2012; Casta, Fresno, Tornadijo, & Carballo, 2002; Gahan, O'Driscoll, & Hill, 1996; Kunene, Hastings, & von Holy, 1999; Moore, 2004; Nout, Beernink, & Bonants-van Laarhoven, 1987).

### **1.2.1.2 *Escherichia coli***

Es un bacilo Gram-negativo, móvil por flagelos peritricos, anaerobio facultativo, quimioorganótrofo, tienen metabolismo fermentativo y respiratorio. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. Cataboliza carbohidratos como la D-glucosa y otros para formar ácido y gas. Son oxidasa negativos, catalasa positivos, rojo de metilo positivos, Voges-Proskauer negativo y usualmente citrato negativo, al igual que H<sub>2</sub>S, hidrólisis de la urea y lipasa. Reduce nitratos. Fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa y L-ramnosa (Bergey's, 2000).

De acuerdo con su método de patogenicidad, se ha clasificado a *E. coli* en diversos grupos:

- *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC)
- *E. coli* Enteropatógena (EPEC)
- *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC)
- *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC)

- *E. coli* Enteroagregativa (EAaggEC)
- *E. coli* Enterodifusa (DAEC)

Se ha reportado la presencia de varios tipos de *E. coli* en ensaladas, quesos frescos, hamburguesas, leche cruda, embutidos, yogurt, lechuga, agua, etc. (Janda y Abbott, 2006). También, en alimentos fermentados, se ha reportado la presencia de *E. coli*, por ejemplo en el salami, ya que se demostró su crecimiento a valores de pH de 5.0, lo que demostró una adaptación de este microorganismo a la acidez del medio (Leyer, Wang, Johnson, Leyer, & Wang, 1995). Por otro lado, se logró inhibir durante la fermentación de *tarhana* que es un alimento tradicional turco a base de trigo y yogurt, llegando a un pH de 3.84, donde también se reportó un aumento en la concentración de bacterias ácido lácticas (Sagdic, Soyigit, Ozcelik, & Gul, 2005). También se encontró en el *poto poto* y en el *akasa* (Abriouel et al., 2006; Kunene et al., 1999).

### **1.2.2 Bacterias Gram-positivas esporuladas**

Las bacterias Gram-positivas son aquéllas que no poseen una membrana externa, tienen una gruesa capa de peptidoglicano y que presentan ácidos teicoicos en su superficie. Y son capaces de formar endoespora (*Bacillus*, *Paenebacillus*, *Clostridium*).

Dentro de este grupo, las principales bacterias patógenas que se pueden transmitir por alimentos son las de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*.

#### **1.2.2.1 *Bacillus* sp.**

Pertenece a la familia *Bacillaceae*. Son aerobios estrictos o anaerobios facultativos. En condiciones estresantes forman una endoespora de situación central, que no deforma la estructura de la célula. Dicha forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a algunos desinfectantes.

Son catalasa positiva, su hábitat es el suelo, agua del mar y ríos. Quimioheterótrofos, móviles y rodeados de flagelos peritricos. La célula tiene un tamaño que varía de 0.5 a 2.5  $\mu\text{m}$  x 1.2 a 10  $\mu\text{m}$  (Koneman, 2001).

Entre las especies más representativas de este género se encuentran: *B. alkalophilus*, *B. anthracis*, *B. azotoformans*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. insolitus*, *B. turigiensis*, entre otros (Bergey's, 2000).

Existen diversas especies de este género, algunas de ellas son patógenos para los humanos (como *Bacillus cereus*, *B. anthracis*); en cambio, especies como *Bacillus subtilis*, no son considerados como patógenos humanos y muchas veces participan durante la fermentación de algunos productos; por ejemplo, en el *poto poto*, *ugba* (alimento de Nigeria hecho a base del aceite de semillas de frijol) se encontraron *B. cereus sensu lato*, *Lysinibacillus xylanilyticus*, *B. clausii*, *B.licheniformis*, *B. subtilis*, *B. safensis*; en el *dawadawa*, que es un alimento hecho a base de la fermentación del frijol de soya, se encontraron las siguientes especies de *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. cereus* y *B. firmus* (Dakwa, Sakyi-Dawson, Diako, Annan, & Amoa-Awua, 2005). En el *akasa* se identificó la presencia de *B. cereus* (Kunene et al., 1999). En el *cheonggukjang* un alimento coreano hecho a partir de la fermentación de frijoles de soya se encontraron durante la fermentación *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* (Kwon et al., 2009). En el *tempeh*, alimento de Indonesia de soya se identificó a *B. subtilis*, al igual que en el *ogi* (Nout, Beernink, & Bonants-van Laarhoven, 1987; Odunfa & Adeyele, 1985; Oguntoyinbo et al., 2011).

En el pozol se logró aislar una especie de *Bacillus* sp. CS93 y se demostró que puede inhibir el crecimiento de diversas bacterias Gram-positivas y negativas, hongos y levaduras; que es capaz de actuar en un rango de pH de 3 a 11 y es estable al calor (Ray, Sanchez, O'Sullivan, & McKay, 2000). Posteriormente, se demostró que es capaz de producir diversas sustancias (Bacilisina, clorotetaina e iturina A) y a estas sustancias se le atribuyen algunas las características medicinales del pozol (Phister, Sullivan, & Mckay, 2004).

*B. cereus* puede producir dos enterotoxinas: la toxina diarreica (HBL, Nhe y EntK) y la toxina emética (ETE), que dan lugar a dos distintas formas clínicas de intoxicación alimentaria (Agata et al. 1996). El síndrome emético es causado por un péptido termoestable, tiene un periodo de incubación de 1 a 6 horas y

predominan los síntomas como náuseas y vómitos. El síndrome diarreico se atribuye a las enterotoxinas (Nhe, HBL); un grupo de proteínas lábiles, que expuestas al calor, codificadas por el operón hbl/CDA y es una hemolisina; que causan dolor abdominal y diarrea después de la incubación, además, hay un crecimiento vegetativo de las bacterias en el intestino; los síntomas son dolor abdominal, diarrea acuosa profunda, tenesmo y náuseas que generalmente duran 12 a 24 horas (Notermans & Batt, 1998). Los niveles reportados de *B. cereus* en alimentos contaminados van de 10<sup>2</sup> a 10<sup>8</sup> UFC/g (Manzo et al, 2005).

### 1.3 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POR MÉTODOS FENOTÍPICOS

Se basan en la información derivada del fenotipo o características que expresa un organismo. Estos métodos constituyen la base de las descripciones formales taxonómicas desde familia, género, especie y subespecies. Las características fenotípicas clásicas de las bacterias comprenden su morfología, fisiología y bioquímica.

Dentro de las técnicas fenotípicas se encuentra la tipificación por:

- Crecimiento y características morfológicas.
- Características bioquímicas
- Características serológicas
- Características funcionales o fisiológicas

Dichas técnicas se llevan a cabo por procedimientos estándar donde se observan las características microscópicas y macroscópicas de las bacterias; como características macroscópicas se encuentra la morfología del cultivo: medios de cultivo y requisitos de crecimiento en relación a atmósfera, temperatura y nutrición; así como pruebas bioquímicas. Existen cuatro tipos de pruebas bioquímicas:

1) Pruebas que se utilizan en la identificación preliminar y con lectura inmediata como la catalasa y oxidasa; 2) otras pruebas rápidas, con lectura en menos de 6 h tal y como la  $\beta$ -galactosidasa (ONPG), las aminopeptidasas, la ureasa y el indol; 3)

pruebas lentas, con lectura de 18 a 48 h que incluirían la óxido-fermentación, reducción de nitratos, rojo de metilo, Voges-Proskauer, Agar hierro de Kligler, fermentación de azúcares, hidrólisis de la esculina, coagulasa, fenilalanina-desaminasa, ADNsa, hidrólisis de la gelatina, decarboxilasas, lipasa, lecitinasa, utilización de citratos, utilización de malonato, y prueba de CAMP entre las más frecuentes, y 4) pruebas basadas en caracteres de resistencia a ciertas sustancias tal y como optoquina, bacitracina, solubilidad en bilis, y crecimiento en caldo hipersalino.

### **1.3.1 Identificación mediante el sistema API®20E**

El API® 20E es un sistema estandarizado que permite la identificación de 51 especies pertenecientes a *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram-negativos no exigentes, que incluyen 21 pruebas bioquímicas miniaturizados, así como una base de datos.

La galería del sistema API® 20E se compone de 20 microtubos que contienen los substratos deshidratados. Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteriana que reconstituyen las pruebas. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos (Figura 4).



**Figura 4: Tira API®20E para la identificación de enterobacterias**

Para la identificación, es necesario recurrir a un software llamado ApiWeb diseñado por Biomerieux® que compara los perfiles obtenidos con los de una base de datos para obtener el nombre del microorganismo correspondiente (Biomérieux SA, 2007).

#### **1.4 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POR MÉTODOS GENOTÍPICOS**

Se basan en la información derivada de los ácidos nucleicos. Estos permiten distinguir microorganismos al nivel de especie y de cepa. Idealmente, estas técnicas son universalmente aplicables, reproducibles, fáciles, altamente discriminatorias y han reemplazado en muchos laboratorios a las técnicas clásicas (Maslow et al., 1993). Cuando se aplican en alimentos, las técnicas moleculares nos permiten tener datos confiables sobre la diversidad e identificación taxonómica de los microorganismos del alimento, datos cuantitativos que describan los cambios en la población microbiana durante la producción, el impacto de factores intrínsecos, extrínsecos sobre el crecimiento, sobrevivencia y actividad en los microorganismos, lo que a su vez permite producir los alimentos en condiciones controladas y asegurar su calidad.





Figura 5: Métodos de evaluación de las comunidades microbianas de los alimentos (Díaz y Wachter, 2003).

#### 1.4.1 Gen rARN 16S

El ARN ribosomal 16S, es un componente de la subunidad 30S de los ribosomas procariontes. El uso de la secuencia del gen rARN 16S para el estudio de filogenética y taxonomía bacteriana se ha usado como el marcador genético preferente. Las razones de su uso son: se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias universales, su función no ha cambiado durante el tiempo y es lo suficientemente largo para propósitos bioinformáticos (1500 pb) (Janda, Abbott, 2007).

El ribosoma está compuesto por dos subunidades, la sub-unidad larga (LSU) y la sub-unidad pequeña (SSU). Estas dos subunidades rodean el mRNA durante la traducción. En general, en las bacterias, la SSU está codificada por el gen rARN 16S y la LSU está codificada por el gen rRNA 23S y el gen rRNA 5S (Rodicio y Mendoza, 2004).

El gen rARN 16S es una herramienta comúnmente utilizada en la identificación de bacterias por su función conservada. El gen 16s rARN, es un gen muy corto (1542 nucleótidos). Es una cadena conformada por 9 regiones hipervariables (V1 – V9) (Figura 6). Las regiones hipervariables de un gen son las partes que, con el tiempo, han sido más tolerante de mutaciones, y por lo tanto se han acumulado más cambios dentro de la secuencia de nucleótidos (Schmalenberg et al., 2001).



Figura 6: Mapa molecular de 9 regiones hipervariables y regiones conservadas presentes en el gen 16S rRNA. Imagen tomada de <http://www.alimetrics.net>

#### **1.4.2 Ampliación del ADN Polimórfico al azar (RAPD)**

La técnica de amplificación del ADN Polimórfico al Azar “*Random Amplified Polymorphic ADN*” (RAPD) es un método de tipificación genética de alta resolución para cepas cercanas entre sí, generalmente miembros de una sola especie. La razón de llevar a cabo un perfil RAPD-PCR viene de la necesidad de estudiar la similitud de una cepa o una caracterización genética poblacional. El RAPD-PCR es fácil y rápido de realizar. No existen requerimientos técnicos específicos y no se requiere un conocimiento de la secuencia del organismo en estudio. La principal crítica que recibe este método, es la reproducibilidad. Sin embargo, cuando las condiciones de la reacción se mantienen estrictamente constantes, se puede obtener una reproducibilidad bastante razonable entre laboratorios. Por lo tanto, es importante verificar la reproducibilidad de la técnica con controles positivos antes de introducir la muestra problema (Bardakci, 2001).

El RAPD-PCR utiliza sólo un cebador bajo condiciones de PCR poco astringentes. El cebador hibrida en dirección *forward* y en la hebra complementaria en dirección *reverse*, por lo tanto genera un producto de PCR. La hibridación ocurre

simultáneamente en varias partes del genoma, y de este modo se genera un patrón de bandas características (Figura 7). Las cepas que tengan una secuencia del genoma idéntica darán el mismo patrón de bandas (Reddy, 2007).

Debido a la simplicidad y el bajo costo de la técnica RAPD, se han encontrado varias aplicaciones en muchas áreas de la biología. Como por ejemplo:

- Mapeo Genético
- Desarrollo de marcadores genéticos
- Estudio de la población y evolución genética
- Crianza animal y vegetal (Bardakci, 2001).

El RAPD es la técnica que más se ha utilizado para el análisis de colecciones microbianas aisladas de alimentos fermentados (Díaz y Wachter, 2003). Por ejemplo, se reportó el uso de esta técnica para caracterizar los distintos tipos de *Lactobacillus* aislados de una masa de maíz fermentada de Ghana (Hayford et al., 1999), también para caracterizar de distintas especies de lactobacilos aislados de salchichas tradicionales de Veneto, Italia (Andrighetto et al., 2001), para identificar las bacterias ácido lácticas predominantes aisladas de productos vegetales fermentados tradicionales del Este de los Himalayas (Tamang et al., 2005), por mencionar algunos usos.

Otras aplicaciones en alimentos del RAPD-PCR es el estudio de un primer para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos (Aznar, 2002); también, para tipificar a larga escala *Bacillus cereus* en leche (Nilsson et al., 1998).

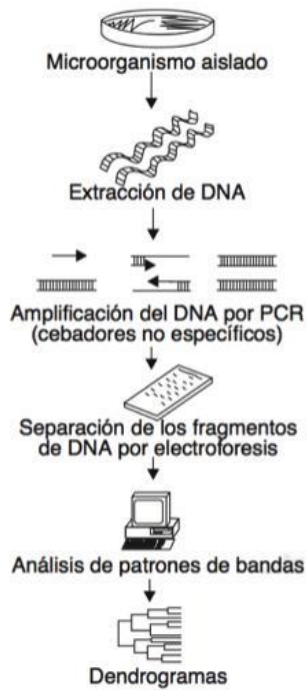


Figura 7: Análisis de microorganismos por medio de la técnica RAPD (Díaz y Wachter, 2003).

#### **1.4.2 Reacción del Espaciador Transcripcional Interno 16S-23S**

Los genes del rRNA están presentes en todos los organismos. En las bacterias los operones del rRNA se componen del gen 16S rRNA, espaciador, tRNA, gen 23S rRNA y el gen 5S rRNA (Watson et al., 1987). Las regiones del espaciador interno transcrito, Internal Transcribed Spacer (ITS) son secuencias localizadas entre el rADN 16S y 23S. variaciones en longitudes y secuencias fueron encontradas para las regiones ITS de diferentes bacterias. Por lo tanto, las secuencias del ITS bacteriano puede ser utilizado para el diseño de pruebas específicas de ADN para cada género y especie (Chiu et al., 2005).

#### **1.5 CONDICIONES DE ESTRÉS ÁCIDO Y TÉRMICO EN LOS MICROORGANISMOS**

Se conocen con detalle los mecanismos que usan los microorganismos, sobre todo los patógenos, para enfrentar y sobrevivir a las condiciones de estrés que encuentran en el cuerpo humano: sin embargo, no se conocen suficientemente las estrategias de los microorganismos para sobrevivir a estas condiciones en los

alimentos. Estas permitirían establecer medidas de control para eliminar o inhibir a los microorganismos indeseables y evitar su consumo.

### **1.5.1 Estrés ácido**

Una importante propiedad de los patógenos microbianos asociados con las rutas de transmisión oral-fecal, es su habilidad de sobrevivir en ambientes extremadamente ácidos, así como ambientes moderadamente ácidos, que contienen ácidos débiles. La resistencia al pH bajo es importante para los patógenos alimentarios para sobrevivir en alimentos específicos y en el tracto gastrointestinal (Eklund, 1985). En muchos alimentos, los ácidos débiles son producidos por otros organismos vía fermentación. Una vez digeridos, los patógenos exitosos deben atravesar la barrera gastroentérica, en la que las secreciones son una defensa contra los patógenos entéricos (Giannella et al., 1972).

Con su paso por el intestino delgado, los organismos encuentran un ambiente menos ácido (pH de 4 a 6) por la presencia de productos ácidos débiles de la fermentación de la biota normal intestinal (Salmond et al., 1984).

Toda la evidencia sugiere que los microorganismos con mecanismos inducibles de ácido resistencia pueden estar mejor equipados a sobrevivir a retos ácidos y causar enfermedad.

El estrés ácido se describe como el efecto biológico de los iones H<sup>+</sup> y de los ácidos orgánicos que se encuentran en el medio ambiente. Esto puede ser el resultado de una fermentación, como en el caso del atole agrio, o de la naturaleza de los alimentos, como la mayoría de las frutas, o de alguna formulación (McClure, 2005). El pH del atole agrio reportado previamente es de

#### ***1.5.1.1 Escherichia coli frente al estrés ácido***

Los mecanismos de inactivación de *E. coli* por acidificación consisten en la acidificación intracelular, la cual daña o interrumpe procesos bioquímicos clave (Zhao et al., 1993; Garland-Miller y Kaspar, 1994; Chung et al., 2006).

A bajos valores de pH (<3), el ingreso de protones es más rápida que la capacidad de las células para mantener la homeostasis.

Los ácidos orgánicos, que son ácidos débiles, son efectivos para eliminar microorganismos, ya que en su forma protonada (que no está cargada), penetran a través de la membrana celular y se disocian dentro de la célula, liberando protones. Esto reduce el pH celular y al incrementar concentración interna de protones disminuye la diferencia, que constituye la fuerza protón motriz, de la cual dependen la producción de ATP y el transporte de algunos nutrientes, entre otros. Se sabe que *E. coli* comienza a inhibirse a valores de pH menores de 4 (Bogh-Sorensen, 2003; Chung et al., 2006).

Otra variable de este factor de inactivación es el tipo de ácido y la concentración. Sin embargo, se ha encontrado que la mayoría de las cepas de *E. coli* pueden generar tolerancia al ácido en la fase estacionaria y esto depende del medio y de las condiciones de crecimiento. Esta propiedad está dada por tres diferentes sistemas ácido resistentes: glutamato-dependiente, arginina-dependiente y oxidativo (Foster, 2004). Un sistema es expresado durante el crecimiento oxidativo de la bacteria, que protege la célula hasta un pH de 2.5, este sistema no es evidente en células que metabolizan por fermentación. Sin embargo, los otros dos sistemas se hacen evidente bajo estas condiciones. Para el sistema de arginina-dependiente, sólo protege a la célula si se encuentra presente arginina extracelular, es inducido por pH bajo en condiciones anaeróbicas, este sistema está compuesto por la enzima ácido inducible arginina descarboxilasa AdiA y la proteína antiporte AdiC, que intercambia la arginina extracelular por el producto intracelular de la descarboxilación, agmatina (Castanie-Cornet et al., 1999) El sistema Glutamato-dependiente (Gad) es el más efectivo. Dos isoformas del glutamato descarboxilasa, GadA y GadB, consumen los protones intracelular cuando descarboxilan el glutamato, y GadC, una proteína integral membranal, intercambia el glutamato por el producto descarboxilado, el ácido  $\alpha$ -amino butírico. (Lin et al., 1996; Buchanan y Doyle 1997). Aunado a esto, existe también un sistema en *E. coli* que libera L-glutamina (Gln), tras la absorción en *E. coli*, Gln

se convierte en L-glutamato (Glu) por la YbaS glutaminasa activadas con ácido, acompañado con la liberación de amoníaco gaseoso; el amonio libre neutraliza el protón, resultando en una elevación del pH intracelular bajo un ambiente ácido (Lu et al., 2013).

Otra medida de defensa al ácido es la modificación de la membrana celular, ya que el contenido de ácidos grasos de la membrana citoplasmática cambia, aumentando los niveles de fosfolípidos. Algo importante de señalar es que se ha encontrado que cuando *E. coli* sobrevive al tratamiento con ácido se presenta una resistencia cruzada, haciendo una cepa más fuerte y resistente a otros tratamientos como el cambio de actividad de agua (Brown et al., 1997).

*E. coli* posee la capacidad de resistir en ambientes difíciles, como el cuerpo humano, en ambientes como los alimentos fermentados y dentro del macrófago. Lleva a cabo una respuesta molecular programada, con expresión genética, mutaciones y cambios en la morfología celular. Existen respuestas generales y repuestas específicas para los diferentes tipos de estrés. Un gen regulatorio *rpoS*, está también involucrado en la resistencia ácida. rPoS protege a *E. coli* de condiciones ambientales adversas como ayuno, hiper osmoralidad, daño oxidativo y radiación UV (Small et al., 1994).

En las bacterias Gram-negativas, el periplasma está envuelto por una membrana externa, que contiene transportadores no específicos, como porinas, que permite la difusión libre de moléculas más pequeñas que 600 Da, incluyendo protones (Schirmer, 1998). Cuando las bacterias entran al estómago, el pH del periplasma desciende rápidamente a un valor cercano al del medio ambiente; un amplio rango de proteínas están localizadas en el periplasma y en la membrana interna, incluyendo enzimas y transportadores esenciales para la toma de nutrientes, así como también los antiportes transmembranales involucrados en los sistemas de descarboxilación (Markiewicz, 1989). Recientemente, dos proteínas periplasmáticas, codificadas por los genes *hdeA* y *hdeB*, fueron descubiertas como factores clave en el apoyo de la resistencia ácida en el periplasma de las bacterias (Gajiwala & Burley, 2000). *hdeA* y *hdeB* son expresados bajo

condiciones fisiológicas normales, y su expresión puede ser inducida en respuesta de pH moderadamente bajo (Tucker et al., 2002). Se encontró que la proteína HdeA previene la agregación de las proteínas periplasmáticas exclusivamente por debajo de pH 3 y por lo tanto considerada como chaperona bajo condiciones ácidas (Gajiwala & Burley, 2000), las proteínas que son capaces de interactuar con HdeA incluyen proteínas de transporte, enzimas metabólicas, chaperonas, lipoproteínas, proteasas, entre otras (Zhang et al., 2011). HdeB ha demostrado también prevenir la agregación de las proteínas periplasmáticas a bajo pH; siendo más efectiva a pH de 3 (Kern et al., 2007).

#### **1.5.1.2 *Bacillus cereus* frente al estrés ácido**

La capacidad de las bacterias para responder rápidamente al cambio de las condiciones ambientales es un prerrequisito para la sobrevivencia en su hábitat. En bacterias Gram-positivas, el factor alternativo sigma ( $\sigma^B$ ) es la llave para controlar la respuesta general de estrés. Este factor es una subunidad secundaria de la RNA polimerasa. En *Bacillus cereus*,  $\sigma^B$  es activada en condiciones de estrés como: etanol, exposición al NaCl o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y al choque ácido (van Schaik et al., 2004).

El pH externo así como la presencia de ácidos débiles determina el pH intracelular. Los ácidos débiles en su forma protonada puede difundirse en la célula y disociarse, liberando un protón llevando a la acidificación del citoplasma. Las bacterias pueden sobrevivir gracias a su habilidad para regular su pH interior, un proceso llevado a cabo por el control del movimiento de los cationes a través de la membrana; sin embargo, esta habilidad de mantener el pH interior puede ser superado a un pH extracelular bajo y llevar a la muerte celular (Beales, 2004). Las células de *B. cereus* crecen a un pH de 7.0 o 5.5 con un pH interior de 7.10 y 6.22; pero después de 40 minutos de exposición de las células a un pH de 4, el pH interior disminuyó a 2.02, combinado con una reducción poblacional de 2.35 log (Senouci-Rezkallah et al., 2011).

Dado que *B. cereus* es una bacteria anaerobia facultativa, se puede suponer que esta bacteria utiliza tanto la hidrólisis como la síntesis de ATP para mantener la



homeóstasis. De hecho, la expresión de genes de  $F_0F_1$ -ATPasa disminuyó en *Bacillus cereus* al ser expuesto a condiciones ácidas no letales, indicando que *B. cereus* no utiliza la  $F_0F_1$ -ATPasa para extruir el protón en condiciones aeróbicas; esta represión de los genes de la  $F_0F_1$ -ATPasa puede ser explicado con la célula que está tratando de prevenir el flujo excesivo de protones vía la ATPasa a la exposición de condiciones ácidas (Mols et al., 2010).

La ruta de la desaminación de la arginina ha sido identificada en una variedad de bacterias Gram-positivas, incluyendo *Bacillus* spp. Esta ruta convierte la arginina en citrulina y amonio. Subsecuentemente, la citrulina es metabolizada en ornitina generando dióxido de carbono, amonio y ATP. La arginina y la ornitina es intercambiada vía un antiporte que importa arginina y exporta ornitina. Esto resulta en que el  $NH_3$  reacciona rápidamente con el  $H^+$  y ayuda a alcalinizar el ambiente consumiendo protones y formando amonio (Ryan et al., 2009). Este sistema tiene tres principales enzimas: arginina desaminasa, ornitina transcarbamilasa y carbamato cinasa, codificadas por *arcA*, *arcB* y *arcC*, respectivamente, mostrando actividad a un pH de 3.5 (Curran et al., 1995). La enzima ureasa cataliza la hidrólisis de la urea, generando dos moléculas de amonio y una molécula de dióxido de carbono. Rasko et al. (2004) identificó un cluster de ureasa compuesto por nueve genes en *B. cereus*.

Los genes que codifican para la enzima alcohol deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa son inducidas una vez expuestas al estrés ácido letal. Por lo tanto, la conversión del piruvato a etanol o lactato, generando  $CO_2$ , y disipando  $H^+$ , es una respuesta de *B. cereus* para hacer frente al bajo pH intracelular (Mols et al., 2010).

Otro sistema que presenta *Bacillus cereus* en respuesta al estrés ácido, es la inducción de un grupo de genes como los que codifican para la superóxido dismutasa, catalasa y tioredoxinas, que están involucradas en la respuesta al estrés oxidativo (Mols et al., 2010).

De igual manera que *E. coli*, *B. cereus* es capaz de activar un sistema de descarboxilación de la lisina y de la arginina; que actúan como fue señalado para *E. coli*. Sin embargo, la presencia de la glutamino descarboxilasa no ocurre aquí, ya que hay muchas cepas que no presentan este sistema de respuesta (Desriac et al., 2013).

### **1.5.2 Estrés térmico**

La temperatura es un factor cardinal que controla la tasa de crecimiento microbiano. Un microorganismo en particular puede exhibir un intervalo de temperatura en el cual es capaz de crecer. Las bacterias pueden ser clasificadas en diferentes grupos: los microorganismos con una temperatura óptima de crecimiento cercana a los 37 °C son mesófilos; aquellos microorganismos con una temperatura de crecimiento entre 45 y 70 °C son termófilos. Los microorganismos capaces de crecer a temperaturas de 0 °C o menores, son psicrófilos. Finalmente, los microorganismos cuya temperatura de crecimiento varía entre 10 y 15 °C son conocidos como psicrótrofos (Tortora, 2014)

La cinética química se encarga de estudiar las velocidades de reacción que pueden presentar cambios en el alimento o en la carga microbiana que contiene, cuando son afectados por temperatura, humedad, pH, presión, la presencia y cantidad de reactantes y otras condiciones (Romero et al., 2004).

En la actualidad existen modelos matemáticos que permiten predecir el crecimiento de un amplio rango de microorganismos. El modelado matemático se realiza asumiendo condiciones constantes para determinar los valores de los parámetros cinéticos de crecimiento (Agustin y Carlier, 2000).

- Valor D: la muerte de microorganismos a una temperatura elevada es generalmente aceptada por la cinética de primer orden, la cual se basa en que a una temperatura constante el rango de muerte de los microorganismos es directamente proporcional con la concentración presente en un tiempo particular. El resultado de la cinética de primer orden es definido por el tiempo durante el cual el número de microorganismos muere de uno a diez del número

inicial en un intervalo de tiempo, independientemente del número actual (Rees y Bettison, 1991). Esto puede ser descrito, siguiendo un número de microorganismos, teniendo una temperatura letal constante y después contar los sobrevivientes en el tiempo dado. El tiempo que se requiere para reducir la cuenta por un factor de 10 (o se reducen en un 90%), se conoce como Tiempo de reducción decimal (D) para estos microorganismos (Vázquez-Aguilar, 2007). El valor D se refiere a la resistencia térmica de los microorganismos y es diferente de su temperatura óptima.

- Valor Z: En los trabajos de Begelow en 1921, se muestra una relación lineal entre el logaritmo del tiempo de reducción decimal para esporas y la temperatura. El valor Z puede ser definido como el número de grados que hay que aumentar para que la curva de muerte térmica disminuya un ciclo logarítmico al tiempo D (Rees y Bettison, 1991).

#### **1.5.2.1 *Escherichia coli* frente al estrés térmico**

*E. coli* es una bacteria mesófila, cuya temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C. En *E. coli*, un incremento de temperatura de 30 a 42 °C causa una rápida inducción de la síntesis de varias proteínas de choque térmico (HSP), que es seguido por un periodo de adaptación donde la tasa de síntesis de proteínas de choque térmico disminuye de tal manera que se consigue un nuevo estado de equilibrio (Bukau, 1993). La mayoría de las proteínas de choque térmico son chaperonas moleculares y proteasas. ADNK y ADNJ, junto con GrpE, consituye uno de dos sistemas de chaperonas en *E. coli*, con el otro siendo el sistema de chaperonas GroE, que está constituido por otro set de proteínas de choque térmico. Este sistema de chaperonas es considerado importante ya que constituye entre el 15 y 20 % del total de proteínas en *E. coli* a 46 °C, indicando el importante papel que desempeñan en la sobrevivencia celular en condiciones de estrés por temperatura (Georgopoulos et al., 1994). Las chaperonas moleculares son vitales para el aseguramiento de un correcto plegamiento y ensamblaje de las proteínas. Esta función se vuelve más importante a altas temperaturas, cuando las proteínas

se vuelven inestables y son incapaces de formar correctamente sus estructuras funcionales adecuadas.

La respuesta al choque térmico en *E. coli* está regulada positivamente a nivel transcripcional por la proteína  $\sigma^{32}$ , que es un producto del gen *rpoH* (Gross, 1996).  $\sigma^{32}$  es necesaria tanto para la expresión inducida como para la expresión basal de varios genes de choque térmico. La concentración de  $\sigma^{32}$  es extremadamente bajo en condiciones estables (10 a 30 copias por célula a 30 °C), y es el factor limitante para la transcripción de genes de choque térmico (Craig & Gross, 1991). La respuesta al choque térmico viene como consecuencia de un rápido incremento de los niveles de  $\sigma^{32}$ , dando lugar a un aumento en la transcripción de genes de choque térmico y la producción de proteínas de choque térmico. La regulación de la respuesta al choque térmico a través de los niveles de  $\sigma^{32}$  en la célula es un proceso bastante rápido, y que permite a *E. coli* responder rápidamente a condiciones de estrés.

El conjunto de proteínas chaperonas ADNK, consiste de las proteínas ADNK, ADNJ y GrpE (Tilly et al., 1983). Las mutaciones en los genes *ADNK*, *ADNJ* y *grpE* inducen la respuesta de choque térmico a través de aumentos en la estabilidad y la actividad de  $\sigma^{32}$  (Straus et al., 1990). El modelo actual de la regulación de  $\sigma^{32}$  por las proteínas chaperonas ADNK se ha referido como el “modelo de titulación de proteína desplegada” (Straus et al., 1990; Craig and Gross, 1991; Bukau, 1993). En este modelo, las proteínas desplegadas y  $\sigma^{32}$  compiten el unirse a ADNK, con el complejo ADNK- $\sigma^{32}$  inactivo en la transcripción. En suma, la unión de ADNK a  $\sigma^{32}$  facilita la degradación de  $\sigma^{32}$  de una forma desconocida. Cuando las proteínas desplegadas son bajas en relación con ADNK, el complejo inactivo ADNK- $\sigma^{32}$  predomina,  $\sigma^{32}$  es degradado rápidamente, y la expresión de genes de respuesta al calor es menor. Sin embargo, cuando la concentración de las proteínas desplegadas es mayor con respecto a ADNK, el estado activo, estable de  $\sigma^{32}$  predomina, y los genes de choque térmico son inducidos.

En la célula, una red de proteínas chaperonas controla el plegamiento de las proteínas (Buchberger et al., 1996). Buenos candidatos para ser reguladores adicionales de  $\sigma^{32}$  son GroEL/S y HtpG (Fink, 1999).

#### **1.5.2.2 *Bacillus cereus* frente al estrés térmico**

Como se mencionó anteriormente, *Bacillus cereus* es una bacteria mesófila; sin embargo, se ha demostrado que es capaz de crecer a temperaturas superiores en su estado vegetativo. Una vez alcanzadas temperaturas exteriores de aproximadamente 42 °C, comienza la síntesis de aproximadamente 31 proteínas en *Bacillus cereus*. Muchas de las proteínas identificadas pertenecen al grupo de chaperonas ADNK y GroEL (cuyo funcionamiento y regulación se explicó anteriormente para *E. coli*) y proteínas como ClpP, que es una ATPasa que funciona como chaperona en el plegamiento de proteínas (Gottesman et al., 1997). Otras chaperonas que son inducidas por el calor el *B. cereus* son HSP16.4, PpiB, YloH, CspB y CspE. HSP16.4 es miembro de la familia de pequeñas proteínas de choque térmico y muestra una gran homología a una familia de este tipo de proteínas en la bacteria ácido láctica *Streptococcus thermophilus* (Solow & Somkuti, 2000). PpiB es una peptidil-prolil *cis trans* isomerasa que puede catalizar y replegar proteínas en *B. subtilis* (Periago et al., 2002). YloH es la subunidad omega de la RNA polimerasa, podría actuar como una chaperona en el núcleo específico de la RNA polimerasa que contrarresta la desestabilización del núcleo de la enzima causado por temperaturas elevadas (Ghosh et al., 2001). Finalmente, en esta familia de chaperonas, dos proteínas de choque frío, CspB y CspE, son inducidas al estrés por calor (Mayr et al., 1996).

La producción de varias proteínas presumiblemente involucradas en procesos metabólicos también se incrementa a 42 °C en *B. cereus*. FoliD es una metileno-tetrahidrofolato deshidrogenasa que está involucrada en la biosíntesis de compuestos celulares esenciales como purinas, metionina e histidina. Dra es la última enzima en la cascada del catabolismo de desoxiribonucleósidos y se piensa que es capaz de proporcionar una fuente extra de energía a las células (Saxild et al., 1996).

Un aumento de temperatura de 30 a 42 °C conduce a la activación de 20,1 veces de  $\sigma^B$  y es, por mucho, el disparo más potente que conduce a la activación de  $\sigma^B$  en *B. cereus* (van Schaik et al., 2004) cuya función se explicó previamente.

## 2. JUSTIFICACIÓN

En México, el consumo de diversos alimentos y bebidas regionales elaboradas con materias primas de alto consumo nacional, como el maíz es muy frecuente; sin embargo, dichos productos, por su carácter regional, solo se producen y consumen localmente, por lo que carecen de popularidad en el resto del país y su estudio no se ha llevado a cabo. Tal es el caso del atole agrio, una bebida fermentada elaborada con maíz, muy popular en las comunidades mazatecas (Norte de Oaxaca, Tabasco y sur de Veracruz).

A pesar de las ventajas que ofrecen los alimentos fermentados tradicionales, se presentan también riesgos a la salud. *Salmonella* spp. es el principal microorganismo patógeno causal de enfermedades como fiebre tifoidea y paratifoidea, que en México están reportadas como la 18va causa de morbilidad durante el presente año. Se ha reportado la presencia de *Salmonella* spp. en diversos alimentos fermentados a base de cereales, como por ejemplo en el nono (Olasupo et al, 2002), togwa (Kingamkono et al, 1999), kunun (Essien et al, 2009), tempeh, por lo que era necesario evaluar la presencia de este microorganismo en el atole agrio.

*Escherichia coli* es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria. La infección por *E. coli* se transmite generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda. También se ha reportado su presencia en alimentos fermentados a base de maíz como el pozol (Sainz, 1998), así que su análisis e identificación en el atole agrio es importante debido a su posible patogenicidad y, que además, sirve también como indicador de malas prácticas de elaboración.

El estudio de bacilos esporulados en los alimentos fermentados es muy importante, ya que son capaces de producir una endospora que les confiere resistencia ante condiciones adversas como el pH ácido y calor (condiciones

presentes en el atole agrio), una vez que se vuelve a encontrar en condiciones óptimas, la célula vegetativa vuelve a estar presente. *Bacillus cereus* es una bacteria capaz de producir enfermedad gastrointestinal si se encuentra presente en el alimento. Por lo tanto, su estudio en el atole agrio es muy importante para conocer el comportamiento de este grupo de bacterias.



### **3. HIPÓTESIS**

El atole agrio es una bebida fermentada de maíz que se elabora mediante un proceso tradicional, su manipulación se da en condiciones deficientes de higiene tanto de la materia prima, como por parte del elaborador y del equipo utilizado hasta la obtención del producto. La calidad e inocuidad del producto podría entonces verse comprometida por la presencia de microorganismos patógenos capaces de producir enfermedades de transmisión por alimentos. Sin embargo, debido a los bajos valores de pH y al calentamiento del producto, estos serán eliminados y no se presentarán en el producto final.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar e identificar la presencia de posibles cepas de bacterias patógenas (enterobacterias y bacterias aerobias esporuladas) en las diferentes etapas de elaboración del atole agrio con fermentación sólida y líquida de Villahermosa, Tabasco y su posible sobrevivencia al pH bajo y al calor.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar *Salmonella* spp. de las materias primas y de las principales etapas de elaboración del atole agrio.
- Identificar las cepas aisladas de *Salmonella* por medio del método fenotípico Api20E y de la amplificación del Espacio Intergénico 16S-23S.
- Inocular una cepa conocida de *Salmonella* spp. a diferentes tiempos de fermentación del atole agrio para conocer su sobrevivencia.
- Aislar *Escherichia coli* de las materias primas y de las principales etapas de elaboración del atole agrio.
- Determinar si existen diferencias en el tipo y la cantidad de *E. coli* entre las fermentaciones sólida y líquida del atole agrio.

- Agrupar mediante RAPD PCR las cepas de *E. coli* aisladas e identificarlas mediante pruebas bioquímicas y comparación de secuencias del gen rRNA 16S.
- Aislar cepas de bacterias esporuladas aerobias de diferentes etapas de elaboración de atole agrio líquido y sólido.
- Identificar los aislados de bacilos aerobios esporulados mediante la comparación de secuencias del gen rRNA16S.
- Determinar la resistencia a la acidez de las cepas de *E. coli* aisladas.
- Determinar la temperatura a la cual las cepas de *E. coli* aisladas del atole agrio, son capaces de crecer, así como conocer el valor de temperatura en la cual estas cepas de *E. coli* son eliminadas. Determinar el valor D y valor Z de cada una de las cepas de *E. coli* aisladas del atole agrio.
- Conocer si la presencia de bacterias ácido lácticas, aisladas del atole agrio, influye en el crecimiento y sobrevivencia de los microorganismos patógenos (*Salmonella* Infantis, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *E. coli*).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

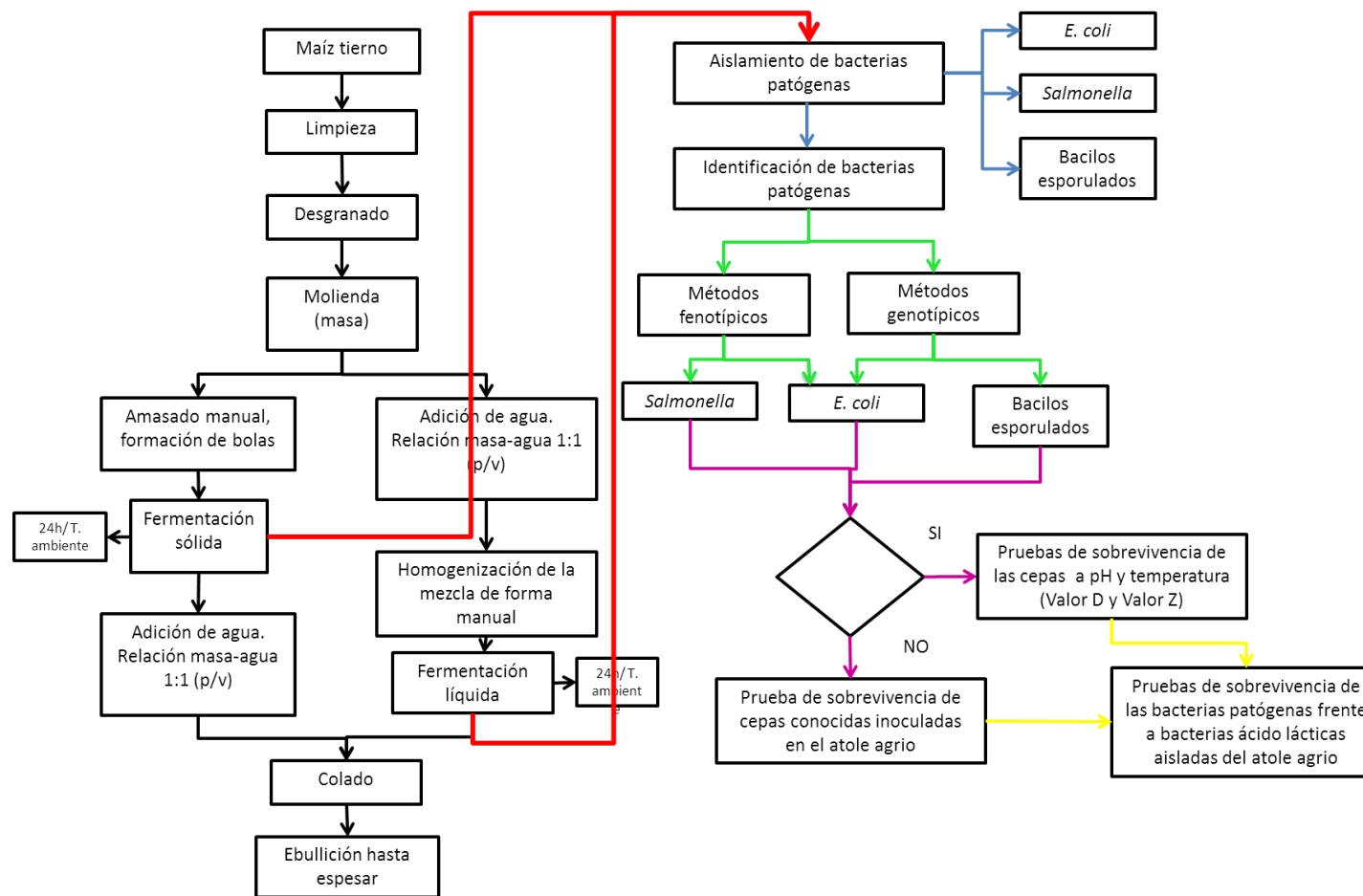


Figura 8: Metodología que se llevó a cabo para el estudio de las bacterias patógenas en el atole agrio de Villahermosa, Tabasco

## 5.2 CEPAS UTILIZADAS DURANTE EL ESTUDIO

Tabla 3: Cepas utilizadas para el estudio de las bacterias patógenas en el atole agrio de Villahermosa, Tabasco.

Especie	Referencia
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Laboratorio 324, Depto. Alimentos y Biotecnología, UNAM
<i>Salmonella</i> Infantis EELA 37	Finnish Food Safety Authority EVIRA
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	Colección Universidad del Este de Finlandia
<i>Candida albicans</i> EELA 188	Finnish Food Safety Authority EVIRA
<i>Bacillus cereus</i> EELA 72	Finnish Food Safety Authority EVIRA
<i>Weissella confusa</i>	Valderrama, 2011
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Valderrama, 2011
<i>Lactococcus lactis</i>	Valderrama, 2011
<i>Leuconostoc (pseudo)mesenteroides</i>	Valderrama, 2011
<i>Weissella confusa</i>	Valderrama, 2011
<i>Lactococcus lactis</i>	Valderrama, 2011
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Valderrama, 2011
<i>Lactococcus lactis</i>	Valderrama, 2011
<i>Weissella paramesenteroides</i>	Väkeväinen, 2011
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Väkeväinen, 2011
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Väkeväinen, 2011
<i>Lactobacillus dextrinicus</i>	Väkeväinen, 2011
<i>Weissella paramesenteroides</i>	Väkeväinen, 2011
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Väkeväinen, 2011
<i>Leuconostoc (pseudo)mesenteroides</i>	Väkeväinen, 2011
<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>Lactis</i>	Väkeväinen, 2011
<i>Weissella confusa</i>	Väkeväinen, 2011
<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>Lactis</i>	Väkeväinen, 2011
<i>Lactococcus mali</i>	Aznar, 2011
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Aznar, 2011
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Aznar, 2011
<i>Lactococcus lactis</i>	Aznar, 2011

### **5.3 ELABORACIÓN DEL ATOLE AGRIO**

Se compró 1 Kg de elote a un productor de la comunidad “El Chinal” en el municipio de Teapa, Tabasco; las mazorcas se almacenaron en bolsas de plástico a temperatura ambiente (aproximadamente 30 °C durante 16 horas).

Posteriormente, la señora Catalina Hernández elaboró el atole agrio limpiando las mazorcas: se eliminaron todas las hojas y los olotes del maíz, además se eliminaron los insectos. A continuación, se desgranaron las mazorcas con un cuchillo sanitizado con alcohol antes de realizar la operación; los granos obtenidos se recolectaron en una tinaja de plástico, previamente sanitizada con alcohol. Después, se llevó a cabo la molienda en el molino familiar manual sin marca.

La masa obtenida se colocó en una bandeja de plástico para la fermentación sólida durante 24 horas a temperatura ambiente. Para la fermentación líquida se coló la masa a través de una malla no estéril y se agregó agua a la masa (1:1), después se disolvió la masa en el agua manualmente y sin guantes y se dejó reposar con una cubierta de manta de cielo durante 24 horas a temperatura ambiente.

Las muestras obtenidas se almacenaron por triplicado en bolsas de plástico para su posterior congelación y transporte.

### **5.3 DETECCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS**

#### **5.3.1 *Salmonella* spp.**

Para realizar el aislamiento selectivo de *Salmonella* spp. se llevó a cabo la metodología señalada en la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994; que consiste en los siguientes pasos:

**a) Pre-enriquecimiento:**

Se pesó en una bolsa de Stomacher estéril, en área aséptica 25 g / 25 mL de atole agrio y se añadieron 225 mL de caldo lactosado (Difco™) (Anexo 1) estéril en la bolsa. Posteriormente se homogeneizó la muestra con el diluyente durante 30 segundos a velocidad media en el Stomacher; después, se transfirió asépticamente la mezcla a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca y se dejó reposar por 60 min a temperatura ambiente con la tapa perfectamente cerrada. Se mezcló y se incubó la muestra a 37 °C durante 24 horas.

**b) Enriquecimiento selectivo:**

Una vez transcurridas las 24 horas, se sacaron los matraces de la incubadora y se agitaron suavemente para después transferir 0.5mL del cultivo a un tubo con 4.5mL con los caldos Vassiliadis-Rappaport (Oxoid®) (Anexo 1) y Selenito-cistina (Oxoid®) (Anexo 1), se agitaron e incubaron a 37°C durante 24 horas.

**c) Aislamiento diferencial:**

Se homogeneizó el tubo con caldo de enriquecimiento ya incubado, se tomó una muestra del cultivo anterior con asa microbiológica estéril y se sembró en estría por agotamiento en cuadrantes en cajas de Petri, en los medios selectivos Verde Brillante (Difco™) (Anexo 1) y Entérico de Hektöen (Difco™)(Anexo 1).

Se seleccionaron las colonias características de cada medio (Tabla 4) y se llevó a cabo una purificación en medio MacConkey (Difco™) (Anexo 1) y se realizó la prueba de catalasa y la tinción de Gram.

Tabla 4: Características de *Salmonella* spp. en los medios selectivos (NOM-114-SSA1-1994: Método para la identificación de *Salmonella* en alimentos).

Medio	Características coloniales de <i>Salmonella</i> spp.
Agar Verde Brillante	Colonias rosas-rojas, pueden ser transparentes, rodeadas con medio enrojecido. Las bacterias fermentadoras de lactosa son amarillas.
Agar entérico Hektöen	Colonias verdes o azules verdes con o sin centro negro. En algunos casos completamente negras.
Agar MacConkey	Colonias incoloras con el medio decolorado.

- **Tinción de Gram**

Se prepararon los *frotis* bacterianos a partir de las colonias aisladas con un crecimiento no mayor a 18 horas de incubación. Después se realizó la tinción de Gram. Las preparaciones se examinaron al microscopio con un aumento total de 1000x. *Salmonella* son bacilos Gram-negativos.

- **Prueba de catalasa**

Se tomó una colonia aislada, y se distribuyó sobre una gota de peróxido de hidrógeno colocada sobre un porta objetos. La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en agua (H<sub>2</sub>O) y oxígeno (O<sub>2</sub>). *Salmonella* es catalasa-positivo.

### **5.3.2 Escherichia coli**

Para realizar el aislamiento selectivo de *E. coli* se llevó a cabo la metodología indicada por el Bacteriological Analytical Manual (BAM) de la Food and Drug Administration (FDA): Enumeración de *Escherichia coli* y bacterias coliformes. De la siguiente manera:

#### **a) Enriquecimiento:**

Se pesó en una bolsa de Stomacher estéril, en área aséptica 25 g / 25 mL de atole agrio y se añadieron 225 mL de Caldo Cerebro Corazón (BHI) (Difco™) (Anexo 1) estéril en la bolsa. Posteriormente se homogeneizó la muestra durante 30 segundos a velocidad media en el Stomacher; después, se transfirió asépticamente la mezcla a un matraz estéril y se incubó la muestra a 37 °C durante 24 horas.

#### **b) Aislamiento diferencial:**

Se homogeneizó el matraz de enriquecimiento ya incubado, se tomaron 0.5 mL y se colocaron en 4.5 mL de agua peptonada al 0.1 % y se hicieron diluciones decimales seriadas, después se tomó 0.1 mL de las diluciones y se inocularon en las placas del medio Eosina Azul de Metileno (EMB) (Anexo I) con su respectiva réplica. El inóculo se esparció con ayuda de un asa triangular por extensión superficial en la placa con el agar EMB; al final, se incubó cada placa a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se observó el crecimiento de las



colonias y aquéllas que tuvieran las características para *E. coli* en este medio: colonias circulares verdosas, con brillo metálico y centro negro azulado.

Después se seleccionaron las colonias y se purificaron en agar EMB por medio de la técnica de cuadrante radial y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Por último las colonias del medio EMB se purificaron nuevamente en medio MacConkey con sorbitol (Difco™) (Anexo 1) y se realizó la prueba de catalasa y la tinción de Gram.

### **5.3.3 Bacilos esporulados aerobios**

Para realizar el aislamiento selectivo de los bacilos esporulados Gram-positivos aerobios se llevó a cabo la metodología sugerida por Ramírez Gama et al., 2006; que consiste en los siguientes pasos:

#### **a) Enriquecimiento:**

Se pesaron en una bolsa de Stomacher estéril, en área aséptica 25 g / 25 mL de atole agrio y se añadieron 225mL de caldo (Difco™) (Anexo 1) estéril en la bolsa. Posteriormente se homogeneizó la muestra con el diluyente durante 30 segundos a velocidad media en el Stomacher; después, se transfirió asépticamente la mezcla a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca. Se mezcló y se incubó la muestra a 30°C durante 24 horas.

#### **b) Dilución y eliminación de células viables**

Se homogeneizó el contenido del matraz de enriquecimiento ya incubado, se tomaron 0.5 mL y se colocaron en 4.5 mL de agua peptonada al 0.1 % y se hicieron diluciones decimales seriadas, después se colocaron las diluciones: 0, -1, -2 y -3 en calentamiento a ebullición durante 10 minutos; transcurrido ese tiempo, se tomaron 0.1 mL de las diluciones y se inocularon en las placas del medio Tripticasa Soya Agar con Sulfato de Manganeso al 0.5 % (TSA+MnSO<sub>4</sub>) (Anexo I) con su respectiva réplica. El inóculo se esparció con ayuda de un asa triangular por extensión superficial en la placa con el agar TSA+MnSO<sub>4</sub>; al final, se incubó cada placa a 30 °C durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se observó el crecimiento de las colonias y aquéllas que tuvieran las crecimiento se

seleccionaron y se purificaron en agar TSA+MnSO<sub>4</sub> por medio de la técnica de cuadrante radial y se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se realizó la prueba de catalasa y la tinción de Gram.

Una vez seleccionadas aquellas colonias que fuesen bacilos Gram-positivos, se procedió a realizar la tinción de espora. Para esto, se sembraron las colonias en agar TSA+MnSO<sub>4</sub> nuevamente y se incubaron a 30 °C durante 48 a 72 horas para favorecer la esporulación.

- **Tinción de Espora. Técnica de Shaeffer-Fulton (Rodríguez Caballini, 2005).**

La envoltura de la endospora es más compleja e impermeable que la cubierta de las células vegetativas en las que se forma. Sólo se puede teñir el contenido de la espora alterando su cubierta. La impermeabilidad de las cubiertas dificulta que las endosporas se decoloren una vez teñidas. El verde de malaquita es un colorante débilmente básico (tiene una carga positiva débil) y por tanto, se une débilmente a la bacteria. Penetra en las células vegetativas. Cuando se calienta la preparación también penetra la endospora. Durante el lavado con agua, el verde de malaquita se elimina de las células vegetativas, pero no de la endospora. El colorante de contraste (la safranina) solo puede teñir a las células vegetativas (decoloradas por el agua).

Se prepararon los *frotis* bacterianos a partir de las colonias aisladas con un crecimiento de 48 horas de incubación. Después se realizó la tinción de espora (Anexo II). Las preparaciones se examinaron al microscopio con un aumento total de 1000 x. Las esporas se observaron de color verde y las células vegetativas color rosa.

#### **5.4 CONSERVACIÓN DE CEPAS**

Para llevar a cabo la conservación de las cepas puras de las presuntas bacterias patógenas, se inoculó una colonia, proveniente del agar MacConkey en agar Nutritivo (Difco™) (Anexo I), para después incubar durante 24 horas a 37 °C para obtener colonias jóvenes. Al paso de este tiempo, se inoculó una colonia del agar Nutritivo en un tubo con 5 mL de caldo BHI se incubó durante 24 horas a una

temperatura de 37 °C. Después, se colocaron 1.7 mL de este cultivo en un tubo que contenía 0.3 mL de glicerol estéril al 20 % (J.T. Baker). Al final cada cultivo se guardó a -60 °C en el ultracongelador (Puffer Hubbard).

Para la reactivación de las cepas, se colocaron 200 µL provenientes del tubo con glicerol en caldo BHI, se incubó a 37 °C durante 24 horas para después sembrar por agotamiento en agar nutritivo.

## **5.5 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS**

### **5.5.1 *Salmonella* spp.**

Para la identificación de los aislados de presuntos *Salmonella* spp. se llevó a cabo la prueba Api20E®, así como una reacción de PCR del ITS 16S-23S.

#### **5.5.1.1 Tiras API20E®**

La preparación de la galería (BioMerieux-Industry, USA) se realizó de la siguiente manera: se reunió el fondo y la tapa de una cámara de incubación y se repartieron 5mL de agua destilada en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda. Después se sacó la galería del envase y se inoculó, para esto fue necesario colocar en 5 mL de NaCl 0.85 % estéril una colonia proveniente de un cultivo joven (18-24 horas) de cada una de las colonias provenientes de agar nutritivo y se suspendió hasta homogenizar en el medio, después, se debe introducir la suspensión bacteriana en los tubos de la galería (Anexo III) con la ayuda de una pipeta (inclinando la cámara ligeramente para evitar la formación de burbujas); para las pruebas citrato, Voges Proskauer y gelatina, se llenó el tubo y la cúpula; para las otras pruebas, se llenó únicamente los tubos y para las pruebas de arginina dihidrolasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, H<sub>2</sub>S, ureasa, se creó una atmósfera anaerobia llenando la cúpula con aceite de parafina. Terminando la inoculación, se procedió a cerrar la cámara de incubación y se incubaron las galerías a 36±2 °C durante 18-24 horas.

Concluido el tiempo de incubación, se realizó la lectura de la cámara de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Terminando este paso, se obtuvo un perfil

numérico de 7 cifras, y con la ayuda del software de identificación Apiweb™ (BioMerieux-Industry, USA) se introdujo el código de 7 cifras y se obtuvo el perfil de identificación de cada muestra.

#### **5.5.1.2 PCR de ITS 16S-23S**

Para llevar a cabo la reacción del Espaciador Transcripcional Interno 16S-23S, se extrajo primero el ADN de las cepas que fueran diferentes obtenidas a partir de la identificación del API20E.

##### **a) Extracción de ADN**

Para realizar la extracción de ADN se procedió a descongelar y reactivar las cepas que, previamente identificadas mediante las tiras API 20E®, fuesen de distintos géneros y especies. Por lo que se colocaron 200 µL del cultivo en glicerol en un tubo con 4 mL de caldo BHI y se incubó durante 24 horas a 37 °C, al término se observó el crecimiento y se procedió a sembrar por el método de estría radial en placas con agar Trypticase Soya (TSA) (Anexo I), se incubaron las placas durante 24 horas a 37 °C. Después de este tiempo, dado que hubo un buen crecimiento, se procedió a realizar la extracción del ADN utilizando un método químico-enzimático (Lawson *et al.*, 2001).

A partir de las placas se tomó una colonia aislada que fue suspendida en 500 µL de amortiguador TES 1X (Anexo IVa), a continuación se procedió a adicionar 20 µL de lisozima (20 mg/mL Sigma-Aldrich (Anexo IVa)) y se agitó con vórtex, después, se incubó en una incubadora con agitación (Eppendorf, Thermomix comfort) a 37 °C de 15 a 60 minutos hasta que la solución se tornó viscosa. Al término de ese tiempo, se adicionaron 8 µL de pronasa 20 mg/mL Sigma-Aldrich (Anexo IVa) y 8 µL de RNAasa 20mg/mL Sigma-Aldrich (Anexo IVa) se agitó con el vórtex y se incubó a 65 °C durante una hora. Después se adicionaron 120 µL de detergente SDS al 10 % (Anexo IVa), se agitó vigorosamente y se colocaron los tubos en el baño con agitación a 65 °C durante 10 minutos más. Se retiraron los tubos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron 600 µL de fenol-cloroformo 24:1 (Sigma®) y se agitaron los tubos en el vórtex hasta formar una emulsión blanca. Se centrifugaron los tubos durante 10 minutos

a 14,000 rpm y la fase superior se colocó en un tubo nuevo; se agregaron 600  $\mu$ L de fenol-cloroformo y se agitaron los tubos en el vórtex hasta formar una emulsión blanca. Se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 14,000 rpm y la fase superior se colocó en un tubo nuevo. Después se agregaron 500  $\mu$ L de etanol absoluto frío, se agitó suavemente cada tubo y se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos; se desechó el etanol y se dejaron reposar las muestras durante 12 horas destapadas para eliminar el etanol residual. Al finalizar, se adicionaron 50  $\mu$ L de agua destilada, se colocaron los tubos en la incubadora con agitación a 65 °C durante una hora.

Para comprobar la integridad del ADN extraído, se preparó un gel de agarosa al 1 % (Invitrogen®), se colocaron 5  $\mu$ L de muestra junto con 1  $\mu$ L de amortiguador de carga con colorante en cada uno de los pozos del gel, usando un pozo por muestra y uno extra para colocar 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 1 Kbp de la marca InvitroGen®. A continuación se corrió el gel en una cámara para electroforesis de Pharmacia Biotech, modelo GNA 100 a 90 V por 30 minutos, usando el equipo Bio-Rad Power Pac 30 como fuente de poder. Después de este tiempo, se tiñó el gel en una solución de Bromuro de etidio al 2 % por 15 minutos para después observarlo en un transiluminador marca Fotodyne modelo FotoUV/15. La imagen se capturó con el equipo Kodak Image Station y el programa Carestream. La formación de bandas en el gel mostró el ADN presente y su integridad.

### ***b) ITS 16S-23S***

Para la amplificación la reacción del Espaciador Transcripcional Interno 16S-23S, se usan los cebadores señalados en la Tabla 5:

**Tabla 5: Cebadores utilizados para la reacción ITS**

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Referencia</b>
<b>ITSf</b>	TGC CGG CTG GAT CAC CTC CTT	Chiu et al., 2005.
<b>ITSr</b>	TAT AGC CCC ATC GTG TAG TCA GAA C	Chiu et al., 2005.

El cóctel de la reacción de amplificación del espacio intergénico se encuentra en la Tabla 6.

Tabla 6: Cóctel de la reacción, método ITS.

Reactivo	Concentración en la reacción	Volumen
Amortiguador 10X	1x	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2.5 mM	5 µL
dNTPs (10mM)	0.2 mM	1 µL
Tween-20 (0.1%)	0.001%	5 µL
Glicerol (50%)	12 %	12 µL
Cebador ITSF (50µM)	10 pmol	1 µL
Cebador ITSr (50µM)	10 pmol	1 µL
Taq (1U/µl)	5 U/µL	1 µL
Agua destilada estéril		9 µL
AND	Variable	10 µL
<b>Total</b>		<b>50 µL</b>

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial durante 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 30s a 94 °C (desnaturalización), 35 segundos a 61 °C (alineamiento) y 35 segundos a 72 °C (extensión) y una extensión final de 10 segundos a 72 °C. El procedimiento se realizó en el termociclador marca Biometra modelo Tpersonal.

Para la visualización de los fragmentos amplificados se preparó un gel de agarosa (InvitroGen®) al 2 % (Anexo IVb), se colocaron 5 µL de los productos de PCR junto con 1.5 µL de amortiguador de carga con colorante en cada uno de los pozos del gel, usando un pozo por muestra y uno extra para colocar 5 µL de marcador de peso molecular de la marca InvitroGen® de 1Kpb. Se realizó la electroforesis durante 90 minutos en una cámara para electroforesis de Pharmacia Biotech, modelo GNA 100 a 70 V por 60 minutos, usando el equipo Bio-Rad Power Pac 30 como fuente de poder. Después se tiñó el gel en una solución de bromuro de

etidio al 2 % durante 15 minutos; para después observarlo en un transiluminador marca Fotodyne modelo FotoUV/15. Al final, el gel se fotografió con el equipo Kodak Image Station y se capturó con el software Carestream.

### **5.5.2 Escherichia coli**

Para la identificación de los aislados de presuntos *Escherichia coli* se llevó a cabo la prueba Api20E® descrita previamente, además se realizó el agrupamiento diferencial de los aislados por medio del RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic PCR*); después, se llevó a cabo la secuenciación del rRNA 16S.

#### **5.5.2.1 RAPD**

Para llevar a cabo la reacción RAPD, se extrajo primero el ADN de 12 cepas previamente aisladas del atole agrio e identificadas mediante el Api 20E®.

##### **a) Extracción de ADN**

La extracción del ADN se llevó a cabo con ayuda del kit: NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Alemania). Primero, se procedió a reactivar las cepas previamente identificadas. Por lo que se colocaron 1 asada del cultivo en 5 mL de caldo BHI y se incubó durante 24 horas a 37 °C, al término se observó el crecimiento. Después se midió 1 mL de cultivo y se centrifugó durante 5 minutos a 8,000 x g. Se removió el sobrenadante. Después el pellet se resuspendió en 180 µL de amortiguador T1, a continuación se procedió a adicionar 25 µL de proteinasa K y se agitó con vórtex, después, se incubó en una incubadora con agitación (Eppendorf, Thermomix comfort) a 56 °C de 1 a 3 horas hasta que la solución se tornó transparente. Al término de ese tiempo, se agitó con vórtex las muestras. Después, se adicionaron 200 µL del amortiguador B3, se agitó con vórtex y se incubó a 70 °C durante 10 minutos. Al término de este tiempo, se agitó con vórtex y se adicionaron 210 µL de etanol absoluto frío, se agitó con vórtex hasta la aparición de un precipitado. Después se colocó un Nucleospin® Tissue Column en un tubo de recolección y se pasó la muestra a través de la columna. Se centrifugó a 11,000 x g durante 1 minuto. Se desechó lo colectado en el tubo de recolección y se procedió a lavar la columna. Para un primer lavado, se añadieron 500 µl de amortiguador BW y se centrifugó durante 1 minuto a 11,000 x g. Se

eliminó el contenido del tubo de recolección; para el segundo lavado, se añadieron 600  $\mu$ l de amortiguador B5 y se centrifugó durante 1 minuto a 11,000 x g. Se eliminó el residuo del tubo de recolección. Después se centrifugaron los tubos durante 1 minuto a 11,000 x g para remover el etanol residual. Se colocó la columna en un tubo de microcentrifuga y se añadieron 70  $\mu$ L de buffer BE previamente calentado a 70 °C. Se incubaron los tubos a temperatura ambiente durante 1 minuto y finalmente se centrifugaron durante 1 minuto a 11,000 x g.

Para comprobar la pureza e integridad del ADN extraído, se preparó un gel de agarosa al 1% (Invitrogen®) con 1  $\mu$ L de colorante SYBR® Safe ADN gel (Invitrogen®), se colocaron 5  $\mu$ L de muestra junto con 1  $\mu$ L de amortiguador de carga con colorante en cada uno de los pozos del gel, usando un pozo por muestra y uno extra para colocar 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 1 Kbp de la marca InvitroGen®. A continuación se corrió el gel en una cámara para electroforesis de Pharmacia Biotech, modelo GNA 100 a 90 V por 1 hora, usando el equipo Bio-Rad Power Pac 30 como fuente de poder. La imagen se capturó con el equipo Machine MultiDoc-It, Digital Imaging System (UVP, USA., UV Transilluminator; Program Launch Doc-ItLS). La formación de bandas en el gel mostró el ADN presente y su integridad; que dieron un criterio preliminar de la pureza y concentración del mismo.

Después, se midió la concentración de ADN mediante el NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, U.S.A.). Para ello, se tomaron 1.5  $\mu$ L de agua como blanco, después se colocaron 1.5  $\mu$ L de muestra y se obtuvo la concentración de cada muestra.

#### ***b) RAPD-PCR***

Para la amplificación la reacción RAPD, se usan los cebadores señalados en la Tabla 7:



Tabla 7: Cebadores utilizados para la reacción RAPD

Cebador	Secuencia 5'-3'	Referencia
P2	GAT CGG ACG G	Samarzija et al., 2002.
P15	CTG GGC ACG A	Samarzija et al., 2002.
P16	TCG CCA GCC A	Samarzija et al. 2002
P17	CAG ACA AGC C	Samarzija et al. 2002
Corr1	TGC TCT GCC C	Corrorel et al. 1999

El cóctel de la reacción RAPD se encuentra en la Tabla 8.

Tabla 8: Cóctel de la reacción, método RAPD.

Reactivo	Volumen
Amortiguador 5X	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3 µL
dNTPs (10mM)	0.5 µL
Cebador (50µM)	0.5 µL
Taq (5U/µl)	0.25 µL
Agua destilada estéril	15.25 µL
AND	5 µL
<b>Total</b>	<b>25 µL</b>

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial durante 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturalización), 2 minutos a 32 °C (alineamiento) y 2 minutos a 72 °C (extensión) y una extensión final de 5 minutos a 72 °C. El procedimiento se realizó en el termociclador marca Biometra modelo Tpersonal.

Para la visualización de los fragmentos amplificados se preparó un gel de agarosa al 1 % (Invitrogen®) con 1 µl de colorante SYBR® Safe ADN gel (Invitrogen®), se

colocaron 5 µl de muestra junto con 1 µl de amortiguador de carga con colorante en cada uno de los pozos del gel, usando un pozo por muestra y uno extra para colocar 5 µl de marcador de peso molecular de 1 Kbp de la marca InvitroGen®. A continuación se corrió el gel en una cámara para electroforesis de Pharmacia Biotech, modelo GNA 100 a 90 V por 1 hora, usando el equipo Bio-Rad Power Pac 30 como fuente de poder. La imagen se capturó con el equipo Machine MultiDoc-It, Digital Imaging System (UVP, USA., UV Transilluminator; Program Launch Doc-ItLS).

### c) PCR del gen rRNA 16S

Para la amplificación de todo el rRNA 16S, se utilizaron los cebadores señalados en la Tabla 9:

Tabla 9: Cebadores utilizados para la reacción rRNA 16S

Cebador	Secuencia 5'-3'	Referencia
27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane et al., 1991
685r	TCTACGCATTTACCGCTAC	Barakat et al., 2000

El cóctel de la reacción rRNA 16S se encuentra en la Tabla 10:

Tabla 10: Cóctel de la reacción, rRNA 16S

Reactivo	Volumen
Amortiguador 5X	10 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	6 µL
dNTPs (10 mM)	1 µL
Cebador 27f (10 pmol/µl)	1 µL
Cebador 685r (10 pmol/µl)	1 µL
Taq (5 U/µl)	0.5 µL
Agua destilada estéril	29.5 µL
AND	1 µL
Total	50 µL

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial durante 6 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C (desnaturalización), 1 minuto a 54 °C (alineamiento) y 1 minuto a 72 °C (extensión) y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. El procedimiento se realizó en el termociclador marca Biometra modelo Tpersonal.

Para la visualización de los fragmentos amplificados se preparó un gel de agarosa al 1% (Invitrogen®) con 1 µL de colorante SYBR® Safe ADN gel (Invitrogen®), como se explicó previamente.

Una vez llevada a cabo la amplificación, fue necesario llevar a cabo una purificación de los productos de PCR. Para ello, se utilizó el kit PCR clean-up Gel extraction ® de Macherey-Nagel, Alemania de la siguiente manera: Se mezcló 1 volumen de muestra con 2 volúmenes de buffer NT1, después se colocó una columna de purificación del proveedor en un tubo de colección y se corrió la muestra. Se centrifugó durante 30 segundos a 11,000 x g. Se desechó el fluido y se colocó la columna en el tubo de colección. Después se llevó a cabo el lavado de la columna añadiendo 700 µL de buffer NT3. Se centrifugó durante 30 segundos a 11,000 x g. Se desechó el fluido y se colocó la columna en el tubo de colección. Después, se centrifugó durante 1 minuto a 11,000 x g para remover el buffer NT3 completamente, debido a que el buffer NT3 contiene etanol residual que puede inhibir reacciones enzimáticas, se incubaron las columnas durante 2 a 5 minutos a 70 °C. Después, se colocó la columna en un nuevo tubo de microcentrífuga y se añadieron 15-30 µL de buffer NE y se incubó de 18 a 25 °C durante 1 minuto. Al final, se centrifugó durante 1 minuto a 11,000 x g.

Para la comparación de las secuencias, las muestras de las bacterias *E. coli*, con los fragmentos amplificados del gen ribosomal, se enviaron a LGC Genomics, Alemania, para obtener las secuencias de cada una de las cepas utilizadas. Los resultados obtenidos se compararon con la base de datos del NCBI utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

### **5.5.3 Bacilos esporulados aerobios**

Para la identificación de los aislados de bacilos esporulados aerobios, se realizó la amplificación de la región V1 del gen ARNr 16S. Para ello, se extrajo el ADN de cada una de las cepas aisladas en la sección 5.3.3 por medio del método de extracción químico-enzimático (Lawson et al., 2001) descrito previamente.

Para la amplificación del ADN extraído, se realizaron diluciones de cada una de las muestras de ADN de las cepas. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Biometra Tpersonal, utilizando los cebadores pA y 3 (Tabla 11) para así poder amplificar la región V1 del gen ARNr 16S (Rodríguez, 2011).

Tabla 11: Cebadores utilizados para la reacción PCR de la región V1 del gen rRNA 16S

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia 3'-5'</b>	<b>Posición</b>	<b>Orientación</b>
<b>pA</b>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	9-28	Reversa
<b>3</b>	GTTGCGCTCGTTGCGGGACT	1109-1090	Hacia adelante
<b>Γ</b>	ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG	358-339	Hacia adelante

El cóctel de la reacción PCR de la región V1 del gen rRNA 16S se encuentra en la Tabla 12.

Tabla 12: Cóctel de la reacción, rRNA 16S

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
<b>Amortiguador 10x</b>	5 µL
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	5 µL
<b>dNTPs (10mM)</b>	1 µL
<b>Cebador pA (50µM)</b>	0.5 µL
<b>Cebador 3 (50µM)</b>	0.5 µL
<b>Taq (10ng/µl)</b>	1 µL
<b>Agua destilada estéril</b>	27 µL
<b>AND</b>	5 µL
<b>Total</b>	50 µL

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial durante 3 minutos a 94 °C, 34 ciclos de 1 minuto a 94 °C (desnaturalización), 1.3 minutos a 65 °C (alineamiento) y 2 minutos a 72 °C (extensión) y una extensión final de 15 minutos a 72 °C.

Los productos de PCR se observaron con una electroforesis en gel de agarosa preparado al 1.5 %, a 70 volts durante 1 hora.

Una vez llevada a cabo la amplificación, fue necesario llevar a cabo una purificación de los productos de PCR. Para ello, se utilizó el kit QIAquick® PCR Purification Kit de QIAGEN® explicado previamente.

Para la comparación de las secuencias, las muestras de las bacterias *Bacillus*, con los fragmentos amplificados del gen ribosomal, se enviaron a Macrogen, Maryland, USA, para obtener las secuencias de cada una de las cepas utilizadas junto con 0.5 µL del cebador Γ. Los resultados obtenidos se compararon con la base de datos del NCBI utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

## **5.6 SOBREVIVENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS EN EL ATOLE AGRIO**

### **5.6.1 Inoculación de *Salmonella* spp. en el atole agrio**

Para probar la sobrevivencia de *Salmonella* spp. en el atole agrio, fue necesario realizar una prueba de reto a las diferentes etapas de la fermentación del atole agrio.

#### **a) Preparación del inóculo de *Salmonella* spp.:**

A partir de un cultivo puro de *Salmonella* Typhimurium, proveniente de la colección del laboratorio 324 del conjunto E del departamento de Alimentos y Biotecnología de la UNAM,. Se inocularon 0.2 mL en 5 mL de caldo BHI, para después incubar a 37 °C durante 18 a 24 horas. Después se resembró 0.5 mL en 4.5 mL de BHI y se incubó a 37 °C durante 8 horas.

#### **b) Lavado de células:**

Para obtener un cultivo puro, libre de medio de cultivo, fue necesario realizar un lavado de células, para esto, se tomaron 1.5 mL del cultivo proveniente del medio

BHI y se colocaron en un tubo eppendorf estéril, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante; después, se agregaron 1.5 mL de agua peptonada al 0.1 % y se agitó para volver a centrifugar. Por último, se eliminó de nuevo el sobrenadante y se agregaron 1.5 mL de agua peptonada al 0.1 % y se agitó el tubo.

**c) Estandarización del inóculo**

Para conocer la concentración del cultivo con *Salmonella* Typhimurium se realizaron diluciones decimales seriadas a partir del cultivo de células lavadas; para esto se tomaron 0.5 mL del cultivo y se colocaron en 4.5 mL de agua peptonada estéril al 0.1 % después, de realizar las diluciones decimales seriadas, se tomaron 0.1 mL de cada dilución y se inocularon en las placas del medio Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) (Anexo I) con su respectiva réplica. El inóculo se esparció con ayuda de un asa triangular por extensión superficial en la placa con el agar XLD; al final, se incubó cada placa a 37 °C durante 24 horas, que, transcurrido ese tiempo, se llevó a cabo el conteo de colonias que de acuerdo con el medio de cultivo fueran características, colonias circulares negras.

**d) Inoculación de *Salmonella* Typhimurium en el atole agrio**

Una vez que se conoció la concentración de UFC/mL que hay en el cultivo de células lavadas, es necesario realizar las diluciones seriadas para inocular en el atole agrio 1 mL del tubo correspondiente a la concentración de  $10^6$  UFC/mL.

Después se tomó 1 mL de dicho tubo y se añadió a un matraz con 225 mL de agua peptonada estéril y 25 g (o mL para la fermentación líquida) de atole agrio. Se colocó en una bolsa para stomacher y se agitó durante 2 minutos a velocidad media; luego, se realizaron las diluciones seriadas correspondientes en agua peptonada estéril al 0.1 %, se tomaron 0.1 mL de cada dilución y se inocularon en las placas del medio XLD con su respectiva réplica. El inóculo se esparció con ayuda de un asa triangular por extensión superficial en la placa con el agar XLD; al final, se incubó cada placa a 37 °C durante 24 horas, que, transcurrido ese tiempo, se llevó a cabo el conteo de colonias.

### **5.6.2 Pruebas de sobrevivencia de *E. coli* a pH y temperatura**

#### ***a) Resistencia al calor por cepas de *E. coli* vs temperatura (condiciones del atole agrio)***

Se descongelaron las cepas de *E. coli* que se encontraban a  $-80^{\circ}\text{C}$  transfiriendo 0.1 mL del cultivo en 5 mL de caldo BHI, después, se colocaron en incubación las bacterias a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Para realizar la comprobación de la pureza se sembró por cuadrante en agar tripticasa Soya (TSA) cada una de las bacterias y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

Se colocó una colonia aislada en crecimiento en caldo Luria (Anexo I) durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente, se ajustaron los cultivos con el espectrofotómetro de 0.16-0.21 a  $625_{\text{nm}}$  (concentración  $10^8$  UFC/mL). Se colocaron 0.5 mL de esta dilución en 4.5 mL de caldo Luria y se midió la absorbancia con el espectrofotómetro .

Se tomaron 0.5 mL del cultivo y se realizaron las diluciones seriadas correspondientes. Después, se tomaron 0.1 mL del cultivo y esparció en agar TSA con asa triangular. Se incubó cada placa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se contaron las colonias aisladas.

El cultivo inicial en caldo Luria, se colocó en un baño a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos y se repitieron los pasos anteriores. Este ensayo se llevó a cabo por duplicado.

#### ***b) Resistencia al calor por cepas de *E. coli* vs temperatura (Determinación del valor D y valor Z)***

Se descongelaron las cepas de *E. coli* que se encontraban a  $-80^{\circ}\text{C}$  transfiriendo 0.1 mL del cultivo en 5mL de caldo BHI, después, se colocaron en incubación las bacterias a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Para realizar la comprobación de la pureza se sembró por cuadrante en agar tripticasa Soya (TSA) cada una de las bacterias y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

Se colocó una colonia aislada en crecimiento en caldo Luria durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Del mismo modo anterior, se ajustaron los cultivos a una concentración de  $10^8$  UFC/mL.

Se colocó el cultivo en un baño a una temperatura de 45 °C; después, se midió la absorbancia con el espectrofotómetro cada 2 minutos. (Valor D de *E. coli* a 55 °C 6.7 minutos (Romero et al., 2011) durante 10 minutos. Este procedimiento se repitió a 55 °C, 65 °C y 75 °C. Para la determinación del valor Z, se graficaron cada uno de los Valores D vs Temperatura.

***c) Resistencia a la acidez de las cepas de E. coli aisladas del atole agrio***

Se descongelaron las bacterias que se encontraban a -80 °C transfiriendo 0.1 mL del cultivo en 5 mL de caldo BHI. Después, se colocó en incubación bacterias a 37 °C durante 24 horas. Se realizó la comprobación de la pureza sembrando por cuadrante en agar tripticasa Soya (TSA); se incubaron a 37 °C durante 24 horas; al transcurrir este tiempo, se realizó una tinción de gram de las colonias aisladas. Se colocó una colonia aislada en crecimiento en caldo Luria durante 24 horas a 37 °C.

Transcurrido este tiempo, se transfirió 0.5 mL de cada cultivo a viales con caldo Luria a diferentes valores de pH, ajustado con ácido láctico (a un pH de 4 y 6) y ácido clorhídrico (a un pH de 2, 4 y 6); después, se incubó a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se tomaron 0.5 mL del cultivo en cada una de los diferentes valores de pH ajustados con ácido láctico y ácido clorhídrico y se realizaron las diluciones seriadas correspondientes. Después, se tomaron 0.1 mL del cultivo y se esparció en agar TSA con asa triangular. Se incubó cada placa a 37 °C durante 24 horas. Finalmente, se contaron las colonias aisladas.

**5.6.3 Pruebas de reto de patógenos frente a Bacterias ácido lácticas aisladas del atole agrio**

La prueba de difusión en agar se utiliza para evaluar la actividad de inhibición de crecimiento (antimicrobial) de compuestos. El método consiste en esparcir bacterias en el agar correspondiente, crear pozos y añadir el compuesto al pozo. El efecto antimicrobial es evaluado basado en la formación de una zona de



inhibición en el área dónde se añadió el compuesto. Para ello, se llevó a cabo la siguiente metodología:

**a) Crecimiento de las bacterias para la prueba**

Previamente, durante los años 2010 y 2011 Väkeväinen, Valderrama (2011), así como Aznar (2011) aislaron ciertas cepas de bacterias ácido lácticas a partir de diferentes etapas de la fermentación del atole agrio (Tabla 13). Estas bacterias se utilizaron como aquellas capaces de producir un sobrenadante en el que se encuentra el antimicrobiano que inhibe las bacterias patógenas.

**Tabla 13: Bacterias ácido lácticas utilizadas para la prueba**

Código	Número	Especie	Referencia
IL3I3	6	<i>Weissella confuse</i>	Valderrama, 2011
IL4I1	7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Valderrama, 2011
IL5I1	10	<i>Lactococcus lactis</i>	Valderrama, 2011
IL5I2	11	<i>Leuconostoc (pseudo)mesenteroides</i>	Valderrama, 2011
IIL4I3	28	<i>Weissella confusa</i>	Valderrama, 2011
IIS4I2	59	<i>Lactococcus lactis</i>	Valderrama, 2011
IIS10I2	68	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Valderrama, 2011
IS6A1	79	<i>Lactococcus lactis</i>	Valderrama, 2011
S0I7	S0I7	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Väkeväinen, 2011
S0I8	S0I8	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Väkeväinen, 2011
S0I10	S0I10	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Väkeväinen, 2011
S2I3	S2I3	<i>Lactobacillus dextrinicus</i>	Väkeväinen, 2011
S2I6	S2I6	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Väkeväinen, 2011
S4I8	S4I8	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Väkeväinen, 2011
S6I4	S6I4	<i>Leuconostoc (pseudo)mesenteroides</i>	Väkeväinen, 2011
L3I7	L3I7	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>Lactis</i>	Väkeväinen, 2011
L4I2	L4I2	<i>Weissella confusa</i>	Väkeväinen, 2011
GTI1	GTI1	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>Lactis</i>	Väkeväinen, 2011
BTI5	BTI5	<i>Lactococcus mali</i>	Aznar, 2011
AIMM10	A1MM10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Aznar, 2011
A2SMM4	A2SMM4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Aznar, 2011
A1MS3	A1MS3	<i>Lactococcus lactis</i>	Aznar, 2011

Para ello, se reactivaron cada una de las cepas que se encontraban en placas con agar Man Rogosa y Sharpe (MRS, LabM®) (Anexo I), y se colocaron por duplicado en 8 mL de caldo MRS y se incubaron a 30 °C durante 18 horas.

También, se utilizaron como microorganismos patógenos, los provistos por la Universidad del Este de Finlandia (UEF):

- *Salmonella* Infantis, EELA 37 (Finnish Food Safety Authority Evira)
- *Listeria monocytogenes* ATCC 7644
- *Candida albicans* EELA 188 (Finnish Food Safety Authority Evira)
- *Bacillus cereus* EELA 72 (Finnish Food Safety Authority Evira)

Así como los aislados previamente e identificados en este estudio (2014) como *Escherichia coli*, *Kluyvera ascorbata*, *Shigella dysenteriae* y *Shigella flexneri*.

Se inoculó una sólo colonia de dichos patógenos en 15 mL de caldo BHI y se incubaron a 37 °C durante 18 horas.

#### **b) Preparación de las bacterias patógenas para la prueba**

Para la preparación de las bacterias patógenas se ajustó la concentración de cada uno de los microorganismos con el espectrofotómetro a una densidad óptica 625 nm de 0.16 a 0.21, para alcanzar una concentración de 10<sup>8</sup> UFC/mL; luego, se añadieron 15 mL de esta dilución en 100 mL del agar bacteriológico al 0.4 % (BD®), previamente derretido en el microondas y, se enfrió a 39-40 °C en un baño de agua (si el agar está demasiado caliente, las bacterias no sobreviven), y se agitó. Una vez mezclados, se tomaron 2 mL de la suspensión bacteriana y se colocaron en placas Petri con agar TSA, se esparció, se dejó solidificar durante 40 minutos.

#### **c) Preparación del sobrenadante de bacterias ácido lácticas**

El cultivo de bacterias ácido lácticas en caldo MRS se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C; después a uno de los tubos del duplicado, se ajustó el pH a 7±0.2 con NaOH 5M. Se traspasó todo el sobrenadante a un nuevo tubo

falcon de 15 mL con ayuda de un filtro estéril, tanto para la réplica con el ajuste del pH, como la réplica sin ajuste del pH.

***d) Realización del ensayo***

Para llevar a cabo ensayo se esterilizó el penicilindro a 160 °C durante 180 minutos; después, en cada una de las placas Petri con agar TSA con los patógenos, se realizaron 3 pozos con aproximadamente 7 mm de diámetro. Se midieron 50 µl de cada uno de los sobrenadantes de las bacterias ácido lácticas y se colocó en el pozo de la placa. Finalmente, se incubó cada placa a 37 °C para las bacterias y a 30 °C para la levadura durante 24 horas. Como control positivo se utilizó Dimetilsulfóxido (DMSO) y como control negativo, caldo MRS.

Transcurrido este tiempo, se midió el diámetro del halo formado en cada una de las placas. Este ensayo se realizó por triplicado.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS

#### 6.1.1 Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp.

##### 6.1.1.1 *Aislamiento de Salmonella* spp.

Para la fermentación líquida se aislaron selectivamente un total de 25 colonias, cuyas características se encuentran descritas en la Tabla 14. Las claves para identificar las colonias se asignaron de la siguiente manera:

- S: Clave para las posibles cepas de *Salmonella* spp.
- L/S: Proveniente del atole agrio Líquido o Sólido.
- 0,1,2,3,...,24: Corresponde al tiempo de fermentación en el que se toma la muestra de atole agrio.
- a/b/c: Repetición.
- S/V: Proveniente del caldo Selenito-cistina/ Vassiliadis-Rappaport.

Tabla 14: Características morfológicas de las colonias aisladas del atole agrio

Clave	Medio Entérico de Hektöen	Medio Verde Brillante	Fermentación De lactosa	Catalasa	Observación microscópica
AguaS	Colonias verdes, circulares planas.	/	-	+	Bacilos rectos. G(-).
AguaV	/	Colonias amarillas-transparentes con el medio rojo.	-	+	Bacilos rectos. G(-).
MasaS	Colonias rosas con amarillo, circulares, brillosas.	/	-	+	Bacilos rectos. G(-).
SL1aV	Colonias verdes, circulares, brillosas.	/	-	+	Bacilos rectos. G(-).
SL1cV	Colonias verdes, brillosas, planas.	/	-	+	Bacilos rectos. G(-).
SL1cS	Colonias verdes, brillosas, planas.	/	-	+	Bacilos rectos. G(-).
SL2bV	Colonias circulares, naranjas, brillosas, planas.	/	-	+	Bacilos rectos. G(-).
SL3aS	Colonias circulares, rosas brillosas, planas.	/	-	+	Bacilos rectos. G(-).
SL3aS	/	Colonias transparentes con el medio rojo.	-	+	Bacilos rectos. G(-).
SL3bS	/	Colonias circulares, transparentes con el medio enrojecido.	-	+	Bacilos rectos. G(-).
SL3cV	Colonias circulares, rosa con naranja, brillosas.	/	-	+	Bacilos rectos. G(-).
SL3cS	Colonias circulares, rosas, brillosas.	/	-	+	Bacilos rectos. G(-).
SL4aS	Colonias circulares, azules, brillosas, medio completamente azul.	/	-	+	Bacilos rectos. G(-).
SL5aS	Colonias circulares, transparentes, planas.	/	-	+	Bacilos rectos. G(-).
SL5bV	Colonias circulares, blancas, secas.	/	-	+	Bacilos rectos. G(-).
SL6aV	Colonias circulares, blancas, secas.	/	-	+	Bacilos rectos. G(-).
SL6cS	Colonias circulares, transparentes, planas.	/	-	+	Bacilos rectos G(-).
SL6cV	Colonias circulares, transparentes, planas.	/	-	+	Bacilos rectos G(-).
Grano sV	Colonias circulares, rosa con naranja, brillosas.	/	-	+	Bacilos rectos G(-).
SS0bV	Colonias circulares, rosa claro, brillosas.	/	-	+	Bacilos rectos G(-).
SS2bV	Colonias circulares, transparentes, planas.	/	-	+	Bacilos rectos G(-).
SS2bV	/	Colonias circulares, rosas, brillosas.	-	+	Bacilos rectos G(-).
SS4aV	Colonias circulares, rosa claro, brillosas.	/	-	+	Bacilos rectos G(-).

### 6.1.1.2 Identificación de *Salmonella* spp.

La identificación de *Salmonella* spp., se realizó por método fenotípico: la galería API20E® (BioMérieux), así como por el método genotípico de PCR del ITS 16S-23S. Para poder manejar de una manera más sencilla las cepas, las claves se cambiaron por las siguientes:

L/S: Proveniente del atole agrio Líquido o Sólido.

1,2,3,..., 20: Enumeración.

Tabla 15: Reasignación de claves para las cepas aisladas del atole agrio

Clave nueva	Clave previa	Clave nueva	Clave previa	Clave nueva	Clave previa
L1	AguaS	L10	L6cS	L18	L6cV
L2	L3Bs	L11	L3cV	L19	L5bV
L3	L4aS	L12	L3cS	L20	L6aV
L4	masas	L13	L5aV	S1	granosV
L5	L1cV	L14	aguaV	S2	S0bS
L6	L1cS	L15	L2bV	S3	S2bV
L7	L1aV	L16	L3aS	S4	S2bS
L8	L3aS	L17	L6cS	S5	S4aV
L9	L6cV				

- **Prueba Api 20E®**

En la Tabla 16, se encuentran los resultados obtenidos a partir de la identificación de las 25 cepas con ayuda del sistema apiweb®.

Tabla 16: Resultados De La Prueba Api 20E

Clave	Tipo de identificación	Taxón significativo	%ID
L1	Perfil dudoso	<i>Serratia marcescens</i>	97.1%
L2	Buena	<i>Serratia fonticola</i>	92.1%
L3	Muy buena en el género	<i>Enterobacter cloacae</i>	71%
L4	Muy buena en el género	<i>Enterobacter cloacae</i>	71%
L5	Muy buena en el género	<i>Enterobacter cloacae</i>	71%
L6	Muy buena en el género	<i>Enterobacter cloacae</i>	71%
L7	Muy buena en el género	<i>Enterobacter cloacae</i>	71%
L8	Perfil dudoso	<i>Enterobacter sakazakii</i>	66.1%
L9	Muy buena en el género	<i>Pseudomonas luteola</i>	68.2%
L10	Muy buena en el género	<i>Pseudomonas luteola</i>	68.2%
L11	Muy buena en el género	<i>Enterobacter cloacae</i>	71%
L12	Muy buena en el género	<i>Enterobacter cloacae</i>	71%
L13	Perfil dudoso	<i>Serratia liquefaciens</i>	67%
L14	Perfil dudoso	<i>Serratia liquefaciens</i>	67.9%
L15	-	-	-
L16	Muy buena en el género	<i>Enterobacter cloacae</i>	71%
L17	Muy buena en el género	<i>Pseudomonas luteola</i>	68.2%
L18	Muy buena en el género	<i>Enterobacter cloacae</i>	71%
L19	Baja discriminación	<i>Serratia plymuthica</i>	58.6%
L20	Baja discriminación	<i>Serratia plymuthica</i>	58.6%
S1	Identificación aceptable	<i>Enterobacter cloacae</i>	85.4%
S2	Identificación aceptable	<i>Enterobacter cloacae</i>	85.4%
S3	Perfil dudoso	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	47.4%
S4	Perfil dudoso	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	47.4%
S5	Perfil dudoso	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	47.4%

Como se puede observar en la Tabla 16, ninguna de las cepas se identificó como *Salmonella* spp. y se encontraron géneros similares a los identificados previamente por Esquivel, 2012, algunas de las cuales son enterobacterias patógenas oportunistas y muchas de ellas endófitas del maíz, como lo son: *Serratia marcescens*, *Serratia fonticola*, *Pseudomonas luteola*, *Raoultella ornithinolytica* (Esquivel, 2012). Se puede observar que no es suficiente la especificidad de los medios sólidos selectivos, ya que las colonias típicas no siempre se identificaron como *Salmonella* spp. A pesar de que se eligieron las cepas de los medios selectivos, muchas de ellas al ser enterobacterias pueden crecer en estos medios y tienen una morfología colonial similar, aunque no son del género *Salmonella*. Es importante mencionar que cuando se analizó el agua, si hubo crecimiento de microorganismos en los medios, y una cepa aislada proveniente del agua fue identificada como *Serratia marcescens*.

- **Identificación mediante la amplificación por PCR del ITS 16S-23S**

Para la parte de confirmación mediante la PCR del ITS 16S-23S, con base en las distintas cepas identificadas mediante la prueba API20E, si existía más de una con el mismo género y especie, se seleccionaba una. Dichas cepas fueron con las claves (tabla): S1, S3, L1, L2, L8, L9, L13, L19.

**a) Extracción ADN**

Se llevó a cabo una electroforesis de las muestras del ADN extraído para comprobar la pureza, integridad y concentración del ADN.

La detección del producto de amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa se observa como una banda. La intensidad de la banda se considera proporcional a la cantidad de producto amplificado. De acuerdo con la Figura 9, podemos decir, que el ADN se encuentra íntegro, ya que todas las bandas se observan nítidas, al ser una amplificación cualitativa, sólo esperábamos encontrar la presencia o ausencia de ADN en cada una de las muestras.

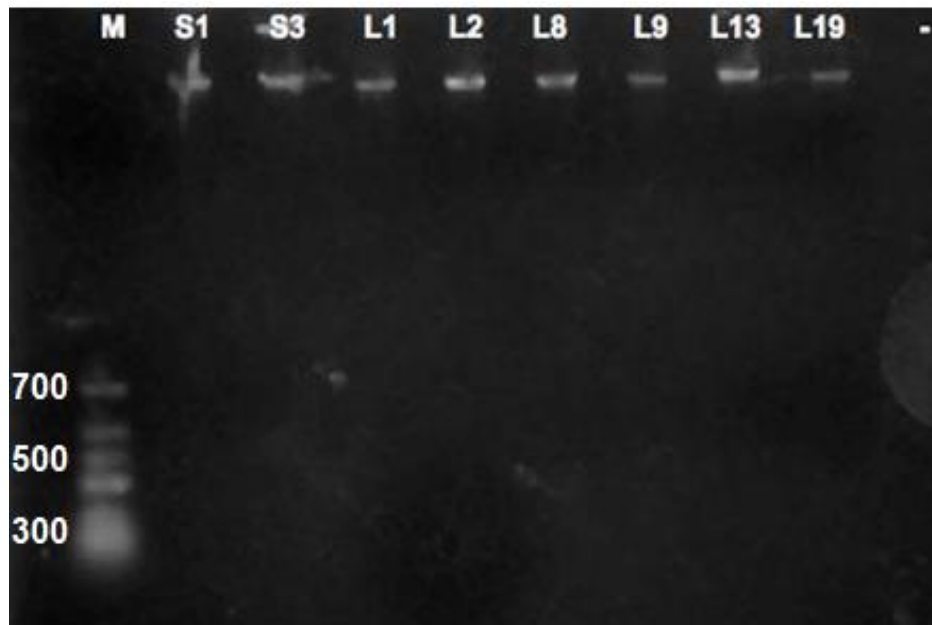


Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN extraído de las cepas puras de: S1 *Enterobacter cloacae*, S3 *Raoultella ornithinolytica*, L1 *Serratia marcescens*, L2 *Serratia fonticola*, L8 *Enterobacter sakazakii*, L9 *Pseudomonas leuteola*, L13 *Serratia liquefaciens*, L19 *Serratia plymuthica* a 90V durante 30 minutos; M= Marcador de peso molecular (Invitrogen®)



**b) Productos de PCR de la Región Espaciadora 16S-23S**

Los cebadores ITSf/ITSr fueron utilizados para la detección exclusivamente de *Salmonella* spp. Como control positivo se utilizó un ADN de *Salmonella* Typhimurium (Domínguez, 2013) en la cual se generó un producto de PCR con un peso molecular igual a 312 pb (Figura 10). Los resultados demuestran que las cepas aisladas en este estudio que no corresponden a *Salmonella*, que incluyen cepas de Enterobacteriaceae, no generaron resultados positivos. Esto nos ayuda a concluir que: los resultados encontrados en las pruebas API 20E, son correctos y no se encontró *Salmonella* spp. en el atole agrio.

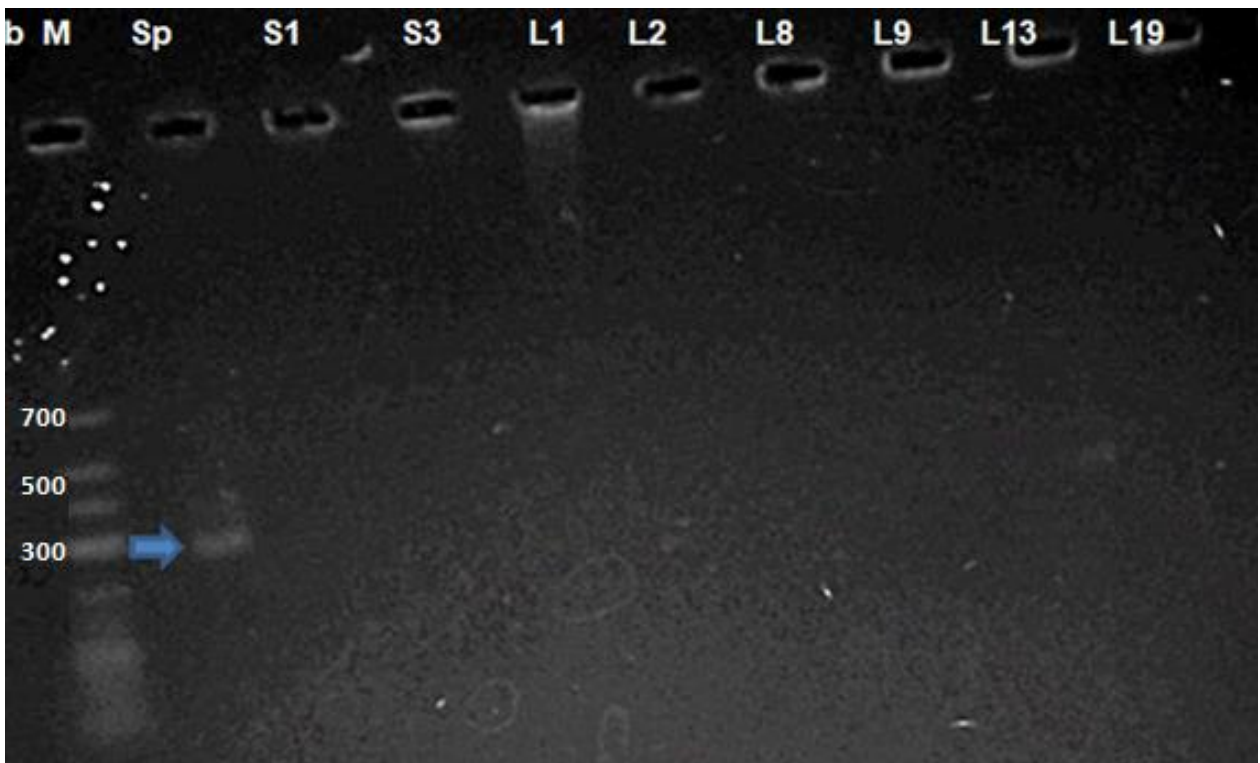


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR de la reacción del espaciador transcripcional interno 16S-23S con los primers itsf e itsr a 70v durante 60 minutos; m= marcador de peso molecular, sp: control positivo con *Salmonella* Typhimurium

## **6.1.2 Aislamiento e identificación de *Escherichia coli***

### **6.1.2.1 Aislamiento de *E. coli***

Para la fermentación líquida se aislaron a partir del medio EMB un total de 12 colonias (Tabla 17); sin embargo, la mayoría de ellas presentaba una morfología puntiforme, que al microscopio se observaban como cocos Gram-positivos y catalasa negativo, por lo que se procedió a aislar las cepas selectivamente en agar MacConkey con sorbitol, ya que éste permite el crecimiento de *E. coli* y es capaz de diferenciar las cepas tipo EHEC y la cepa O157:H7. Se seleccionaron todas las colonias que crecieran en este medio obteniendo un total de 2 colonias, mismas que debían de cumplir con las características de *E. coli* para el medio EMB; además de ser catalasa positivo y microscópicamente Bacilos Gram-negativos.

Para la fermentación sólida, a partir de las colonias provenientes del medio EMB se aislaron un total de 11 colonias con las características descritas en la Tabla 17; y se sembraron en agar MacConkey con sorbitol. Además que cumplían con las características morfológicas de *E. coli* en medio EMB, catalasa positivo y bacilos Gram-negativos.

Las claves para identificar las colonias se asignaron de la siguiente manera:

- *E*: Clave para las posibles cepas de *Escherichia coli*
- L/S: Proveniente del atole agrio Líquido o Sólido.
- 0,1,2,3,...,24: Corresponde al tiempo de fermentación en el que se toma la muestra de atole agrio.
- a/b/c/d/e: Repetición.

Dichas características de las 23 colonias se encuentran descritas en la tabla 17:

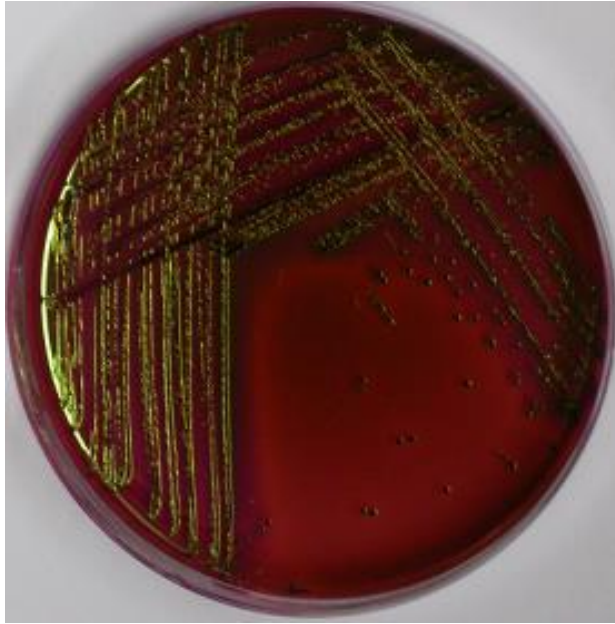


Figura 11: *E. coli* en agar Eosina Azul de Metileno (EMB)

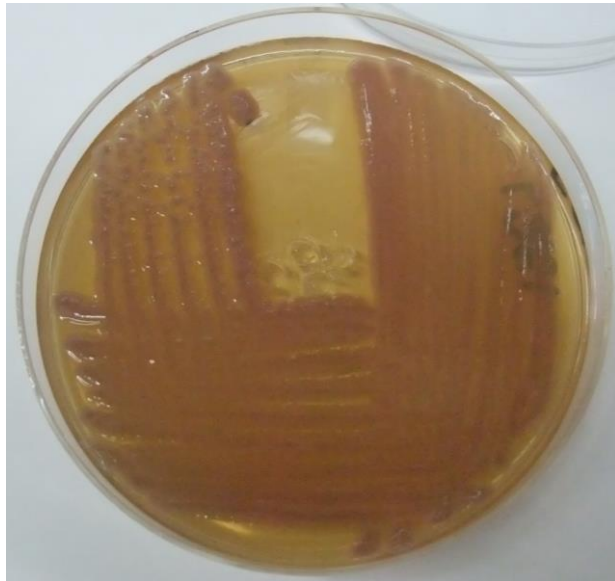


Figura 12: *E. coli* en agar McConkey con Sorbitol

Tabla 17: Características morfológicas de las colonias aisladas del atole agrio en el medio EMB

Clave	Medio EMB	sorbitol	Catalasa	Observación Microscópica
Masa A	Colonias puntiformes, muy pequeñas, verdes metálicas, brillosas	NC	-	Cocos G(+)
Masa C	Colonias puntiformes, muy pequeñas, verdes metálicas, brillosas	NC	-	Cocos G(+)
EL1b	Colonias circulares, verdes metálicas con centro negro, brillosas	-	+	Bacilos rectos. G(-).
EL1c	Colonias circulares, verdes metálicas con centro negro, brillosas	+	+	Bacilos rectos. G(-).
EL4c	Colonias puntiformes, muy pequeñas, verdes metálicas, brillosas	NC	-	Cocos G(+)
EL4e	Colonias puntiformes, muy pequeñas, verdes metálicas, brillosas	NC	-	Cocos G(+)
EL6a	Colonias puntiformes, muy pequeñas, verdes metálicas, brillosas	NC	-	Cocos G(+)
EL6d	Colonias puntiformes, muy pequeñas, verdes metálicas, brillosas	NC	-	Cocos G(+)
EL6e	Colonias puntiformes, muy pequeñas, verdes metálicas, brillosas	NC	-	Cocos G(+)
EL12b	Colonias puntiformes, muy pequeñas, verdes metálicas, brillosas	NC	-	Cocos G(+)
EL24d	Colonias puntiformes, muy pequeñas, verdes metálicas, brillosas	NC	-	Cocos G(+)
ES4a	Colonias circulares, verdes metálicas con centro negro, brillosas	+	+	Bacilos rectos G(-).
ES4b	Colonias circulares, verdes metálicas con centro negro, brillosas	+	+	Bacilos rectos. G(-).
ES4c	Colonias circulares, verdes metálicas con centro negro, brillosas	+	+	Bacilos rectos. G(-).
ES4d	Colonias circulares, verdes metálicas con centro negro, brillosas	+	+	Bacilos rectos. G(-).
ES4e	Colonias circulares, verdes metálicas con centro negro, brillosas	+	+	Bacilos rectos. G(-).
ES6a	Colonias circulares, verdes metálicas con centro negro, brillosas	-	+	Bacilos rectos G(-).
ES8a	Colonias circulares, verdes metálicas con centro negro, brillosas	+	+	Bacilos rectos G(-).
ES8b	Colonias circulares, verdes metálicas con centro negro, brillosas	+	+	Bacilos rectos G(-).
ES8c	Colonias circulares, verdes metálicas con centro negro, brillosas	+	+	Bacilos rectos G(-).
ES8d	Colonias circulares, verdes metálicas con centro negro, brillosas	+	+	Bacilos rectos G(-).
ES8e	Colonias circulares, verdes metálicas con centro negro, brillosas	+	+	Bacilos rectos G(-).
ES10d	Colonias puntiformes, muy pequeñas, verdes metálicas, brillosas	NC	-	Cocos G(+)

NC: No creció

### 6.2.2.2 Identificación de *E. coli*

A partir de las cepas obtenidas en la Tabla 17, se seleccionaron aquellas que fueran bacilos Gram-negativos y que fueran capaces de crecer en el agar MacConkey con sorbitol, por lo que se obtuvieron en total, para la fermentación líquida 2 colonias aisladas y para la sólida 10. La identificación de *Escherichia coli* se realizó por método bioquímico, galería API20E®.

- **Identificación mediante API 20E®**

Con ayuda del sistema apiweb® se analizaron los perfiles obtenidos y se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 18.

Tabla 18: Resultados De La Prueba Api 20E®

Clave	Tipo de identificación	Taxón significativo	%ID	Tiempo de fermentación (horas)	pH
EL1b	Perfil dudoso	<i>Escherichia coli</i> 1	49.1%	1	6.23
EL1c	Perfil dudoso	<i>Escherichia coli</i> 1	49.1%	1	6.23
ES4a	Excelente	<i>Escherichia coli</i> 1	99.8%	4	6.59
ES4b	Excelente	<i>Escherichia coli</i> 1	99.8%	4	6.59
ES4c	Excelente	<i>Escherichia coli</i> 1	99.8%	4	6.59
ES4d	Excelente	<i>Escherichia coli</i> 1	99.8%	4	6.59
ES4e	Excelente	<i>Escherichia coli</i> 1	99.8%	4	6.59
ES6a	Excelente	<i>Escherichia coli</i> 1	99.9%	6	5.72
ES8a	Excelente	<i>Escherichia coli</i> 1	99.9%	8	5.08
ES8b	Excelente	<i>Escherichia coli</i> 1	99.9%	8	5.08
ES8c	Excelente	<i>Escherichia coli</i> 1	99.9%	8	5.08
ES8d	Excelente	<i>Escherichia coli</i> 1	99.9%	8	5.08
ES8e	Excelente	<i>Escherichia coli</i> 1	99.9%	8	5.08

Como se puede observar en la Tabla 18, once cepas de trece se identificaron como *Escherichia coli* con un muy buen tipo de identificación.

En la fermentación líquida, a pesar de ser un medio líquido en el que el crecimiento de *E. coli* es más factible, sólo se aislaron dos cepas. En la fermentación líquida *E. coli* se identificó después de una hora de iniciada la fermentación (pH de 6.23) después no se logró detectar.

En la fermentación sólida, se detectó *E. coli* en los tiempos 4, 6 y 8 horas después de iniciada la fermentación, con un pH de 6.59, 5.72, 5.08; sin embargo, el hecho que no se haya logrado la detección de *E. coli* en tiempos anteriores, puede deberse a que al principio este microorganismo estaba en una concentración tan baja que no se pudo detectar, por lo que se identificó en los tiempos antes mencionados cuando debido a las características del medio fue capaz de desarrollar un crecimiento cuantificable mediante los métodos tradicionales. En cambio, al no haberse detectado en tiempos posteriores, puede haber una inhibición de *E. coli*, ya sea tanto por la disminución del pH, como por la presencia de antimicrobianos producidos por las bacterias ácido lácticas presentes en el atole agrio. Es importante mencionar que no se aisló *E. coli* en la masa ni en las muestras de agua.

- **ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD)**

Para la identificación de las cepas mediante la PCR RAPD, se llevó a cabo la extracción del ADN.

**a) Concentración de ADN**

La concentración medida con el nanodrop se encuentra en la tabla 19. Para su rápida identificación, se eliminó la letra “E” de la clave de la cepa.

Tabla 19: Concentración de ADN de *E. coli* medida con nanodrop

Muestra	Concentración (ng/μl)
L1b	102.85
L1c	89.63
S4a	50.34
S4b	91.40
S4c	103.36
S4d	59.53
S4e	90.68
S6a	100.05
S8a	101.53
S8b	94.97
S8c	97.70
S8e	96.75

De acuerdo con la Tabla 19, la concentración de ADN fue alta; por lo que fue necesario realizar diluciones para poder llevar a cabo el RAPD-PCR.

### **b) RAPD-PCR**

De acuerdo con la Figura 13, se obtuvieron 3 grupos y 2 clados. Con 25 % de similitud (1) se dividen en 2 clusters, en 1a se encuentran las cepas aisladas del atole líquido: L1b y L1c; el segundo cluster "2" (50% de similitud) están las cepas aisladas del atole sólido, que se dividen en 2b, con 35% de similitud se divide en la línea L1, que es la cepa S8e y 2b, que con 40% de similitud forma un grupo (3a) con las cepas S8a y S8b. Con 67% de similitud, el grupo 3 se divide en la línea L2, que incluye la cepa S6a y el grupo 3b (80% de similitud) incluye el resto de las cepas (S4c, S4d, S4e, S8c, S4b y S4a).

Con esta técnica, las cepas se agruparon primero por tipo de fermentación (líquida y sólida) y luego por tiempo de fermentación: 4, 6 y 8 h, con excepción de S8c y S8e, identificadas como *Shigella*, que se agruparon con las de tiempo 4 (S8c) el tiempo que se agrupó en el cluster 3b y el tiempo 8 (S8e).

Lo anterior indica que las condiciones de la fermentación líquida deben ser más estresantes, ya que se aislaron solamente 2 cepas. De la fermentación sólida se aislaron más cepas que son diferentes a medida que avanza la fermentación. Esto sugiere que las obtenidas a mayor tiempo de fermentación deben ser más resistentes a la acidez.

Para obtener información sobre la patogenicidad de las cepas sería necesario realizar su serotipificación y virotipificación.

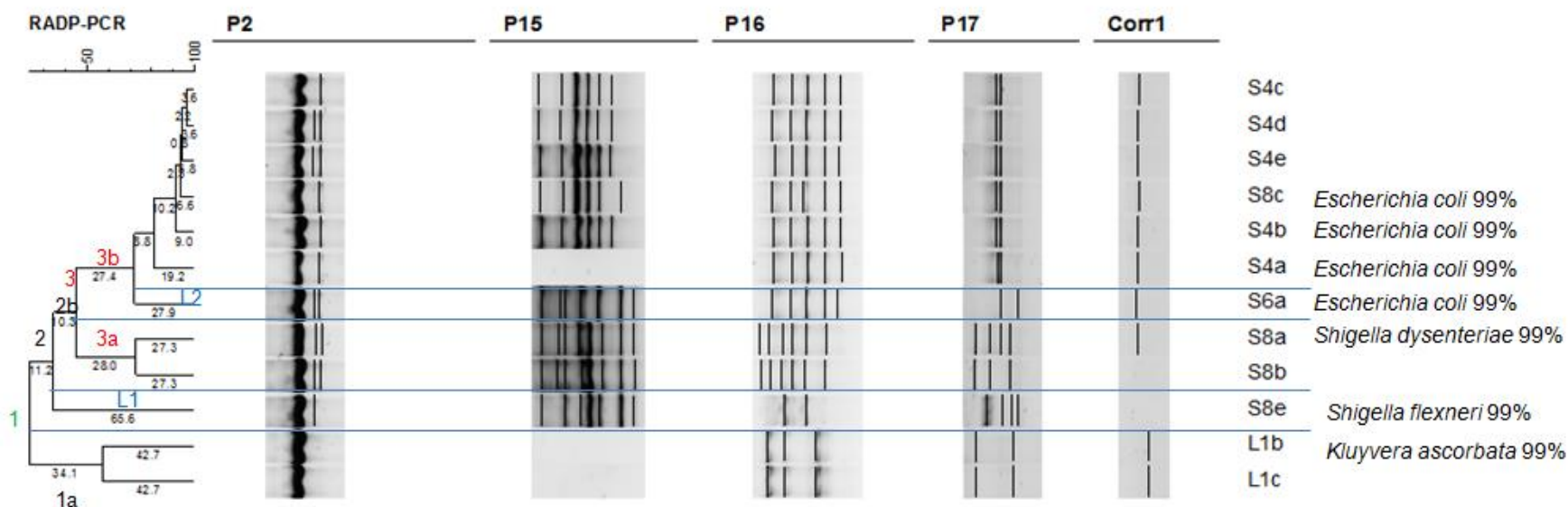


Figura 13: Dendrograma generado a partir de RAPD-PCR de las diferentes cepas de *E. coli* aisladas de la fermentación sólida (S) y líquida (L) del atole agrio de Villahermosa, Tabasco, usando los primers P2, P15, P16, P17 y Corr1 (Los patrones de bandas se convirtieron en distancias usando el procedimiento de Hierarchical cluster analysis y el UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) para obtener el dendrograma. Se usó el software de Gelcompare II (Applied Maths, Bélgica, Versión 6.5). Las identificaciones se realizaron mediante la comparación de secuencias del gen ribosomal 16S, correspondiente a las posiciones 30 a 338 del gen de rRNA 16S. Las identificaciones y sus porcentajes de identificación se muestran junto a la cepa que corresponde.



- **Identificación mediante la comparación de secuencias obtenidas con el PCR-16S rRNA**

Se llevó a cabo la PCR de una cepa de cada uno de los clusters que se obtuvieron del RAPD por lo que se utilizaron dos cebadores que permiten la amplificación a nivel especie, se efectuó la secuenciación, y se realizó el análisis por medio del BLAST del NCBI, donde se obtuvieron las identificaciones mostradas en la Tabla 20.

Tabla 20: Resultados del BLAST para la identificación de las cepas de *E. coli*

Clave	Identidad	% de Identidad	Valor E
L1b	<i>Kluyvera ascorbata</i>	99%	0.0
S4a	<i>Escherichia coli</i>	99%	0.0
S4b	<i>Escherichia coli</i>	99%	0.0
S6a	<i>Escherichia coli</i>	99%	0.0
S8a	<i>Shigella dysenteriae</i>	99%	0.0
S8c	<i>Escherichia coli</i>	99%	0.0
S8e	<i>Shigella flexneri</i>	99%	0.0

Como se puede observar en la Tabla 20, las cepas S4a, S4b, S6a y S8c fueron identificadas como *E. coli*, lo cual concluye que se logró su aislamiento e identificación a partir del atole agrio de Villahermosa, Tabasco y que dicho microorganismo no logró sobrevivir en tiempos mayores que a 8 horas de fermentación con un pH de 5.08. Para la cepa proveniente de la fermentación líquida, se identificó como *Kluyvera ascorbata*, que es un bacilo Gram-negativo, catalasa positivo, oxidasa negativo; capaz de crecer en agar MacConkey, se ha aislado principalmente del medio ambiente (Farmer et al., 1981). Descrito también como agente etiológico en infecciones clínicamente significativas que pertenece a la familia de las enterobacterias (López, 2013).

Se identificó a la cepa S8a como *Shigella dysenteriae*, que es un bacilo Gram-negativo, no formador de esporas, anaerobio facultativo. Se propaga en agua y los alimentos causando como enfermedad shigelosis debido a su toxina shiga; se ha estudiado su presencia y sobrevivencia en diferentes alimentos fermentados a base de maíz como los africanos, los resultados indican que se inhibieron después de 7 horas de fermentación a un pH de 3.8 en pruebas de reto (Svanberg et al., 1992). También se identificó a *S. flexneri*, que en otro estudio, se inocularon cuatro diferentes cepas de este microorganismo en una masa de maíz de Ghana observando que después de 24 horas de exposición a un pH de 3.2 no se logró aislar ninguna de las cepas (Mensah et al., 1988).

También, se ha demostrado que a pesar de la inoculación de *E. coli* enterotoxigénica en una masa fermentada de maíz de Ghana, después de un tiempo de fermentación de 8 horas, la mitad de las cepas de ETEC fueron eliminadas (Mensah et al., 2008). Además que, durante la cocción *E. coli* se elimina (Sanni et al. 2002) en tres diferentes masas fermentadas de Ghana. En el pozol, se aisló *E. coli* hasta las 48 horas de fermentación e incluso hasta los 8 días después de colectada la muestra (Sainz, 1998). Se obtuvo sobrevivencia a valores de pH por debajo de 4. Posteriormente se mostró que las cepas eran resistentes a valores bajos de pH y que éstos estaban relacionados con la síntesis de proteínas de membrana externa (Sainz et al., 2001).

### **6.1.3 Aislamiento e identificación de Bacilos esporulados aerobios**

#### **6.1.3.1 Aislamiento de Bacilos esporulados aerobios**

De la fermentación líquida se aislaron a partir del medio Trypticase Soya agar con sulfato de manganeso 63 colonias (Figura 14), de las cuales sólo se seleccionaron aquéllas que tuviesen una morfología microscópica de bacilos Gram-positivos. Posteriormente, de las 35 colonias seleccionadas, se llevó a cabo el crecimiento en agar TSA con  $MnSO_4$  durante 72 horas para favorecer la esporulación. Se realizó la tinción de espora y un total de 15 colonias la presentaron (Tabla 21). De la fermentación sólida, de igual manera que para la líquida, se aislaron un total de 10 colonias (Tabla 22). Las claves para identificar las colonias se asignaron de la siguiente manera:

- B: Clave para las posibles cepas de *Bacillus* sp.
- L/S: Proveniente del atole agrio Líquido o Sólido.
- 0,1,2,3,...,24: Corresponde al tiempo de fermentación en el que se toma la muestra de atole agrio.
- a/b/c/d/e: Repetición.



Figura 14: Colonia de *Bacillus* aislados en agar Trypticase Soya con sulfato de manganeso

Tabla 21: Características morfológicas de las colonias de bacilos esporulados aislados de la fermentación sólida.

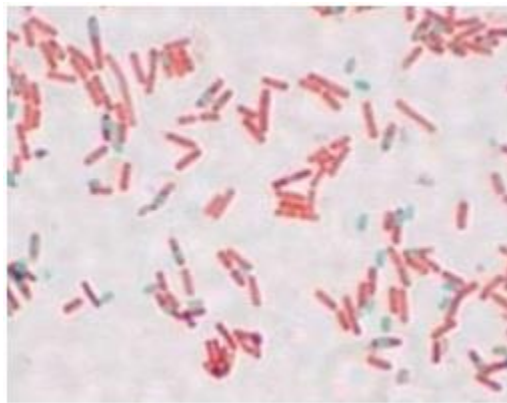
Clave	Tiempo fermentación (h)	pH	Características en medio TSA+MnSO <sub>4</sub>	Catalasa	Observación microscópica	Tinción de espora
BS4b	4	6.59	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+
BS6b	6	5.72	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+
BS6e	6	5.72	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+
BS6g	6	5.72	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+
BS8c	8	5.08	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+
BS8f	8	5.08	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+
BS12c	12	4.4	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+
BS24a	24	4.07	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+
BS24c	24	4.07	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+
BS24d	24	4.07	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+

Tabla 22: Características morfológicas de las colonias aisladas de bacilos esporulados de la fermentación líquida.

Clave	Tiempo fermentación (h)	pH	Características en medio TSA+MnSO <sub>4</sub>	Catalasa	Observación microscópica	Tinción de espora
BL0a	0	6.19	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+
BL0k	0	6.19	Colonia circular, borde entero, color blanco, grande y brillante	+	Bacilos G(+)	+
BL1b	1	6.23	Colonia circular, borde entero, color blanco, grande y brillante	+	Bacilos G(+)	+
BL1k	1	6.23	Colonia circular, borde entero, color blanco, grande y brillante	+	Bacilos G(+)	+
BL2g	2	6.23	Colonia circular, borde entero, color blanco, grande y brillante	+	Bacilos G(+)	+
BL2h	2	6.23	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+
BL4C	4	5.26	Colonia circular, borde entero, color blanco, grande y brillante	+	Bacilos G(+)	+
BL5c	5	4.01	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+
BL5f	5	4.01	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+
BL6b	6	3.85	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+
BL6f	6	3.85	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Cocos G(+)	+
BL6d	6	3.85	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+
BL6g	6	3.85	Colonia circular, borde entero, color blanco, grande y brillante	+	Bacilos G(+)	+
BL6h	6	3.85	Colonia circular, borde entero, color blanco, grande y brillante	+	Bacilos G(+)	+
BL24h	24	3.27	Colonia circular, borde rugoso, color crema, grande y seca.	+	Bacilos G(+)	+

Las características de las colonias eran circulares, de aproximadamente 3 cm de diámetro, secas. Además se observaba el crecimiento tipo de biopelícula. Se ha reportado que *Bacillus subtilis* es capaz de formar biopelículas durante su crecimiento como sistema de protección y sobrevivencia al ambiente (Lemon et al., 2009). Las colonias de *Bacillus* sp. se caracterizan por presentar pliegues abultados, blanquecinos y con bordes irregulares (FDA, 2014).

Es importante observar que de acuerdo con las Tablas 21 y 22, se logró aislar una cantidad considerable de bacilos Gram-positivos esporulados (Figura 15).



**Figura 15: Tinción de espora de colonias de *Bacillus* por medio de la técnica de Schaeffer-Fulton**

Este grupo incluye otros bacilos mesófilos esporulados, por lo cual fue necesario llevar a cabo su identificación, ya que puede incluir microorganismos no patógenos, como *Bacillus subtilis*, que es el principal microorganismo que participa en la fermentación del frijol de soya para producir *natto* (Toda et al., 1999). Dentro de este género, también se encuentra la especie *B. cereus*, que es un microorganismo capaz de causar intoxicaciones alimentarias a través de la ingesta de alimentos contaminados ( $10^5$  células/g) ya que produce dos tipos de toxinas: una emética y otra diarreica. También se ha aislado e identificado *B. cereus* a partir del *poto-poto* y del *dégué*, dos alimentos fermentados de Burkina Faso y de la República del Congo (Abriouel et al., 2007). También se analizó su prevalencia en el *Ouagadougou*, un alimento a base de maíz de Burkina Faso, en el cual, se lograron aislar 26 cepas de *B. cereus* después de 24 horas de fermentación y un pH de 3.6 (Humblot et al., 2012).

En diversos estudios se ha reportado la presencia de especies de bacilos esporulados aerobios, como por ejemplo, en el *fufu* y el *ogi* (Adegoke y Babalola, 1988), dos alimentos fermentados elaborados a base de maíz en Nigeria, identificando durante la fermentación tradicional durante tres días y a un pH de aproximadamente 4, a *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*.

### 6.2.3.2 Identificación de bacilos esporulados aerobios

Del total de 25 cepas aisladas, se seleccionaron aquéllas que fuesen diferentes entre sí, ya fuese por sus diferencias macro o microscópicas. Siendo las cepas gggseleccionadas las siguientes: BS8f, BL0a, BL2h, BL24h, BL4c, BS4b, BS6g, BS6b, BS24d y BL0k. Para la identificación de los aislados de bacilos esporulados aerobios, se realizó la amplificación de la región V1 del rRNA 16S. Para poder llevar a cabo un manejo sencillo de las cepas, se modificó la clave de las cepas de la siguiente manera:

Tabla 23: Asignación de claves nuevas para las cepas aisladas como Bacilos esporulados aerobios

Clave original	Clave nueva
BS8f	A
BL0a	B
BL2h	C
BL24h	D
BL4c	E
BS4b	F
BS6g	G
BS6b	H
BS24d	I
BL0k	K

#### a) Extracción ADN

Se llevó a cabo una electroforesis de las muestras del ADN extraído para comprobar la pureza, integridad y concentración del ADN.

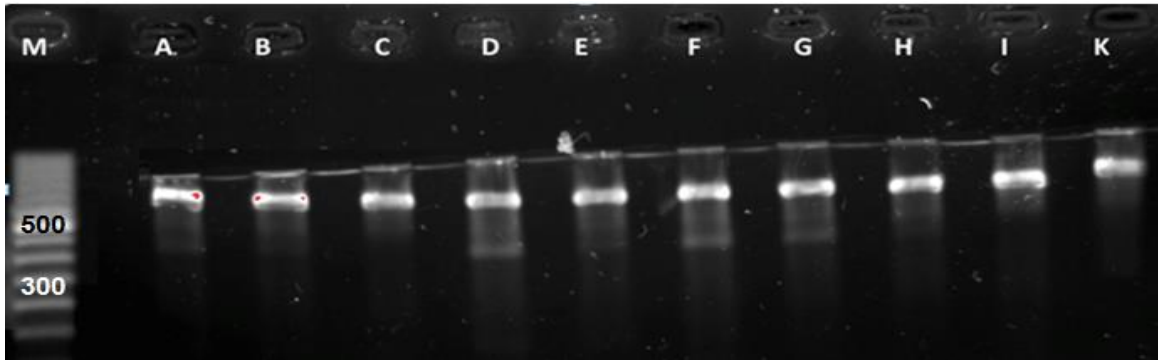


Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN extraído de las cepas puras a 90V durante 30 minutos; M= Marcador de peso molecular (InvitroGen®). Carril 2 a 11= ADN de Bacilos esporulados aerobios.

De acuerdo con la Figura 16, el ADN se encuentra íntegro, ya que todas las bandas se observan nítidas.

**b) Amplificación de la region V1 del gen rRNA 16S**

Como resultado de la amplificación de la región V1 del rRNA 16S con los cebadores pA y 3, se esperaba un producto de aproximadamente 1000 pb de las cepas de *Bacillus* spp. y se obtuvo a figura 22:

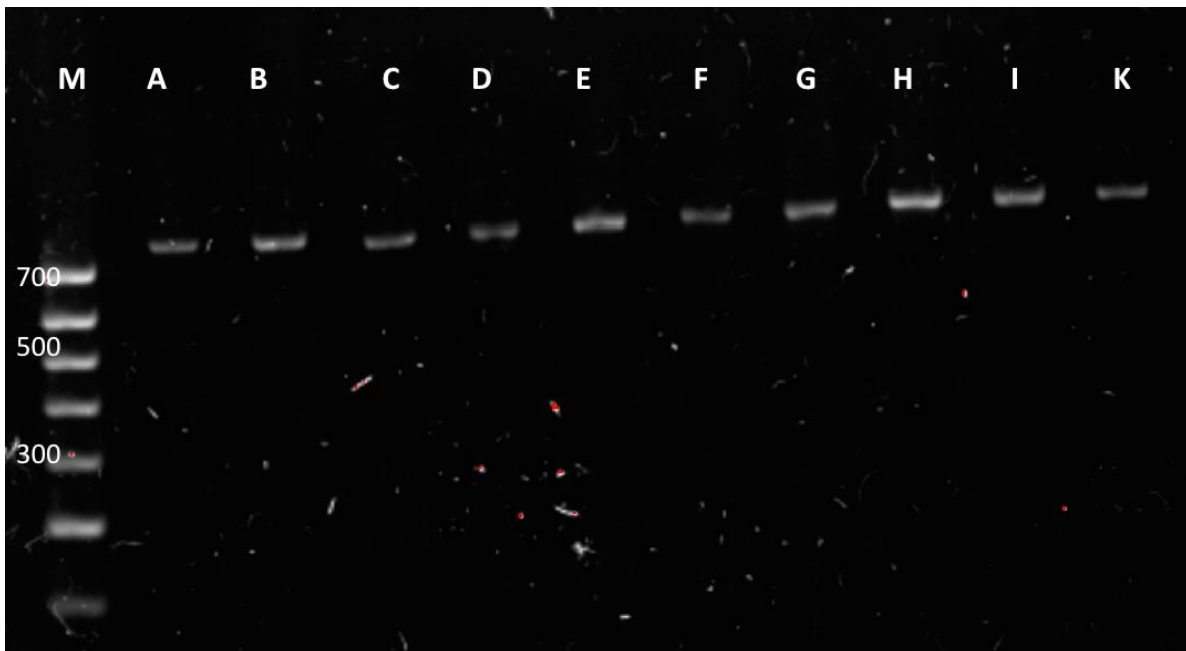


Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la reacción PCR del rRNA 16S con los primers pA y 3 a 70v durante 60minutos; m= marcador de peso molecular, CARRIL 2 a 11= PCR de Bacilos esporulados aerobios

A continuación, se enviaron a secuenciar junto con el cebador  $\Gamma$ , en el cual se obtiene una región de aproximadamente 350 pb entre los que se encuentran regiones universales y la región V1 del ADNr 16S y se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 24:

Tabla 24: Identidad de las cepas de *Bacillus* sp. Asiladas del atole agrio

Clave	Identidad	% de identidad	Valor E
A	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	$1 \times 10^{-161}$
B	<i>Bacillus anthracis</i>	99%	$8 \times 10^{-163}$
C	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%	$6 \times 10^{-159}$
D	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%	$8 \times 10^{-156}$
E	<i>Bacillus megaterium</i>	96%	$1 \times 10^{-145}$
F	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%	$5 \times 10^{-160}$
G	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99%	$8 \times 10^{-163}$
H	<i>Bacillus anthracis</i>	99%	$4 \times 10^{-161}$
I	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	$6 \times 10^{-159}$
K	<i>Bacillus cereus</i>	97%	$8 \times 10^{-148}$

Como se observa en la Tabla 24, se identificaron las cepas A y H como *B. anthracis*, ambas cepas provenían de la fermentación sólida, la cepa A fue aislada a las 8 horas de fermentación y la cepa H, después de 6 horas de iniciada la fermentación. *B. anthracis* es un bacilo Gram-positivo que pertenece a la familia *Bacillaceae*, son aerobios o anaerobios facultativos, capaz de formar una spora. Su presencia ha sido detectada en bovinos, ovinos, caprinos, equinos, porcinos, suelo y agua. En el ambiente son capaces de sobrevivir ya que cuando las formas vegetativas de la bacteria se exponen al oxígeno del aire, se forman endosporas centrales que pueden sobrevivir durante 2 años en el agua, 10 años en la leche y durante décadas en el suelo. Es capaz de generar la enfermedad del carbonuco (pústula maligna, enfermedad de los cardadores de lana) que es una infección que se manifiesta de tres formas diferentes: cutáneo, respiratorio, gastrointestinal. Su patogenicidad está determinada por una cápsula que inhibe la fagocitosis y por



una exotoxina que, a su vez, está constituida por el antígeno protector (PA) y el factor edema (EF), los cuales no resultan tóxicos por separado. La toxina produce edema, septicemia y necrosis tisular (Pavan et al., 2011). En estudios anteriores, se ha identificado esta especie en el poto-poto, un alimento fermentado africano a base de maíz, debido a las precarias condiciones en las que se elabora el alimento (Abriouel et al., 2007). En el atole agrio su presencia puede ser explicada ya que la fermentación se lleva a cabo al aire libre, por lo que este microorganismo pudo provenir del suelo, siendo una contaminación.

También, se identificó a *B. thuringiensis* tanto en la fermentación sólida (a tiempos de fermentación de 0, 2 y 4) así como en la líquida (después de 4 horas de iniciada la fermentación). *B. thuringiensis* es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, Es considerada una bacteria ubicua ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, etc. Contiene un cuerpo paraesporal conocido como cristal, el cual es de naturaleza proteica y tiene propiedades insecticidas. Está constituido por proteínas denominadas d-endotoxinas también conocidas como proteínas Cry y Cyt (Bechtel & Bulla, 1976). *B. thuringiensis* se ha utilizado extensivamente durante cuatro décadas en formulaciones de biopesticidas debido a su seguridad ambiental y a la salud humana (Brar et al., 2006).

A partir de la fermentación líquida, se identificó al inicio de la fermentación y en el tiempo de 4 horas, a *B. megaterium*. Este es un microorganismo perteneciente al género *Bacillus*, es una bacteria no patógena a la que se le brinda un uso en producción biotecnológica ya que es un buen huésped para varias sustancias, como por ejemplo, vitamina B12, penicilina, amilasas y bacteriófagos (Clarke & Cowels, 1952). Debido a su gran tamaño, es muy utilizado para los estudios de los componentes de la morfología bacteriana, así como para explicar esporulación, estructura de la spora, etc. (Christie et al., 2010). Este microorganismos ha sido encontrado en diversos hábitats desde el suelo hasta agua de mar, sedimentos, campos de arroz, miel, pescado y alimentos secos (Vary et al., 2007).

En el atole agrio, se encontró a *B. cereus* en la fermentación sólida después de 24 horas de fermentación, cuando se encontraba a un pH de 4.07. *B. cereus* es una bacteria que se ha distribuido en el ambiente natural y puede difundirse en muchos tipos de alimentos, especialmente en aquellos de origen vegetal. Es capaz de contaminar los alimentos y generar dos tipos de enfermedades (Grandum & Lund, 1997). A pesar de la competición y la actividad antagonista por la microbiota dominante, se ha reportado la presencia en alimentos fermentados tradicionales de *B. cereus*, como por ejemplo el africano dawadawa, el tempeh indonesio, idli y kinema (Antai & Ibrahim, 1986; Nout et al., 1998; Samson, et al., 1987; Vardaraj, et al., 1992), también en el sufú chino (Han et al., 2001) así como en los alimentos tradicionales africanos hechos a base de maíz (poto-poto) y de mijo, el degué (Abriouel et al., 2007). Como se mencionó anteriormente, en el atole agrio se identificó este microorganismo al final de la fermentación, y dado que no se identificó en etapas previas, su presencia puede ser debido a que ocurrió una contaminación cruzada, *B. cereus* es una bacteria cuyo hábitat natural es el suelo. Al identificar este microorganismo en el atole agrio, es muy importante el proceso posterior de calentamiento, ya que como es sabido, es capaz de formar una espora, lo que favorecería su futura germinación y provocar enfermedades en el consumidor del producto.

Es importante mencionar que una vez encontrados los microorganismos, monitorear su orden de aparición, así como la interacción que se generan con los otros microorganismos, nos dará un amplio conocimiento de la microbiota del atole agrio.

Las especies de *Bacillus* que se identificaron, también se encontraron en otros alimentos fermentados; sin embargo, a diferencia del atole agrio, estos alimentos provienen de la fermentación de leguminosas, con un pH final de aproximadamente 8, resultado de la hidrólisis de las proteínas y la subsecuente liberación de aminoácidos libres y la presencia de amonio (Sarkar et al., 1997). Su fermentación es liderada por *B. subtilis*, al contrario que del atole agrio cuya fermentación es liderada por bacterias ácido lácticas.

Por lo que la presencia de este tipo de microorganismos, puede ser principalmente por contaminación, durante el proceso, y no precisamente porque sea parte de la microbiota nativa del alimento y no toma parte en el proceso de fermentación.

Por último, se encontró a la bacteria *Staphylococcus epidermidis* durante la fermentación sólida a 6 horas de iniciada la fermentación. Los *Staphylococcus* son bacterias comunes oportunistas capaces de colonizar la piel y las membranas mucosas de los humanos y otros mamíferos (Kloos, 1986). Se ha encontrado a *S. epidermidis* en el tempeh, alimento fermentado de semillas de soya, siendo uno de los microorganismos que lideran la fermentación de este alimento ya que se encontró en todas las etapas de la fermentación (Mulyowidarso et al., 1989). En cambio, en el daddawa, un alimento fermentado nigeriano de soya, no forma parte de los principales microorganismos durante la fermentación (Omafuvbe et al., 2000). También se ha encontrado en salchichas de pescado con un crecimiento significativo de aproximadamente  $10^5$ - $10^7$  UFC/g (Aryanta et al., 1991). De igual manera, estos alimentos son provenientes de fuentes altamente proteicas, por lo que se lleva a cabo una degradación proteínica.

## **6.2 SOBREVIVENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS EN EL ATOLE AGRIO**

### **6.2.1 Pruebas de reto con *Salmonella* Typhimurium en el atole agrio**

No se detectó *Salmonella* spp. en el atole agrio, posiblemente porque no se encontraba en el atole o porque su concentración era muy pequeña para poder ser detectada; por lo que se inoculó *Salmonella* Typhimurium en atole agrio que fue elaborado en la comunidad de Tabasco en bolsas de plástico con diferentes tiempos de fermentación y se evaluó su sobrevivencia con el fin de conocer qué es lo que sucede en caso que estuviera presente o llegase a existir por contaminación cruzada en el producto. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 25, así como descritos en las figuras 24 y 25.

Tabla 25: Cuentas de *Salmonella* Typhimurium inoculadas en muestras de atole agrio sólido y líquido con diferentes tiempos de la fermentación e incubadas a 37°C.

Tiempo de incubación (horas)	Cuenta de <i>Salmonella</i> Typhimurium log(UFC/mL o g) en atole agrio con diferentes tiempos de fermentación					
	Sól 0	Sól 10	Sól 24	Líqu 0	Líqu 6	Líqu 24
Fermentación con Tiempos de inoculación sólida (sol 0, 10, 24) y líquida (Liq 0, 6, 24)						
0	3.90	3.69	2.78	4.49	4.08	3.34
2	3.85	3.32	2.78	4.61	3.83	2.28
4	3.78	3.11	<10 UFC/g	4.62	3.40	<10 UFC/mL

Como se observa en ambas Figuras (18 y 19), cuando se inoculó el atole agrio con una concentración conocida de *Salmonella* Typhimurium, se observó una disminución en ésta después de 24 horas de fermentación, que es proporcional a la disminución de pH que sufre el alimento.

En la fermentación sólida, cuando se sembró el inóculo de *Salmonella* Typhimurium en el atole agrio y se muestreó inmediatamente (tiempo de inoculación 0), después de 24 horas se observa una disminución de 1.12 ciclos logarítmicos (28.72 % de reducción). Cuando se muestreó después de 2 horas de la inoculación de *Salmonella*, la disminución fue de 1.07 ciclos log (27.80 % de reducción) a 24 horas de fermentación. Finalmente, después de 4 horas de haber hecho la inoculación, se eliminó *Salmonella* Typhimurium a un pH de 4.07.

De igual manera, para la fermentación líquida, cuando se sembró el inóculo de *Salmonella* Typhimurium en el atole agrio y se muestreó inmediatamente (tiempo de inoculación 0), después de 24 horas se observa una disminución de 1.15 ciclos logarítmicos (reducción de 25.62 %). Cuando se muestreó después de 2 horas de la inoculación, a 24 horas de fermentación la disminución fue de 2.33 ciclos logarítmicos (reducción de 50.54 %); es decir, el doble de disminución que cuando se muestreó a 0 horas. Finalmente, cuando se muestreó después de 4 horas de la inoculación, se alcanzó la eliminación completa de *Salmonella* Typhimurium a un pH de 4.62. Esta diferencia entre los tiempos de inoculación y la disminución de *Salmonella* Typhimurium nos habla acerca de cuánto tardan en actuar los ácidos que se encuentran en el atole agrio contra *Salmonella*. Así como de la capacidad que tiene *Salmonella* de resistir a la acidez.

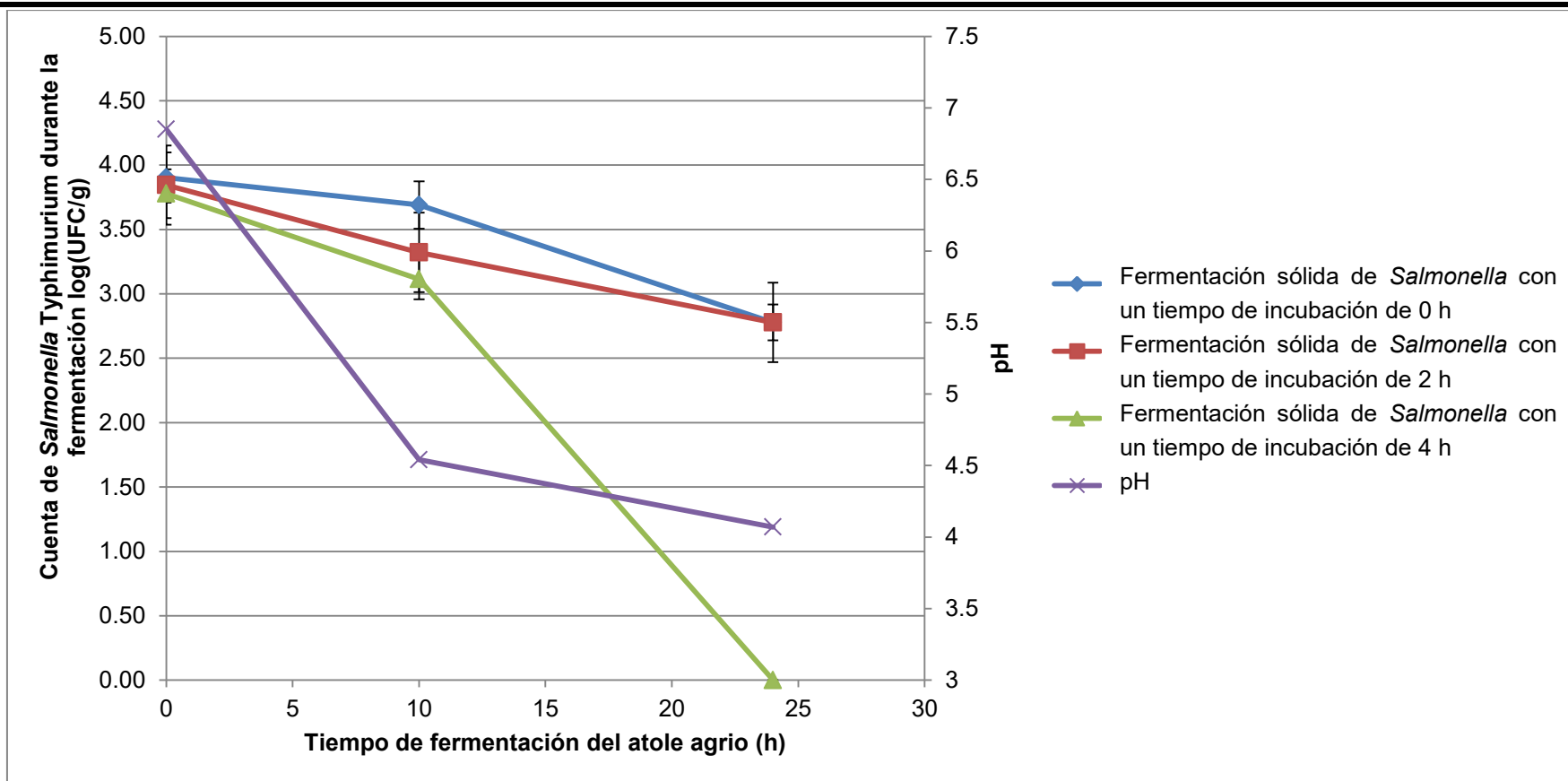


Figura 18: Prueba de reto del desarrollo de *Salmonella Typhimurium* inoculada en muestras de atole agrio sólido fermentadas durante 0, 10 y 24 h e inoculadas a diferentes tiempos (0, 2 y 4 h). Los resultados son promedio de 3 muestras. Se indica la desviación estándar con líneas verticales

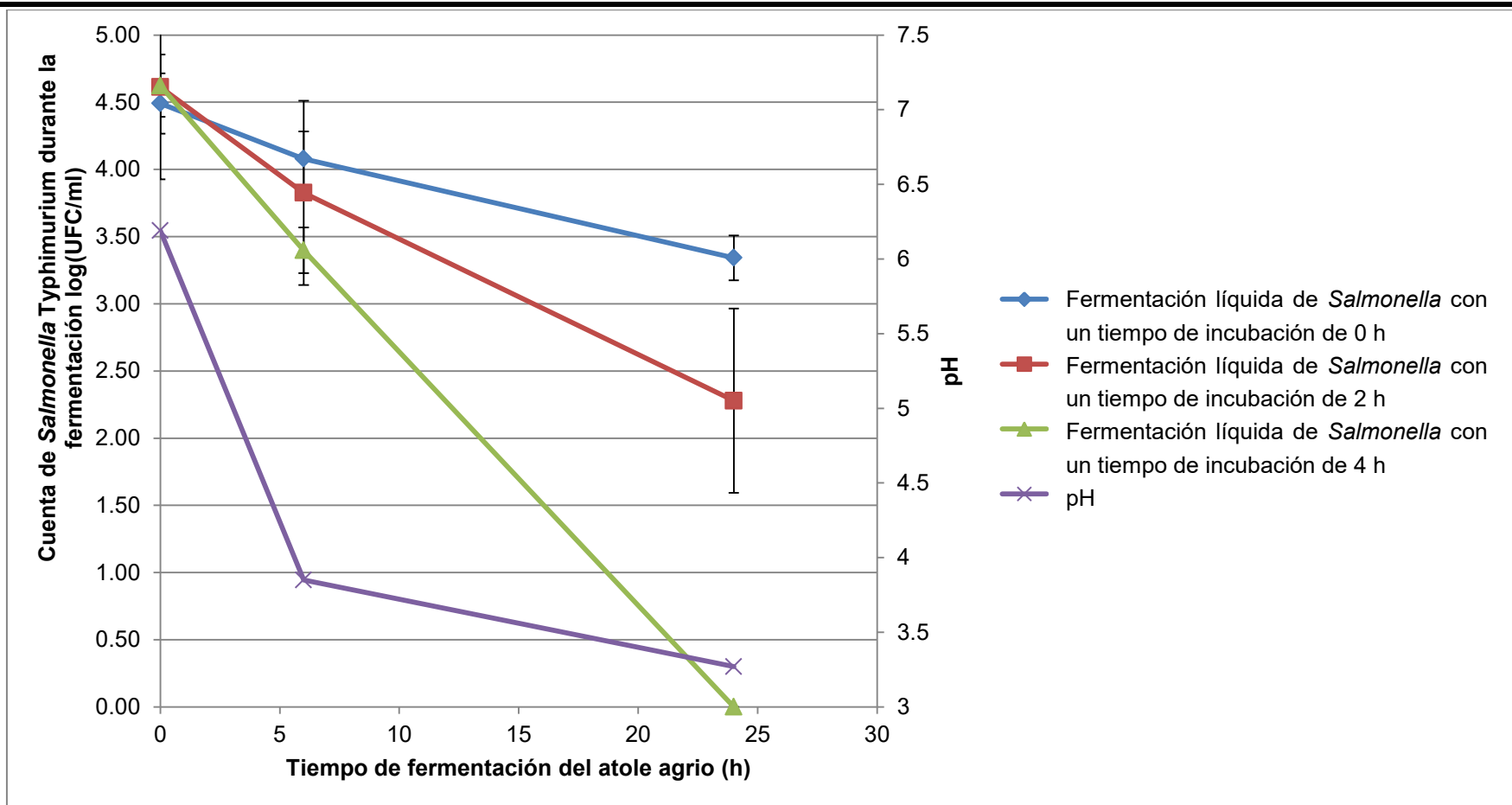


Figura 19: Prueba de reto del desarrollo de *Salmonella Typhimurium* inoculada en muestras de atole agrio sólido fermentadas durante 0, 6 y 24 h e inoculadas a diferentes tiempos (0, 2 y 4 h). Los resultados son promedio de 3 muestras. Se indica la desviación estándar en la gráfica con líneas verticales

Se ha estudiado el efecto del crecimiento de *Salmonella* Typhimurium frente a un valor de pH de 5.5 ajustado con ácido láctico (1 M), en el que se logró la completa disminución del microorganismo después de 2 horas de exposición en caldo tripticasa soya con glucosa (Greenacre et al., 2003).

Se sabe que el pH óptimo de crecimiento de *Salmonella* se encuentra entre 6.5 y 7.5; sin embargo se ha demostrado que es capaz de sobrevivir a un pH de 4 (Coma, 2005). Los ácidos inorgánicos como el HCl, permiten el crecimiento de *Salmonella* hasta valores de pH cercanos a 4, mientras que el ácido acético, propiónico, butírico y láctico, tienen un mayor poder bacteriostático impidiendo el crecimiento de *Salmonella* a pH inferiores a 5 (ICMSF, 2015).

En general, la actividad bactericida de todos los ácidos se incrementa linealmente con la concentración del mismo. De esta forma, concentraciones > 4 % de ácido son necesarias para reducir >2 log el número de células de *S. Typhimurium* (Trepatt, 2002).

Por estas razones, si *Salmonella* spp. llegase a estar presente en el atole agrio debido a una contaminación cruzada del atole agrio, en el producto terminado, ésta se eliminaría y esta eliminación será más rápida mientras menor sea el valor de pH del alimento. Además del efecto de los ácidos, las bacterias lácticas producen otros agentes antimicrobianos, como las bacteriocinas, el peróxido de hidrógeno, el diacetilo, etc.

### **6.3.2 Pruebas de sobrevivencia de *E. coli* a pH y temperatura**

#### ***a) Crecimiento de cepas de *E. coli* a diferentes temperaturas.***

Una vez terminada la fermentación, es necesario calentar el atole agrio en un proceso que las personas que lo elaboran llaman “atolado”, esto con el fin de crear una consistencia más viscosa en el alimento; sin embargo, el tiempo que dura este calentamiento es dependiente del gusto del productor y puede ser de 10 hasta 30 minutos, a una temperatura que puede ir desde los 70 °C hasta la ebullición del atole. Por esta razón, fue necesario caracterizar las cepas de *E. coli* aisladas previamente del atole agrio en su sobrevivencia frente a los retos en condiciones ácidas y de temperatura elevada.

Tabla 26: Resultados cuentas de crecimiento de *E. coli* a 35 °C y 80 °C (UFC/mL)

Repetición	S4a (UFC/mL)		S4b (UFC/mL)		S6a (UFC/mL)		S8c (UFC/mL)	
	35 °C	80 °C	35 °C	80 °C	35 °C	80 °C	35 °C	80 °C
1	24x10 <sup>11</sup>	0	28x10 <sup>12</sup>	0	53x10 <sup>11</sup>	0	11x10 <sup>12</sup>	0
2	73x10 <sup>12</sup>	0	63x10 <sup>11</sup>	0	22x10 <sup>12</sup>	0	25x10 <sup>12</sup>	0
3	37x10 <sup>11</sup>	0	27x10 <sup>11</sup>	0	18x10 <sup>12</sup>	0	43x10 <sup>11</sup>	0

Como se observa en la tabla 26, para todas las cepas de *Escherichia coli* que se aislaron previamente del atole agrio (S4a, S4b, S6a y S8e) cuando son cultivados a temperatura ambiente (25 °C aproximadamente) y posterior a su incubación se observó un crecimiento en todas las cepas y en todas las repeticiones. Por el contrario, cuando las cepas son sometidas a un calentamiento previo durante 10 minutos a 80 °C, se logró la completa eliminación del microorganismo.

De este modo, si el atole agrio no recibe un tratamiento de calentamiento, si hay presentes células de *Escherichia coli*, serán capaces de crecer y sobrevivir a esta temperatura. En cambio, cuando se somete al atole agrio a un calentamiento a 80 °C durante 10 minutos se puede eliminar la bacteria del alimento.

**b) Resistencia de cepas de *E. coli* a diferentes tratamientos de temperatura y tiempo (Determinación del valor D y valor Z).**

La cinética de crecimiento se encarga de estudiar las velocidades de reacción que pueden presentar cambios en el alimento o en la carga microbiana que contiene, cuando son afectados por temperatura, humedad, pH, presión, la presencia y cantidad de reactantes y otras condiciones (Romero et al., 2004). Es por ello que se decidió estudiar la cinética de crecimiento de las cepas de *E. coli* aisladas del atole agrio.

Como se puede observar en la Tabla 27, el tiempo necesario para eliminar el 90% de microorganismos es dependiente tanto de la cepa en estudio, como de la temperatura que se aplique durante el tratamiento.



Tabla 27: Cuenta de sobrevivientes de 4 cepas de *Escherichia coli* aisladas del atole agrio después de un tratamiento térmico de 45, 55, 65 y 75 °C durante 10 minutos.

Tiempo (min)	S4a log (UFC/mL)				S4b log (UFC/mL)				S6a log (UFC/mL)				S8c log (UFC/mL)			
	45 °C	55 °C	65 °C	75 °C	45 °C	55 °C	65 °C	75 °C	45 °C	55 °C	65 °C	75 °C	45 °C	55 °C	65 °C	75 °C
0	12.93	11.43	11.64	10.66	11.94	12.63	11.45	12.57	12.93	12.85	11.15	12.68	12.54	11.20	11.85	12.77
2	12.86	10.85	6.88	0.48	11.91	11.97	9.11	0.70	12.88	12.57	6.68	2.37	12.51	10.86	4.65	1.08
4	12.80	10.72	4.61	0.00	11.89	11.91	8.66	0.00	12.83	12.04	3.34	0.48	12.46	10.84	1.32	0.00
6	12.79	10.64	2.98	0.00	11.86	11.89	7.08	0.00	12.76	11.72	2.48	0.00	12.41	10.62	0.00	0.00
8	12.74	10.45	1.61	0.00	11.84	11.70	4.32		12.75	11.68	0.78	0.00	12.38	10.30	0.00	
10	12.71	10.21	0.00	0.00	11.80	11.49	2.30		12.72	11.60	0.00		12.34	9.97		

\*Se muestra el promedio de dos réplicas

Tabla 28: Valor D (minutos) para las diferentes cepas de *E. coli* a diferentes temperaturas

Temperatura	Valor D (min)			
	S4a	S4b	S6a	S8c
45°C	47.39	71.94	45.05	49.02
55°C	9.51	10.68	7.59	8.71
65°C	0.93	1.13	0.94	0.51
75°C	0.20	0.31	0.32	0.31

Para todas las cepas de *E. coli* (S4a, S4b, S6a y S8e) cuando se da un tratamiento de 45 °C el valor D es de más de 40 minutos, llegando hasta 71.94 minutos para la cepa S4b; sin embargo, al aumentar 10 °C, es decir a 55 °C, el valor D disminuye de 8.71 a 10.68 minutos para cada cepa; por lo que realizar un tratamiento a 55 °C durante 15 minutos sería óptimo para reducir un 90% la población de *E. coli* que pudiera encontrarse en el atole agrio. Cuando el tratamiento es de 65°C, el valor de D va de 0.51 minutos hasta 1.13 minutos, por lo que con aumentar la temperatura 10 °C, disminuye el tiempo necesario para eliminar la población de microorganismos. Ahora bien, si el tratamiento que se le da al atole agrio es de 75 °C, el valor D es muy parecido para todas las cepas de *E. coli*, con valores de 0.20 a 0.32 minutos. Se sabe que la inactivación de *E. coli* comienza alrededor de los 49.5 °C o que el valor D es de 6.7 minutos a 55 °C (Casp y Abril, 1998; Richardson, 2004). Para *E. coli* O157:H7 a 55 °C el valor D es de 27.62 minutos y de 0.04 minutos a 70 °C (Osaili et al., 2006). En otros estudios, se ha calculado el valor D de *E. coli* en alimentos, por ejemplo, en la leche de cabra (Pereira et al., 2006) se inoculó *E. coli* ATCC®25922, obteniendo como resultados  $D_{60^{\circ}\text{C}} = 3.9$  min,  $D_{65^{\circ}\text{C}} = 3.5$  min,  $D_{67^{\circ}\text{C}} = 2.8$  min,  $D_{75^{\circ}\text{C}} = 1.5$  min). Esta variación de valores entre cepas, nos indica que cada cepa de *Escherichia coli* tiene un valor D diferente entre sí.

Por lo tanto, si se detecta *E. coli* en el atole agrio al final de la fermentación, al recibir un tratamiento térmico de aproximadamente 75 °C, se lograría eliminar la población. Se elimina el 90 % pero para eliminar por ejemplo 100 microorganismos

se necesitaría calentar 2 veces el valor D. Es importante aclarar que este valor D que se obtuvo es para estas cepas especialmente.

Tabla 29: Valor Z (°C) para las diferentes cepas de *E. coli*

<i>E. coli</i>	Valor Z (°C)
S4a	12.25
S4b	12.43
S6a	13.66
S8c	10.68

Para el valor Z, todas las cepas de *E. coli* aisladas previamente del atole agrio presentaron valores desde 10.68 °C hasta 13.66 °C; lo que nos indica que con un aumento de la temperatura correspondiente, tendremos una disminución en 1 ciclo logarítmico del valor D. Valores Z de *E. coli* reportados previamente son de 3.6 °C (Chung et al., 2006), para *E. coli* O157:H7, el valor Z fue de 5.2 °C (Osaili et al., 2006) y en la leche de cabra inoculado con *E. coli* ATCC®25922 fue de 23.1 °C (Pereira et al., 2006).

En conjunto, estos parámetros cinéticos nos ayudan a obtener información de las cepas de *E. coli* aisladas del atole agrio, por lo que, de esta parte se concluye que es necesario aplicar un tratamiento térmico de por lo menos 75 °C durante 13.6 minutos al finalizar la fermentación del atole agrio. Esto garantizaría la eliminación de un ciclo logarítmico de esta bacteria. Si la cuenta de *E. coli* es *mayor de 10*, deberá aplicarse un tratamiento del valor D multiplicado por el número de log de la bacteria en alimentos.

### **c) Resistencia a la acidez de las cepas de *E. coli* aisladas del atole agrio**

El estrés ácido se describe como el efecto biológico de los iones H<sup>+</sup> y el efecto de los ácidos orgánicos que se encuentran en el medio ambiente como resultado de la fermentación, como en el caso del atole agrio. Los mecanismos de inactivación de *E. coli* por acidificación consisten en la acidificación intracelular, la cual daña o

interrumpe procesos bioquímicos clave, así como estructuras celulares (Zhao et al., 1993; Garland-Miller y Kaspar, 1994; Chung et al., 2006).

Se usaron cepas de *E. coli* aisladas del atole agrio, sobre todo de la fermentación sólida, en los diferentes tiempos de fermentación (S4a, S4b, S6a y S8C). Se ajustó el pH a 2 con ácido clorhídrico para simular las condiciones del tracto gastrointestinal, suponiendo que las cepas de *E. coli* lograsen sobrevivir el calentamiento que tiene el atole agrio; y se incubaron a 37 °C, para determinar si eran capaces de sobrevivir en esas condiciones. Para determinar la sobrevivencia se realizaron cuentas en placa en el medio Tripticasa Soya Agar.

Como se observa en la Tabla 30, las cuentas de *E. coli* sobrevivientes a un pH de 2 con ácido clorhídrico son muy bajas, y conforme transcurre el tiempo de incubación de la bacteria ésta se elimina y no se detecta. Las más resistentes fueron las cepas S4a y S4b.

**Tabla 30: Cuentas de *E. coli* de las cepas aisladas del atole agrio sólido, inoculadas en agar Tripticasa Soya Agar con el pH ajustado en 2 con HCl e incubadas durante 24 h.**

Tiempo (horas)	S4a log(UFC/mL)	S4b log(UFC/mL)	S6a log(UFC/mL)	S8c log(UFC/mL)
0	2.38	3.45	2.41	2.54
6	1.28	2.51	1.56	1.41
12	1.20	1.57	<10	<10
24	<10	<10	<10	<10

En la Tabla 31, se encuentra el crecimiento de *E. coli* a un pH de 4 con ácido clorhídrico, es muy poco; sin embargo, el crecimiento no es inhibido pero tampoco aumenta, esto pudo observarse para cada una de las cepas claramente. En cambio, para el ácido láctico, para las 6 horas, se observó una disminución de casi un ciclo logarítmico para todas las cepas y conforme transcurre el tiempo la bacteria comienza a crecer, sin llegar a crecer un ciclo logarítmico.

**Tabla 31: Crecimiento por cuenta en placa en Trypticasa Soya Agar de las cepas aisladas de *E. coli* a pH 4 con HCl y ácido láctico e incubadas a diferentes tiempos (0, 6 y 12 horas)**

Tiempo (horas)	S4a log(UFC/mL)		S4b log(UFC/mL)		S6a log(UFC/mL)		S8a log(UFC/mL)	
	HCl	ácido láctico	HCl	ácido láctico	HCl	ácido láctico	HCl	ácido láctico
0	8.63	9.74	8.51	9.45	9.08	9.32	8.81	9.28
6	8.95	8.94	9.82	8.79	9.48	8.69	8.85	8.54
12	8.96	8.97	9.88	8.86	9.31	8.94	8.91	8.62
24	8.97	8.95	9.91	8.90	9.22	8.96	8.84	8.73

Por último, en la Tabla 32, se encuentra el crecimiento de *E. coli* a un pH de 6, tanto con el ácido clorhídrico, como con el ácido láctico, se observa un crecimiento para toda las cepas que se utilizaron.

**Tabla 32: Crecimiento por cuenta en placa en Trypticasa Soya Agar de las cepas aisladas de *E. coli* a pH 6 con HCl y ácido láctico e incubadas a diferentes tiempos (0, 6 y 12 horas)**

Tiempo (horas)	S4a log(UFC/mL)		S4b log(UFC/mL)		S6a log(UFC/mL)		S8c log(UFC/mL)	
	HCl	ácido láctico	HCl	ácido láctico	HCl	ácido láctico	HCl	ácido láctico
0	9.65	9.58	9.15	9.64	9.34	9.28	9.95	9.18
6	13.78	13.26	12.36	13.95	13.54	12.52	13.98	13.68
12	14.88	14.80	14.15	15.75	14.88	14.32	14.80	15.57
24	14.96	14.95	14.74	15.93	15.36	14.71	14.91	15.72

Cuando se lleva a cabo la comparación entre ambos tipos de ácido, se observa una mayor disminución del crecimiento de las cepas con el ácido láctico que con el ácido clorhídrico. Los ácidos débiles son considerados ser más efectivos contra los patógenos que el ácido clorhídrico, debido a que las moléculas débiles pueden penetrar fácilmente la membrana celular para causar un decremento intracelular del pH por la disociación (Deng, et al., 2001; Buchanan et al., 2004). En un estudio de cuatro diferentes ácidos débiles y HCl contra *E. coli* enterohemorrágica, el ácido láctico tuvo una mayor inhibición del microorganismo y la menor inhibición fue aquella dada por el HCl (Buchanan et al., 2004).

En 2005, Sainz et al., estudiaron el efecto que tiene condiciones de pH ácido frente a diferentes cepas de *E. coli* O88:H25 serotipo (95217 y 95222) aisladas durante la fermentación del pozol a 6 y 48 horas después de iniciada con un valor

de pH de 4.9 y 3.7 respectivamente. Cuando se colocaron las cepas en un reto microbiano con HCl, las cepas aisladas del pozol sobrevivieron durante 6 horas a un pH de 2.5, con una concentración de  $10^6$  UFC/mL, concentración que permaneció constant durante todo el tiempo de exposición. Cuando las cepas fueron probadas contra el ácido lactico, se redujo un ciclo logarítmico después de 6 horas de duración del reto. Por lo que, tanto para el pozol, como en el atole agrio, *E. coli* es un microorganismo que se puede adaptar al medio ácido del alimento, y se deben de tomar medidas para asegurar que el alimento es inocuo y puede ser consumido sin correr riesgo de padecer una enfermedad causada por algún patógeno.

### **6.2.3 Pruebas de reto de patógenos contra bacterias ácido lácticas aisladas del atole agrio**

Otro de los factores que puede afectar el crecimiento de los microorganismos patógenos, es la presencia de metabolitos creados por las bacterias ácido lácticas, ya que se sabe que éstos tienen la facultad de crear compuestos como bacteriocinas, que son compuestos que se han probado tener un efecto antimicrobiano, por lo que era interesante conocer el efecto de la presencia de los sobrenadantes de las BAL que tiene sobre el crecimiento de los microorganismos patógenos.

La prueba de reto por difusión en agar, es usada para evaluar la actividad inhibitoria (efecto antimicrobiano) de compuestos en estudio. En el método, un microorganismo en estudio es esparcido en el agar apropiado, se realizan “pozos” en el agar y el compuesto del estudio se agrega a los pozos. El efecto antimicrobiano es evaluado basado en la zona de inhibición formada en el área dónde los compuestos se absorben. En este estudio, se evaluaron los diferentes patógenos aislados del atole agrio e identificados previamente (*E. coli* S4a, S4b, S6a y S8a, *Kluyvera ascorbata*, *Shigella dysentirae* y *Shigella flexneri*) así como también los patógenos como *Salmonella infantis*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* y *B. cereus*.

Por otro lado, las especies de bacterias ácido lácticas, que también fueron aisladas previamente del atole agrio por Väkeväinen y Membrillo en 2011, y cuyos sobrenadantes en medio MRS, fueron utilizados durante esta prueba, se encuentran en la Tabla 33.

**Tabla 33: Especies de bacterias ácido lácticas utilizadas en las pruebas de reto de patógenos**

Clave	Nombre de la cepa	Procedencia
6	<i>Weissella confusa</i>	Líquida / 3 / 2010
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Líquida / 4 / 2010
10	<i>Lactococcus lactis</i>	Líquida / 5 / 2010
11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Líquida / 5 / 2010
28	<i>Weissella confusa</i>	Líquida / 4 / 2010
59	<i>Lactococcus lactis</i>	Sólida / 4 / 2010
68	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sólida / 10 / 2010
79	<i>Lactococcus lactis</i>	Sólida / 6 / 2010
S017	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Sólida / 0 / 2011
S018	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Sólida / 0 / 2011
S0110	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Sólida / 0 / 2011
S213	<i>Lactobacillus dextrinicus</i>	Sólida / 2 / 2011
S418	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Sólida / 4 / 2011
S614	<i>Leuconostoc (pseudo)mesenteroides</i>	Sólida / 6 / 2011
L317	<i>Lactococcus lactis</i> spp. Lactis	Líquida / 3 / 2011
L412	<i>Weissella confusa</i>	Líquida / 4 / 2011
GT11	<i>Lactococcus lactis</i>	Granos / 2011
BT15	<i>Lactobacillus mali</i>	Granos / 2011
A1MM10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	España
A2SMM4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	España
A1MS3	<i>Lactococcus lactis</i>	España

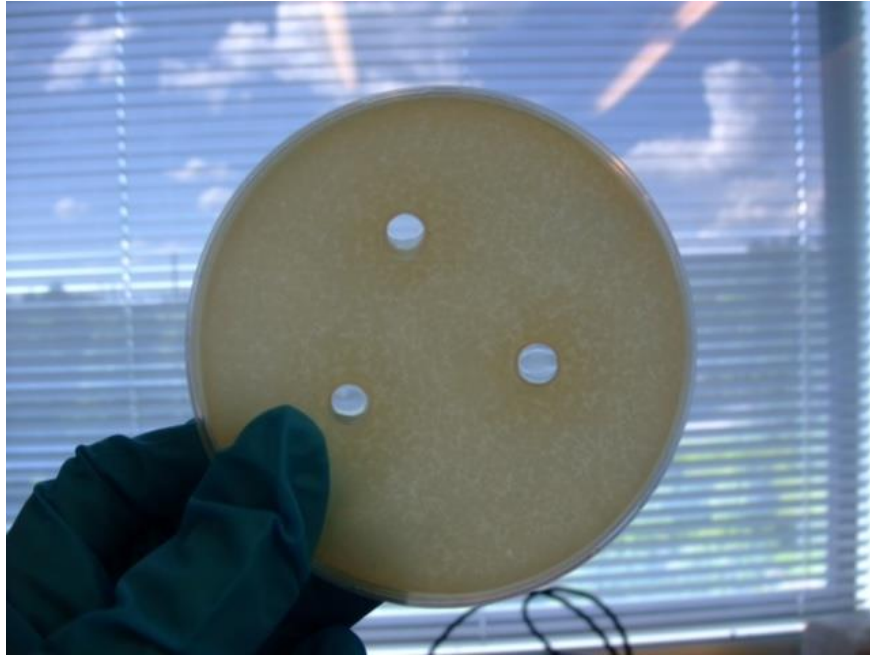


Figura 20: Prueba de reto de patógenos (*Bacillus cereus*) frente a control negativo (MRS sin cultivo)

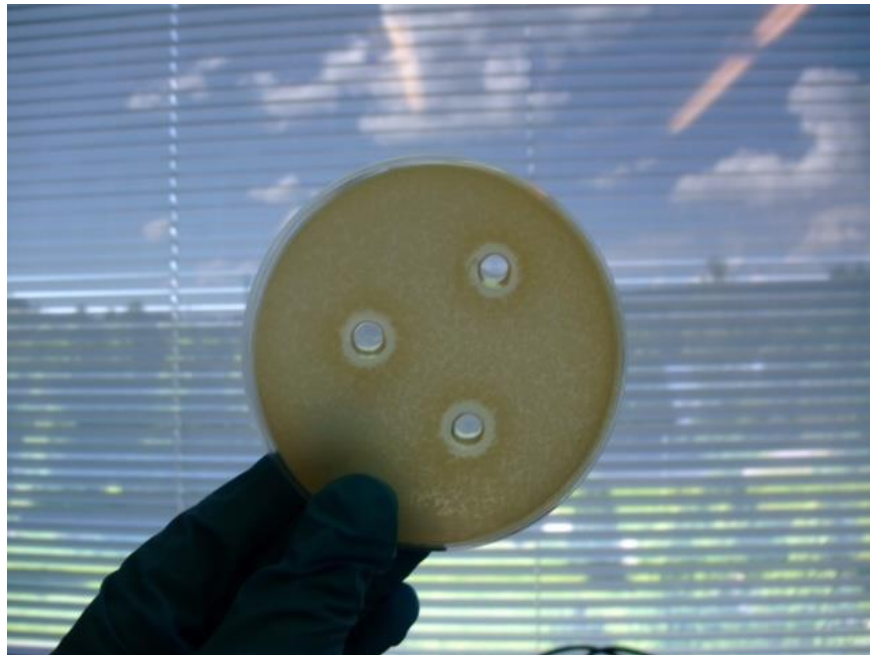


Figura 21: Prueba de reto de patógenos (*Bacillus cereus*) frente a sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* en caldo MRS a pH 4



a) *Salmonella* InfantisTabla 34: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre *Salmonella* Infantis

Bacteria ácido láctica	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 4 (mm)	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 7 (mm)
6	1.1 ± 0.6	0.8 ± 0.4
7	1.7 ± 0.5	0.9 ± 0.3
10	1.6 ± 0.7	0.8 ± 0.6
11	1.0 ± 0.5	0.8 ± 0.4
28	1.0 ± 0.7	0.6 ± 0.5
59	1.3 ± 0.7	1.0 ± 0.5
68	1.8 ± 0.7	1.2 ± 0.4
79	1.4 ± 0.6	0.8 ± 0.4
S017	1.7 ± 0.5	0.9 ± 0.6
S018	1.4 ± 0.6	1.2 ± 0.8
S0110	1.6 ± 0.7	1.1 ± 0.7
S213	2.2 ± 0.8	1.3 ± 0.8
S216	1.4 ± 0.8	0.9 ± 0.6
S418	2.0 ± 1.3	1.3 ± 0.7
S614	1.5 ± 0.5	0.8 ± 0.4
L317	1.1 ± 0.6	0.6 ± 0.5
L412	1.8 ± 0.6	0.8 ± 0.6
GT11	1.6 ± 0.5	1.2 ± 0.8
BT15	1.7 ± 0.8	1.1 ± 1.1
A1MM10	1.4 ± 1.0	0.4 ± 0.5
A2SMM4	1.6 ± 1.0	0.4 ± 0.5
AA1MS3	1.8 ± 0.8	1.2 ± 1.2

Para las pruebas con *Salmonella* Infantis, se observa una mayor inhibición sobre *Salmonella* infantis con todos los sobrenadantes de BAL cuando se encuentran a un pH de 4; el sobrenadante con la que se obtuvo una mayor inhibición fue con el proveniente de la cepa S213 (2.2 mm), que corresponde a *Lactobacillus dextrinicus*. Con un pH de 7, se observó con todos los sobrenadantes de igual manera una menor inhibición, no se puede concluir un efecto bactericida ya que no se observaron halos completos, sino parciales.

**b) *Listeria monocytogenes***Tabla 35: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de Bacterias ácido Lácticas sobre *Listeria monocytogenes*

Bacteria ácido láctica	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 4 (mm)	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 7 (mm)
6	2.4 ± 1.1	1.0± 0.5
7	5.2± 2.7	0.9± 0.3
10	2.6± 1.8	0.9± 0.8
11	1.6± 0.7	1.3± 0.5
28	1.4± 0.5	0.9± 0.3
59	2.7± 0.7	0.9± 0.3
68	4.6± 2.2	1.3± 0.5
79	2.0± 1.1	0.8± 0.4
S017	3.6± 2.7	0.7± 0.5
S018	4.3± 1.4	0.7± 0.5
S0110	3.3± 1.8	0.6± 0.5
S213	2.4±0.9	0.7± 0.5
S216	1.0± 0.9	0.8± 0.6
S418	4.4± 2.6	1.2± 0.9
S614	2.4±1.7	1.4± 1.0
L317	2.0± 1.5	1.0± 0.5
L412	2.6± 1.5	0.7± 0.5
GT11	2.4± 1.9	0.9± 0.8
BT15	2.4± 1.7	0.7± 0.5
A1MM10	3.8± 2.5	0.9± 0.6
A2SMM4	4.3± 1.8	1.0± 0.7
AA1MS3	2.2± 1.0	1.4± 1.0

Para las pruebas con *Listeria monocytogenes*, se observa una mayor inhibición con todas los sobrenadantes de BAL cuando se encuentran a un pH de 4, en comparación cuando se prueban con los sobrenadantes a un pH de 7; el sobrenadante con la que se obtuvo una mayor inhibición fue con el proveniente de la cepa 7 (5.2 mm), que corresponde a *Lactobacillus plantarum*.

c) *Candida albicans*Tabla 36: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre *Candida albicans*

Bacteria ácido láctica	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 4 (mm)	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 7 (mm)
6	1.4 ± 1.0	0.7± 0.5
7	0.9± 0.6	0.7± 0.5
10	0.8± 0.4	1.1± 0.3
11	1.0± 0.0	0.7± 0.5
28	0.9± 0.3	1.1± 0.3
59	0.8± 0.7	0.6± 0.5
68	0.7± 0.5	0.7± 0.5
79	1.2± 0.4	1.1± 0.3
S017	0.9± 0.8	1.0± 0.7
S018	1.2± 0.7	1.1± 0.3
S0110	1.2± 0.4	0.7± 0.5
S213	0.9±0.3	0.7± 0.5
S216	1.0± 0.0	1.0± 0.5
S418	1.0± 0.5	1.2± 0.4
S614	0.8±0.7	0.4± 0.5
L317	1.1± 0.3	0.6± 0.5
L412	0.9± 0.3	0.9± 0.6
GT11	1.1± 0.6	1.0± 0.0
BT15	0.7± 0.4	0.9± 0.3
A1MM10	1.1± 0.3	1.1± 0.3
A2SMM4	1.0± 0.5	0.8± 0.4
AA1MS3	0.9± 0.6	1.0± 0.5

Para las pruebas con *Candida albicans*, se observa una mayor inhibición con todos los sobrenadantes de BAL cuando se encuentran a un pH de 4, excepto el sobrenadante correspondiente a un pH 7 de S418 (*Pediococcus pentosaceus*); el sobrenadante con la que se obtuvo una mayor inhibición fue con el proveniente de la cepa 1 (1.4 mm), que corresponde a *Weissella confusa*.

c) *Bacillus cereus*Tabla 37: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre *Bacillus cereus*

Muestra	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 4 (mm)	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 7 (mm)
6	2.2± 0.8	1.0± 0.0
7	4.8± 0.8	1.0± 0.0
10	1.9± 0.8	1.0± 0.0
11	1.1± 0.3	1.0± 0.0
28	0.8± 0.4	0.7± 0.5
59	2.0± 0.0	0.8± 0.4
68	5.0± 0.7	0.8± 0.4
79	2.0± 0.7	0.8± 0.4
S017	1.7± 0.7	0.8± 0.4
S018	4.3± 0.5	0.8± 0.4
S0110	3.7± 0.9	0.9± 0.3
S213	2.9± 1.2	0.8± 0.4
S216	0.9± 0.3	0.8± 0.4
S418	4.0± 0.9	0.8± 0.4
S614	1.2± 0.8	0.8± 0.4
L317	2.0± 0.7	0.8± 0.4
L412	0.9± 0.3	0.7± 0.5
GT11	2.0± 0.7	0.8± 0.4
BT15	3.2± 1.1	0.8± 0.4
A1MM10	4.0± 1.5	0.7± 0.5
A2SMM4	3.9± 1.3	0.8± 0.4
AA1MS3	1.7± 0.7	0.7± 0.5

Para las pruebas con *Bacillus cereus*, se observa una mayor inhibición con todos los sobrenadantes de BAL cuando se encuentran a un pH de 4, en comparación cuando se prueban con los sobrenadantes a un pH de 7; el sobrenadante con la que se obtuvo una mayor inhibición fue con el proveniente de la cepa 68 (5.0 mm), que corresponde a *Lactobacillus plantarum*.

d) *Kluyvera ascorbata* (L1b)Tabla 38: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre *Kluyvera ascorbata*

Bacteria ácido láctica	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 4 (mm)	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 7 (mm)
6	2.4 ± 0.6	0.4 ± 0.5
7	3.0 ± 0.5	0.6 ± 0.5
10	2.0 ± 0.7	0.4 ± 0.5
11	2.0 ± 0.5	0.3 ± 0.5
28	0.9 ± 0.7	0.4 ± 0.5
59	2.4 ± 0.7	0.3 ± 0.5
68	3.0 ± 0.6	0.9 ± 0.6
79	2.2 ± 0.5	0.3 ± 0.5
S017	1.9 ± 0.7	0.3 ± 0.5
S018	2.1 ± 0.5	0.6 ± 0.5
S0110	1.9 ± 0.7	0.4 ± 0.5
S213	2.6 ± 0.8	0.3 ± 0.5
S216	0.6 ± 0.9	0.3 ± 0.5
S418	2.8 ± 1.3	0.6 ± 0.5
S614	1.6 ± 0.5	0.6 ± 0.5
L317	1.7 ± 0.6	0.8 ± 0.6
L412	2.1 ± 0.7	0.9 ± 0.6
GT11	2.9 ± 0.5	0.8 ± 0.4
BT15	2.7 ± 0.9	0.9 ± 0.7
A1MM10	3.2 ± 1.0	1.0 ± 0.7
A2SMM4	3.4 ± 1.0	0.6 ± 0.5
AA1MS3	2.2 ± 0.8	1.0 ± 0.5

Para las pruebas con *Kluyvera ascorbata*, se observa una mayor inhibición con todos los sobrenadantes de BAL cuando se encuentran a un pH de 4, en comparación cuando se prueban con los sobrenadantes a un pH de 7; el sobrenadante con la que se obtuvo una mayor inhibición fue con el proveniente de la cepa A2SMM4 (3.4 mm), que corresponde a *Lactobacillus plantarum*.

e) *Escherichia coli* S4aTabla 39: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre *Escherichia coli*

Bacteria ácido láctica	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 4 (mm)	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 7 (mm)
6	1.1 ± 0.8	0.9 ± 0.7
7	2.8 ± 0.7	0.8 ± 0.6
10	1.2 ± 1.0	1.2 ± 1.1
11	2.1 ± 0.8	1.8 ± 1.3
28	2.1 ± 1.5	1.3 ± 1.1
59	2.3 ± 1.9	1.0 ± 0.7
68	2.7 ± 1.0	1.3 ± 1.0
79	2.0 ± 1.7	0.9 ± 0.8
S017	1.8 ± 1.4	1.3 ± 1.0
S018	2.7 ± 0.7	1.4 ± 1.0
S0110	2.4 ± 1.1	1.1 ± 1.0
S213	2.0 ± 1.4	1.3 ± 1.3
S216	2.0 ± 1.1	1.4 ± 0.7
S418	3.3 ± 0.9	0.9 ± 0.8
S614	1.8 ± 1.5	0.8 ± 0.8
L317	1.4 ± 1.2	1.2 ± 0.7
L412	1.9 ± 1.3	1.4 ± 0.7
GT11	1.3 ± 0.9	1.3 ± 0.5
BT15	1.6 ± 1.4	0.9 ± 0.8
A1MM10	3.6 ± 1.1	1.7 ± 1.0
A2SMM4	3.2 ± 1.7	1.2 ± 1.2
AA1MS3	2.0 ± 0.9	1.0 ± 0.8

Para las pruebas con *E. coli*, se observa una mayor inhibición con todos los sobrenadantes de BAL cuando se encuentran a un pH de 4, en comparación cuando se prueban con los sobrenadantes a un pH de 7; el sobrenadante con la que se obtuvo una mayor inhibición fue con el proveniente de la cepa A1MM10 (3.6 mm), que corresponde a *Lactobacillus plantarum*.

f) *Escherichia coli* S4bTabla 40: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre *Escherichia coli*

Bacteria ácido láctica	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 4 (mm)	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 7 (mm)
6	1.8 ± 0.8	0.9 ± 0.3
7	3.4 ± 1.7	1.3 ± 0.5
10	2.6 ± 1.2	1.1 ± 0.3
11	1.7 ± 0.7	1.0 ± 0.0
28	1.9 ± 0.8	1.0 ± 0.0
59	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.3
68	4.0 ± 0.5	2.0 ± 1.8
79	1.3 ± 0.5	1.1 ± 0.3
S017	2.4 ± 0.7	1.1 ± 0.3
S018	3.0 ± 1.9	1.0 ± 0.0
S0110	2.3 ± 0.9	0.9 ± 0.0
S213	1.9 ± 0.8	1.1 ± 1.3
S216	1.7 ± 1.0	1.0 ± 0.4
S418	2.0 ± 0.9	1.0 ± 0.5
S614	1.6 ± 0.5	0.9 ± 0.0
L317	1.3 ± 1.1	0.8 ± 0.3
L412	1.6 ± 0.9	1.6 ± 0.0
GT11	1.4 ± 0.7	1.0 ± 0.3
BT15	1.8 ± 1.0	0.9 ± 0.3
A1MM10	2.4 ± 1.2	1.0 ± 1.0
A2SMM4	2.7 ± 1.7	1.1 ± 1.2
AA1MS3	2.2 ± 1.6	1.1 ± 0.8

Para las pruebas con *E. coli*, se observa una mayor inhibición con todos los sobrenadantes de BAL cuando se encuentran a un pH de 4, en comparación cuando se prueban con los sobrenadantes a un pH de 7; el sobrenadante con la que se obtuvo una mayor inhibición fue con el proveniente de la cepa 68 (4.0 mm), que corresponde a *Lactobacillus plantarum*.

g) *Escherichia coli* S6aTabla 41: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre *Escherichia coli*

Bacteria ácido láctica	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 4 (mm)	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 7 (mm)
6	1.6 ± 0.9	1.0 ± 0.0
7	3.4 ± 1.8	1.0 ± 0.0
10	1.4 ± 0.7	1.1 ± 0.3
11	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.0
28	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.4
59	2.0 ± 0.9	1.3 ± 0.5
68	4.6 ± 0.7	2.1 ± 1.7
79	2.0 ± 1.1	0.8 ± 0.4
S017	2.2 ± 0.8	1.1 ± 0.3
S018	2.8 ± 1.6	0.9 ± 0.3
S0110	3.1 ± 1.4	1.0 ± 0.0
S213	2.8 ± 1.2	1.0 ± 0.0
S216	2.6 ± 1.0	1.2 ± 0.4
S418	2.0 ± 1.5	1.0 ± 0.0
S614	2.0 ± 0.9	1.3 ± 0.5
L317	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.0
L412	2.1 ± 0.8	1.4 ± 0.5
GT11	2.0 ± 0.9	1.2 ± 0.4
BT15	1.9 ± 1.2	1.1 ± 0.3
A1MM10	3.4 ± 1.7	1.1 ± 0.3
A2SMM4	3.4 ± 1.9	1.0 ± 0.0
AA1MS3	2.8 ± 1.5	1.0 ± 0.0

Para las pruebas con *E. coli* S6a, se observa una mayor inhibición con todos los sobrenadantes de BAL cuando se encuentran a un pH de 4, en comparación cuando se prueban con los sobrenadantes a un pH de 7; el sobrenadante con la que se obtuvo una mayor inhibición fue con el proveniente de la cepa 68 (4.6 mm), que corresponde a *Lactobacillus plantarum*.



**h) *Shigella dysentirae* (S8a)**

**Tabla 42: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre *Shigella dysentirae***

Bacteria ácido láctica	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 4 (mm)	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 7 (mm)
6	1.9± 1.6	0.9± 0.3
7	2.2± 1.9	1.3± 0.5
10	1.9± 1.1	1.1± 0.3
11	1.2± 0.4	1.0± 0.0
28	2.1± 1.7	1.0± 0.0
59	2.0± 1.3	0.9± 0.3
68	3.8± 1.9	2.0± 1.8
79	2.1± 1.3	1.1± 0.3
S017	1.8± 0.8	1.1± 0.3
S018	4.0± 2.3	1.0± 0.0
S0110	2.3± 1.4	0.9± 0.3
S213	2.7± 1.2	1.1± 0.3
S216	1.0± 0.0	1.0± 0.0
S418	2.6± 1.9	1.0± 0.0
S614	1.2± 0.4	0.9± 1.3
L317	1.2± 1.0	0.8± 0.4
L412	1.0± 0.9	1.6± 0.5
GT11	1.6± 0.9	1.0± 0.0
BT15	1.9± 1.2	0.9± 0.3
A1MM10	2.6± 1.5	1.0± 0.0
A2SMM4	3.0± 1.5	1.1± 0.3
AA1MS3	2.1± 1.7	1.1± 0.3

Para las pruebas con *Shigella dysentirae*, se observa una mayor inhibición con todos los sobrenadantes de BAL cuando se encuentran a un pH de 4, en comparación cuando se prueban con los sobrenadantes a un pH de 7; el sobrenadante con la que se obtuvo una mayor inhibición fue con el proveniente de la cepa S018 (4.0 mm), que corresponde a *Pediococcus pentosaceus*.

**i) *Escherichia coli* (S8c)**

**Tabla 43: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre *Escherichia coli***

Muestra	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 4 (mm)	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 7 (mm)
6	1.6± 0.9	1.2± 0.4
7	3.3± 1.7	1.0± 0.0
10	1.4± 0.5	1.0± 0.0
11	1.2± 1.1	0.9± 0.3
28	1.2± 0.7	1.4± 0.5
59	2.3± 1.0	1.1± 0.3
68	4.3± 1.6	2.1± 1.3
79	2.2± 1.0	0.9± 0.3
S017	2.2± 1.0	1.0± 0.0
S018	2.9± 2.2	1.0± 0.0
S0110	2.8± 1.2	1.7± 1.3
S213	2.7± 1.3	1.0± 0.0
S216	2.4± 0.7	1.0± 0.0
S418	3.1± 1.3	0.9± 0.3
S614	2.2± 0.7	0.7± 0.5
L317	1.3± 1.1	1.0± 0.0
L412	2.0± 1.4	1.4± 0.5
GT11	2.5± 0.8	0.9± 0.3
BT15	2.9± 1.3	1.0± 0.0
A1MM10	3.0± 2.1	1.0± 0.0
A2SMM4	3.2± 2.3	1.1± 0.3
AA1MS3	2.0± 1.1	1.0± 0.0

Para las pruebas con *E. coli*, se observa una mayor inhibición con todos los sobrenadantes de BAL cuando se encuentran a un pH de 4, en comparación cuando se prueban con los sobrenadantes a un pH de 7; el sobrenadante con la que se obtuvo una mayor inhibición fue con el proveniente de la cepa 68 (4.3 mm), que corresponde a *Lactobacillus plantarum*.

j) *Shigella flexneri* (S8e)Tabla 44: Diámetro de la zona de inhibición causada por los diferentes sobrenadantes de bacterias ácido lácticas sobre *Shigella flexneri*

Muestra	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 4 (mm)	Diámetro de la zona de inhibición formada a un pH de 7 (mm)
6	1.5± 0.5	1.0± 0.0
7	4.1± 2.5	1.2± 0.7
10	2.4± 1.1	0.8± 0.4
11	1.8± 1.1	0.9± 0.3
28	1.3± 1.1	0.9± 0.8
59	2.2± 1.8	0.6± 0.5
68	4.0± 2.8	2.3± 2.0
79	2.2± 1.3	0.7± 0.5
S017	2.4± 1.7	0.7± 0.5
S018	3.7± 1.9	0.7± 0.5
S0110	3.7± 1.6	1.6± 1.4
S213	2.4± 1.7	0.8± 0.4
S216	2.2± 0.8	1.0± 0.9
S418	2.9± 1.6	0.9± 0.8
S614	2.1± 1.6	0.8± 0.7
L317	1.8± 1.4	0.3± 0.5
L412	1.4± 1.1	0.7± 0.5
GT11	2.0± 1.5	0.7± 0.5
BT15	2.4± 1.7	0.9± 0.8
A1MM10	3.0± 2.6	0.8± 0.7
A2SMM4	3.7± 2.1	1.0± 0.0
AA1MS3	2.2± 1.4	1.0± 0.0

Para las pruebas con *Shigella flexneri*, se observa una mayor inhibición con todos los sobrenadantes de BAL cuando se encuentran a un pH de 4, en comparación cuando se prueban con los sobrenadantes a un pH de 7; el sobrenadante con la que se obtuvo una mayor inhibición fue con el proveniente de la cepa 7 (4.1 mm), que corresponde a *Lactobacillus plantarum*.

Tabla 45: Resumen de microorganismos patógenos estudiados con los sobrenadantes con los que se present mayor inhibición a pH 4 y 7

Microorganismo patógeno	Sobrenadantes con los que se presentó la mayor inhibición a pH 4	Sobrenadantes con los que se presentó la mayor inhibición a pH 7
<i>Escherichia coli</i> S4a	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Leuconostoc (pseudo)mesenteroides</i>
<i>Escherichia coli</i> S4b	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Escherichia coli</i> S6a	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Escherichia coli</i> S8c	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Weissella confusa</i>
<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactococcus lactis</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Shigella flexneri</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Salmonella infantis</i>	<i>Lactobacillus dextrinicus</i>	<i>Lactobacillus dextrinicus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Leuconostoc (pseudo)mesenteroides</i> <i>Lactococcus lactis</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Weissella confuse</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Weissella confusa</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc (pseudo)mesenteroides</i>

Se realizaron pruebas de reto de diferentes microorganismos patógenos frente a los sobrenadantes de las bacterias ácido lácticas previamente aisladas del atole agrio en muestreos anteriores obteniendo que la mayor inhibición se obtuvo cuando el pH se ajustaba a 4. Para *Salmonella Infantis* la mayor inhibición ocurrió por parte del sobrenadante de *Lactobacillus dextrinicus*. Para *Shigella dysenteriae* la inhibición fue con *Pediococcus pentosaceus*. Para *Listeria monocytogenes*, *Kluyvera ascorbata*, *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri*, *E. coli* S4a, S6a y S8c la mayor inhibición fue por *Lactobacillus plantarum*. Por último, la mayor inhibición para *Candida albicans* fue con el sobrenadante de *Weissella confusa*. (Tabla 45).

Por lo tanto, para lograr la inhibición de las bacterias patógenas en el atole agrio varios factores influyen: acidez del atole agrio, presencia de bacterias productoras de bacteriocinas (u otros factores antimicrobianos) y tratamiento térmico al finalizar la fermentación.

Es importante señalar que solamente para *Bacillus cereus* se observó un efecto bactericida, es decir, que la zona de inhibición no contenía ningún crecimiento bacteriano. En cambio, para los otros patógenos, el efecto observado fue bacteriostático, ya que solamente hubo una disminución en la densidad poblacional en la zona del halo de inhibición.

## 7. CONCLUSIONES

No se encontró la presencia del patógeno *Salmonella*, ni en las materias primas, ni en ninguna etapa de la elaboración del atole agrio, se encontraron enterobacterias que son patógenos oportunistas similares a los reportados previamente.

Por otro lado, debido a las condiciones de pH bajo, presencia de ácido láctico, propician la eliminación a las 24 horas de la fermentación del atole agrio a las 4 horas de inoculación de *Salmonella*; por lo tanto, si *Salmonella* spp. se introdujera, ya sea en las materias primas, o en cualquier etapa de elaboración del atole agrio, se eliminará en el producto final.

Se detectó la presencia de *E. coli* durante la primera hora de la fermentación líquida. En cambio, en la fermentación sólida fue aislada a partir de la cuarta hora. En las materias primas y las últimas horas de fermentación, *E. coli* no se detectó.

Se aislaron 4 diferentes cepas del *E. coli* a partir de la fermentación sólida del atole agrio, en unos tiempos de fermentación de 4, 6 y 8; con un pH de 6.59, 5.72 y 5.08 respectivamente. Dichas cepas de *E. coli* fueron identificadas mediante métodos tanto fenotípicos como genotípicos con un 99 % de identidad.

Mediante el RAPD, se agruparon las cepas de *E. coli* por tipo de fermentación: líquida y sólida, después por tiempo de fermentación.

Se caracterizaron las cepas de *E. coli* aisladas del atole agrio y se determinó el valor D y el valor Z, concluyendo que, si existe la presencia de *E. coli* en el atole agrio al final de la fermentación, al recibir un tratamiento térmico de aproximadamente 75 °C y 13.6 minutos, se lograría eliminar la población de microorganismos presentes en el alimento.

También, se caracterizó el crecimiento de las cepas de *E. coli* en condiciones ácidas, frente a ácido láctico y ácido clorhídrico a distintas concentraciones. Se observó que las cepas no eran capaces de crecer en estas condiciones, si bien no se presentó un decremento en el crecimiento, tampoco hubo un aumento en éste.

Se aislaron 25 cepas de bacilos esporulados Gram-positivos: de la fermentación sólida se identificaron *Bacillus anthraxis*, *B. thuringiensis* y *B. cereus*; y de la fermentación líquida: *B. thuringiensis* y *B. megaterium*.

Se realizaron pruebas de reto de diferentes microorganismos patógenos frente a los sobrenadantes de las bacterias ácido lácticas previamente aisladas del atole agrio en muestreos anteriores obteniendo que la mayor inhibición se obtuvo cuando el pH no era ajustado a 7. Para *Salmonella* linfantis la mayor inhibición ocurrió por parte del sobrenadante de *Lactobacillus dextrinicus*. Para *Shigella dysenteriae* la inhibición fue con *Pediococcus pentosaceus*. Para *Listeria monocytogenes*, *Kluyvera ascorbata*, *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri*, *E. coli* S4a, S6a y S8c la mayor inhibición fue por *Lactobacillus plantarum*. Por último, la mayor inhibición para *Candida albicans* fue con el sobrenadante de *Weissella confusa*. Solamente en *Bacillus cereus* hubo un efecto bactericida, en cambio para todos los demás patógenos el efecto observado fue bacteriostático.

En conjunto, el pH, la temperatura de calentamiento y la presencia de otros microorganismos, hacen que el atole agrio sea un alimento fermentado de maíz en el cual la presencia de bacterias patógenas como *Salmonella*, *E. coli*, *Bacillus* spp. sean eliminadas.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Abriouel, H., Ben Omar, N., Lopez, R.L., Martinez-Canamero, M., Keleke, S., Galvez, A. (2006). Culture-independent analysis of the microbial composition of the African traditional fermented foods poto poto and degue by using three different ADNextraction methods. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 228-233.

Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas-López, R., Martínez-Cañamero, M., Ortega, E. & Gálvez, A. (2007) Differentiation and characterization by molecular techniques of *Bacillus cereus* group isolates from poto poto and dégué, two traditional cereal-based fermented foods of Burkina Faso and Republic of Congo. *Journal of Food Protection.* 70(5):1165-1173

Adegoke, G.O., Babalola, A.K. (1988) Characteristics of microorganisms of importance in the fermentation of fufu and ogi. Two Nigerian foods. *Journal of Applied Microbiology*, 65 (6): 449-453.

Agata, N., Ohta, M. & Mori, M. (1996). Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Current microbiology*, 33: 67-69.

Agustin, JC. & Carlier, V. (2000). Modelling of the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *Int J Food Microbiology*, 25; 56(1): 53-70.

Alejos, L., Aragón, M. & Cornejo, A. (2014) Extracción y Purificación de ADN. **En:** Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. SEMARNAT, INEEC, México. 1-27.

Ampe, F., ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C. & Guyot, J. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican Pozol, a fermented



maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl Environ Microbiology*; 65(12): 5464–5473.

Andrighetto, C., Zampese, L., Lombardi, A., (2001). RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Letters in Applied Microbiology*, 33(1), pp. 26-33.

Ang, D., Chandrasekhar, G. N., Zylicz, M. & Georgopoulos, C. (1986). *Escherichia coli* *grpE* gene codes for heat shock protein B25.3, essential for both  $\lambda$ ADN replication at all temperatures and host growth at high temperature. *Journal of Bacteriology* 167, 25-29.

Antai, S.P., & Ibrahim, M.N. (1986). Micro-organisms associated with African locust bean (*Parkia Wlcoidea Welw.*) fermentation for 'dawadawa' production. *Journal of Applied Bacteriology*, 61, 145–148.

Audia, J. et al. (2001) Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 97–106

Arnold, KW. & Kaspar, CW. (1995). Starvation and stationary phase induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2037-2039.

Arnosti, D., Singer, V. & Chamberlin, M. (1986). Characterization of heat shock in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 168(3): 1243-1249.

Arsène, F., Tomoyasu, T. & Bakau, B. (2000) The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J. Food Microbiology.* 55(1-3):3-9.

Aryanta, R., Fleet, G. & Buckle, K. (1991) The occurrence and growth of microorganisms during the fermentation of fish sausage. *Int. J. Food Microbiology.* 13(2): 143-155.

Aznar, R., Alarcón, B. (2002). On the Specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in Food: a Comparison of Published Primers. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(1), pp.109-119.

Food and Drug Administration: Bacteriological Analytical Manual (BAM), 8th edition, 1998. En: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) En: <http://www.icmsf.org/>

Bardakci, F., 2001. Random Amplified Polymorphic ADN (RAPD) Markers. *Turkish Journal of Biology*, 25, 185-196.

Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 3, 1–20.

Bechtel, D. & Bulla Jr, L. (1976) Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol*, 127:1472-1481

Blandino, A., M.E. Al-Aseeri, S.S. Pandiella, (2003). Cereal-based fermented foods and beverages, *Food Research International*, 36(6), pp. 527-543.

Bogh-Sorensen, L. (2003) *Food Preservation Techniques*. Woodhead Publishing, Inglaterra. 581.

Brar, S., Verma, M., Tyagi, R. & Valéro, JR (2006) Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*. 41 (2): 323-342.

Brown, C. Harmon, B., Zhao, T. & Doyle, M. (1997). Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 27-32.

Buchanan, R. & Doyle, M. (1997) Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other Enterohemorrhagic *E. coli*. *Food Technology*, 51: 69-75.

Buchanan, R.L., Eedelson-Mammel, S.G., Boyd, G. & Marmer, B.S. (2004) Influence of acidulate indentiy on the effect of pH and acid resistance on the radiation resistance of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*; 21: 51-57.

Buchberger, A., Schroder, H., Hesterkamp, T., Schonfeld, H.J., and Bukau, B. 1996. Substrate shuttling between the ADNK and GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding. *J. Mol. Biol.* 261: 328–333.

Bukau, B. (1993). Regulation of the *Escherichia coli* heat shock response. *Mol Microbiol*, 9(4), 671-680.

Casquete, R., Benito, M. J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Aranda, E., & Córdoba, M. G. (2012). Microbiological quality of salchichón and chorizo, traditional Iberian dry-fermented sausages from two different industries, inoculated with autochthonous starter cultures. *Food Control*, 24(1-2), 191–198. doi:10.1016/j.foodcont.2011.09.026

Casta, A., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., & Carballo, J. (2002). Survival of *Enterobacteriaceae* during processing of Chorizo de cebolla, a Spanish fermented sausage, 13, 107–115.

Castanie-Cornet, M. P., T. A. Penfound, D. Smith, J. F. Elliott, and J. W. Foster. (1999). Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181:3525–3535.

Casp, A. & Abril, J. (1998) *Procesos de Conservación de Alimentos*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, 488 p.

Campbell-Platt, G. (1994). "Fermented foods- a world perspective." *Food Research International* 27: 253.

Center of Disease Control, 2012. *Salmonella* Home Page. [en línea] (Actualizado el: 17 de julio de 2015). Disponible en:

<http://www.cdc.gov/salmonella/general/technical.html>

[Último acceso 23 de julio de 2015]

Christie G., Gotzke H., Lowe C. R. (2010). Identification of a receptor subunit and putative ligand-binding residues involved in the *Bacillus megaterium* QM B1551 spore germination response to glucose. *J. Bacteriol.* 17:4317–4326.

Chiu, T., Chen, T., Hwang, W. & Tsen, H. (2005). Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. *Int J Food Microbiology*, 97(3): 259-65.

Chung, H., Bang, W. & Drake, M. (2006). Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5:52-64.

Clarke N. A., & Cowles P. B. (1952). Studies on the host-virus relationship in a lysogenic strain of *Bacillus megaterium*. II. The relationship between growth and bacteriophage production in cultures of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.*63:177–186

Cohen, J., Bartlett, J. & Corey, G. (1987). Extra-intestinal Manifestations of *Salmonella* Infections. *Medicine*, 66 (5): 349-388.

Conway, PL (1996) Selection criteria for probiotic microorganisms. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 5: 10-14.

Corroler, D., Desmasures, N., Gueguen, M. (1999). Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic ADN analysis and phenotypic characterisation of dairy lactococcus isolates. *Appl. Microbiol.biotechnol.* 51, 91–99.

Cotter, P.D., Hill, C., (2003). Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 429–453.

Craig, E. A., & Gross, C. A. (1991). Is Hsp70 the cellular thermometer? Trends Biochem Sci, 16, 135-140.

Curran, T. M., Lieou, J., and Marquis, R. E. (1995). Arginine deiminase system and acid adaptation of oral streptococci. Appl. Environ. Microbiol. 61, 4494–4496.

Dakwa, S., Sakyi-Dawson, E., Diako, C., Annan, NT. & Amoa-Awua, WK. (2005). Effect of boiling and roasting on the fermentation of soybeans into dawadawa (soy-dawadawa). Int J Food Microbiology, 104(1):69-82.

De Alwis, M. C. L. (1970). Some factors influencing the survival of and multiplication of pathogenic *E. coli* in the gastro-intestinal tract. PhD thesis, University of Liverpool.

Delaney, J. (1990). A *grpE* mutant of *Escherichia coli* is more resistant to heat than the wild type. Journal of General Microbiology, 136: 797-801.

Deng, Y., Ryu, J.H. & Beuchat, L.R. (2001) Tolerance of acid-adapted and non-adapted *Escherichia coli* O157:H7 cells to reduce pH as affected by type of acidulant. Journal of Applied Microbiology, 86: 203-210.

Desriac, N., Broussolle, V., Postollec, F., Mathot, A., Sohrier, D., Coroller, L. & Leguerinel, D. (2013). *Bacillus cereus* cell response upon exposure to acid environment: toward the identification of potential biomarkers. Front. Microbiol., 1

Díaz, G. y Wachter, C., (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. Rev. Latinoamericana de Microbiología, 45(1-2), pp. 30-40.

Domínguez, L. (2013) Efecto de tratamientos de presión hidrostática ultra alta sobre la microbiota de carne fresca. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Bioquímicas. UNAM

Doyle, M. & Schoeni, J. (1984). Survival and Growth Characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. Applied and Environmental Microbiology. 855-856.

Duguid IG, Evans E, Brown MR, Gilbert P. (1992) Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*; evidence for cell-cycle dependency. J Antimicrob Chemother.;30:791–802

Eklund, T., (1985). The effect of sorbic acid and esters of para-hydroxybenzoic acid on the proton motive force in *Escherichia coli* membrane vesicles. J. Gen. Microbiol. 131, 73–76.

Escalante, a, Wachter, C., & Farrés, a. (2001). Lactic acid bacterial diversity in the traditional mexican fermented dough pozol as determined by 16S rADN sequence analysis. International journal of food microbiology, 64(1-2), 21–31.

Esquivel, A. (2012) Estudio de las enterobacterias presentes en el atole agrio de Villahermosa, Tabasco. Tesis para obtener el título de Química de Alimentos, UNAM, México

Everis, L., Betts, G., (2001). pH stress can cause cell elongation in *Bacillus* and *Clostridium* species: a research note. Food Control 12, 53–56.

Farmer JJ III, Fanning GR, Huntley-Carter GP. (1981) *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family *Enterobacteriaceae*: identification of *Kluyvera ascorbata* sp nov and *Kluyvera cryocrescens* sp nov in clinical specimens. J Clin Microbiol;13:919-33.

Figueroa, I., & Verdugo, A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Revista Latinoamericana de Microbiología, 47, 25–42.

Fink, A.L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. Physiol. Rev. 79: 425–449.

Foster JW (2004). *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. Nat. Rev. Microbiol; 2:898–907.

Fotadar, U., Zaveloff, P. & Terracio, L. (2005). Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. J. Basic Microbiol. 45(5): 403-4.

Fox, K., Eder, B. (1969). Comparison of survivor curves of *Bacillus subtilis* spores subjected to wet and dry heat. J. Food Science. 34:518-521.

Freese, E., Sheu, C.W., Galliers, E., (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. Nature, 241, 321–325.

Gahan, C. G., O'Driscoll, B., & Hill, C. (1996). Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. Applied and environmental microbiology, 62(9), 3128–32.

Gajiwala, K.S. and Burley, S.K. (2000) HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. J. Mol. Biol. 295, 605–612 29

Garlant-Miller, L. & Kaspar, C. (1994) *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. Journal of Food Protection, 57: 460-464.

Georgopoulos, C., Liberek, K., Zylicz, M., & Ang, D. (1994). Properties of the heat shock proteins of *Escherichia coli* and the autoregulation of the heat shock response. In R. I. Morimoto, A. Tissières, & C. Georgopoulos (Eds.), The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones (pp. 209-249).

Ghosh, P., A. Ishihama, and D. Chatterji. (2001). *Escherichia coli* RNA polymerase subunit omega and its N-terminal domain bind full-length beta' to facilitate incorporation into the alpha(2)beta subassembly. Eur. J. Biochem. 268:4621–4627.

Giannella, R., Broitman, S. & Zamcheck, N. (1972) Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. Gut, 13: 251-256.

Gorden, J., and P. L. C. Small. (1993). Acid resistance in enteric bacteria. Infect. Immun. 61:364–367.

Gothel, S. F., C. Scholz, F. X. Schmid, and M. A. Marahiel. (1998). Cyclophilin and trigger factor from *Bacillus subtilis* catalyze in vitro protein folding and are necessary for viability under starvation conditions. Biochemistry 37: 13392–13399.

Gottesman, S., S. Wickner, and M. R. Maurizi. (1997). Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.* 11:815–823.

Granum, P. E., & Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157, 223–228

Greenacre, E.J., Brocklehurst, T.F., Waspe, C.R., Wilson, D.R. & Wilson, P.D.G (2003). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* Acid Tolerance Response Induced by Organic Acids at 20°C: Optimization and modeling. *American Society for Microbiology*, 69(7): 3945-3951.

Gross, C. A. (1996). Function and regulation of the heat shock proteins. In F. C. Neidhardt (Ed.), *Escherichia coli and Salmonella* (pp. 1382-1399).

Haard, N., Odunfa, S., Lee, C., Quintero, R., Lorence, A. y Wachter, C. (1999). *Fermented cereals: a global perspective*. Roma: FAO.

Han, B., Beumer, R., Rombouts, F. & Nout, R. (2001) Microbiological safety and quality of commercial sufu - a Chinese fermented soybean food. *Food Control* 12(8): 541-547.

Hayford, A., Petersen, A., Vogensen, F. Y Jakobsen, M., (1999). Use of Conserved Randomly Amplified Polymorphic ADN (RAPD) Fragments and RAPD Pattern for Characterization of *Lactobacillus fermentum* in Ghanaian Fermented Maize Dough. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), pp. 3213-3221.

Hecker, M. Schumann, W. & Völker, U. (1996). Heat shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 19(3): 417-28.

Helander, I.M., Makela, P.H., Westphal, O., Rietschel, E.T., (1996). Lipopolysaccharides. En: Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*, Vol. vol. 3, VCH Publishing, pp. 462–471.

Hengge-Aronis, R., (2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the  $\sigma^S$  (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 373–395.



Hong, W., Jiao, W., Hu, J., Zhang, J., Liu, C., Fu, X., Shen, D, Xia, B. & Chang, Z. (2005) Periplasmic protein HdeA exhibits chaperone-like activity exclusively within stomach pH range by transforming into disordered conformation. *J. Biol. Chem.* 280, 27029–27034

Horstman AL, Kuehn MJ (2002) Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. *J Biol Chem*, 26: 26

Janda, J. y Abbott, S. (2006). *The Enterobacteria*. 2ª Edición. Washington, D.C.: ASM Press.

Jiménez, R. J., Muñoz, C. A., & Doblas, A. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por *Salmonella*. *Medicine*, 10(52), 3497–3501.

Kaur, J., Ledward. D., Park, R. & Robson, R. (1998) Factors affecting the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 325-330.

Kern, R., Malki, A., Abdallah, J., Tagourti, J. & Richarme, G.(2007) *Escherichia coli* HdeB is an acid stress chaperone. *J. Bacteriol.* 189, 603–610

Kim, S., Chamberlain, A. K. & Bowie, J. U. (2004). Membrane channel structure of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin; role of multiple GXXXG motifs in cylindrical channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5988–5991.

Kloos W, Schleifer KH. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. PHA S, S M, ME S, JG H, editors. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986.

Koneman.E.W (2001). *Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas de color*. 5ª Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Krebs, H. A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A., and Bedoya, F. (1983). Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem. J.* 214, 657–663.

Krizová, A., Spanová, A. & Rittich, B. (2008). RAPD and rep-PCR Fingerprinting for Characterization of *Bifidobacterium* species. *Folia Microbiol.* 53(3): 99-104.

Kunene, N. F., Hastings, J. W., & Von Holy, a. (1999). Bacterial populations associated with a sorghum-based fermented weaning cereal. *International journal of food microbiology*, 49(1-2), 75–83.

Kwon, G., Lee, H., Park, J., Kim, J., Lim, J., Park, C., Kwon, D., Kim, Y. & Kim, J. (2009). Development of a RAPD-PCR method for identification of *Bacillus* species isolated from Cheonggukjang. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 282-287.

Lawson, P., Falsen, A., Ohlén, E. y Collins, M., (2001). *Aerococcus urinaehominis* sp. nov. isolated from human urine. *Journal of Applied Bacteriology*, 51, pp. 683-686.

Lemon, K.P., Earl, A.M., Vlamakis, H.C., Aguilar, C. & Kolter, R. (2009) Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr Top Microbiol Immunol*; 322: 1-16.

Leyer, G., Wang, L. & Johnson, E. (1995). Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl Environ Microbiol*, 61(10):3752-5.

Lin, J., Lee, IS., Slonczewski, JL & Foster, W. (1995) Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 177, 4097–4104

Lin, J., Smith, K., Chapin, H., Baik, G, Bennet, N. & Foster, J (1996). Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 3094-3100.

Lindquist, S. (1986). The heat shock response. *Annual Review of Biochemistry* 55, 1151- 1191.

Lloyd SA, Sjöström M, Andersson S and Wolf-Watz H. Molecular characterization of the type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. *Mol Microbiol* 43 (2002) 51-59.

López-Larramona, G., Gómez, E., Maestre, M., Ruíz A, Galán, E., González, L. (2013) *Kluyvera ascorbata* bacteremia in an adult patient. *Rev. Esp Quimioter* 26 (3): 226-227

Lu, P., Ma, D., Chen, Y., Guo, Y., Chen, G., Deng, H. & Shi, Y. (2013). L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* enzymatic release of ammonia. *Cell Research* 23: 635-644.

Lüders, S., Fallet, C. & Franco-Lara, E. (2009). Proteome analysis of the *Escherichia coli* shock response under steady-state conditions. *Proteome Science*, 7: 36.

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., (2008), Brock, *Biología de los Microorganismos*, 10ª. Edición. Madrid: Pearson.

Manzano, M., Giusto, C., Mędrala, D., Cantoni, C., & Comi, G. (2003). Optimization of ADN extraction to detect bacillus cereus from food using a pcr technique - short communication. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 12(39 432), 69–71.

Manzo, A., Natividad, D., Quiñónez, E. & Vázquez, C. (2005) *Bacillus cereus*: Peligro bajo el tenedor. *Revista Digital Universitaria*, 6 (4)

Markiewicz, Z. (1989) Structure and functions of the periplasmic space. *Acta Microbiol. Pol.* 38,199–206

Mayr, B., T. Kaplan, S. Lechner, and S. Scherer. (1996). Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201. *J. Bacteriol.* 178:2916–2925.

McClure, P. (2005) *Escherichia coli*: virulence, stress, response and resistance. En: Griffiths, M. Understanding pathogen behaviour. Virulence, stress

responses and resistance. Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC. P. 240-278.

McGilvery, R., (1977) Conceptos Bioquímicos. Barcelona: Reverté.

Mensah, P., Tomkins, A., Drasar, B. & Harrison, T.J. (1988). Effect of fermentation of Ghanaian maize dough on the survival and proliferation of four strains of *Shigella flexneri*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 82: 635-636.

Mensah, P., Tomkins, A., Drasar, B., & Harrison, T.J. (2008). Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. Journal of Applied Microbiology, 70, 3 (203-211).

Mols, M., van Kranenburg, R., Tempelaars, M. H., van Schaik, W., Moezelaar, R., and Abee, T. (2010). Comparative analysis of transcriptional and physiological responses of *Bacillus cereus* to organic and inorganic acid shocks. Int. J. Food Microbiol. 137, 13–21

Monirul-Hasan, C. & Shimizu, K. (2008). Effect of temperature up-shift on fermentation and metabolic characteristics in view gene expressions in *Escherichia coli*. Microbial Cell Factories, 7:35.

Moore, J. E. (2004). Gastrointestinal outbreaks associated with fermented meats. Meat science, 67(4), 565–8.

Mulyowidarso, R., Fleet, G. & Buckle, K. (1989). The microbial ecology of soybean soaking for tempe production. Int. Journal of Food Microbiology, 8:35-46

Neidhardt, f. & Vanbogelen, R. A. (1981). Positive regulatory gene for temperature-controlled proteins in *Escherichia coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 100

Nicholson, W., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. & Setlow, P. (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64(3): 548-572.

Nilsson, J., Svensson, B., Ekelund, K. Y Christiansson, A., (1998). A RAPD-PCR method for large-scale typing of *Bacillus cereus*. Letters in Applied Microbiology, 27, pp. 168-172.

Notermans, S. & Batt, C. (1998) A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, 84: 51S-61S.

Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización".

Nout, M. J. R., Beernink, G., & Bonants-van Laarhoven, T. M. G. (1987). Growth of *Bacillus cereus* in soyabean tempeh. International Journal of Food Microbiology, 4(4), 293–301. doi:10.1016/0168-1605(87)90004-3

Odunfa, S.A. and Adeyele, S. (1985). Microbiological changes during the traditional production of ogi-baba; a West African fermented sorghum gruel. Journal of Cereal Science. 3: 173 – 180.

Oguntoyinbo F. A., Turlomousis P., Gasson M., Narbad A. (2011). Analysis of bacterial communities of traditional fermented West African cereal foods using culture-independent methods. Int. J. Food Microbiol. 145, 205–210

Omafuvbe, BO., Shonukan, OO. & Abiose, SH. (2000) Microbiological and biochemical changes in the traditional fermentation of soybean for "soy-daddawa" - Nigerian food condiment. Food Microbiology, 17 (5): 469-474.

Osaili, T., Griffis, C.L., Martin, E.M., Beard, B.L., Keener, A. & Marcy, J.A. (2006) Thermal inactivation studies of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken-fried beef patties. Journal of Food Protection, 69 (5): 1080-6.

Osman, M. (2011) Effect of traditional fermentation process on the nutrient and antinutrient contents of pearl millet during preparation of lohoh. *Journal of the Saudi society of agricultural sciences*. 10: 1-6.

Park, Y.-K., Bearson, B., Bang, S.H., Bang, I.S., Foster, J.W., (1996). Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. *Mol. Microbiol.* 20, 605–611.

Pavan, M., Pettinari, M., Cairó, F., Pavan, E. & Cataldi, A. (2011). *Bacillus anthracis*: una mirada molecular a un patógeno célebre. *Rev. argent. microbiol.* 43, 4.

Pereira, R., Martins, J., Mateus, C., Teixeira, J.A. and Vicente, A.A. (2006) Death kinetics of *Escherichia coli* in goat milk and *Bacillus licheniformis* in cloudberry jam treated by ohmic heating. *Chem Papers* 61, 121–126.

Phister, T., O'Sullivan, D. & McKay, L. (2004). Identification of bacilysin, chlorotetaine, and iturin a produced by *Bacillus* sp. strain CS93 isolated from pozol, a Mexican fermented maize dough. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 631-634

Prescott, L. M., & Harley, J. P. (2004). *Microbiología* (5th ed., p. 1236). Madrid.

Prodelalová, J., Spanová, A. & Rittich, B. (2005). Application of PCR, rep-PCR and RAPD Techniques for Typing of *Lactococcus lactis* strains. *Folia Microbiol.* 50(2):150-154.

Ramírez-Gama, R., Luna, M., Mejía, C., Velázquez, O., Tsuzuki, R., Vierna, G., Hernández, G. & Muggenburg, I. (2006). *Manual de prácticas de Microbiología General*. Facultad de Química, UNAM. México

Rasko, D. A., Ravel, J., Økstad, O. A., Helgason, E., Cer, R. Z., Jiang, L. (2004). The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. *Nucleic Acids Res.* 32, 977–988.

Ray, P., Sanchez, C., O'Sullivan, D. & McKay, L. (2000) Classification of a bacterial isolate, from pozol, exhibiting antimicrobial activity against several gram-positive and gram-negative bacteria, yeasts, and molds. *J. Food Prot*, 63(8):1123-32.

Reddy, C.A., editor in Chief (T.J. Beveridge, J.A. Breznak, G.A. Marzluf, T.M. Schmidt, and L.R. Snyder), (2007). *Methods for General and Molecular and Microbiology*. 3rd. Edition. Washington D.C.: ASM press.

Richard, H. and Foster, J.W. (2004) *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *J. Bacteriol.* 186, 6032–6041

Richardson, P. S. (2004) *Improving the thermal processing of foods*. Woodhead Publishing Limited, Cornwall, Inglaterra. 507 p.

Rees, JAG. & Bettison, J. (1991) *Processing and Packaging of Heat Preserved Foods*. CMB Packaging Technology, Wantage, Berks. Blackie. Glasgow and London.

Rocha, E., Cornet, E. & Michel, B. (2005). Comparative and evolutionaru analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PLoS Genet.* 1, 15.

Rodicio, M. & Mendoza, M. (2004) Identification of bacteria through 16 S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22 (4): 238-45.

Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F. & García, J. (2005). *Bacteriología General, Principios y prácticas de laboratorio*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.

Rodríguez, C. (2011) *Estudio sobre interacciones negativas de bacterias lácticas del pozol*. Tesis para obtener el título de Química de Alimentos, UNAM, México

Roland, H. (1961). The complications of typhoid fever. *J Trop Med Hyg*, 64: 143.

Romero, R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana, 3ª. edición. México: Ed. Médica Panamericana.

Romero, A., Doval, M., Sturla, M. A., Fogar, R.A. & Judis, M.A. (2004). Estimación de los parámetros cinéticos para la oxidación lipídica con brotes de soja. Facultad de Agroindustrias UNNE. Universidad Nacional del Nordeste. Sáenz Peña, Chaco. Argentina.

Romero, R. y Herrera, I. F. (2002). Síndrome Diarreico Infeccioso. Editorial Médica panamericana. Madrid, España. 682

Ryan, S., Begley, M., Gahan, C. G., and Hill, C. (2009). Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. Environ. Microbiol. 11, 432–445.

Ryter, A. (1965) Étude morphologique de la sporulation de *Bacillus subtilis*. Annls Inst. Pasteur, Paris. 108, 40.

Sagdic, O., H. Soyigit, S. Ozcelik and H. Gul, (2005). Viability of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation of tarhana produced with different spices, Annals of Microbiology, 55 (2), 97-100.

Sainz, T., (1998). Estudio de la Presencia y Sobrevivencia de enterobacterias patógenas en el pozol. Tesis para obtener el grado de: Maestra en Ciencias Bioquímicas. UNAM.

Sainz, T., Pérez, J., Villaseca, J., Hernández, 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 J Food Microbiol, 105 (3): 357-67.

Sainz, T., Wachter, C., Espinoza, J., Centurión, D., Navarro, A., Molina, J., Inzunza, A., Cravioto, A. & Eslava, C. (2001) Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. International Journal of Food Microbiology, 71(2): 169-176.



Salmond, C., Kroll, G & Booth, R. (1984). The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. J. Gen Microbiol. 130: 2845-2850.

Samarzija, D., Sikova, S., Redzepovic, S., Antunac, N. & Havranek, J. (2002). Application of RAPD analysis for identification of *Lactococcus lactis* spp. cremoris strains isolated from artisanal cultures. Microbiol Res. 157: 13-17.

Samson, R.A., van Kooij, J.A., & de Boer, E. (1987). A survey of the microbiological quality of commercial tempeh in the Netherlands. Journal of Food Protection, 50, 92–94.

Sánchez, L., Rodríguez, M., Álvarez, P. & Garrido, M. (1998). Salmonelosis: fiebre tifoidea. Otras formas clínicas sistémicas. Enfermedades infecciosas. Medicine, 7 (79): 3659-65.

Sanni, A.I., Sefa-Dedeh, Sakyl-Dawson, E. & Asiedu, M. (2002) Microbiological evaluation of ghanaiian maize dough co-fermented with cowpea. International Journal of Food Sciencies and Nutrition, 53 (5): 367-373.

Sarkar, PK., Hasenack, B. & Nout MJR (2002) Diversity and functionality of Bacillus and related genera isolated from spontaneously fermented soybeans (Indian Kinema) and locust beans (African Soumbala) Int Journal of Food Microbiology. 77: 175-186

Sarkar, PK., Jones, LJ., Craven, GS., Somerset, M. & Palmer, C. (1997) Amino acid profiles of Kinema, a soybean-fermented food. Food Chemistry, 59: 69-75

Saxild, H. H., L. N. Andersen, and K. Hammer. (1996). dra-nupC-pdp operon of *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence, induction by deoxyribonucleosides, and transcriptional regulation by the deoR-encoded DeoR repressor protein. J. Bacteriol. 178:424–434.

Schmalenberger A, Schwieger F, Tebbe CC. (2001) Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in

PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl Environ Microbiol*;67:3557–3563.

Schirmer, T. (1998) General and specific porins from bacterial outer membranes. *J. Struct. Biol.* 121, 101–109

Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl Microbiol.* 101(3): 514-25.

Shan, Q., Bork, J.M., Webb, B.L., Inman, R.B. & Cox, M.M (1997) RecA protein filaments: end-dependent dissociation from ssADN and stabilization by Reco and RecR proteins. *J Mol Biol*, 265: 519-540.

Shon MY, Lee J, Choi SY, Nam SH, Seo KI, Lee SW, et al. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of chungkukjang. *J. Food Comp. Anal.* 20:113-118

Small P, Blankenhorn D, Welty D, Zinser E, Slonczewski JL. (1994) Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of rpoS and growth pH. *J. Bacteriol*;176:1729–1737.

Solow, B. T., and G. A. Somkuti. (2000). Comparison of low-molecular-weight heat stress proteins encoded on plasmids in different strains of *Streptococcus thermophilus*. *Curr. Microbiol.* 41:177–181

Steinkraus, K.H. (1996). *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. 2nd. Edition. New York: Marcel Dekker.

Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 579–606.

Straus, D.B., Walter, W.A., and Gross, C.A. (1987). The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of s32. *Nature* 329: 348–351

Svanberg, U., Sjögren, E., Lorri, W., Svennerholm, A. (1992) Inhibited growth of common enteropathogenic bacteria in lactic-fermented gruels. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(6): 601-606.

Tamang, J., Tamang, B., Schillinger, U., Franz, C., Gores, M., Holzapfel, W., (2005). Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), pp. 347-356

Thompson, J. y Gentry-Weeks, C.R., (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. En: *Bactéries lactiques*. Editorail Roissart H. Luquet F.M., Loriga, Francia (1) 239-290.

Toda, T., Uesugi, T., Hirai, K., Nukaya, H., Tsuji, K. & Ishida, H. (1999) New 6-O-Acyl Isoflavone Glycosides from Soybeans Fermented with *Bacillus subtilis* (natto). I. 6-O-Succinylated Isoflavone Glycosides and their preventive effects of bone loss in ovariectomized rats fed a calcium deficient diet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 22 (11): 1193-1201.

Tortora, G., Funke, B. & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* 9ª edición. México: Editorial Médica Panamericana.

Trepat, M. (2002) Incidencia y comportamiento de *Salmonella* y *Listeria* en pechugas de pavo curadas. Tesis para obtener el grado de Doctor, Universidad Autónoma de Barcelona.

Tucker, D.L., Tucker, N. & Conway, T. (2002) Gene expression profiling of the pH response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184, 6551–6558

Valderrama, A., (2012). Diversidad de bacterias lácticas del atole agrío de Villahermosa Tabasco. Tesis de Licenciatura. Licenciatura en Química en alimentos. UNAM.

van Schaik, W., Zwietering, M. H., De Vos, W. M., and Abee, T. (2004). Identification of  $\sigma_B$ -dependent genes in *Bacillus cereus* by proteome and in vitro transcription analysis. *J. Bacteriol.* 186, 4100–4109.

Varadaraj, M.C., Keshava, N., Devi, N., Dwarakanath, C.T., & Manjrekar, S.P. (1992). Occurrence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species in Indian snack and lunch foods and their ability to grow in a rice preparation. *Journal of Food Science and Technology*, 29, 344–347.

Varela, G. y Grotiuz, G. (2008). Fisiología y metabolismo bacteriano. En: Oficina del libro FEFMUR, Temas de bacteriología y virología médica. Motevideo: Universidad de la República, pp. 43-57.

Vary, P.S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W. & Jahn, D. (2007) *Bacillus megaterium* from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76(5): 957-967.

Vazquez-Aguilar, M. (2007). Fundamentos de la determinación de parámetros cinéticos para microorganismos de interés en tratamiento térmico de alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos I*: 1-14.

Verghese, A. (1985). The "typhoid state" revisited. *American Journal of Medicine*, 79: 370-372. Virulence Factors of Pathogenic Bacteria [en línea] Disponible en: <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Escherichia>  
[Último acceso 28 de julio de 2015]

Wacher, C. (1993). Sources of microorganisms in pozol, a traditional fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9: 269-274.

Wacher, C., Cañas, A., Bárzana, E., Lappe, P., Ulloa, M., & Owens, J. D. (2000). Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology*, 17(3), 251–256.

Watson, J., Hopkins, N., Roberts, J. Steitz, J. & Weiner, A. (1987). *Molecular Biology of the Gene*. Menlo Park, CA: The Benjamin/Cummings Publishing Company.

Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V.F., Hengge, R., (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*:  $\sigma^S$ -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of Bacteriology* 187, 1591–1603.

Wellhausen, E. J., Roberts, M., Hernández, X. En colaboración con Mangelsdorf, P.C. (1951). Razas de maíz en México. Su origen, características y distribución. OEE-SAG. Folleto No. 5. México, D.F. 236 p.

Zhang, M., Lin, S., Song, X., Liu, J., Fu, Y., Ge, X., Fu, X., Chang, Z. & Chen, P. (2011). A genetically incorporated crosslinker reveals chaperone cooperation in acid resistance. *Nature Chemical Biology*, 7: 671-677.

Zhao, T., Doyle, M. & Besser, R. (1993). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2526-30.

## 9. ANEXOS

### ANEXO I: PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA ESTE PROYECTO

- **Caldo Vassiliadis-Rappaport (Oxoid®)**

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 30g de polvo en 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Distribuir en volúmenes de 4.5mL en recipientes o tubos cerrados a rosca.
5. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

- **Caldo Selenito-cistina (Oxoid®)**

Por instrucciones del proveedor:

1. Disolver 4g de Biselenito sódico L 121 en 1L de agua destilada.
2. Añadir 19g de Caldo Base Selenito Cistina.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Distribuir en volúmenes de 4.5mL en recipientes o tubos cerrados a rosca.
5. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

- **Agar verde brillante Difco™**

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 58g de polvo en 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.

4. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
5. Esperar a que se enfríe y verter en placas estériles.

- **Agar Entérico Hektoen Oxoid®**

Por instrucciones del proveedor:

1. Añadir 76g a 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar suavemente hasta ebullición durante unos segundos hasta la disolución del agar.
4. Dejar enfriar a 50°C y distribuir en placas.

- **Agar McConkey Bioxon™**

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 50g de polvo en 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
5. Esperar a que se enfríe y verter en placas estériles.

- **Agar Nutritivo Difco™**

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 23.8g de polvo en 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
5. Esperar a que se enfríe y verter en placas estériles.

- **Caldo Cerebro Corazón Difco™**

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 37g de polvo en 1L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

## **ANEXO II: TINCIÓN DE GRAM**

La tinción de Gram se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Colocar sobre un porta-objetos una gota de agua y la colonia que se desea teñir, fijando a calor moderado la preparación. En caso de utilizar un cultivo líquido omitir la gota de agua y colocar directamente sobre el porta-objetos una gota de cultivo líquido.
2. Adicionar una gota de cristal violeta y dejarlo durante un minuto.
3. Lavar con agua y dejar escurrir.
4. Cubrir la preparación con lugol (solución yodo-yoduro), y dejarlo actuar durante un minuto.
5. Lavar con agua y decolorar con una mezcla acetona:etanol (1:1) hasta que deje de salir colorante.
6. Inmediatamente después enjuagar con agua y eliminar exceso.
7. Aplicar safranina, esperar 1 minuto.
8. Enjuagar con agua, escurrir y dejar secar.
9. Realizar la observación microscópica.



**ANEXO III: PRUEBAS Y REACCIONES DE LAS TIRAS API20E®**

Prueba	Reacción/enzimas
ONPG	Beta-galactosidasa
ADH	Arginina deshidrolasa
LDC	Lisina descarboxilasa
ODC	Ornitina descarboxilasa
CIT	Utilización de citrate
H <sub>2</sub> S	Producción de H <sub>2</sub> S
URE	Ureasa
TDA	Triptófano desaminasa
IND	Producción de indol
V/P	Producción de acetoina (Voges-Proskauer)
GEL	Gelatinasa
GLU	Fermentación/oxidación glucosa
MAN	Fermentación/oxidación manitol
INO	Fermentación/oxidación inositol
SOR	Fermentación/oxidación sorbitol
RHA	Fermentación/oxidación ramnosa
SAC	Fermentación/oxidación sacarosa
MEL	Fermentación/oxidación melobiosa
AMY	Fermentación/oxidación amigdalina
ARA	Fermentación/oxidación arabinosa
OX	Citocromo oxidasa

**ANEXO IVA: REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN**

- Lisozima (20 ng/μl): Disolver 0.2 g de lisozima en 10mL de agua desionizada, estéril y filtrada.
- Pronasa (20 mg/mL):
  - Tris-HCl 10mM: A un matraz aforado de 250 mL adicionar 1.25 mL de NaCl 2M y 0.3025 g de Tris, el pH debe de ser de 7.5.
  - Disolver 0.2 g de Pronasa en 10 mL de Tris-HCl 10 mM, incubar 1 hora a 37°C y almacenar a -20°C.

- RNASA (20 ng/ $\mu$ l): Disolver 0.2 g de la enzima en 10 mL de agua desionizada, estéril y filtrada.
- Amortiguador TES (100 mL): Tris 0.605 g, EDTA 0.5 M 1 mL, NaCl 0.2922 g, pH=8. Aforar a 100 mL.
- SDS (10%): Disolver 10 g de SDS en 100 mL de agua desionizada, estéril y filtrada.
- EDTA 0.5 M: Disolver 93.06 g en 500 mL de agua destilada, ajustando a pH=8 con NaOH.

#### **ANEXO IVB: REACTIVOS PARA EL GEL DE AGAROSA**

- Agarosa Ultra pura Invitrogen™
- Amortiguador TBE (Tris Borato EDTA) 10X: Tris 34 g, ácido bórico 27.7 g, EDTA 20 mL (0.5 M) disolver en 500 mL y llevar a un pH de 8.
- Amortiguador TBE (Tris Borato EDTA) 1X: Disolver 100 mL de TBE 10X en 900 mL de agua destilada.

Para hacer un gel de agarosa al 1.2%:

-Gel de 11 pocillos: 0.54 g en 45 mL de Buffer TBE 1X

-Gel de 20 pocillos: 0.84 g en 70 mL de Buffer TBE 1X

Calentar 45 segundos o hasta que esté completamente disuelta la agarosa.

Esperar a que enfríe y verter en el acrílico correspondiente. Una vez solidificado, colocar en cámara de electroforesis marca Pharmacia Biotech y colocando 5  $\mu$ l de los productos de PCR junto con 1.5  $\mu$ l de buffer de carga con colorante en cada uno de los pozos del gel, usando un pozo por muestra y uno extra para colocar 5  $\mu$ l de marcador de peso molecular de la marca InvitroGen®.

#### **ANEXO V: GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal.

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

UFC: Unidades formadoras de colonias.