



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio de la actividad antimicrobiana de bacterias lácticas
aisladas de pulque y aguamiel**

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

**PRESENTA
FERNANDO MARTÍNEZ CASTAÑEDA**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Gloria Díaz Ruiz

VOCAL: Francisco Ruiz Terán

SECRETARIO: Aleida Mina Cetina

1er. SUPLENTE: Hugo Antonio Hernández Pérez

2° SUPLENTE: María del Carmen Wachter Rodarte

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 324, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO E
FACULTAD DE QUÍMICA

Asesor: Gloria Díaz Ruiz

Asesor técnico: María del Carmen Wachter Rodarte

Sustentante

Fernando Martínez Castañeda

RECONOCIMIENTO

Al programa PAPIIT de la UNAM por el apoyo económico recibido por el proyecto IN223917 “Combinando la microbiología y la bioquímica clásicas con las ómicas y las biofísicas para entender la fermentación del pozol”.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	3
2.1. Alimentos fermentados	3
2.2. Maguey, pulque y aguamiel	4
2.3. Proceso de elaboración.....	5
2.4. Características fisicoquímicas del pulque y el aguamiel.....	7
2.5. Características nutrimentales del pulque y el aguamiel	8
2.6. Microbiología y proceso de fermentación.....	9
2.7. Bacterias ácido lácticas	13
2.7.1. Generalidades	13
2.7.2. Clasificación.....	13
2.7.3. Características metabólicas	14
2.7.4. Beneficios y ventajas.....	16
2.8. Compuestos antimicrobianos de origen proteico (bacteriocinas).....	16
2.8.2. Características generales	18
2.8.3. Clasificación.....	18
2.8.4. Biosíntesis de bacteriocinas.....	19
2.8.5. Mecanismo de acción de las bacteriocinas.....	20
2.8.6. Aplicación en la industria de alimentos	21
2.9. Compuestos antimicrobianos de origen no proteico	22
2.9.2. Ácidos orgánicos	23
2.9.3. Peróxido de hidrógeno	23
2.9.4. Dióxido de carbono (CO ₂).....	24
2.9.5. Diacetilo	24
2.9.6. Reuterina	25
2.10. Microorganismos patógenos de importancia en alimentos	25
2.10.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	26
2.10.3. <i>Escherichia coli</i>	26
2.10.4. <i>Salmonella</i>	26
2.10.5. Patógenos de cavidad oral	27
2.10.5.1. <i>Streptococcus mutans</i>	27
2.10.5.2. <i>Streptococcus oralis</i>	28

2.10.5.3.	<i>Streptococcus salivarius</i>	28
2.10.5.4.	<i>Streptococcus mitis</i>	29
3.	Justificación	30
4.	Hipótesis	31
5.	Objetivos	31
6.	Metodología.....	32
6.1.	Microorganismos.....	32
6.1.4.	Bacterias ácido lácticas (BAL).....	32
6.1.5.	Microorganismos indicadores.	33
6.2.	Reactivación y comprobación de pureza de cepas	33
6.3.	Conservación de las cepas lácticas y patógenas	34
6.4.	Obtención de sobrenadantes.....	35
6.5.	Preparación de medio Infusión cerebro-corazón amortiguado (BHI-A). Método de difusión en agar.	35
6.6.	Preparación de cepas indicadoras y de cavidad oral	36
6.7.	Preparación de BAL para pruebas de antagonismo.....	37
6.8.	Prueba de difusión en agar	38
6.9.	Tratamiento de sobrenadantes y prueba de actividad antimicrobiana.....	40
6.9.4.	Neutralización de los sobrenadantes y tratamiento térmico	40
6.9.5.	Determinación de la posible naturaleza proteica de las sustancias similares a bacteriocinas producidas por las BAL.....	40
6.10.	Pruebas de reto de BAL vs microorganismos indicadores en medio MRS.....	42
6.10.4.	Selección de microorganismos	42
6.10.5.	Concentración de microorganismos a emplear en la prueba	42
6.10.6.	Prueba de reto en medio MRS.....	42
6.11.	Prueba de reto de <i>Listeria monocytogenes</i> frente a BAL en aguamiel pasteurizado	45
7.	Resultados y discusión	46
7.1.	Reactivación y comprobación de pureza de cepas.	46
7.2.	Conservación de cepas BAL e indicadoras.	48
7.3.	Pruebas de difusión en agar con sobrenadantes no neutralizados y sin tratamiento térmico. 48	
7.4.	Pruebas de difusión en agar para observar el antagonismo de BAL aisladas de pulque y aguamiel frente a BAL de género y especie conocida.	51
7.5.	Tratamiento térmico aplicado a los sobrenadantes.....	53

7.6.	Determinación de la naturaleza proteica de sobrenadantes que presentaron actividad antimicrobiana.....	54
7.7.	Pruebas de reto de BAL frente a microorganismos indicadores.	57
7.7.1.	<i>Listeria monocytogenes</i>	57
7.7.2.	<i>Escherichia coli</i> O88:H25.....	59
7.7.3.	<i>Escherichia coli</i> O8:H10.....	60
7.7.4.	Curvas de pH de pruebas con cepas de <i>Escherichia coli</i>	61
7.7.5.	<i>Streptococcus mutans</i>	62
7.7.6.	<i>Streptococcus oralis</i>	64
7.7.7.	<i>Streptococcus salivarius</i>	67
7.8.	Prueba de reto entre cepa Fv-15 de BAL frente a <i>Listeria monocytogenes</i> en aguamiel pasteurizado obtenido de la región de Huitzilac, Morelos.	69
8.	Conclusiones	74
9.	Perspectivas.....	76
10.	Anexos.....	77
11.	Bibliografía.....	88

Índice de Tablas

Tabla 1: Características establecidas por la NMX-V-022-1972 para los tipos de aguamiel.....	7
Tabla 2: Características establecidas por la NMX-037-1972 para los tipos de pulque.....	8
Tabla 3: Composición química de pulque y aguamiel (López-Munguía, 2004).....	9
Tabla 4: Diversidad microbiana conocida e identificada en pulque y aguamiel.....	12
Tabla 5: Características de las BAL de acuerdo al tipo de fermentación realizada o a la temperatura óptima de crecimiento (Tomado y modificado de Parra, 2010).....	14
Tabla 6: Algunas BAL estudiadas, productoras de bacteriocinas.....	17
Tabla 7: Bacterias ácido lácticas (BAL) empleadas en el presente trabajo de investigación.....	32
Tabla 8: Cepas indicadoras y de cavidad oral empleadas en el presente trabajo de investigación. ..	33
Tabla 9: Composición del medio BHI-Amortiguado (1000 mL).....	36
Tabla 10: Condiciones de uso para pruebas de difusión en agar de microorganismos patógenos y de cavidad oral.....	36
Tabla 11: Condiciones de Bacterias Ácido Lácticas usadas en pruebas de antagonismo.....	37
Tabla 12: Condiciones de los ensayos enzimáticos para determinación de la naturaleza proteica del compuesto antimicrobiano presente en el sobrenadante de BAL.....	40
Tabla 13: Condiciones de los microorganismos indicadores y la cepa Fv-15 (BAL) empleadas en las pruebas de reto.....	42
Tabla 14: Evaluación del crecimiento de BAL y bacterias indicadoras en las pruebas de reto en medio MRS.....	43
Tabla 15: Comprobación de pureza de cepas de BAL, se presentan resultados de la cepa Fv-15 y Fv-148 (de arriba abajo).....	46
Tabla 16: Características microscópicas observadas de los microorganismos indicadores.....	47
Tabla 17: Resultados de las pruebas de difusión en agar del sobrenadante de la cepa Fv-15, frente a <i>L. monocytogenes</i> y bacterias de cavidad oral (cada una se realizó por duplicado).....	50
Tabla 18: Resultados de las pruebas de antagonismo entre la cepa Fv-15 y las cepas de BAL de género y especies conocidas de la colección de cepas del laboratorio 324.....	52
Tabla 19: Resultados de los ensayos enzimáticos realizados con el sobrenadante tratado térmicamente y neutralizado de la cepa <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Fv-15) con cuatro diferentes enzimas. La prueba de difusión en agar se realizó por duplicado.....	56

Índice de Figuras

Figura 1: Elaboración del pulque y el aguamiel, realizado a partir de la información de Manrique (2013) y Arenas (2015).	6
Figura 2: Dinámica de crecimiento de los microorganismos presentes en el proceso de fermentación.	11
Figura 3: Rutas para la formación de compuestos derivados del piruvato. Enzimas que participan: 1. Diacetil sintasa, 2. Acetolactato sintasa, 3. Piruvato-formiato liasa, 4. Piruvato deshidrogenasa, 5. Piruvato oxidasa y 6. Acetato cinasa.....	15
Figura 4. Clasificación de las bacteriocinas, de acuerdo con Klaenhammer, 1993.	19
Figura 5: Mecanismo de acción de los diferentes tipos de bacteriocinas. Adaptado de Cotter et al., 2005.....	21
Figura 6: Metodología empleada para re-activación y comprobación de pureza de cepas	34
Figura 7: Metodología empleada para la conservación de cepas.	35
Figura 8: Metodología empleada para los ensayos de difusión en agar empleando sobrenadantes sin tratamiento (SN), neutralizados, tratados térmicamente (SNTT) y sobrenadantes neutralizados, tratados enzimáticamente (SNTE) empleando los diferentes microorganismos indicadores.....	39
Figura 9: Metodología empleada para tratamientos con proteasas en el sobrenadante tratado térmicamente (SNTT) de la cepa de BAL que presentó actividad antimicrobiana.	41
Figura 10: Prueba de reto de la cepa BAL Fv-15 (productora de compuestos antimicrobianos) frente a los microorganismos indicadores en medio MRS.	44
Figura 11: Metodología para realizar las pruebas de reto entre la cepa de BAL (Fv-15) y <i>Listeria monocytogenes</i> en aguamiel pasteurizado y neutralizado.	45
Figura 12: Resultado de la prueba de difusión en agar realizada con el sobrenadante de la cepa Fv-15 con y sin tratamiento térmico, frente a <i>Listeria monocytogenes</i> , tras 24 horas de incubación de la prueba. (Realización por duplicado).	54
Figura 13: Prueba de reto de <i>Listeria monocytogenes</i> frente a cepa Fv-15 en el medio MRS. Control (+) para la cepa de BAL: curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo mixto: curva naranja, <i>Listeria</i> en cultivo mixto: curva roja. El experimento para cada uno de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado.	58
Figura 14: Curva de pH durante la prueba de reto de <i>Listeria monocytogenes</i> frente a cepa Fv-15. Curva verde: Cepa Fv-15, curva azul: <i>Listeria monocytogenes</i> , curva roja: cultivo mixto.	59
Figura 15: Prueba de reto de <i>Escherichia coli</i> O88:H25 frente a cepa Fv-15 en el medio MRS. Control (+) para la cepa de BAL: curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo	

mixto: curva naranja, <i>E. coli</i> en cultivo mixto: curva roja. El experimento para cada uno de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado.	60
Figura 16: Prueba de reto de <i>Escherichia coli</i> O8:H10 frente a cepa Fv-15 en el medio MRS. Control (+) para la cepa de BAL: curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo mixto: curva naranja, <i>E. coli</i> en cultivo mixto: curva roja. El experimento para cada uno de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado.	61
Figura 17: Curva de pH durante la prueba de reto de <i>E. coli</i> O88:H25 y O8:H10 frente a cepa Fv-15. Curva verde: cepa Fv-15, curva rosa: <i>E. coli</i> O88:H25, curva azul: <i>E. coli</i> O8:H10, curva roja: cultivo mixto de <i>E. coli</i> O88:H25 y curva café: cultivo mixto de <i>E. coli</i> O8:H10.	62
Figura 18: Prueba de reto de <i>Streptococcus mutans</i> frente a cepa Fv-15. Control (+) para la cepa de BAL: curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo mixto: curva naranja, <i>Str. mutans</i> en cultivo mixto: curva roja. El experimento para cada uno de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado.	63
Figura 19: Curva de pH durante la prueba de reto de <i>Streptococcus mutans</i> frente a cepa Fv-15. Curva verde: cepa Fv-15, curva azul: <i>Streptococcus mutans</i> , curva roja: cultivo mixto.	64
Figura 20: Prueba de reto de <i>Streptococcus oralis</i> frente a cepa Fv-15. Control (+) para la cepa de BAL: curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo mixto: curva naranja, <i>Str. oralis</i> en cultivo mixto: curva roja. El experimento para cada uno de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado.	65
Figura 21: Curva de pH durante la prueba de reto de <i>Streptococcus oralis</i> frente a cepa Fv-15. Curva verde: cepa Fv-15, curva azul: <i>Streptococcus oralis</i> , curva roja: cultivo mixto.	66
Figura 22: Prueba de reto de <i>Streptococcus salivarius</i> frente a cepa Fv-15. Control (+) para la cepa de BAL: curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo mixto: curva naranja, <i>Str. salivarius</i> en cultivo mixto: curva roja. El experimento para cada uno de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado.	68
Figura 23: Curva de pH durante la prueba de reto de <i>Streptococcus salivarius</i> frente a cepa Fv-15. Curva verde: cepa Fv-15, curva azul: <i>Streptococcus salivarius</i> , curva roja: cultivo mixto.	69
Figura 24: Prueba de reto de <i>L. monocytogenes</i> frente a cepa Fv-15 en aguamiel pasteurizado de la región de Huitzilac, Morelos. Control (+) para la cepa de BAL: curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo mixto: curva naranja, <i>L. monocytogenes</i> en cultivo mixto: curva roja. El experimento para cada uno de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado y se empleó medio Oxford para el conteo del indicador.	71
Figura 25: Prueba de reto de <i>L. monocytogenes</i> frente a cepa Fv-15 con ajuste en la concentración inicial en aguamiel pasteurizado de la región de Huitzilac, Morelos. Control (+) para la cepa de BAL:	

curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo mixto: curva naranja, *L. monocytogenes* en cultivo mixto: curva roja. El muestreo de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado y se empleó medio Oxford para el conteo del indicador. 72

Figura 26: Curva de pH durante la prueba de reto de *Listeria monocytogenes* frente a cepa Fv-15 en aguamiel pasteurizado de la región de Huitzilac, Morelos. Curva verde: cepa Fv-15, curva azul: *L. monocytogenes*, curva roja: cultivo mixto..... 73

1. Introducción

Se le conoce como pulque a la bebida alcohólica tradicional no destilada producida por la fermentación de la savia conocida como aguamiel, la cual es extraída de algunas especies de maguey como *Agave atrovensis*, *Agave americana* y *Agave mapisaga* principalmente (Escalante *et al.*, 2008); mientras que el aguamiel o jugo de agave es la savia de color amarillento y de olor herbáceo que se obtiene al hacer la capación del maguey maduro, es decir, el corte de las hojas tiernas centrales antes del desarrollo del escapo central y para su elaboración; este último es transportado y almacenado en tinas donde se lleva a cabo la fermentación, de la cual es variable el tiempo (horas a días), dependiendo del productor, hasta lograr la obtención del producto final conocido como pulque. La mayoría de los procesos de producción de estas bebidas alcohólicas y no destiladas involucran un proceso de fermentación complejo en el cual bacterias (productoras de ácido láctico y acético) y levaduras (por ejemplo del género *Saccharomyces*) están presentes en mezclas y pueden actuar de manera simultánea o sucesiva.

Estas bebidas, además de poseer micro y macro nutrientes, como lo son las altas concentraciones de ácido ascórbico que permite la absorción del hierro o el zinc, al igual que las fitasas que se encuentran de igual manera en esta bebida (Pérez, 2006), pueden considerarse en ciertas regiones del país, como una de las fuentes más importantes de energía, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales; considerando obviamente que las concentraciones de estos nutrientes pueden presentar variaciones durante el año, principalmente gracias a la presencia o ausencia de lluvias (López-Munguía *et al.*, 2004); además de que se distinguen por sus propiedades probióticas asociadas a la presencia principalmente de bacterias lácticas, siendo éstas últimas el tema central de esta investigación, pues poseen un historial de aplicación en alimentos fermentados muy amplio gracias a su influencia benéfica en las características nutricionales, sensoriales y de vida de anaquel (Leroy, De Vuyst, 2004) y se sabe que algunas de ellas tienen la capacidad de producir metabolitos conocidos como bacteriocinas; las cuales han recibido una gran atención en los años recientes gracias a su potencial aplicación en la industria alimentaria como conservadores naturales y que poseen un espectro antimicrobiano que puede combatir a algunos patógenos de importancia alimentaria, tanto Gram positivos, como Gram negativos

e inclusive levaduras (Kailasapathy, 2006). El estudio de la actividad de estas bacteriocinas tiene una gran aplicación debido a que pueden ser inhibidores de patógenos, ayudando a evitar la adición de conservadores y convirtiendo al alimento en un producto seguro y menos artificial.

En el presente trabajo de investigación se emplearon 39 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de pulque y aguamiel de una región productora de la delegación Milpa Alta, Ciudad de México; llevando a cabo la búsqueda de una posible presencia de actividad antimicrobiana por medio del método conocido como difusión en agar, empleando a 11 microorganismos indicadores: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* enteropatogénica, *Escherichia coli* enterotoxigénica, además de 5 cepas de cavidad oral, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* (2 cepas) y *Streptococcus mitis*. Únicamente una cepa de las BAL probadas presentó actividad frente algunos de estos microorganismos indicadores. Se comprobó la naturaleza proteica de los posibles compuestos (bacteriocinas) de la cepa que presentó actividad antimicrobiana. Se realizaron pruebas de predominancia de la bacteria láctica probada contra otras BAL; además de llevarse a cabo pruebas de reto iniciales, empleando medios de cultivo comerciales y siendo realizadas contra los microorganismos indicadores que se vieron afectados por la actividad expuesta por la cepa BAL probada, identificando el tiempo en el que se presenta la inhibición y finalmente realizando pruebas de reto directamente en aguamiel obtenido de la región de Huitzilac, Morelos donde se observó el comportamiento de la cepa BAL frente a *L. monocytogenes*.

2. Antecedentes

2.1. Alimentos fermentados

De acuerdo con Steinkraus (1996, 1997), los alimentos fermentados se consideran sustratos propios de los alimentos, los cuales son invadidos por microorganismos comestibles; cuyas enzimas (particularmente amilasas, proteasas y lipasas) llevan a cabo una hidrólisis de proteínas, lípidos y polisacáridos para transformarlos en productos no tóxicos, con presencia de aromas, sabores y texturas que son de gran atractivo para los consumidores.

Existen alrededor de 5000 variedades de alimentos y bebidas fermentadas en todo el mundo, desde la cerveza hasta el sauerkraut, consumidas actualmente por millones de personas; de los cuales algunos poseen certificados con denominación de origen. Estos alimentos fermentados se encuentran clasificados dentro de 9 grandes grupos, con base en sus sustratos: cereales, vegetales, leguminosas tubérculos/raíces, lácteos, cárnicos, pescados, bebidas alcohólicas (Tamang *et al.*, 2016). Estos alimentos fermentados son una fuente potencial de microorganismos para la elaboración y producción de diferentes compuestos, entre los que se encuentran, por mencionar algunos: pigmentos, compuestos aromáticos e inclusive compuestos antimicrobianos; sin embargo, muy pocos han sido aislados, identificados y aplicados a la industria.

La mayor producción de alimentos fermentados en el mundo se encuentra en Europa, América y África. Sudamérica por otra parte, es la región con mayor diversidad de bebidas fermentadas, mientras que Medio Oriente se especializa en la producción de productos lácteos y en el sureste asiático resaltan los alimentos fermentados a partir de pescados y leguminosas; contribuyendo por igual en todas las regiones del mundo para la ingesta proteica de los pobladores. La producción de este tipo de alimentos contribuye igualmente al subsistir de la población rural a través del mejoramiento de la seguridad alimentaria y la generación de empleo por medio de la venta de los mismos. Estos productos forman parte de una gran variedad de actividades sociales, religiosas y culturales en todo el mundo (Giraffa, 2004).

Los alimentos fermentados son por lo general, microbiológicamente seguros, inclusive cuando son desarrollados o producidos por gente sin conocimientos en microbiología o

química en condiciones poco higiénicas; posiblemente se debe a que ciertos microorganismos son capaces de producir metabolitos que llevan a cabo la inhibición del crecimiento de los patógenos e inclusive microorganismos de descomposición.

El proceso de fermentación que experimentan algunos productos, como el pulque y el aguamiel en el caso de este trabajo de investigación, puede tener al menos cinco roles en el procesamiento de los mismos:

- a) La preservación de cantidades considerables de alimento por medio de fermentaciones de tipo ácido láctica o acética, alcalina, alcohólica y de altas concentraciones de sal.
- b) Enriquecimiento de la dieta del ser humano por medio del desarrollo de propiedades sensoriales (aromas, sabores, texturas, etc.) en los alimentos.
- c) Enriquecimiento biológico de los alimentos (vitaminas, proteínas, aminoácidos, etc.).
- d) Disminución de tiempos y costos de elaboración de los alimentos.
- e) Desintoxicación (eliminación de posible contaminación o microorganismos patógenos) durante el proceso de fermentación (Steinkraus, 1996).

2.2. Maguey, pulque y aguamiel

En México, las bebidas alcohólicas de tipo tradicional han tenido una gran relevancia en la vida diaria de las comunidades indígenas. Desde tiempos remotos, los agaves o magueyes (*Agave*) han estado entre las plantas más empleadas en nuestro país. Pertenecen a la familia *Agavaceae*, la cual es endémica del continente americano y son comúnmente confundidas con los cactus, gracias a que crecen en los mismos tipos de ambientes. Los agaves poseen una alta concentración de fructanos, que funcionan como sustancias de reserva y poseen únicamente un ciclo reproductivo en su vida (García-Mendoza, 1995, 1998).

Por lo general, el maguey posee un promedio de vida de alrededor de doce años y la producción de esta planta se lleva a cabo por medio de la plantación de los llamados hijuelos, o por medio de una siembra con semilla. Los primeros surgen de la raíz de la planta adulta, la que una vez bien establecida o desarrollada puede producir entre diez y doce renuevos a lo largo de su vida (Sierra, 2005).

El maguey empleado en la elaboración de la bebida tradicional conocida como pulque abarca las siguientes especies pertenecientes al género *Agave*: *A. atrovirens*, *A. mapisaga*, *A. ferox*, *A. hookeri* y *A. americana*. Estas variedades crecen en zonas semiáridas y templadas, suelos pobres y con lluvias irregulares (López-Munguía *et al.*, 2004). Los principales estados de la República Mexicana productores de pulque son: México, Tlaxcala, Hidalgo, Querétaro, Distrito Federal, Puebla, San Luis Potosí y Morelos.

El pulque es una bebida alcohólica no destilada tradicional producida por la fermentación de la savia conocida como aguamiel, la cual es extraída de las especies de maguey mencionadas anteriormente (Escalante *et al.*, 2008). Esta bebida es probablemente la más antigua y tradicional de México. Es un líquido blanco, viscoso, ligeramente ácido y con un contenido alcohólico menor a 6% y gracias a su impacto en el aspecto nutricional, económico y químico, ha sido la bebida más estudiada desde diferentes puntos de vista (Gonçalves de Lima, 1990). De acuerdo a la NMX-V-037-1972 se le conoce así al líquido que se obtiene por fermentación alcohólica del aguamiel y existen dos tipos: Pulque de semilla y puntas (tipo I) y Pulque comercial (tipo II).

Por otra parte, el aguamiel (la savia del agave) es un líquido blanco con algunos tintes amarillentos, ligeramente turbio, espeso, dulce, con sabor fresco y ligeramente ácido. Contiene agua, azúcares (tales como glucosa, fructosa y sacarosa), proteínas y sales minerales como sus principales componentes. Y de acuerdo con la NMX-V-022-1972, el aguamiel es el jugo obtenido mediante el raspado previo del cajete o la cavidad central del maguey pulquero, de color ámbar, sabor dulce y aspecto translúcido y de igual forma reconoce dos tipos de aguamiel (I y II).

2.3. Proceso de elaboración

A continuación, se presenta un diagrama en el que se representan los pasos para la obtención tanto del pulque como del aguamiel, siendo este proceso algo fundamental para entender los puntos en los cuales las fermentaciones ocurren y obviamente inferir en cuales de estas etapas los microorganismos llevan a cabo la posible producción de metabolitos:

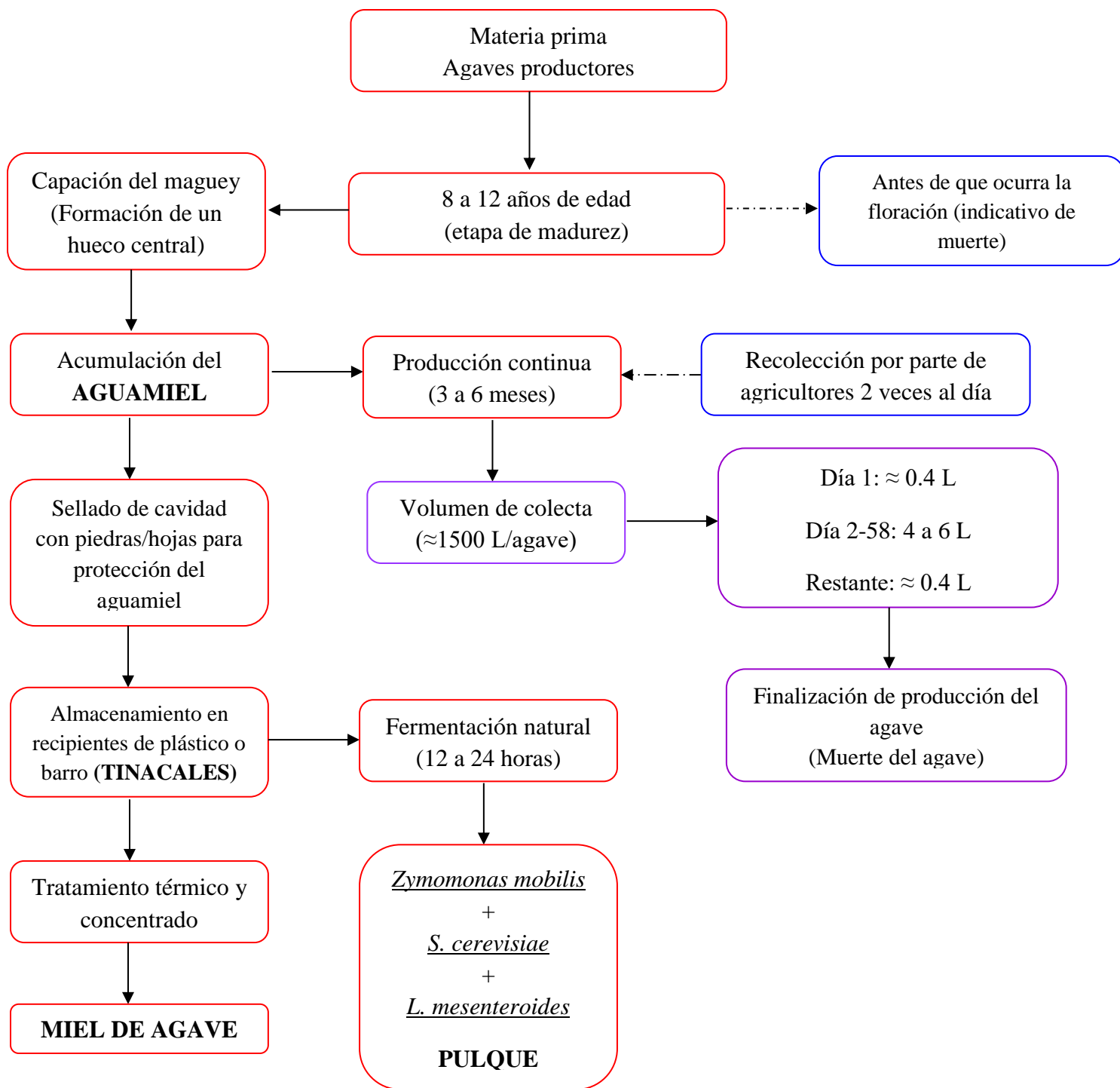


Figura 1: Elaboración del pulque y el aguamiel, realizado a partir de la información de Manrique (2013) y Arenas (2015).

El proceso de elaboración antes descrito es llevado a cabo en condiciones no asépticas, esto quiere decir que durante la acumulación del aguamiel en el maguey, este se encuentra

expuesto a condiciones como lluvias y la presencia de animales; enseguida, los recipientes en los que es recolectado y transportado no son sometidos a ningún procesamiento térmico (como esterilización) o de desinfección y de igual forma, los tanques conocidos como tinacales. Por lo que los microorganismos que se encuentran en el proceso de fermentación son aquellos que provienen del aguamiel, además aquellos que se incorporaron en las diferentes etapas, tales como transporte, recolección, manipulación, etc. (Escalante *et al.*, 2004).

2.4. Características fisicoquímicas del pulque y el aguamiel

Como se mencionó anteriormente, en la NMX-V-022-1972 se distinguen dos clases de aguamiel con un solo grado de calidad (tabla 1) y son de suma importancia debido a que influyen en las características del pulque obtenido. Para el caso del pulque, la NMX-V-037-1972 lo clasifica de acuerdo a su producción: el pulque de puntas, que es empleado como cultivo iniciador en el proceso de fermentación y que es obtenido de las tinas en el proceso fermentativo (y que emplea aguamiel tipo I como materia prima) y el pulque comercial, que es realizado a partir de cualquier aguamiel, las características se describen en la tabla 2.

Tabla 1: Características establecidas por la NMX-V-022-1972 para los tipos de aguamiel.

<i>Tipo de aguamiel</i>	Tipo I		Tipo II
Especificación	Mínimo	Máximo	No mayor a
<i>pH</i>	6.6	7.5	4.5
<i>Índice de refracción a 20 °C</i>	59	100	27
<i>Azúcares reductores totales (g/100 mL)</i>	8	12	6
<i>Azúcares reductores directos (g/100 mL)</i>	2	3	3
<i>° Baumé</i>	5	7	4.5
<i>Acidez (mg/100 mL)</i>	0.9	1.3	4
<i>Cenizas (mg/100 mL)</i>	300	430	180
<i>Proteínas (mg/100 mL)</i>	300	600	100

Tabla 2: Características establecidas por la NMX-037-1972 para los tipos de pulque.

<i>Tipo de pulque</i>	Tipo I		Tipo II	
Especificación	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
<i>pH</i>	>3.7	4.2	3.5	4.0
<i>Acidez total (g/100 mL)</i>	0.40	0.75	0.40	0.70
<i>% alcohólico</i>	6	9	0.6	4.0
<i>Reductores totales (g/100 mL)</i>	0.10	0.80	0.20	0.50
<i>Índice de refracción a 20 °C</i>	1.3390	1.3406	1.3365	1.3380

La cantidad y composición del aguamiel durante el periodo de producción varía dependiendo de las especies de *Agave*, las condiciones de cultivo de la planta, la temporada del año, la humedad presente y las propiedades del suelo (Sánchez-Marroquín, 1970). Por lo tanto, los factores antes mencionados, pueden ser vitales, debido a que además de afectar la composición del aguamiel, podrían existir variaciones en la composición final del pulque.

2.5. Características nutrimentales del pulque y el aguamiel

El pulque ha sido considerado como una bebida saludable gracias a que aporta energía, vitaminas y aminoácidos esenciales, en especial lisina y triptófano, los cuales son deficientes en la dieta mexicana, la cual está basada en maíz. Inclusive en algunas poblaciones rurales, en las cuales existe una carencia importante de agua potable, el pulque es consumido como sustituto gracias a su bajo contenido alcohólico y su alta disponibilidad (Vargas, 1999).

El valor nutricional del pulque se relaciona con su contenido de vitaminas del complejo B y vitamina C, sintetizadas principalmente por levaduras, aminoácidos esenciales y el hierro biodisponible (Cravioto *et al.*, 1951). En la tabla 3 se presenta la composición química tanto del pulque como del aguamiel en un estudio realizado por López-Munguía en 2004, en la cual se puede observar que el contenido de proteína y fósforo es mayor en el pulque, mientras que tiene valores menores que el aguamiel en cuanto a cenizas, calcio, riboflavina, niacina y vitamina C.

Tabla 3: Composición química de pulque y aguamiel (López-Munguía, 2004).

Componente	PULQUE	AGUAMIEL
Proteína (g/100g)	0.44	0.3
Cenizas (g/100g)	0.2	0.4
Calcio (mg/100g)	10	20
Fósforo (mg/100g)	10	9
Hierro (mg/100g)	0.7	-----*
Tiamina (mg/100g)	0.02	0.02
Riboflavina (mg/100g)	0.03	0.04
Niacina (mg/100g)	0.3	0.4
Vitamina C (mg/100g)	6.2	6.7

*No encontrado en aguamiel

Además de las propiedades nutrimentales que ya se mencionaron, se cree que el pulque puede tener actividad prebiótica, gracias a su contenido de fructanos y actividad probiótica debido a la presencia de BAL y levaduras (Ortíz-Basurto *et al.*, 2008). Inclusive el aporte energético y nutrimental de esta bebida tradicional puede aumentar si se realiza un curado, es decir, si se lleva a cabo la preparación con frutas, cereales, granos, semillas u otros productos de origen animal e inclusive puede llegar a impactar considerablemente en sus propiedades sensoriales (Arenas, 2015).

2.6. Microbiología y proceso de fermentación

El proceso de fermentación para la elaboración del pulque puede llevarse a cabo por varios días, dependiendo de la calidad de la savia (aguamiel), la madurez de los cultivos iniciadores del pulque, la microbiota presente en ambos sustratos, la temporada y los cambios de temperatura. Se dice entonces que el grado de fermentación ha sido adecuado cuando se alcanza un grado alcohólico y una viscosidad específica (Loyola-Montemayor, 1956; Sánchez-Marroquín, 1977).

El proceso de fermentación comienza cuando la savia, la cual es rica en carbohidratos (8-10%), sales minerales y factores de crecimiento, se convierte en un medio apto o favorable para la proliferación de un gran número de microorganismos que suelen aparecer en las paredes de la cavidad (del maguey) o propio de la acción del tallado con ayuda de los utensilios de extracción, de la tierra o inclusive de los insectos que pueden estar presentes, que introducen una población heterogénea de microorganismos que logran rápidamente adaptarse al nicho ecológico. Por medio de la acción de estos microorganismos y aquellos presentes por ejemplo, en la semilla del pulque, ocurren una serie de fermentaciones (Loyola-Montemayor, 1956; Sánchez-Marroquín, 1977).

Estos microorganismos que están presentes dentro de la savia y el pulque son principalmente bacterias y levaduras, aunque inclusive pueden encontrarse algunos hongos como *Aspergillus*, *Mucor* y *Penicillium*. Tanto en la savia como en el pulque fresco, existe una prevalencia de las bacterias ($\approx 8.0-15.0 \cdot 10^8$ células/mL) con respecto a las levaduras ($\approx 3.0-6.0 \cdot 10^6$ células/mL), gracias a que presenta un pH cercano a la neutralidad (7-7.4). Con la continuación del proceso de fermentación, la población de levaduras aumenta gradualmente hasta que logra obtener la predominancia con respecto a las bacterias ($2.5-3.0 \cdot 10^8$ células/mL y $1.0-2.0 \cdot 10^8$ células /mL respectivamente), ambas poblaciones están presentes en altas concentraciones (Loyola-Montemayor, 1956) y esto se puede deber a que conforme avanza la fermentación, el pH se hace más ácido (4-4.5) y esto favorece el desarrollo de las levaduras.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, la dinámica de crecimiento que se presenta en el proceso fermentativo se esquematiza en la figura 2, donde en primer lugar se tiene una gran concentración de BAL homo y heterofermentativas y las especies del género *Leuconostoc* son las que comienzan evacuando el oxígeno por medio de la producción de CO₂ y esto permite la generación de exopolisacáridos y la disminución del pH hasta un valor de 5.8, posteriormente existe una etapa donde convergen bacterias y levaduras y la fermentación de tipo ácida se lleva a cabo por medio de las bacterias del género *Lactobacillus*, a la par de que *Z. mobilis* y *S. cerevisiae* llevan a cabo la fermentación alcohólica, alcanzando así los valores de pH de entre 4.0 y 6.0 y un contenido de etanol aproximado de 7% al finalizar todo el proceso de fermentación (Ramírez *et al.*, 2004).

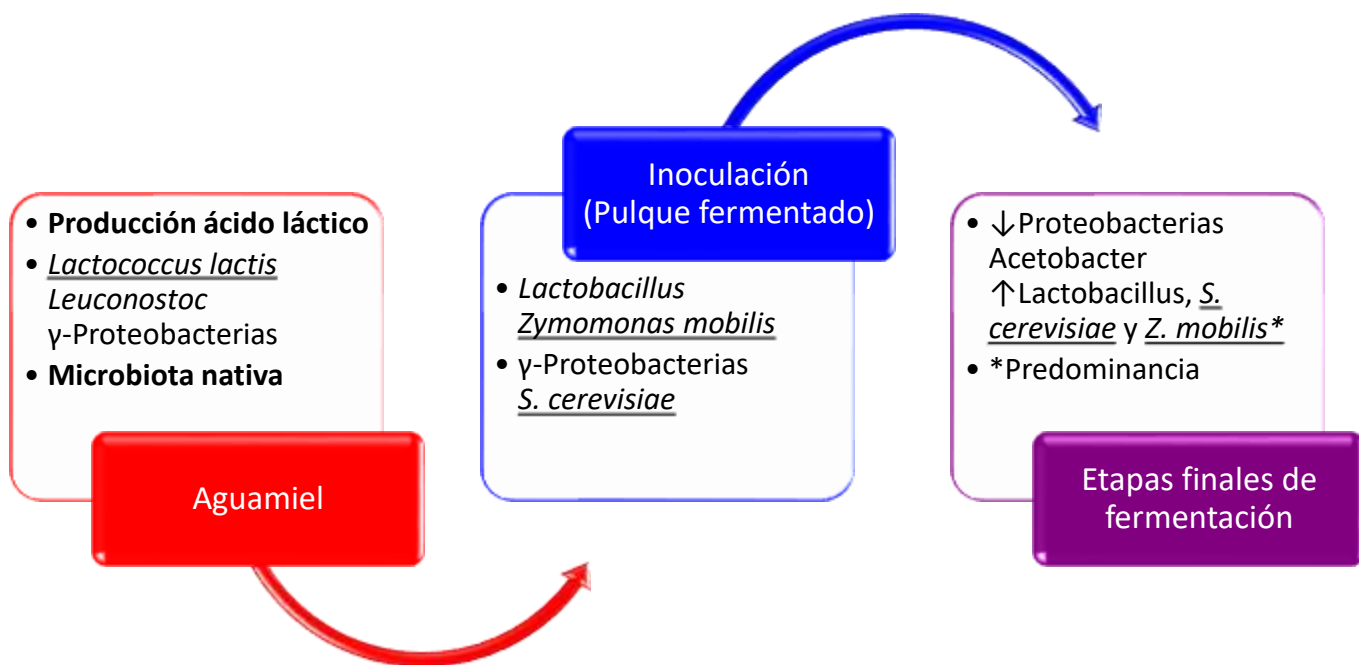


Figura 2: Dinámica de crecimiento de los microorganismos presentes en el proceso de fermentación.

De igual forma, se ha encontrado otro tipo de microorganismos como *Enterobacter* spp. o *Acinetobacter radioresistens* en el aguamiel, esto debido posiblemente a una contaminación por acumulación en el maguey e inclusive por el proceso de extracción y las condiciones poco higiénicas por parte de los productores (Escalante *et al.*, 2008). A continuación, en la Tabla 4 se presenta la microbiota identificada del aguamiel y el pulque, donde se puede apreciar, como ya se mencionó anteriormente, la gran gama de bacterias (ácido lácticas principalmente) y levaduras que pueden encontrarse a lo largo del proceso de fermentación descrito.

Tabla 4: Diversidad microbiana conocida e identificada en pulque y aguamiel.

Matriz alimentaria	Microorganismo		Técnica usada para identificación	Referencia
	Bacterias	Levaduras		
Aguamiel	<i>Acinetobacter radioresistens</i> , <i>Citrobacter</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>L. citreum</i> , <i>L. kimchii</i> , <i>L. mesenteroides</i> <i>Enterobacter</i> spp., <i>Erwinia rhapontici</i> , <i>Kluyvera cochleae</i> , <i>Serratia grimensis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>Bulgaricus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae (capensis)</i> , <i>Candida lusitaneae</i>	*Aislamiento con medio de cultivo y caracterización morfológica *Librería genómica del gen ADNr 16S	Cruz-Guerrero <i>et al.</i> , 2005; Escalante <i>et al.</i> , 2008; Estrada-Godina <i>et al.</i> , 2001; Lappe-Oliveras <i>et al.</i> , 2008
Pulque	<i>Lb. acidophilus</i> spp., <i>L. acetotolerans</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbruecki</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. vermiforme</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. pseudomesenteroides</i> , <i>Macrococcus caseolyticus</i> , <i>Microbacterium arborescens</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Sarcina</i> spp., <i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Acetobacter malorum</i>	<i>S. cerevisiae (capensis y chevalien)</i> , <i>Candida valida</i> , <i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i> , <i>Cryptococcus</i> spp., <i>Candida parapsilosis</i> , <i>C. valida</i> , <i>Clavispora lusitaneae</i> , <i>Debaryomyces carsonii</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>K. lactis</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>Geotrichum candidum</i> <i>Pichia</i> spp., <i>Pichia fuillermundii</i> , <i>Rhodotorula</i> spp., <i>S. bayanus</i> , <i>Torulasporea delbrueckii</i>	*Aislamiento con medio de cultivo y caracterización morfológica *Librería genómica del gen ADNr 16S	Cruz-Guerrero <i>et al.</i> , 2005; Escalante <i>et al.</i> , 2008; Estrada-Godina <i>et al.</i> , 2001; Lappe-Oliveras <i>et al.</i> , 2008

2.7. Bacterias ácido lácticas

2.7.1. Generalidades

Se les conoce como bacterias ácido lácticas (BAL) al grupo de microorganismos de morfología coco o bacilar (con diversas agrupaciones) de Gram positivo, de longitud variable y de un grosor que va de 0.5 a 0.8 μm , no esporulados, catalasa negativo, sin movilidad, generalmente no aerobias pero pueden ser aero y ácido tolerantes, estrictamente fermentativas, con ácido láctico como el mayor producto de la fermentación de azúcares (Seppo *et al.*, 2004). Las BAL están asociadas con hábitats ricos en nutrientes, tales como productos alimentarios como leche, carne, bebidas o vegetales e inclusive algunas suelen ser parte de la microbiota habitual de la boca, intestino y vagina de mamíferos.

Las BAL realizan un papel muy importante en los procesos de fermentación en los alimentos; esto ya que son ampliamente usadas en la industria alimentaria, no solamente por su capacidad para acidificar y por lo tanto ayudar a la conservación de los alimentos, sino también gracias a que tienen una implicación en las propiedades sensoriales (textura, sabor, olor, etc.) de alimentos que han llevado este proceso de fermentación (Axelsson *et al.*, 1993).

Las BAL además, pueden actuar como cultivos lácticos o iniciadores, los cuales se emplean principalmente en la industria láctea para la elaboración de productos como quesos o mantequilla, e inclusive en productos fermentados. Se distinguen tres tipos de cultivos iniciadores: inicial, cultivo madre y el cultivo tradicional. Los de tipo inicial son puros y a partir de estos, es preparado el cultivo madre; u partiendo de este es desarrollado el tradicional, éste último suele ser utilizado para los procesos fermentativos (Castro-Rovetto, 2006).

2.7.2. Clasificación

Las bacterias ácido lácticas pertenecen al phylum Firmicutes que comprende aproximadamente 20 géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* son los principales miembros, siendo *Lactobacillus* el más grande de todos los géneros antes mencionados.

De acuerdo a la fermentación de la lactosa que lleven a cabo pueden clasificarse en dos grandes grupos, homofermentativas (donde únicamente se produce ácido láctico) y heterofermentativas (producción de ácido láctico y otras sustancias) y de acuerdo a la temperatura de crecimiento pueden clasificarse en mesófilos y termófilos (Tabla 5).

Tabla 5: Características de las BAL de acuerdo al tipo de fermentación realizada o a la temperatura óptima de crecimiento (Tomado y modificado de Parra, 2010).

Clasificación	Tipo de fermentación		Clasificación	Temperatura	
	<i>Homofermentativa</i>	<i>Heterofermentativa</i>		<i>Mesófilos</i>	<i>Termófilos</i>
Producen	Ácido Láctico	Ácido Láctico + otros (etanol, CO ₂ , ATP)	Temperatura de incubación	20-25 °C	40-45 °C
Vía/Ruta	Embden-Meyerhoff-Parnas	Hexosa monofosfato o pentosas	Tiempo de incubación	18-20 horas	2-4 horas
Enzimas activas	Aldolasa isomerasa y hexosa isomerasa	Fosfocetolasa	Acidez final (% ácido láctico)	0.8	0.9
% producción ácido láctico*	≈ 85%	≈ 50%	Géneros	<i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i>

*Se refiere a un porcentaje estimado de producción del ácido en un proceso de fermentación

2.7.3. Características metabólicas

Las BAL únicamente pueden desarrollarse en medios ricos en carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y sales minerales. Y gracias a su comportamiento quimiorganótrofo, las posibles fuentes de carbono que son capaces de asimilar son en su mayoría carbohidratos (tales como hexosas, pentosas y algunos disacáridos) (Von Wright y Axelsson, 2012).

Una vez que los carbohidratos se encuentran dentro de la célula, el proceso de fermentación es llevado a cabo por medio de dos tipos de rutas metabólicas: la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (o glucólisis) para BAL homofermentativas o la ruta pentosa fosfocetolasa para el caso de las BAL heterofermentativas.

Por medio del metabolismo homofermentativo, el metabolito producido es el ácido láctico, donde el rendimiento es de 2 moles de este metabolito por cada mol de glucosa (rendimiento energético: 2 moles ATP por cada mol de glucosa) y las hexosas son el único tipo de

carbohidrato que pueden tomar esta vía. Mientras que la ruta heterofermentativa además de obtener como producto al ácido láctico, se produce etanol y CO_2 (1 mol de productos por cada mol de glucosa) y por medio de esta vía son utilizadas tanto hexosas como pentosas.

Estas bacterias lácticas son capaces de producir distintos compuestos a partir del piruvato, entre los que se encuentran acetoína, acetaldehído, diacetilo o el 2,3-butanodiol, los que pueden tener un gran impacto tecnológico para la elaboración de algunos alimentos fermentados. De igual forma, a partir del metabolismo del piruvato es posible obtener (por medio de una fermentación mixta) compuestos como acetato, CO_2 y etanol y tal y como se muestra en la figura 3, empleando el metabolismo del piruvato se logra explicar la síntesis de los compuestos antes mencionados, que con excepción del CO_2 todos pueden presentar actividad antimicrobiana (Liu, 2003; Von Wright y Axelsson, 2012).

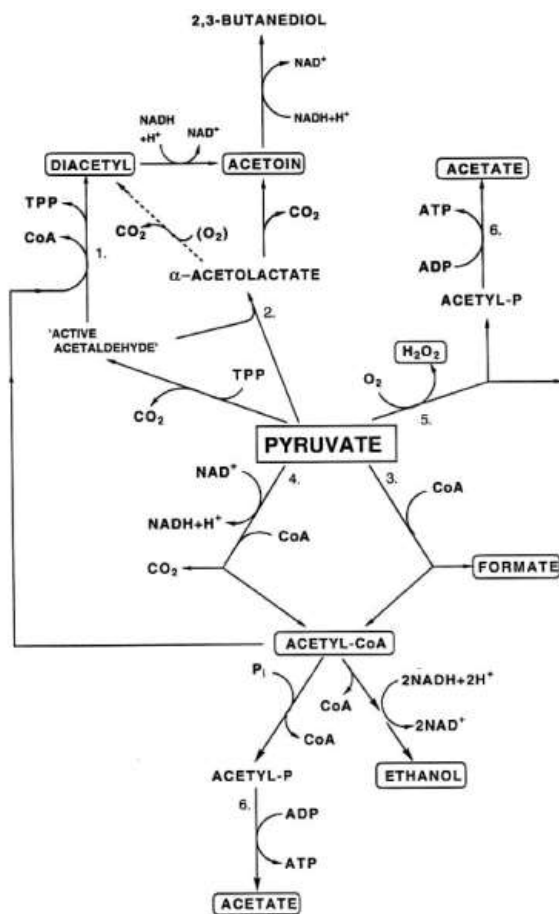


Figura 3: Rutas para la formación de compuestos derivados del piruvato. Enzimas que participan: 1. Diacetil sintasa, 2. Acetolactato sintasa, 3. Piruvato-formiato liasa, 4. Piruvato deshidrogenasa, 5. Piruvato oxidasa y 6. Acetato cinasa

Tomado de Von Wright y Axelsson, 2012.

2.7.4. Beneficios y ventajas

Las BAL poseen propiedades muy interesantes y de gran importancia económica. Muchas de estas propiedades, tales como la utilización de lactosa, la actividad proteasa, mecanismos de defensa de bacteriófagos o la producción de bacteriocinas u otros compuestos antimicrobianos están mediados genéticamente por plásmidos (McKay, 1985). La tecnología de la modificación y mejora del ADN de las bacterias lácticas ha sido aplicada durante los últimos años y este tipo de estrategias ha permitido que inclusive puedan ser aplicadas para el desarrollo y mejora de los cultivos iniciadores, por lo que al actuar en el alimento, por medio de la fermentación, se mejoren sus propiedades fisicoquímicas, nutrimentales y sensoriales (Seppo *et al.*, 2004).

Sin embargo, además de que las BAL pueden ser utilizadas satisfactoriamente en la industria de alimentos, también han tenido aplicación para la síntesis de químicos, fármacos y otros productos que son útiles para los seres humanos y esto se debe a que poseen múltiples ventajas en la industria de las fermentaciones (Seppo *et al.*, 2004).

- ✓ Han sido consumidas a lo largo de la historia, lo que ha implicado que no son patógenas para los seres humanos
- ✓ No llevan a cabo formación de toxinas o derivados de tóxicos
- ✓ Son microaerófilos y aerotolerantes, lo que significa que requieren un proceso de fermentación simple
- ✓ Crecen rápidamente, requiriendo un proceso de fermentación corto
- ✓ Han sido empleados en la industria de alimentos por años, lo que implica que los métodos para su cultivo a larga escala ya se conocen o se han perfeccionado
- ✓ Son capaces de fermentar diversos sustratos como leche, desechos de plantas, etc.
- ✓ Pueden secretar proteínas y llevar a cabo su expresión

2.8. Compuestos antimicrobianos de origen proteico (bacteriocinas)

Se les conoce así a las proteínas (sintetizadas ribosomalmente) que se encuentran biológicamente activas, encargadas de inhibir o eliminar el crecimiento de especies similares o muy relacionadas a la cepa productora. A diferencia de los antibióticos, estos

poseen un origen o una naturaleza proteínica y las células hospederas son inmunes a ellas. Son péptidos bioactivos con efecto bactericida o bacteriostático. Han sido objeto de múltiples investigaciones en recientes años por su novedoso uso potencial como conservador natural en alimentos e inclusive en propósitos médicos (Parra *et al.*, 2008).

Típicamente, las bacteriocinas poseen un estrecho espectro antibacteriano. Así, algunas de estas bacteriocinas de las BAL tienen la posibilidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas Gram positivas, al igual que algunas Gram negativas e inclusive levaduras (Kailasapathy, 2006). El estudio de la actividad de estas bacteriocinas tiene una gran aplicación debido a que además de ser una alternativa para satisfacer la demanda de consumidores de alimentos higiénicos y seguros, pueden ser inhibidores de patógenos, ayudando a evitar la adición de conservadores, convirtiendo al alimento en un producto seguro y menos artificial.

Las bacteriocinas producidas por las BAL presentan características que las distingue como potenciales conservadores de alimentos, de las principales puede mencionarse que al poseer una naturaleza proteínica no pueden ser inactivadas por enzimas de tipo gastrointestinal, además de no ser tóxicas (Chen y Hoover, 2006). Gracias a la presencia de este tipo de compuestos antimicrobianos derivados de las BAL en múltiples matrices alimentarias, han sido objeto de estudio y se ha logrado identificar al microorganismo productor y el tipo de bacteriocina producida, tal y como se observa en la tabla 6.

Tabla 6: Algunas BAL estudiadas, productoras de bacteriocinas.

Bacteriocina	Bacteria ácido láctica	Referencia
Nisina A Nisina Z	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NIZO 22186	Mattick & Hirsch, 1947 Mulders <i>et al.</i> , 1991
Lactocidina Acidolina	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> 2181	Vincent <i>et al.</i> , 1959 Hamdan & Mikolajcik, 1973
Pediocina SJ-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> SJ-1	Schved <i>et al.</i> , 1993
Leuconicina S	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i> OX	Lewus <i>et al.</i> , 1992
Bacteriocina St10 Termofilina 13	<i>Streptococcus thermophilus</i> St10 <i>Streptococcus thermophilus</i> Sfi13	Cilano <i>et al.</i> , 1990 Marciset & Mollet, 1993

2.8.2. Características generales

La mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL presentan características generales o comunes, sin importar de qué especie sean obtenidas o determinadas, entre las que se encuentran (De Vuyst & Vandamme, 1994):

- + La mayoría presenta o posee mayor actividad antibacteriana cuando se encuentran a pH menor o igual a 5.
- + La adsorción a la superficie celular de las bacterias sensibles depende del pH. Es decir que habrá una máxima adsorción a $\text{pH} \geq 6$ y una mínima adsorción cuando se tiene un $\text{pH} \approx 2$.
- + Termorresistencia general, ayudando a conservar su actividad antimicrobiana al ser sometidas a condiciones similares a las de la pasteurización o algún tratamiento térmico que involucre altas temperaturas (Chen y Hoover, 2006). Esto gracias a que poseen enlaces entrecruzados estables y son estructuras globulares pequeñas.
- + Su acción se ve favorecida cuando se encuentran en los alimentos fermentados, ya que estos últimos al poseer un pH ácido hacen que al actuar contra un microorganismo sensible sea más fácil.

2.8.3. Clasificación

Las bacteriocinas producidas por BAL fueron divididas o clasificadas por Klaenhammer, agrupándolas en clases y subclases sobre la base de la estructura química, peso molecular y estabilidad térmica. La clasificación que realizó, ha servido como base para que todos los esquemas posteriores de división que se han realizado tengan validez. De todas las bacteriocinas conocidas, quizás es la nisina A la más ampliamente caracterizada y la que inclusive posee una aprobación regulatoria, para su uso o aplicación en diversas industrias de alimentos en el mundo como un agente de bioprotección para la alimentación y que ha servido como una referencia para la continua investigación de estos compuestos de origen proteico (Delves, 2005).

En la figura 4 se puede apreciar esta clasificación, presentando las características principales de cada tipo de bacteriocina, además de un ejemplo representativo o característico.

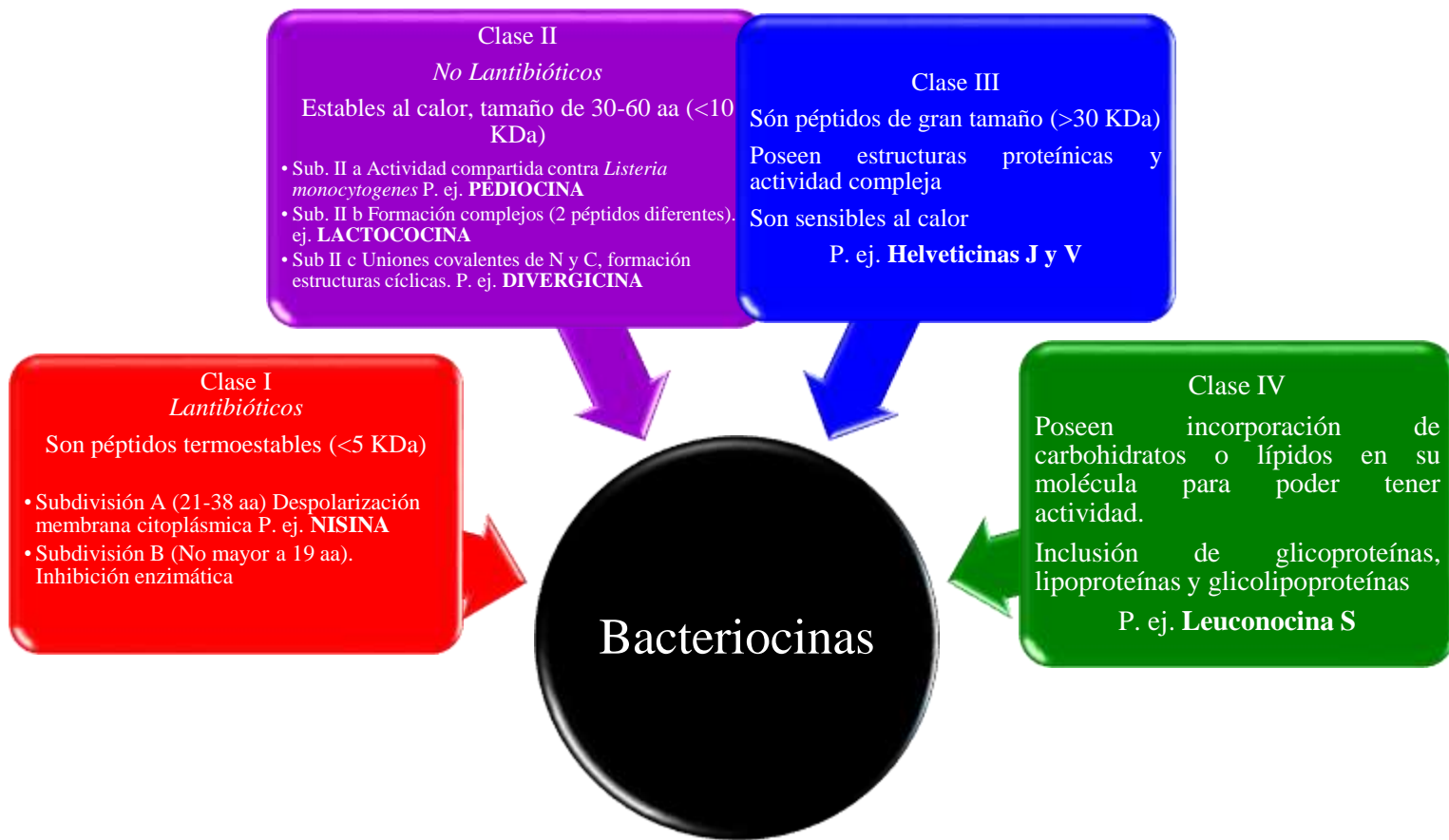


Figura 4. Clasificación de las bacteriocinas, de acuerdo con Klaenhammer, 1993.

2.8.4. Biosíntesis de bacteriocinas

Los genes codificados para la producción e inmunidad de bacteriocinas están generalmente organizados en clusters pertenecientes al operon y pueden ser localizadas en elementos móviles como el cromosoma en asociación con transposones o plásmidos (Deegan *et al.*, 2006). Las bacteriocinas son primariamente sintetizadas como prepéptidos inactivados biológicamente, los cuales contienen una secuencia N-terminal líder enlazada al extremo C-terminal del prepéptido y existen diferencias de acuerdo al tipo de genes necesarios para su liberación.

La producción de estas bacteriocinas en BAL se encuentra relacionada con el crecimiento, debido a que suele ocurrir en la fase exponencial y es detenida al finalizar esta etapa, aunque existen excepciones, tal como la nisina, en la que la producción ocurre a la mitad de la fase logarítmica y alcanza su máxima expresión cuando se alcanza la fase estacionaria (Riley y Wertz, 2002). Además, las bacteriocinas pueden sintetizarse a partir del uso como sustrato de diversos azúcares, aunque se ha observado, que de manera general, que el mejor sustrato para una mayor producción es la glucosa (Muñoz-Rojas, 2003; Savadogo *et al.*, 2006).

El sistema que se emplea para la producción de bacteriocinas está conformado por tres elementos: un péptido inductor (o factor de activación), el cual es sintetizado en el ribosoma como un prepéptido, el cual es dividido y excretado al medio; una histidina cinasa transmembranal (o receptor), la cual es activada cuando se alcanza una concentración (del péptido inductor) y lo que provoca la autofosforilación del residuo de histidina y por último un regulador de respuesta, el cual recibe la transferencia de fosfato (Cotter *et al.*, 2005).

2.8.5. Mecanismo de acción de las bacteriocinas

De acuerdo al contenido de cistina (alto efecto bactericida), se han establecido tres diferentes espectros de acción que pueden llevar a cabo las bacteriocinas:

- a) Espectro inhibitorio estrecho, para inhibición de microorganismos de la misma especie.
- b) Espectro inhibitorio intermedio, para inhibición de géneros de BAL e inclusive algunas bacterias patógenas Gram (+).
- c) Espectro inhibitorio amplio, que actúan contra un gran número de bacterias patógenas Gram (+).

La manera en la que actúan las bacteriocinas es diferente. Como se aprecia en la figura 5, algunos miembros de las bacteriocinas clase I (o lantibióticos), tal como la nisina, han sido estudiadas, encontrando que pueden unirse al lípido II, el principal transportador de subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular y por lo tanto, prevenir la correcta síntesis de la pared celular, guiando a la muerte celular. Además, pueden usar el lípido II como una molécula de acoplamiento para comenzar el proceso de inserción de membrana y formación de poro que de igual forma conduce a una muerte celular rápida. En

general, los péptidos de clase II poseen una estructura helicoidal anfifílica, la cual permite que se inserte en la membrana de la célula objetivo, ocasionando una despolarización y la muerte celular. Mientras que las proteínas bacteriolíticas largas (conocidas como bacteriolisinas, clase III), pueden funcionar de manera directa en la pared celular de bacterias Gram positivas, produciendo la muerte o lisis celular (Cotter *et al.*, 2005).

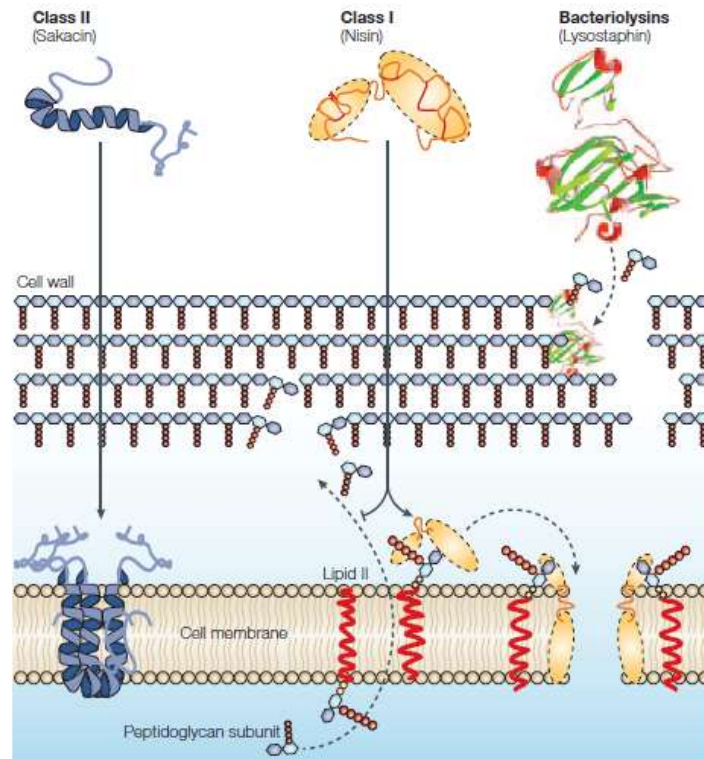


Figura 5: Mecanismo de acción de los diferentes tipos de bacteriocinas. Adaptado de Cotter et al., 2005.

2.8.6. Aplicación en la industria de alimentos

Actualmente, las empresas productoras de alimentos se enfrentan a una demanda muy alta, por parte de los consumidores, de alimentos seguros, con una larga vida de anaquel y un procesamiento mínimo, sin la presencia de conservadores químicos. Es por ello que el uso y aplicación de las bacteriocinas se ha demostrado en productos como huevos, vegetales, alimentos enlatados, pescados, cárnicos, entre muchos otros, en combinación claro, con otros métodos de conservación o por medio de su incorporación en materiales de empaque. Estas son usualmente estables a tratamientos térmicos y han logrado inhibir a varios de los

microorganismos patógenos y de contaminación, causantes de los problemas de salud (gastrointestinales principalmente) en alimentos mínimamente procesados. La nisina y la pediocina PA1/AcH han sido utilizados ampliamente en los alimentos (De Vuyst, Vandamme, 1994).

Para que una bacteriocina pueda tener una aplicación en una matriz alimentaria, se deben tomar en cuenta seis criterios muy importantes:

- a) La cepa productora debe ser preferentemente reconocida como segura (GRAS).
- b) Debe poseer un amplio espectro de inhibición que incluya patógenos o que la tenga en contra de un patógeno en específico.
- c) Debe ser estable a tratamientos térmicos
- d) No debe estar asociada con riesgos a la salud
- e) Su inclusión al producto(s) debe guiarse hacia la obtención de efectos benéficos tal como la garantía de seguridad, calidad y sabor.
- f) Debe poseer una alta actividad específica (Holzapfel *et al.*, 1995).

Y aunque tradicionalmente, el uso de bacteriocinas está asociado con la preservación de alimentos, en un futuro próximo, se busca que el alimento pueda actuar como un vehículo para el suministro de bacterias probióticas productoras de estos compuestos. La producción de antimicrobianos por un cultivo de este tipo es algo deseable ya que se ha observado que pueden contribuir a la inhibición de bacterias patógenas en el intestino (Dunne *et al.*, 1999; Marteau y Rambaud, 1993; Tannock, 1997).

2.9. Compuestos antimicrobianos de origen no proteico

La habilidad que poseen las BAL para producir metabolitos antimicrobianos ha sido históricamente usada para la conservación de alimentos. La fermentación que experimentan reduce la cantidad de carbohidratos disponibles y tiene como resultado un amplio rango de pequeñas moléculas orgánicas que exhiben este tipo de actividad antimicrobiana, siendo los más comunes los ácidos acético, propiónico y láctico (Blom y Mörtvedt, 1991). En adición a la producción de estos metabolitos primarios, muchos otros compuestos antimicrobianos pueden ser formados por diversas bacterias ácido lácticas. El significado biológico se piensa que es el amensalismo, lo que significa que una bacteria gana ventaja sobre otro

microorganismo (competencia) y esto puede lograrse por medio de la modificación de las condiciones de crecimiento de la BAL (Seppo *et al.*, 2004).

2.9.2. Ácidos orgánicos

Tras llevar a cabo el proceso de fermentación de las hexosas, es posible que se obtenga ácido láctico únicamente (microorganismos homofermentativos) o cantidades equimolares de ácido láctico, acético, etanol y CO₂ (por un mecanismo heterofermentativo).

Se ha observado que los ácidos débiles poseen una mayor actividad antimicrobiana a bajos pH que a uno neutral (Simon y Blackman, 1949). De los ácidos débiles, el ácido acético es el que posee una inhibición más fuerte y tiene un amplio rango de actividad inhibitoria, siendo efectivo contra levaduras, mohos y bacterias (Blom y Mörtvedt, 1991), mientras que el ácido propiónico se ha observado que posee igualmente un fuerte efecto antimicrobiano, pero en particular únicamente contra mohos y levaduras (Suomalainen y Mäyrä-Mäkinen, 1999). Esta actividad antimicrobiana tan alta del ácido acético y propiónico puede ser explicado en parte por su alto pK_a en comparación al del ácido láctico (4.87, 4.75 y 3.08, respectivamente). Cuando una mezcla de ácidos está presente, es común que el ácido láctico únicamente, contribuya principalmente a la reducción del pH, mientras que los ácidos propiónico y acético, los cuales se vuelven no disociados, son en realidad los agentes antimicrobianos. Sin embargo, adicional a la función de reducción de pH, el ácido láctico se ha observado que puede permeabilizar las membranas, potenciando con ello la actividad de las otras sustancias antimicrobianas (Alakomi *et al.*, 2000).

Se asume que la forma no disociada (neutral) de los ácidos orgánicos penetran a través de la membrana celular debido a que son lípido-solubles y al valor de pH intracelular más alto, se disocian para producir iones hidrógeno e interfieren con funciones metabólicas tales como translocaciones de sustrato y fosforilación oxidativa, reduciendo así el pH intracelular (Baird-Parker, 1980).

2.9.3. Peróxido de hidrógeno

En presencia de oxígeno, las BAL son capaces de generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por medio de la acción de oxidasas (que contienen flavoproteínas), NADH oxidasas y de la superóxido dismutasa. De acuerdo con Fontaine *et al.*, (1996), se argumenta que el peróxido de hidrógeno no se acumula en cantidades significativas *in vivo*, debido a que es degradado por peroxidasas, flavoproteínas y pseudo-catalasa. El efecto bactericida causado por este metabolito se ha atribuido a su potente efecto oxidante en la célula bacteriana; los grupos sulfhidrilo de las proteínas de la célula y los lípidos de membrana pueden ser oxidados (Morris, 1976; Schlegel, 1985; Lindgren y Dobrogosz, 1990). Inclusive, algunas de las reacciones en las que se produce H_2O_2 se elimina el oxígeno, creando condiciones anaeróbicas que pueden ser desfavorables para ciertos microorganismos.

El principal efecto antimicrobiano logrado es gracias al bloqueo de la glicólisis. Se ha propuesto que inhibe el transporte de la glucosa, la actividad hexocinasa y la actividad de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa gracias a la oxidación de los grupos sulfhidrilo en estas enzimas metabólicas (Carlsson *et al.*, 1983). La actividad que se presenta frente a bacterias Gram-positivas y otras BAL es generalmente bacteriostática, mientras que muchas bacterias Gram-negativas son eliminadas rápidamente.

2.9.4. Dióxido de carbono (CO_2)

El dióxido de carbono (CO_2) es formado principalmente por la acción de las BAL heterofermentativas, pero de igual forma otras vías metabólicas pueden llevar a cabo la generación de este compuesto durante la fermentación y posee un doble efecto antimicrobiano. Su formación crea un ambiente anaeróbico y el dióxido de carbono en sí posee actividad antimicrobiana (Lindgren y Dobrogosz, 1990). Se ha sugerido que la manera de actuar de este compuesto es por la inhibición de descarboxilaciones enzimáticas (King y Nagel, 1975) y la acumulación en la bicapa lipídica causa disfunción en la permeabilidad de la membrana. Y a altas concentraciones de este, puede prevenir el crecimiento de ciertos organismos (Lindgren y Dobrogosz, 1990). Gracias a su actividad antimicrobiana, el CO_2 es ahora comúnmente usado como el componente principal de los empaques de atmósferas modificadas.

2.9.5. Diacetilo

El diacetilo (2.3-butanodiona) es el componente de aroma y sabor presente en la mantequilla. Es producido por las especies y cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, entre otros microorganismos (Jay, 1982). Cuando las hexosas son metabolizadas, la formación de este es reprimida; sin embargo, el diacetilo puede llevar a cabo una sobre-producción si el citrato es metabolizado. Es así como el citrato es convertido vía piruvato en diacetilo (Lindgren y Dobrogosz, 1990). Jay (1982) observó que este compuesto era más efectivo a pH <7. Además de que la actividad antimicrobiana era antagónica en presencia de glucosa, acetato y tween 80. Este se ha observado que es más efectivo contra bacterias Gram-negativas, levaduras y mohos que contra las Gram-positivas.

2.9.6. Reuterina

Considerado como un componente de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana, producido por las BAL, en especial por *Lactobacillus reuteri*, en condiciones anaerobias cuando existe una mezcla de glucosa y glicerol o gliceraldehído. Sin embargo, cuando las células entran en fase estacionaria, la reuterina comienza a acumularse (Axelsson, 1990). En soluciones acuosas, esta puede presentarse en 3 formas: principalmente monomérica, hidratada monomérica y en una menor proporción un dímero cíclico; aunque no se sabe con certeza cual forma o combinación es biológicamente más activa (Talarico y Dobrogosz, 1989).

La reuterina posee un espectro muy amplio de actividad antimicrobiana. Se ha encontrado que posee actividad antibacteriana, antifúngica, antiprotozoica y antiviral (Axelsson *et al.*, 1989, Chung *et al.*, 1989) y esto puede ser explicado por su mecanismo de acción, ya que actúa contra enzimas sulfhidrilo. Se ha demostrado además, que puede ser un inhibidor del sitio de enlace-sustrato de la ribonucleótido reductasa y de este modo interfiere con la síntesis de DNA (Dobrogosz *et al.*, 1989).

2.10. Microorganismos patógenos de importancia en alimentos

Las bacterias o microorganismos patógenos se definen como aquellos que al ingresar a un hospedero, pueden causar enfermedad o daño. Algunos de estos patógenos pueden ser transmitidos por vía alimenticia. Las enfermedades que son transmitidas por los alimentos (ETA) son las que se aplican a las enfermedades que son adquiridas a través del consumo de

alimentos contaminados. Estos microorganismos pueden ser agrupados en aquellos que causan intoxicaciones y aquellos que pueden ocasionar infecciones (FAO, sin año).

2.10.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram-positiva, con forma bacilar, anaerobia facultativa, móvil mediante flagelos, la cual crece de manera adecuada a una temperatura de 37 °C, puede desarrollarse a la temperatura del cuerpo humano e inclusive a temperaturas de refrigeración, además de ser halotolerante y es una de las principales causas de muerte por ETA, debido a ello, ha sido estudiada ampliamente para ser controlada y erradicada.

Siete especies de *Listeria* son conocidas y de ellas, tanto *Listeria monocytogenes* como *Listeria ivanovii* son las que pueden ser patogénicas para humanos y rumiantes, respectivamente (Farber y Peterkin, 2000). *Listeria* afecta principalmente a la población que tiene una deficiencia en su sistema inmune, fundamentalmente celular o una enfermedad debilitante. Esta población típicamente son adultos mayores, gente con SIDA, e inclusive mujeres embarazadas pudiendo causar el aborto del feto.

2.10.3. *Escherichia coli*

Bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo, móvil por flagelos, no formador de esporas y es el organismo más común en el tracto intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas ya que colonizan el sistema digestivo y desempeñan inclusive papeles importantes en el mantenimiento de la fisiología intestinal. Sin embargo, algunas cepas son patógenas y pueden causar enfermedades gastrointestinales y algunas de ellas tienen la capacidad de producir enterotoxinas muy potentes. Los grupos más importantes son: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* adherente-difusa (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EA_gEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Doyle *et al.*, 1997).

2.10.4. *Salmonella*

Este género de bacterias pertenece a la familia Enterobacteriaceae; son bacilos Gram-negativos, no esporulados, anaerobios facultativos y que cuentan con movilidad gracias a los flagelos que poseen. Este género normalmente se caracteriza por ser muy resistente, ya que pueden sobrevivir por semanas en ambientes secos e inclusive meses en sistemas acuáticos.

La enfermedad infecciosa que es originada por este tipo de bacterias se conoce como salmonelosis, la cual es adquirida por la ingesta de alimentos o bebidas que estén contaminadas con alguno de los serotipos de este género. Los serotipos causantes de la enfermedad en humanos, generalmente lo hacen de manera invasiva y pueden llegar a ser mortales si no se es suministrado el tratamiento adecuado (WHO, 2016). Las tres formas clínicas más conocidas de salmonelosis son: fiebre entérica (*Salmonella enterica* ser. Typhi y ser. Paratyphi), gastroenteritis (*Salmonella enterica* ser. Typhimurium y ser. Enteritidis) e invasiva (*Salmonella enterica* ser. Cholerasius) (Romero, 2007).

2.10.5. Patógenos de cavidad oral

Existe una concentración muy alta de microorganismos que se desarrollan en la zona bucal de los seres humanos que pueden inclusive colonizar distintas partes de este nicho (placa dental, encías, tracto respiratorio, etc.).

La microbiota normal de la zona bucal, se encuentra formada principalmente por aquellos microorganismos que se encuentran tanto en la saliva como en la superficie de la cavidad oral. En un hospedero sano, se puede encontrar microbiota como cocos Gram-positivos (principalmente del género *Streptococcus*), bacterias anaerobias e inclusive especies de *Candida*, las cuales por lo general no causan algún tipo de daño; con excepción del momento en el que comienza a ocurrir una acumulación de estos, causando problemas de salud que inclusive pueden alcanzar tejidos más profundos y llegar al torrente sanguíneo. La microbiota total de la zona bucal se alcanza cuando se completa el desarrollo fisiológico del hospedero. La calidad y cantidad de microorganismos que componen esta microbiota varía de acuerdo a los factores que influyen en su distribución o su crecimiento (Wescombe *et al.*, 2012).

2.10.5.1. *Streptococcus mutans*

Es una bacteria Gram-positiva, con forma de coco y es considerado el microorganismo más cariogénico presente en la placa bacteriana; siendo el principal responsable del desarrollo del problema dental conocido como caries y teniendo un papel activo y continuo en el desarrollo de las primeras etapas de este padecimiento. Es un microorganismo tolerante a la acidez (acidúrico) y productor de ácido (acidógeno); permitiendo que el pH del medio en el que se desarrolla la bacteria tenga una reducción y la gran mayoría de las cepas son alfa-hemolíticos (Philips *et al.*, 2010).

La supervivencia de este microorganismo se ve favorecida gracias a las condiciones de alta concentración de sacarosa, el pH bajo y la alta proporción de las fuentes de carbono y nitrógeno presentes en la placa natural de los seres humanos (Carranza, 1968). La habilidad de *S. mutans* para adherirse y acumularse en la superficie de la placa dental, se da gracias a la síntesis de polisacárido extracelular, que aunado a la sacarosa, le permite adquirir las propiedades acidogénicas y acidúricas antes mencionadas, que involucran y permiten el desarrollo de este padecimiento (Murata *et al.*, 2010).

2.10.5.2. *Streptococcus oralis*

S. oralis es un microorganismo Gram-positivo, se ha encontrado en altas concentraciones en la boca y garganta de los seres humanos. Perteneció al grupo *viridans* y puede causar tanto placa dental como endocarditis. A pesar de que se considera una bacteria de poca virulencia, se ha observado que tiene una gran importancia clínica en procesos como bacteremias y en menor grado, en meningitis y neumonía.

Esta bacteria pertenece al grupo *viridans* y gracias a ello, se puede agrupar de acuerdo a su filogenia en el grupo *mitis*, el cual incluye además a especies orales comunes como *Streptococcus mitis* y *Streptococcus pneumoniae*; las cuales se ha observado que están muy relacionadas, pues exhiben >99% de homología en la secuenciación del gen rRNA 16S y son en ocasiones difíciles de diferenciar (Arbique *et al.*, 2004).

2.10.5.3. *Streptococcus salivarius*

S. salivarius es una bacteria que se encuentra principalmente en la boca de los seres humanos. Es la primera bacteria comensal que aparece en la cavidad oral de recién nacidos donde

coloniza las vías respiratorias superiores (Aas *et al.*, 2005). En la saliva, se encuentra típicamente a niveles de aproximadamente $1 \cdot 10^7$ UFC/mL y de acuerdo a los estudios realizados por Gibbons y Van Houte (1971) y Guglielmetti *et al.* (2010), se adhiere eficientemente a las células epiteliales orales y representa más del 50% de los estreptococos presentes en la lengua. En el hospedero saludable es extremadamente raro que pueda causar algún tipo de infección; esto debido a que inclusive algunas cepas son productoras de sustancias inhibitorias, como bacteriocinas, siendo una de las más estudiadas la cepa *S. salivarius* K12, la cual produce la salivaricina A y la salivaricina B, que ayudan a controlar e inhibir bacterias patógenas que pueden encontrarse en la cavidad oral (Tagg, 2004).

2.10.5.4. *Streptococcus mitis*

S. mitis poseen una forma tipo flecha, con una longitud aproximada de $0.5 \mu\text{m}$; estas crecen en pares o cadenas cortas. Al igual que *S. pneumoniae* contiene residuos de fosfatidilcolina en los ácidos teicoicos de su envoltura celular.

Se ha considerado generalmente como un estreptococo benigno y miembro de la flora comensal oral de los seres humanos. Sin embargo, *S. mitis* puede escapar de su nicho y causar una gran variedad de complicaciones infecciosas como endocarditis, bacteremia y septicemia (Mitchell, 2011) e inclusive está emergiendo como causa de infecciones del torrente sanguíneo en personas inmunocomprometidas.

Existe mucho acerca de la biología de este microorganismo que permanece desconocido. Es vital por ello estudiar la interacción de este con su hospedero humano y los demás miembros de la microbiota oral para entender como *Streptococcus mitis* realiza la transición de un estado comensal a uno patogénico (Mitchell, 2011).

3. Justificación

La aplicación del proceso conocido como fermentación es cada vez más recurrente en el campo de los alimentos; debido a que a lo largo de este procesamiento, las propiedades nutrimentales y fisicoquímicas del mismo están en un constante cambio, hasta lograr que contenga los elementos necesarios para poder extender un beneficio al consumidor y en estrecha relación a este, se encuentra el uso y aplicación de microorganismos con capacidad para llevar a cabo la producción de metabolitos antimicrobianos, los cuales son cada vez más estudiados para su uso potencial como conservadores naturales y como una barrera de defensa contra microorganismos indeseables en los alimentos evitando su presencia o su desarrollo y alargando la vida de anaquel de diferentes matrices alimentarias.

El pulque, es una bebida tradicional mexicana con raíces ancestrales, de la cual se han estudiado ampliamente sus características microbiológicas, nutrimentales y fisicoquímicas. Consumida principalmente en poblaciones rurales, gracias a su uso como complemento de la dieta diaria, sobre todo para aquellas de bajos recursos económicos. Se sabe que posee varias etapas de fermentación en las que se ven involucradas bacterias y levaduras principalmente, diversas especies de bacterias lácticas se han identificado y se ha observado que pueden producir compuestos antimicrobianos como bacteriocinas y otros de origen no proteico.

Los resultados obtenidos en esta investigación permitirán observar el comportamiento que tienen las cepas de BAL productoras de compuestos antimicrobianos frente a patógenos de importancia alimentaria y de esta forma, tener bases científicas para su utilización como una estrategia de conservación e inocuidad del pulque en su procesamiento artesanal e industrial.

4. Hipótesis

Si las bacterias ácido lácticas aisladas del pulque y aguamiel son capaces de producir compuestos antimicrobianos (proteicos y/o no proteicos), podrán inhibir a algunas bacterias patógenas de importancia en alimentos y/o de cavidad oral.

5. Objetivos

Objetivo General

Determinar si las cepas de BAL aisladas de pulque y aguamiel de una zona productora de Milpa Alta, Ciudad de México, son capaces de producir compuestos antimicrobianos de origen proteico y/o no proteico para inhibir bacterias patógenas de importancia en alimentos y de cavidad oral.

Objetivos particulares

- a) Determinar el potencial antimicrobiano de las cepas de BAL aisladas de pulque y aguamiel frente a bacterias patógenas y de cavidad oral por medio del método de difusión en agar.
- b) Verificar la naturaleza proteica de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas aisladas de pulque y aguamiel.
- c) Evaluar el antagonismo de las cepas aisladas de pulque y aguamiel que presenten actividad antimicrobiana frente a diferentes cepas de BAL identificadas.
- d) Analizar la interacción entre las BAL aisladas de pulque y aguamiel productoras de compuestos antimicrobianos y las bacterias patógenas y de cavidad oral que se vieron inhibidas, mediante una prueba de reto.
- e) Estudiar la interacción entre *Listeria monocytogenes* y las cepas de BAL aisladas de pulque y aguamiel productoras de compuestos antimicrobianos mediante pruebas *in situ* en aguamiel pasteurizado recolectado de la región de Huitzilac, Morelos.

6. Metodología

6.1. Microorganismos

6.1.4. Bacterias ácido lácticas (BAL)

La colección de 39 BAL empleadas en el presente estudio fueron aisladas e identificadas en un estudio previo de una región productora de Milpa Alta, Ciudad de México y se encontraban conservadas y almacenadas en caldo MRS con 20% de glicerol a una temperatura de -70 °C (Tabla 7) en el laboratorio 324 del conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

Tabla 7: Bacterias ácido lácticas (BAL) empleadas en el presente trabajo de investigación.

Clave	Origen* (alimento)	Procedencia	Clave	Origen* (alimento)	Procedencia	Clave	Origen* (alimento)	Procedencia
Fv-01	P/A	Milpa Alta	Fv-29	P/A	Milpa Alta	Fv-b28	P/A	Milpa Alta
Fv-15	P/A	Milpa Alta	Fv-b11	P/A	Milpa Alta	Fv-134	P/A	Milpa Alta
Fv-03	P/A	Milpa Alta	Fv-119	P/A	Milpa Alta	Fv-154	P/A	Milpa Alta
Fv-61	P/A	Milpa Alta	Fv-71	P/A	Milpa Alta	Fv-139	P/A	Milpa Alta
Fv-148	P/A	Milpa Alta	Fv-100	P/A	Milpa Alta	Fv-140	P/A	Milpa Alta
Fv-a16	P/A	Milpa Alta	Fv-115	P/A	Milpa Alta	Fv-163	P/A	Milpa Alta
Fv-a18	P/A	Milpa Alta	Fv-107	P/A	Milpa Alta	Fv-164	P/A	Milpa Alta
Fv-a28	P/A	Milpa Alta	Fv-97	P/A	Milpa Alta	Fv-151	P/A	Milpa Alta
Fv-158	P/A	Milpa Alta	Fv-109	P/A	Milpa Alta	Fv-146	P/A	Milpa Alta
Fv-a08	P/A	Milpa Alta	Fv-123	P/A	Milpa Alta	Fv-160	P/A	Milpa Alta
Fv-a88	P/A	Milpa Alta	Fv-122	P/A	Milpa Alta	Fv-129	P/A	Milpa Alta
Fv-a11	P/A	Milpa Alta	Fv-105	P/A	Milpa Alta	Fv-a141	P/A	Milpa Alta
Fv-b18	P/A	Milpa Alta	Fv-150	P/A	Milpa Alta	Fv-b141	P/A	Milpa Alta

*P/A: Pulque y aguamiel

6.1.5. Microorganismos indicadores.

Con el objetivo de observar la posible producción de bacteriocinas o compuestos antimicrobianos de origen no proteico de las BAL, se emplearon las bacterias indicadoras que se presentan en la Tabla 8. Se evaluaron tanto Gram negativas como positivas y se conservaron en caldo BHI (OXOID) al 20% de glicerol a una temperatura de -70 °C.

Tabla 8: Cepas indicadoras y de cavidad oral empleadas en el presente trabajo de investigación.

Especie	Clave	Especie	Clave
<i>L. monocytogenes</i>	CFQ-103	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
<i>S. enterica</i> Typhimurium	ATCC 14028	<i>Streptococcus oralis</i>	FM ¹
<i>Listeria innocua</i>	Ceparío FQ	<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 10449
<i>Streptococcus mitis</i> ²	FM	<i>Streptococcus salivarius</i> ²	Sin clave
<i>Escherichia coli</i> O8:H10	Ceparío Lab. 324	<i>Escherichia coli</i> O88:H25	Ceparío Lab. 324
	Control [+] de <i>Lactococcus lactis</i> para <i>L. monocytogenes</i> ³		A-45212

1: Cepa de caso clínico, Facultad de Medicina, UNAM., 2: Cepa, Facultad de medicina, UNAM

3: Cepa usada como control positivo (Maldonado, 2016) para pruebas de difusión en agar con *Listeria monocytogenes*.

6.2. Reactivación y comprobación de pureza de cepas

La reactivación de las cepas, tanto de las BAL como de los microorganismos indicadores (Tavera, 2010; Maldonado, 2016), se realizó en 5 mL de medio MRS Difco™ y en 5 mL de medio BHI OXOID® respectivamente; partiendo de las cepas conservadas en medio MRS/BHI con glicerol al 20% a -70 °C. Se inoculó un volumen de 50 µL, en el caso de aquellas cepas conservadas en medio líquido, mientras que las cepas conservadas en perlas de vidrio se empleó solo una de estas para la reactivación y las condiciones de incubación para las cepas de BAL fueron de 30 °C/24h, mientras que para los patógenos fue de 37 °C/24 h. Para determinar la pureza de las cepas se realizó una tinción de Gram tanto para las cepas de BAL como para las indicadoras, buscando una uniformidad u homogeneidad en su morfología y Gram al observarse al microscopio (Figura 6).

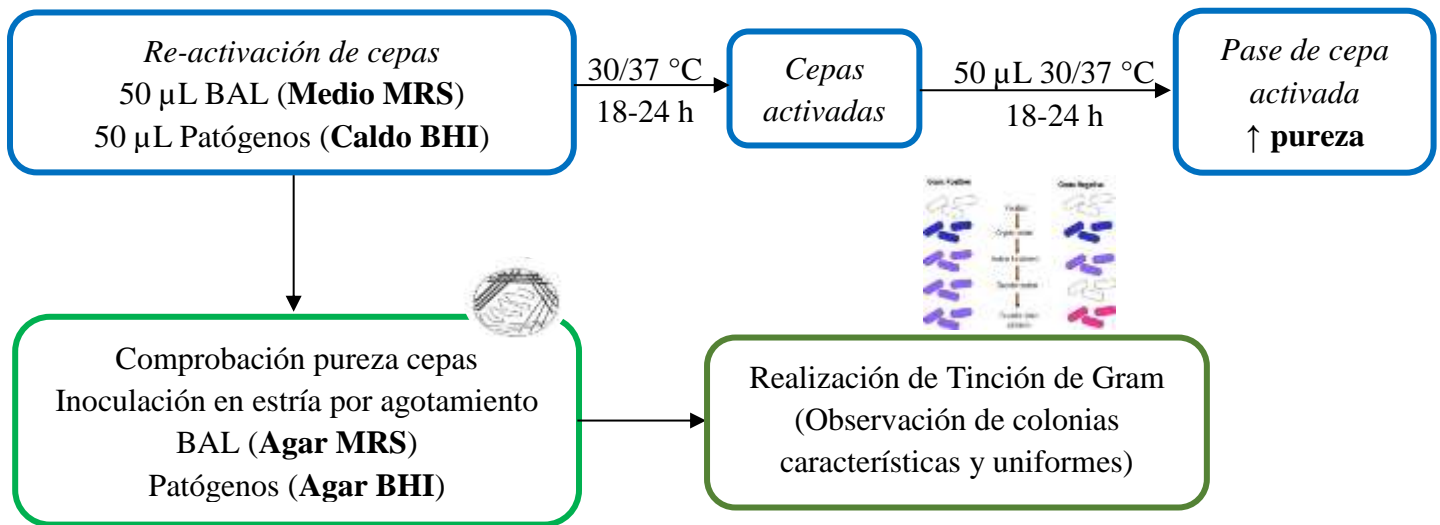


Figura 6: Metodología empleada para re-activación y comprobación de pureza de cepas

6.3. Conservación de las cepas lácticas y patógenas

Para realizar la conservación de las cepas, se inoculó una colonia de cada una de ellas en 5 mL de medio MRS y medio BHI para BAL y microorganismos indicadores respectivamente; estos cultivos se incubaron durante 24 h a 30 °C para BAL y 37 °C para las bacterias patógenas y se separaron posteriormente las células del medio de cultivo, empleando 1 mL de cada cultivo, contenidos en un microtubo de 1.5 mL y centrifugándolos a 8000 rpm durante un lapso de 10 minutos y se realizó por dos veces más. El pellet de células fue lavado con 1 mL de solución salina al 0.85% para enseguida volver a separarlas por centrifugación. Una vez obtenidas las células lavadas, se resuspendió el pellet en medio MRS o BHI con glicerol al 20% de acuerdo al tipo de cultivo y finalmente transferirlo a un criotubo para ser almacenado en un ultracongelador marca Puffer HubbardTM a -73 °C, tal y como se representa en la Figura 7.

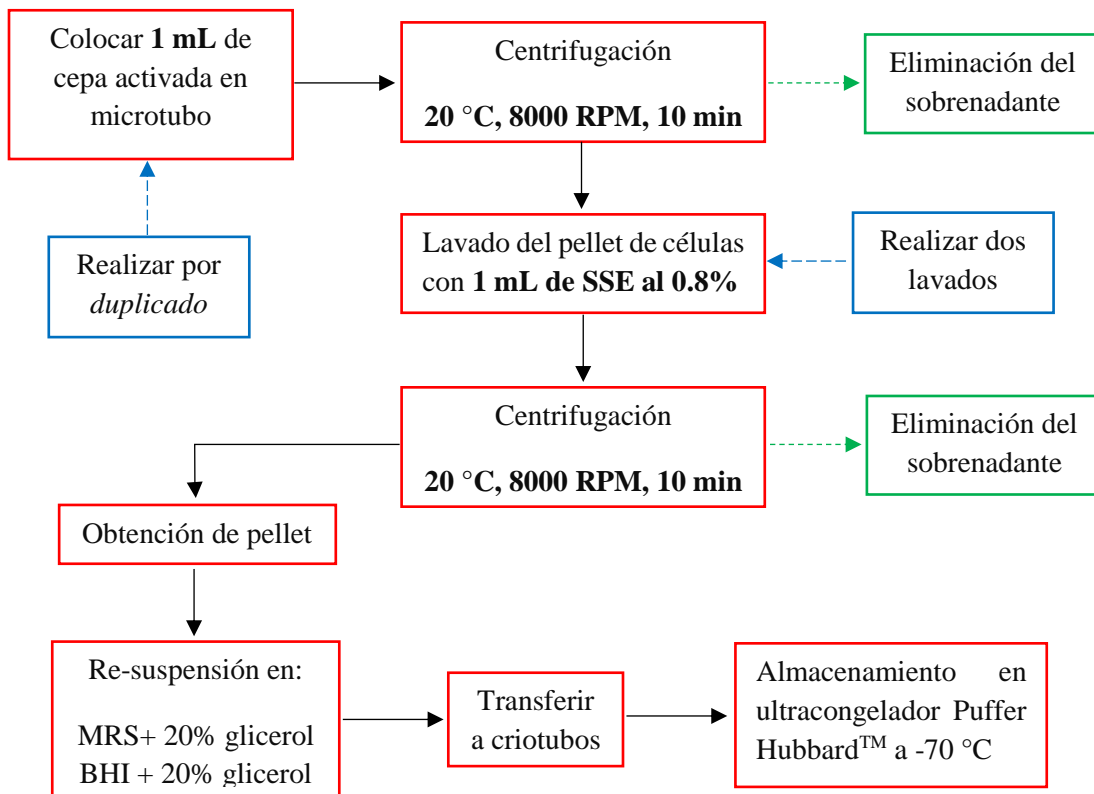


Figura 7: Metodología empleada para la conservación de cepas.

6.4. Obtención de sobrenadantes

Tras ser reactivadas las cepas de BAL en 5 mL de medio MRS, se preparó un segundo cultivo de las cepas con las mismas condiciones, al terminar el tiempo de incubación, se tomaron alícuotas de aproximadamente 1 mL y se colocaron en microtubos de 1.5 mL; se centrifugaron a 8000 RPM por 10 minutos en una centrífuga Eppendorf 5417R para separar así las células (pellet) del medio de cultivo. El sobrenadante obtenido se transfirió entonces a otro microtubo y se conservó en refrigeración (4-5 °C) para realizar pruebas a corto plazo tales como el tratamiento térmico y/o enzimático y llevar a cabo las pruebas de difusión en agar para la detección de actividad antimicrobiana.

6.5. Preparación de medio Infusión cerebro-corazón amortiguado (BHI-A). Método de difusión en agar.

La elaboración de este medio tamponado se realizó con el fin de eliminar el efecto inhibitorio que podría presentarse por los ácidos orgánicos producidos por las BAL. La composición tanto de la placa como la sobrecapa, así como las condiciones de preparación se presentan a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9: Composición del medio BHI-Amortiguado (1000 mL).

Medio BHI amortiguado			
PLACA	g/L	SOBRECAPA	g/L
Fosfato de sodio monobásico (J. T. BAKER)	4.3	Fosfato de sodio monobásico (J. T. BAKER)	4.0
Fosfato de sodio dibásico (J. T. BAKER)	10.0	Fosfato de sodio dibásico (J. T. BAKER)	10.0
Agar bacteriológico (OXOID)	17.0	Agar bacteriológico (OXOID)	8.0
Caldo BHI (OXOID)	37.0	Agar BHI (OXOID)	15.0
Condiciones: Esterilización: 121 °C por 15 minutos Verter ≈18 mL en placas y enfriar, incubar a 30 °C por 24 horas para prueba de esterilidad.		Condiciones: Verter ≈10 mL en tubos con tapón de rosca, esterilizar (121 °C/15 lb de presión por 15 minutos).	

6.6. Preparación de cepas indicadoras y de cavidad oral

Todas las cepas de microorganismos indicadores utilizadas para las pruebas de difusión en agar fueron previamente re-activadas (tal como se describió previamente) en días previos a la realización de la misma y las condiciones utilizadas para cada uno se presentan a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10: Condiciones de uso para pruebas de difusión en agar de microorganismos patógenos y de cavidad oral.

Microorganismo	Tiempo de incubación (h)	Dilución empleada en prueba	Inóculo en sobrecapa (µL)	Tiempo de incubación de prueba (h)
<i>L. monocytogenes</i>	6	10 ⁻²	50	18-24
<i>S. enterica</i> Typhimurium	24	10 ⁻⁴	50	18-24
<i>Listeria innocua</i>	6	10 ⁻²	50	18-24
<i>Escherichia coli</i> O8:H10	24	10 ⁻³	50	18-24
<i>Escherichia coli</i> O88:H25	24	10 ⁻³	50	18-24

<i>Bacillus cereus</i>	24	10 ⁻³	50	18-24
<i>Streptococcus oralis</i>	48	10 ⁻¹	50	18-24
<i>Streptococcus mutans</i>	24	10 ⁻²	50	18-24
<i>Streptococcus salivarius</i>	24	10 ⁻¹	50	18-24
<i>Streptococcus mitis</i>	24	10 ⁻²	50	18-24

Tomada y modificada de (Llanos, 2015) y (Maldonado, 2016)

6.7. Preparación de BAL para pruebas de antagonismo.

Se emplearon 5 cepas de BAL, almacenadas en congelación a -70 °C, pertenecientes a la colección del laboratorio 324 del edificio E de la Facultad de Química; las cuales fueron re-activadas en 5 mL de medio MRS con inóculos de 50 µL. Las condiciones usadas de los cultivos de BAL para las pruebas de antagonismo se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11: Condiciones de Bacterias Ácido Lácticas usadas en pruebas de antagonismo.

BAL	Clave de cepa*	Tiempo de incubación (h)	Dilución empleada	Inóculo en sobrecapa (µL)	Tiempo de incubación de prueba (h)
<i>Weissella paramesenteroides</i>	BAL-06	18-20	Directo, 10 ⁻¹	50	18-24
<i>Streptococcus</i> spp.	BAL-11	18-20	10 ⁻²	50	18-24
<i>Lactococcus lactis</i>	BAL-54	18-20	Directo, 10 ⁻¹	50	18-24
<i>Lactobacillus pentosus</i>	BAL-80	18-20	Directo, 10 ⁻¹	50	18-24
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	BAL-73	18-20	Directo, 10 ⁻¹	50	18-24

*Las cepas pertenecen a la colección de BAL del laboratorio 324

6.8. Prueba de difusión en agar

Para el método conocido como difusión en agar, se emplearon torres de vidrio para obtener la formación de pozos en el medio de cultivo, los cuales se emplearon para la inoculación de los sobrenadantes de las cepas de BAL. En primer lugar, se colocaron las torres en la capa del medio tamponado, posteriormente se fundió la sobrecapa y se inoculó con 40 μL de la dilución correspondiente de cada bacteria indicadora, según el microorganismo a emplear, tal y como se muestra en la Tabla 10. Una vez inoculada la sobrecapa con el microorganismo indicador, se vertió sobre la placa del medio tamponado, evitando un posible derrame del medio de cultivo en la parte central de las torres, con el propósito de que la formación de los pozos se lleve a cabo correctamente. Una vez que la sobrecapa se enfrió y se solidificó, se retiraron las torres de vidrio con ayuda de unas pinzas de metal (previamente esterilizadas). En cada pozo se inocularon 80 μL del sobrenadante de cada cepa de las BAL. Por último, se incubaron a 37°C y transcurridas las 24 horas, se reportan los halos de inhibición, tal y como se aprecia en la Figura 8.

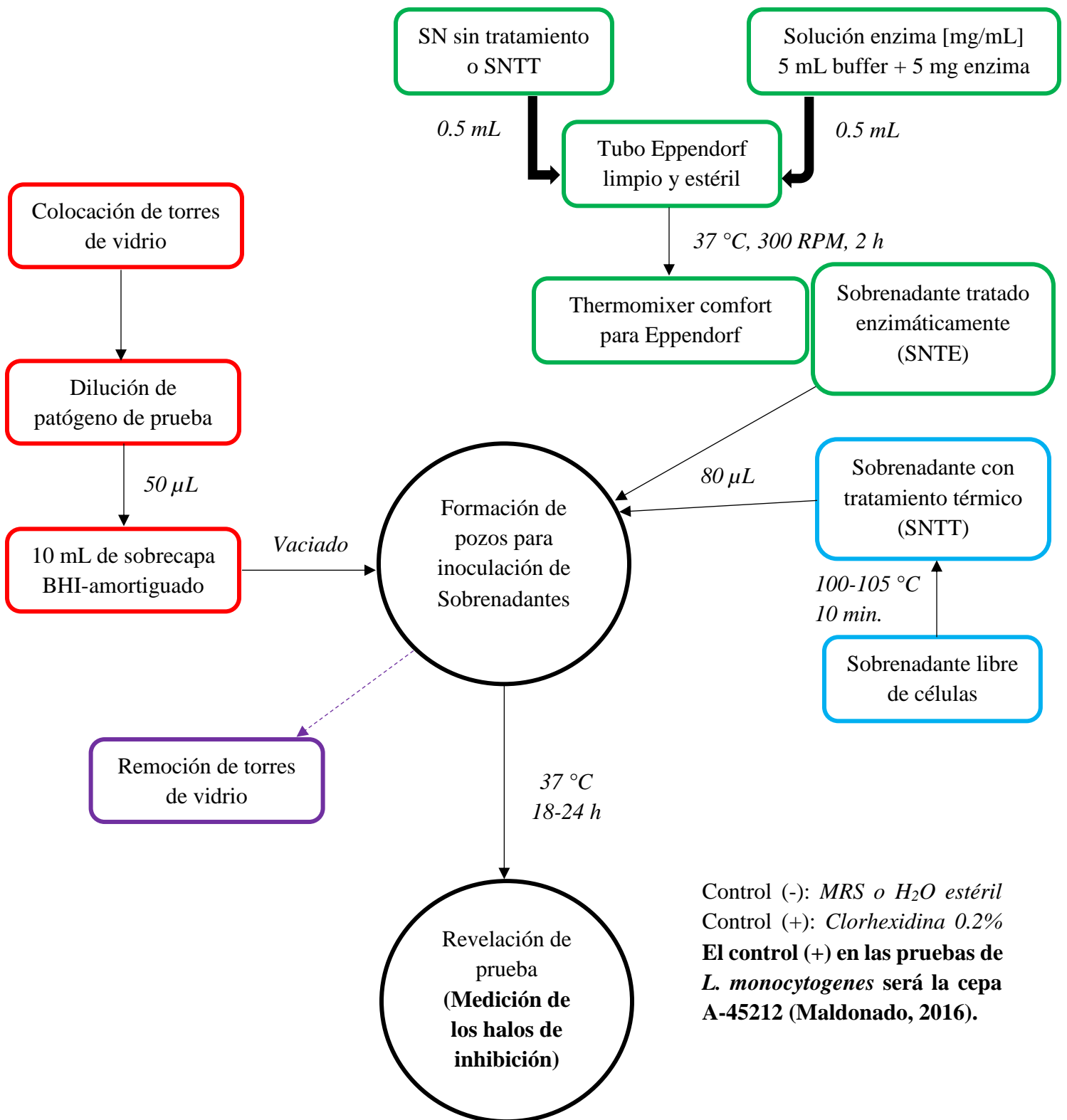


Figura 8: Metodología empleada para los ensayos de difusión en agar empleando sobrenadantes sin tratamiento (SN), neutralizados, tratados térmicamente (SNTT) y sobrenadantes neutralizados, tratados enzimáticamente (SNTE) empleando los diferentes microorganismos indicadores.

6.9. Tratamiento de sobrenadantes y prueba de actividad antimicrobiana

6.9.4. Neutralización de los sobrenadantes y tratamiento térmico

Los sobrenadantes de las cepas de BAL que presentaron actividad antimicrobiana se neutralizaron empleando NaOH 0.1 N hasta alcanzar un pH de 8.0, para posteriormente someterlos a un tratamiento térmico, aplicando una temperatura de 100-105 °C por 10 minutos.

6.9.5. Determinación de la posible naturaleza proteica de las sustancias similares a bacteriocinas producidas por las BAL

Únicamente las cepas que mantuvieron su actividad tras aplicarles el tratamiento térmico, se sometieron a un tratamiento con 4 diferentes enzimas, con el propósito de comprobar si los compuestos producidos pueden ser de origen proteico: una proteasa de *Bacillus licheniformis*, una proteasa de *Streptomyces griseus* (Pronasa E), tripsina aislada de páncreas porcino y una α -quimotripsina (todas de la marca Sigma-Aldrich®; las características de estas enzimas se muestran en el anexo B). Las condiciones para cada una de las enzimas se describen en la Tabla 12. Tras realizar el tratamiento enzimático, se emplearon pruebas de difusión en agar para observar la posible actividad antimicrobiana, reportando los halos de inhibición, tal y como se aprecia en la Figura 9.

Tabla 12: Condiciones de los ensayos enzimáticos para determinación de la naturaleza proteica del compuesto antimicrobiano presente en el sobrenadante de BAL.

Enzima	Tiempo de incubación	Agitación	Temperatura de incubación	Relación de volumen
Proteasa	2 h	300 rpm	37 °C	0.5 mL del SNTT* + 0.5 mL solución de enzima (1 mg/mL)
Pronasa E	2 h	300 rpm	37 °C	
Tripsina	2 h	300 rpm	37 °C	
α -quimotripsina	2 h	300 rpm	37 °C	

*SNTT: Sobrenadante tratado térmicamente

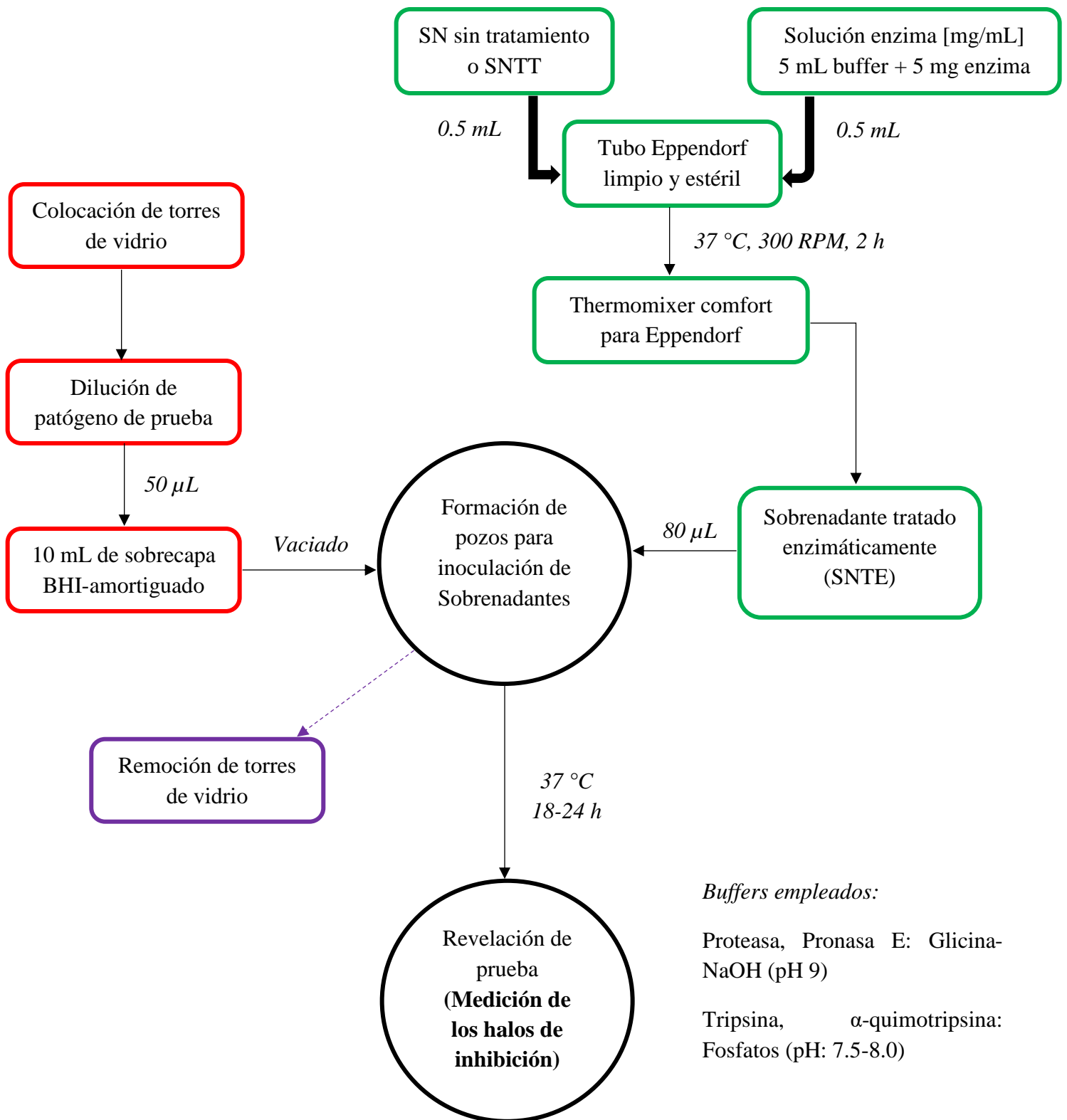


Figura 9: Metodología empleada para tratamientos con proteasas en el sobrenadante tratado térmicamente (SNTT) de la cepa de BAL que presentó actividad antimicrobiana.

6.10. Pruebas de reto de BAL vs microorganismos indicadores en medio MRS.

6.10.4. Selección de microorganismos

El experimento se realizó con la cepa Fv-15, la cual fue la única que presentó actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* y otros de los patógenos mencionados en la sección 6.6 al realizar pruebas de difusión en agar. De igual forma se empleó esta cepa de BAL debido a que al aplicar el tratamiento térmico al sobrenadante, la actividad antimicrobiana se mantuvo.

6.10.5. Concentración de microorganismos a emplear en la prueba

La cantidad de inóculo y la dilución adecuada a utilizar tanto de los microorganismos indicadores, como la cepa de BAL Fv-15, se presentan en la tabla 13.

Tabla 13: Condiciones de los microorganismos indicadores y la cepa Fv-15 (BAL) empleadas en las pruebas de reto.

Microorganismo	Cepa Fv-15	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>E. coli</i> O88:H25	<i>E. coli</i> O8:H10
Medio de cultivo	MRS	BHI	BHI	BHI	BHI	BHI	BHI
Volumen (medio)	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Medio de plaqueo	MRS	Oxford	Agar Sangre	Agar Sangre	Agar Sangre	BHI/McConkey	BHI/McConkey
Volumen de inóculo (μL)	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
Concentración (UFC/mL)	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴

6.10.6. Prueba de reto en medio MRS

Una vez que se prepararon los inóculos de la BAL y los microorganismos indicadores tal y como se describe en la Tabla 13, se inocularon 4 matraces Erlenmeyer con 100 mL de medio, tal como se describe a continuación:

- I. Control negativo: Matraz con medio estéril.
- II. Control positivo (para BAL): Matraz con BAL cepa Fv-15 (medio MRS).
- III. Control positivo (para microorganismo indicador): Matraz con el microorganismo patógeno o de cavidad oral a probar (medio BHI).
- IV. Cultivo mezcla: Matraz con Cepa Fv-15 y microorganismo indicador (medio MRS)

Los matraces antes mencionados se incubaron a 30/37 °C (control positivo BAL, control positivo indicador, mezcla y negativo respectivamente) por 48 h. El seguimiento del crecimiento se llevó a cabo en los tiempos 0, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24 y 48h, evaluándose por medio de la técnica de cuenta en placa y midiéndose además el pH con un potenciómetro Oakton pH700, tomando 5 mL de cada cultivo. La metodología completa se esquematiza en la Figura 10 y las especificaciones de crecimiento para cada microorganismo empleado, se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14: Evaluación del crecimiento de BAL y bacterias indicadoras en las pruebas de reto en medio MRS.

Microorganismo/Medición	Cuenta en placa	Medio de cultivo	Rango estadístico
BAL cepa Fv-15	Colonias blancas, convexas, redondas y brillantes. (MRS) y colonias transparentes, brillantes, sin hemólisis (agar sangre)	Agar MRS	25-250
<i>Listeria monocytogenes</i>	Colonias negras con halo negro	Agar Oxford	5-150
<i>E. coli</i> (Enteropatógena)	Colonias rosas, convexas y brillantes	McConkey	15-200
<i>E. coli</i> (Enterotoxigénica)	Colonias rosas, convexas y brillantes	McConkey	15-200
<i>Streptococcus mutans</i>	Colonias blanquecinas, redondas, no presentan hemólisis.	Agar Sangre	10-200
<i>Streptococcus salivarius</i>	Colonias blanquecinas, pequeñas, con hemólisis α .	Agar Sangre	10-200
<i>Streptococcus oralis</i>	Colonias marrón, muy pequeñas, con hemólisis α .	Agar Sangre	10-200

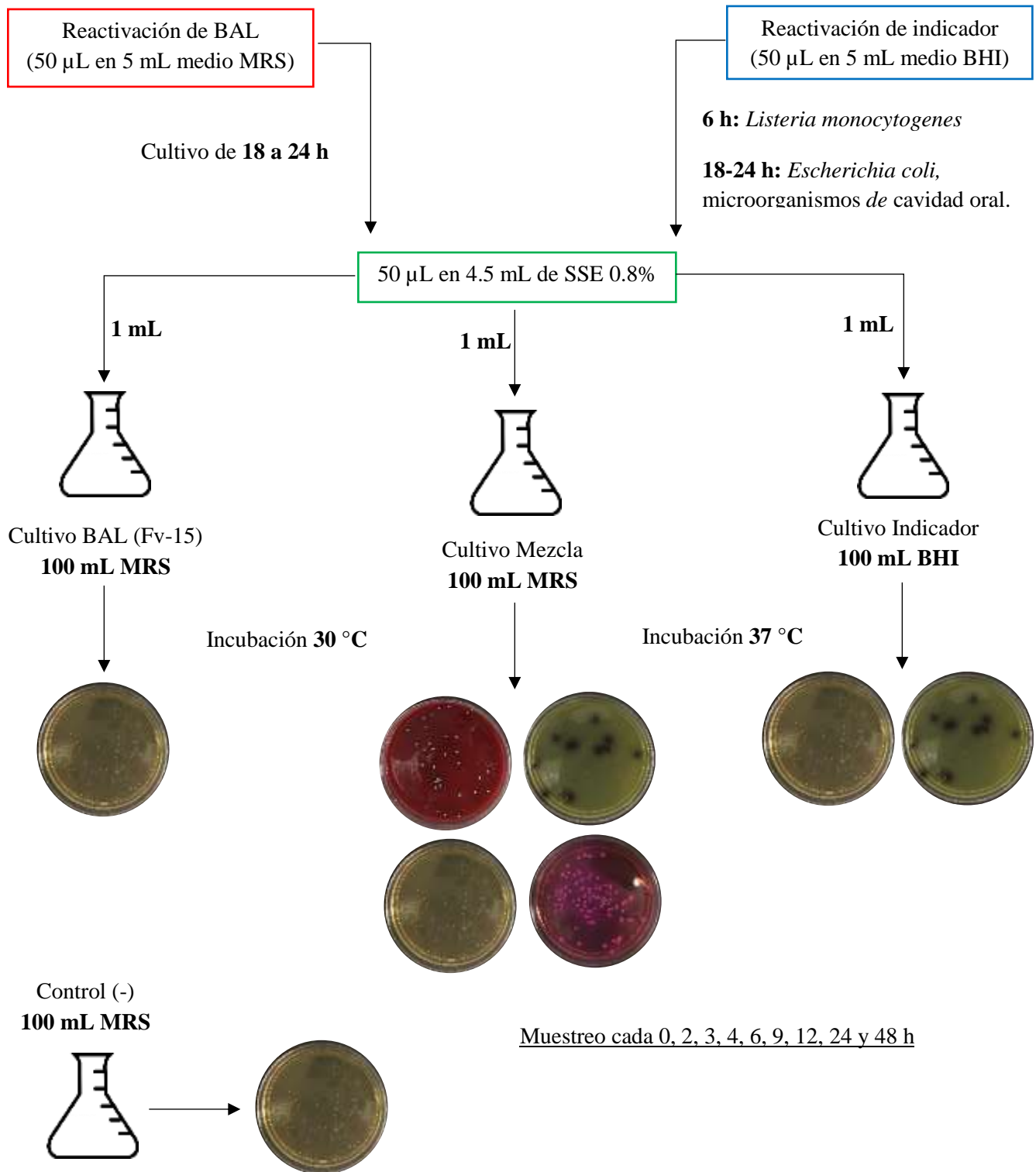


Figura 10: Prueba de reto de la cepa BAL Fv-15 (productora de compuestos antimicrobianos) frente a los microorganismos indicadores en medio MRS.

6.11. Prueba de reto de *Listeria monocytogenes* frente a BAL en aguamiel pasteurizado

Tras realizar las pruebas de reto en medios óptimos de crecimiento para la cepa Fv-15 de BAL y los microorganismos indicadores para la posible respuesta de los compuestos antimicrobianos, se acudió a la zona productora de aguamiel de Huitzilac en el estado de Morelos, de donde se obtuvieron aproximadamente 5 L de aguamiel fresco, los cuales fueron transportados cuidando la cadena de frío hasta llegar al laboratorio. Se pasteurizó el aguamiel con las siguientes condiciones: 62-65 °C por 30 minutos en un pasteurizador Elecrem Modelo D9000. El aguamiel pasteurizado se almacenó en bolsas Ziploc en condiciones de congelación hasta su uso. Previo a la realización de las pruebas de reto, el aguamiel fue descongelado y neutralizado hasta un pH de 6.0. La metodología empleada para la prueba de reto fue similar a la mencionada previamente en la sección 6.10.3 (Figura 11).

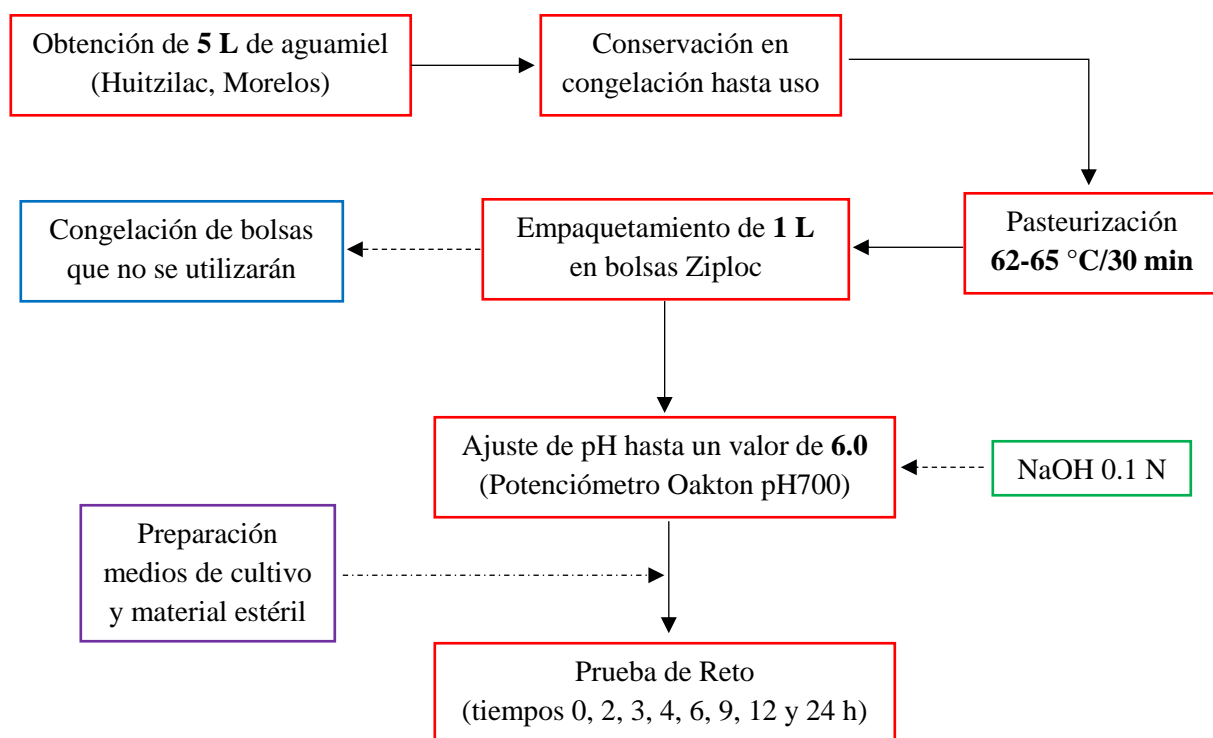


Figura 11: Metodología para realizar las pruebas de reto entre la cepa de BAL (Fv-15) y *Listeria monocytogenes* en aguamiel pasteurizado y neutralizado.


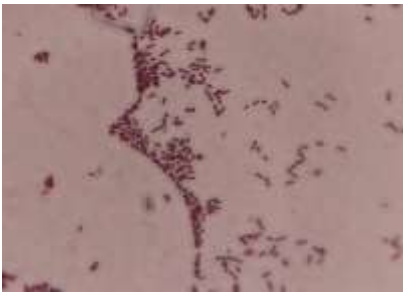

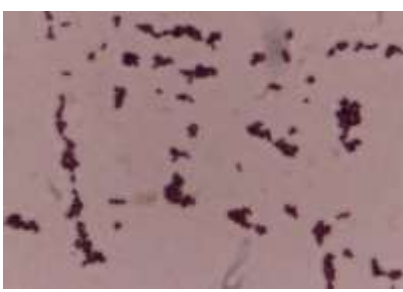
7. Resultados y discusión

7.1. Reactivación y comprobación de pureza de cepas.

a) *Bacterias ácido lácticas (BAL)*

Al conjunto de bacterias ácido lácticas (Tabla 7) se les determinó su pureza por medio de la observación de sus características macro y microscópicas. Se reactivaron de acuerdo con la sección 6.2, posteriormente, se inocularon en cajas de agar MRS mediante siembra por agotamiento y se incubaron a 30 °C por 24 h. De manera general, dentro de las características macroscópicas (desarrollo en cajas Petri) se observaron colonias homogéneas, de tamaño pequeño a mediano, convexas, circulares, de color crema; mientras que microscópicamente (por medio de una tinción de Gram) se observó una morfología clásica de coco y coco-bacilo, Gram (+), sin agrupaciones características y homogéneas (uniformes), confirmándose así su pureza, previo a su utilización en los experimentos. En la Tabla 15 se ejemplifican los resultados obtenidos para el caso de dos cepas de BAL.

Tabla 15: Comprobación de pureza de cepas de BAL, se presentan resultados de la cepa Fv-15 y Fv-148 (de arriba abajo).

Vista en caja	Tinción de Gram	Descripción
		Colonias aisladas muy pequeñas (medio sólido) color crema; mientras que en la tinción se aprecia una morfología clásica de coco-bacilo, que pueden presentar las BAL, Gram (+) con un crecimiento homogéneo.
		Abundantes colonias color crema aisladas, convexas y de borde redondo en el medio MRS; mientras que en la tinción se aprecia otra morfología clásica de las BAL, cocos. Gram (+) con crecimiento homogéneo.

b) *Microorganismos indicadores*

Para el caso de los microorganismos indicadores empleados, igualmente como se muestra en la sección 6.2, se inocularon en cajas con agar BHI, donde macroscópicamente todas mostraron un desarrollo similar, presentando colonias circulares, convexas, de coloración amarillo pálidas, de borde redondo, de tamaño medio; mientras que microscópicamente se observaron Gram positivas y negativas; en la Tabla 16 se presentan condensadas estas características. Además de estas observaciones macro y microscópicas y de acuerdo con trabajos previos (Tavera, 2008; Llanos, 2015; Maldonado, 2016); se realizaron cinéticas de crecimiento para los indicadores empleados en pruebas de reto. En el caso de *L. monocytogenes* se incubó por seis horas, con el propósito de asegurar su adecuado crecimiento y mantenerlo en un estado fisiológico activo, ya que si se cultiva en fase estacionaria podría desarrollar una mayor resistencia.

Tabla 16: Características microscópicas observadas de los microorganismos indicadores

Microorganismo	Morfología	Gram	Observaciones
<i>Listeria monocytogenes</i>	Bacilos	Positivo	Morfología y tinción homogéneas, comprobación de pureza previo a su utilización.
<i>Listeria innocua</i>	Bacilos	Positivo	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Bacilos largos	Negativo	
<i>Bacillus cereus</i>	Bacilos largos	Positivo	
<i>Escherichia coli</i> (EPEC)	Bacilos cortos	Negativo	
<i>Escherichia coli</i> (ETEC)	Bacilos cortos	Negativo	
<i>Streptococcus mutans</i>	Cocos	Positivo	
<i>Streptococcus oralis</i>	Cocos	Positivo	
<i>Streptococcus salivarius</i>	Cocos	Positivo	
<i>Streptococcus mitis</i>	Cocos	Positivo	

7.2. Conservación de cepas BAL e indicadoras.

Tras realizar la comprobación de pureza de las cepas, se llevó a cabo la conservación de 5 BAL, Fv-01, Fv-15, Fv-03, FV-61 y Fv-148; además de los microorganismos indicadores *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *Salmonella* Typhimurium, en caldo MRS con 20% de glicerol y caldo BHI con 20% de glicerol respectivamente; además de la cepa A-45212 (control positivo para *L. monocytogenes* en pruebas de reto); estos crio-viales se almacenaron en el ultracongelador Puffer-Hubbard a -70 °C empleando la metodología establecida en la sección 6.3.

7.3. Pruebas de difusión en agar con sobrenadantes no neutralizados y sin tratamiento térmico.

Se realizaron pruebas de difusión en agar con las 39 cepas de BAL provenientes de pulque y aguamiel de la zona de Milpa Alta, Ciudad de México; de las cuales únicamente la cepa Fv-15, obtuvo resultados positivos, halos de inhibición, en contra de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y algunos microorganismos de cavidad oral Gram positivos (fotografías anexo B) (halos de inhibición en tabla 17); debido probablemente a que las bacteriocinas llevan a cabo su actividad con una alta eficiencia frente a bacterias que estén estrechamente relacionadas (Cotter *et al.*, 2005).

Se observaron halos transparentes, de aproximadamente 1 mm para el caso de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* y de un rango de 3 a 5 mm en el caso de algunas de las cepas de cavidad oral y estos resultados se presentan de manera condensada en la Tabla 17. La diferencia principal en la obtención de un halo transparente o uno opaco, radica en el efecto bactericida o bacteriostático (respectivamente) que pueda presentar el sobrenadante en la prueba de difusión en agar (Daba *et al.*, 1991). La formación de estos halos de inhibición indica un efecto antimicrobiano que no está relacionado con el bajo pH del medio, posible producción de ácidos orgánicos, debido a que al emplearse un medio tamponado como el BHI-amortiguado, se lleva a cabo la regulación del pH y la actividad mostrada fue gracias a compuestos de origen proteico como las bacteriocinas (Daba *et al.*, 1991).

Con respecto a las pruebas de difusión realizadas con *Bacillus cereus* (bacteria Gram positiva), *Salmonella enterica* Typhimurium y dos cepas de *Escherichia coli*, ninguna de las

cepas de BAL presentó algún tipo de actividad (bactericida o bacteriostática) frente a estas, esto probablemente a que son muy pocas las ocasiones en las que se observa una inhibición contra bacterias Gram negativas. Tal es el caso de la acidolina, la cual fue aislada de cepas de *Lb. acidophilus* 2181, la cual presentó actividad frente a un amplio número de microorganismos Gram positivos y negativos, incluyendo enteropatógenos y formadores de esporas (Mikolajcik & Hamdan, 1975) o el caso de la bacteriocina L23, producida por *Lactobacillus fermentum* L23, la cual inhibió el crecimiento de *K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. vulgaris* (Pascual *et al.*, 2008).

No existió una inhibición de los sobrenadantes de las cepas de BAL contra bacterias indicadoras Gram negativas, debido principalmente a que poseen diversos mecanismos o propiedades como lo puede ser su carga o estructura de los componentes de membrana externa, así como los mecanismos de transporte, flujo y degradación de péptidos que llevan a cabo (Devine, 2003). Además, la actividad antimicrobiana de las posibles bacteriocinas, dependerá en gran medida de cuál tipo se trate, esto debido a que en las clasificaciones establecidas, existen algunos de estos metabolitos primarios que requieren de alguna otra sustancia para aumentar su actividad o inclusive como ya se mencionó anteriormente, hay algunas que actúan únicamente frente a bacterias de la misma especie o género (Monroy *et al.*, 2009; Zacharof *et al.*, 2012).

Con respecto a las pruebas de difusión en agar realizadas frente a las cepas de cavidad oral, únicamente se presentaron resultados negativos para el caso de *Streptococcus mitis* y *Streptococcus mutans*. En el caso de *Streptococcus mitis*, se ha reconocido como el causante líder de endocarditis y bacteremia infectiva (Mitchell, 2011), y de acuerdo con los reportes emitidos de protección a la salud en el caso de países como Inglaterra, Gales e Irlanda del Norte (HPA, 2009), algunas de las cepas aisladas de pacientes con estas enfermedades, son resistentes a antibióticos comunes. Bochud y colaboradores (1997), describen que los pacientes que presentan este tipo de enfermedades, son causadas por las cepas comensales presentes en la cavidad oral. Debido a todo lo antes mencionado, pudo observarse un crecimiento homogéneo, pero abundante, en todo el medio de la prueba, no permitiendo que alguno de los sobrenadantes de las cepas de BAL pudieran llevar a cabo la inhibición por compuestos antimicrobianos, como es el caso de las bacteriocinas. Mientras que en el caso

de *Streptococcus mutans*, no se logró una inhibición posiblemente porque *S. mutans* produjo una biopelícula, la cual le permitió fijarse y le confirió una gran resistencia a compuestos antimicrobianos, incluyendo los de origen proteico (Herzberg *et al.*, 1982; Little *et al.*, 1978).

Tabla 17: Resultados de las pruebas de difusión en agar del sobrenadante de la cepa Fv-15, frente a *L. monocytogenes* y bacterias de cavidad oral (cada una se realizó por duplicado).

Microorganismo indicador	Cepa Fv-15	
	Halo (mm)	Observaciones
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.0	Halo transparente
<i>Listeria innocua</i>	1.0	Halo transparente
<i>Streptococcus mutans</i>	-----	-----
<i>Streptococcus mitis</i>	-----	-----
<i>Streptococcus oralis</i>	5.0	Halo transparente
<i>Streptococcus salivarius</i> (Cepario, Facultad de Química)	2.0	Halo transparente
<i>Streptococcus salivarius</i> (Cepa caso clínico, Facultad de Medicina)	4.0	Halo transparente





Es importante mencionar que *L. monocytogenes* es reconocido como un importante patógeno transmitido en alimentos al poder sobrevivir condiciones extremas de temperatura, pH, concentraciones de sal, entre otras, tanto en las materias primas como en los productos finales y es por ello que deben tomarse medidas para minimizar la contaminación en los alimentos (Harris *et al.*, 1989). Por lo anterior, se ha observado que los métodos tradicionales de conservación de alimentos no previenen o erradican en su totalidad su crecimiento y gracias a la demanda de los consumidores de métodos más novedosos y naturales, el uso de BAL productoras de bacteriocinas como cultivos iniciadores e inclusive como aditivos alimentarios, puede ser favorable para lograr el control de este patógeno en alimentos procesados y por lo tanto contribuir a la inocuidad y seguridad alimentaria.

7.4. Pruebas de difusión en agar para observar el antagonismo de BAL aisladas de pulque y aguamiel frente a BAL de género y especie conocida.

Se tomó el sobrenadante de la cepa Fv-15 de BAL, que fue la única que presentó actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* y algunas cepas de cavidad oral, para observar su predominancia o antagonismo frente algunas otras BAL que puedan estar presentes en este proceso de fermentación que experimenta el pulque y el aguamiel.

De las cinco especies de BAL probadas, cuatro: *Weissella paramesenteroides*, *Streptococcus* spp., *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus pentosus* se vieron inhibidas por la presencia de sustancias antimicrobianas presentes en el sobrenadante del cultivo de la cepa Fv-15, la cual fue identificada en un estudio previo como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Los compuestos antimicrobianos generados por la cepa Fv-15, sin importar si son de origen proteico o no, pueden llevar a cabo la inhibición de cepas de bacterias que estén estrechamente relacionadas a esta (Monroy *et al.*, 2009), por lo que al tratarse de una cepa de BAL Gram positiva, no esporulada, no móvil y catalasa negativa, pudo inhibir a estas especies de BAL que comparten las mismas características que la cepa BAL productora. Además, tal y como se observa en la Tabla 18, los halos de inhibición oscilaron entre 4 y 6 mm y esta variación posiblemente se debió a que a pesar de que todas son bacterias ácido lácticas y basándonos en el árbol filogenético de este grupo de microorganismos, la relación más estrecha es entre el género *Streptococcus* y el género *Lactococcus* (cepa Fv-15) y se esperaba entonces que en este se tuviera el halo de inhibición más grande; sin embargo fue en el caso de *Lactobacillus pentosus* del cual se obtuvo un halo de 6 mm. Para el caso de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, no se observó crecimiento en la capa en el medio tamponado y por lo tanto se pudo observar un efecto antimicrobiano sobre ella por parte de la cepa Fv-15.

Tabla 18: Resultados de las pruebas de antagonismo entre la cepa Fv-15 y las cepas de BAL de género y especies conocidas de la colección de cepas del laboratorio 324.

BAL/Dilución usada vs Sobrenadante Fv-15	Fotografía de prueba revelada*	Descripción/Resultados
<i>Weissella paramesenteroides</i> Dilución: Directo/10 ⁻¹		Adecuado crecimiento de la BAL probada, presencia de halo de 5 mm de la cepa Fv-15, indicando una prevalencia sobre el indicador. El halo del control positivo fue de 9 mm.
<i>Streptococcus</i> spp. Dilución: 10 ⁻²		Adecuado crecimiento de la BAL probada, presencia de halo de 4 mm de la cepa Fv-15, indicando una prevalencia sobre el indicador. El halo del control positivo fue de 5 mm.
<i>Lactococcus lactis</i> Dilución: Directo/10 ⁻¹		Adecuado crecimiento de la BAL probada, presencia de halo de 4 mm de la cepa Fv-15, indicando una prevalencia sobre el indicador. El halo del control positivo fue de 9 mm.
<i>Lactobacillus pentosus</i> Dilución: Directo/10 ⁻¹		Adecuado crecimiento de la BAL probada, presencia de halo de 6 mm de la cepa Fv-15, indicando una prevalencia sobre el indicador. El halo del control positivo fue de 11 mm.

<p><i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> Dilución: Directo/10⁻¹</p>		<p>No existió crecimiento de la BAL probada, por consecuencia los posibles halos de inhibición generados por la acción de la cepa Fv-15, así como los controles positivos no fueron observados.</p>
-------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

*Control positivo 1 (arriba, izquierda): Cepa A-45212 (Maldonado, 2016)
Control positivo 2 (arriba, derecha): Clorhexidina al 0.2% (Llanos, 2015; Maldonado, 2016)
Control negativo (abajo, izquierda): Medio MRS estéril

7.5. Tratamiento térmico aplicado a los sobrenadantes.

Se realizó una prueba de difusión en agar empleando un cultivo de ocho horas de *L. monocytogenes* como indicador, y se colocó el sobrenadante de la cepa de BAL Fv-15, la cual fue la única que presentó actividad antimicrobiana, tal y como se describió en la sección 7.3, frente a microorganismos indicadores y de cavidad oral. En la Figura 12, se puede apreciar la permanencia del halo transparente de 1 mm del sobrenadante de la cepa Fv-15, tras ser neutralizado y tratado térmicamente; lo que indica que la resistencia térmica de esta es de moderada (100 °C) a alta (121 °C) y posiblemente pertenezca a la clase I o clase II de bacteriocinas (Seppo *et al.*, 2004). La estabilidad al calor puede deberse a la formación de pequeñas estructuras globulares y la incidencia de regiones fuertemente hidrofóbicas (lactacina F, lactococcina A, nisina), enlaces cruzados estables (nisina, lactocinas) y un alto contenido de glicina como en el caso de diplococcina y lactacina F (De vuyst & Vandamme, 1994). Hasta este punto del estudio de investigación, puede decirse que es posible que la cepa Fv-15, identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, produzca alguna bacteriocina, que por su naturaleza proteica, se degrade fácilmente en el cuerpo humano y en el ambiente, por ello su potencial aplicación como conservador natural en alimentos; sin embargo, aún es necesario comprobar su naturaleza proteica mediante un ensayo enzimático (Zendo, 2013).


Fotografía de Prueba con SNTT	Observaciones
	<p>Arriba: Control positivo para la prueba, cepa A-45212 (Maldonado, 2016).</p> <p>Izquierda (CT): Sobrenadante de la cepa Fv-15 de BAL con tratamiento térmico.</p> <p>Derecha (ST): Sobrenadante de la cepa Fv-15 de BAL sin tratamiento térmico</p> <p>Abajo: Control negativo para la prueba, medio MRS estéril.</p>

Figura 12: Resultado de la prueba de difusión en agar realizada con el sobrenadante de la cepa Fv-15 con y sin tratamiento térmico, frente a *Listeria monocytogenes*, tras 24 horas de incubación de la prueba. (Realización por duplicado).





7.6. Determinación de la naturaleza proteica de sobrenadantes que presentaron actividad antimicrobiana.

Con el propósito de evidenciar la naturaleza proteica de la sustancia inhibidora producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cepa Fv-15, tras realizar la neutralización y el tratamiento térmico de los sobrenadantes, se le aplicaron a este cuatro diferentes enzimas, tal como se describe en la sección 6.9.2 y posteriormente se realizaron las pruebas de difusión en agar frente a *L. monocytogenes*.

Se realizaron controles positivos para cada enzima, con el objetivo de observar que tuvieran actividad enzimática y en dado caso de que el origen del compuesto antimicrobiano fuera proteico (bacteriocina), este perdiera su actividad una vez colocado en la solución de la enzima a probar. En la Tabla 19, se presentan los resultados obtenidos con el tratamiento enzimático aplicado al sobrenadante de la cepa Fv-15 y se puede apreciar para las cuatro enzimas, que la actividad antimicrobiana; es decir, la presencia de un halo de inhibición se mantiene, aunque en cada caso existe una disminución considerable del halo que se presenta al no tener un tratamiento enzimático, pues en los cuatro casos se presenta un halo de 3 mm

en el sobrenadante sin enzima y al adicionarle la solución previamente preparada como lo indica la sección 6.9.2, en el caso de la pronasa E, se redujo hasta 1 mm y en el caso de la α -quimotripsina, la tripsina y la proteasa de *Bacillus licheniformis* se redujo únicamente hasta un halo de 2 mm. Carminati *et al.* (1989), aislaron compuestos antimicrobianos de origen proteico de siete cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* que fueron sensibles a pronasa, tripsina, α -quimotripsina aunque ninguna fue sensible a α -amilasa o pepsina y emplearon un modo de acción de tipo bactericida sin llevar a cabo completamente una lisis de las células de los microorganismos probados. Estudios más recientes demostraron que este tipo de bacteriocinas son de hecho muy similares a la nisina (Piard & Desmazeaud, 1992). En el caso de la cepa Fv-15, por el tipo de actividad que presentó frente a diferentes proteasas pudiera tratarse de nisina, debido a que es estable al calor, un lantibiótico pentacíclico con un amplio espectro de actividad frente a la mayoría de los microorganismos Gram positivos y se ve inactivada por la α -quimotripsina, que en este caso no ocurrió. Posiblemente debido a la actividad enzimática de ésta pues únicamente se logró observar una reducción de 1 mm con respecto al pozo que no poseía la solución de la enzima; pero es resistente a enzimas como la pronasa y la tripsina, entre algunas otras proteasas y que la sensibilidad a este tipo de proteasas es un punto clave para la caracterización de un inhibidor como bacteriocina (De Vuyst & Vandamme, 1994). Por otro lado, la reducción, más no la inactivación de la actividad antimicrobiana dentro de las pruebas realizadas, probablemente se atribuya a que la concentración del sobrenadante se puede incrementar hasta en 10 veces cuando se manifiesta la actividad de esta bacteriocina en presencia de la enzima probada (Hirsch (1951). Por otra parte, Liu & Hansen (1990), demostraron que la conformación reversible y los efectos de la carga que experimenta la nisina a un bajo pH puede ser lo que ocasione su alta actividad biológica, por ejemplo en una fermentación como la que se experimenta en el pulque y el aguamiel; sin embargo la nisina a pesar de que puede permanecer estable tras realizar un proceso de esterilización a 115-120 °C a un pH de 2, pierde cerca del 40% de su actividad a pH 5 y más del 90% si se alcanza un pH de 6-8 (Tramer, 1966).

Tabla 19: Resultados de los ensayos enzimáticos realizados con el sobrenadante tratado térmicamente y neutralizado de la cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Fv-15) con cuatro diferentes enzimas. La prueba de difusión en agar se realizó por duplicado.

Bacteria sensible/Dilución usada y enzima aplicada	Fotografía de prueba revelada	Descripción/Resultados
<p>Control (+) de prueba (sobrenadante cepa A-45212),</p> <p>STE: sobrenadante sin proteasa CTE prot: sobrenadante con proteasa <i>Bacillus licheniformis</i> CTE pro E: sobrenadante con pronasa E</p>		<p>El sobrenadante de la cepa control A-45212 (Maldonado, 2016) presenta actividad antimicrobiana sin la presencia de proteasas (STE) mientras que en la presencia de las proteasas evaluadas la actividad antimicrobiana se pierde. Prueba control para las cuatro enzimas a probar.</p>
<p>Sobrenadante cepa Fv-15 vs Proteasa de <i>Bacillus licheniformis</i> SIGMA P4860</p>		<p>Mantenimiento de la actividad (halo de inhibición) del sobrenadante con la enzima, aunque hubo una reducción del tamaño del halo de 3 mm (STE) a 2 mm (CTE).</p>
<p>Sobrenadante cepa Fv-15 vs Proteasa Tipo XIV: Bacterial de <i>Streptomyces griseus</i> (Pronasa E)</p>		<p>Mantenimiento de la actividad (halo de inhibición) del sobrenadante con la enzima, aunque hubo una reducción del tamaño del halo de 3 mm (STE) a 1 mm (CTE).</p>
<p>Sobrenadante cepa Fv-15 vs Tripsina (EC 3.4.21.4) Tipo IX-S SIGMA T-0303</p>		<p>Mantenimiento de la actividad (halo de inhibición) del sobrenadante con la enzima, aunque hubo una reducción del tamaño del halo de 3 mm (STE) a 2 mm (CTE).</p>

<p>Sobrenadante cepa Fv-15 vs α-Quimotripsina de páncreas bovino Tipo II SIGMA C4129-1G</p>		<p>Mantenimiento de la actividad (halo de inhibición) del sobrenadante con la enzima, aunque hubo una reducción del tamaño del halo de 3 mm (STE) a 2 mm (CTE).</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

7.7. Pruebas de reto de BAL frente a microorganismos indicadores.

Las pruebas de reto se realizaron con el objetivo de poner en competencia a la BAL de la cepa Fv-15 frente a diversos microorganismos indicadores en un mismo medio de cultivo para observar si existió una inhibición durante el crecimiento y desarrollo de ambos microorganismos en el mismo medio de cultivo y se presentan a continuación para cada uno de los indicadores probados.

7.7.1. *Listeria monocytogenes*

En la Figura 13, se presenta el crecimiento para la prueba realizada con *Listeria monocytogenes*, inoculando en una concentración aproximada de 10^6 UFC/mL a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y en una menor concentración, de 10^4 UFC/mL al microorganismo indicador. Se puede observar el efecto bactericida que ejerce la cepa Fv-15 de BAL a partir de las 6 horas de incubación (curva roja), la cual si comparamos contra el control de la cepa indicadora (curva azul), se ve reducido su crecimiento hasta en dos ciclos logarítmicos, teniendo a las 48 horas una concentración muy similar a la inicial. Con respecto a la cepa Fv-15 de BAL, el comportamiento que presentó no se vio afectado por la presencia de *Listeria* en el cultivo mixto (curva naranja).

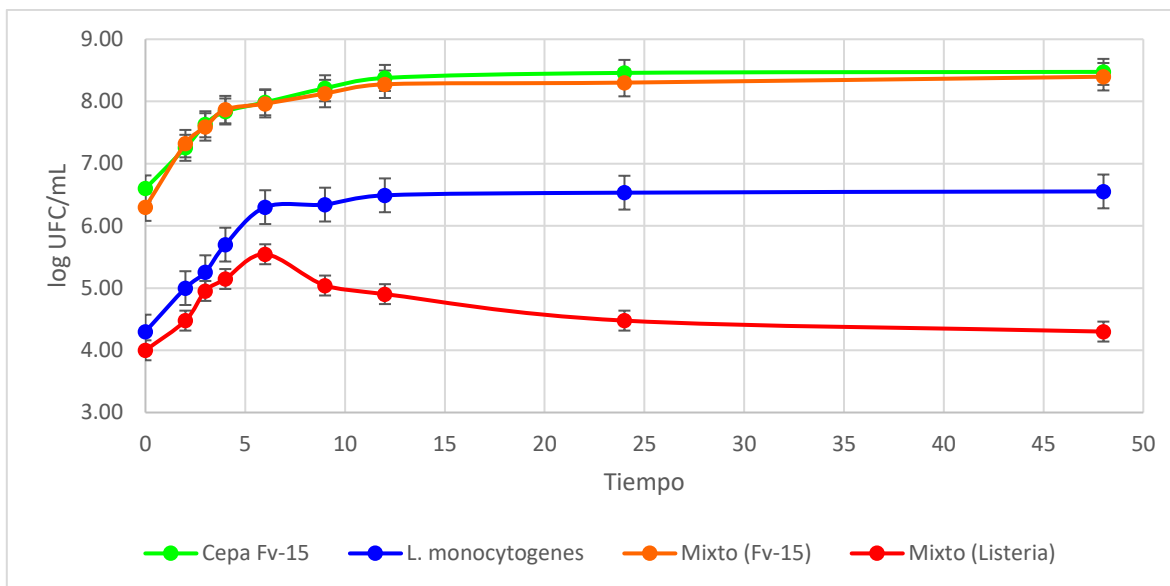


Figura 13: Prueba de reto de *Listeria monocytogenes* frente a cepa Fv-15 en el medio MRS. Control (+) para la cepa de BAL: curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo mixto: curva naranja, Listeria en cultivo mixto: curva roja. El experimento para cada uno de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado.

Por otra parte, en la Figura 14, se muestra el comportamiento del pH a lo largo de la prueba de reto para este microorganismo indicador. Se aprecia entonces, en la curva azul un mantenimiento del pH en un rango de pH de 7.2 y 7.3 y es hasta después de este tiempo, a las 24 horas de incubación se lleva a cabo un descenso brusco en el pH hasta alcanzar a las 48 horas un pH final de 5.17 y con lo anterior, se exhibe que *Listeria monocytogenes* posee cierta ácido-resistencia o tolerancia en alimentos acidificados (Cole *et al.*, 1990; Conner *et al.*, 1990). La inhibición de este microorganismo durante la fermentación del aguamiel es muy probable que se deba no únicamente al decremento del pH, sino que es afectado por la producción de compuestos como ácidos orgánicos, etanol o bacteriocinas producidas por las BAL (Harris *et al.*, 1989; Wood & Holzapfel, 1995). En cambio, si observamos primeramente la curva verde correspondiente al comportamiento de pH mostrado por la cepa Fv-15, se puede apreciar el descenso progresivo del pH, siendo posterior a las 4 horas de incubación cuando disminuye significativamente y alcanzando a las 48 horas de incubación el máximo descenso, correspondiente a un valor de 4.06. Finalmente si se aprecia la gráfica de pH del cultivo mixto (curva roja), se aprecia que a partir de las 6 horas de incubación, el pH se ve muy disminuido, probablemente por la acción del metabolismo de la BAL frente a

la presencia de *Listeria monocytogenes* y de esta forma comenzar la inhibición del patógeno, haciendo que inclusive el comportamiento a partir de las 12 horas de incubación sea muy similar al de la curva control de la cepa Fv-15 (curva verde) y que el valor de pH final sea muy similar (4.11 en cultivo mixto y 4.06 en el cultivo de la BAL).

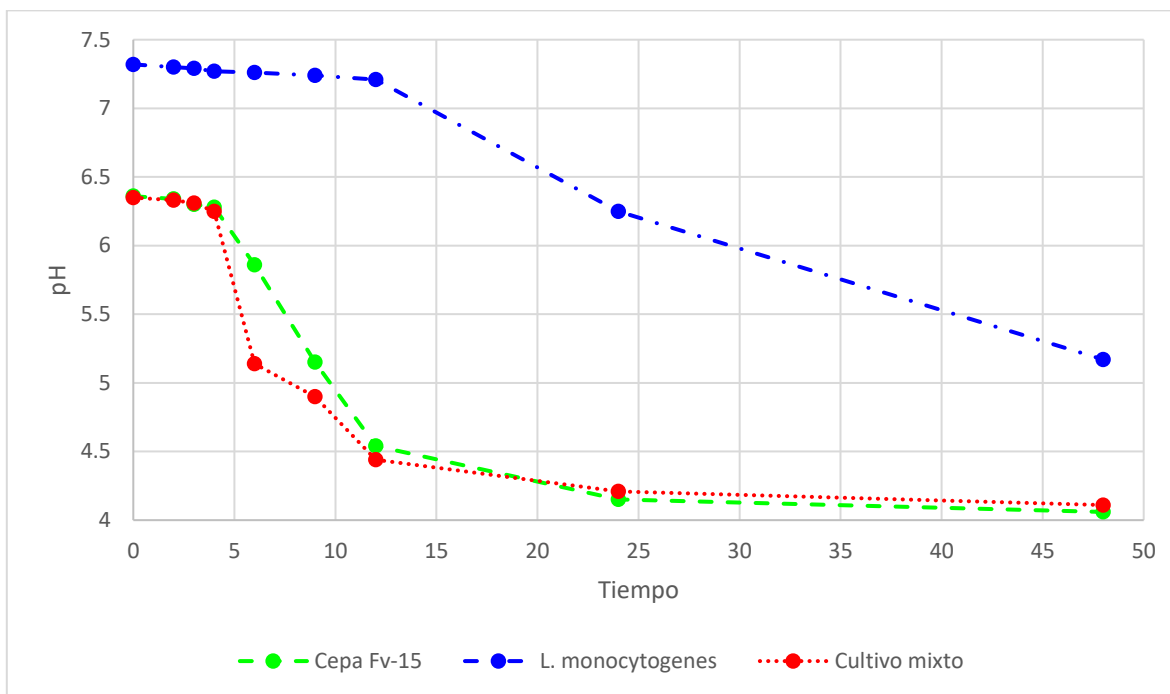


Figura 14: Curva de pH durante la prueba de reto de *Listeria monocytogenes* frente a cepa Fv-15. Curva verde: Cepa Fv-15, curva azul: *Listeria monocytogenes*, curva roja: cultivo mixto.

7.7.2. *Escherichia coli* O88:H25

En la Figura 15, se presenta el crecimiento de *Escherichia coli* O88:H25 en el medio MRS inoculado con 1 mL del cultivo en una concentración aproximada de 10^5 - 10^6 UFC/mL a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y en una concentración menor al microorganismo indicador, de 10^4 UFC/mL aproximadamente. Se obtuvo únicamente un efecto bacteriostático por parte de la cepa Fv-15 de BAL a partir de las 4 horas de incubación, pues el indicador (curva roja) reduce muy poco su crecimiento. A pesar de que en las primeras horas la bacteria indicadora tiene un desarrollo lento, a las 48 horas alcanzó una concentración cercana a las 10^7 UFC/mL. Si comparamos contra el control de la cepa indicadora (curva azul), se observó que el crecimiento sí alcanzó las 10^7 UFC/mL. Con respecto a la cepa Fv-15 de BAL, a pesar de

que se alcanzó un crecimiento de 10^8 UFC/mL tanto en el cultivo control (curva verde) como en el cultivo mixto (curva naranja) y como se mencionó anteriormente, aunque se llevara a cabo la producción de un compuesto antimicrobiano como la nisina o alguna otra bacteriocina; no fue capaz de llevar a cabo un efecto bactericida para inhibir al patógeno pero de igual forma, la BAL no se afectó por la presencia de *Escherichia coli* en el cultivo mixto. A pesar de que no existen reportes de la presencia de cepas de *E. coli* en pulque y aguamiel es altamente probable que puedan exponerse a fuentes de contaminación de este tipo de microorganismos en la planta de agave durante la recolección, transporte y fermentación (Gómez-Aldapa *et al.*, 2012).

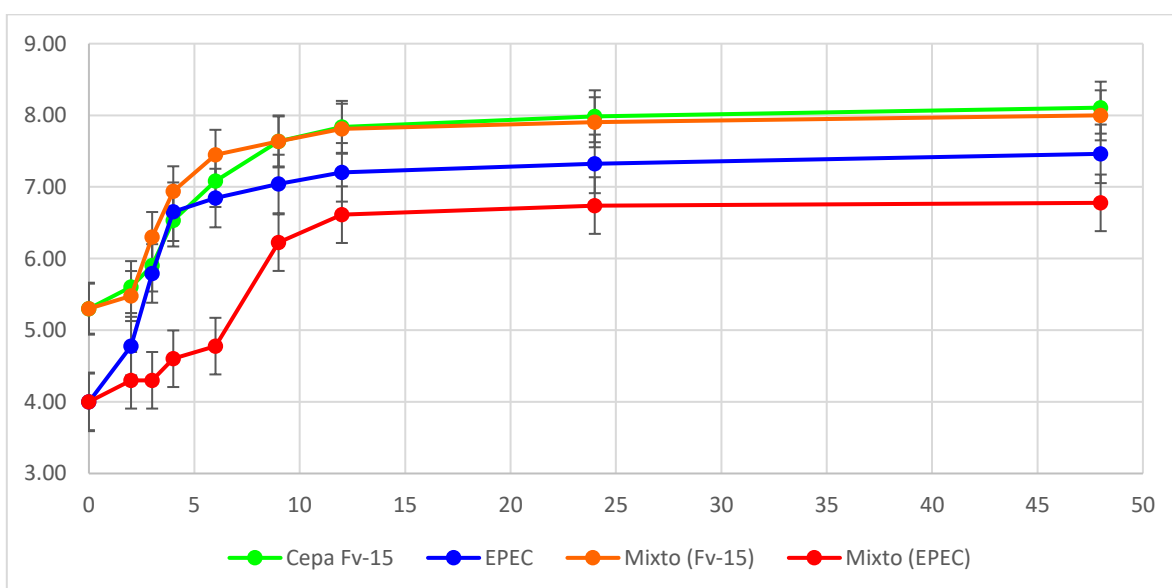


Figura 15: Prueba de reto de *Escherichia coli* O88:H25 frente a cepa Fv-15 en el medio MRS. Control (+) para la cepa de BAL: curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo mixto: curva naranja, E. coli en cultivo mixto: curva roja. El experimento para cada uno de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado.

7.7.3. *Escherichia coli* O8:H10

Al igual que en el caso de la cepa de *E. coli* en el punto 7.7.2, para la prueba de reto realizada con la cepa de *E. coli* O8:H10 y tal como se observa en la Figura 16, se ajustó tanto a la BAL como al indicador a una concentración cercana a 10^6 y 10^4 UFC/mL respectivamente. Al igual que con la otra cepa de *E. coli* probada, únicamente la cepa Fv-15 pudo llevar a cabo un efecto bacteriostático en el cultivo mixto en medio MRS tal y como se observa en la curva

roja, pues mantuvo un comportamiento homogéneo, constante y muy similar al control (curva azul) pues alcanzó una concentración de 10^6 UFC/mL, siendo cercano al del control de 10^7 UFC/mL. En este caso, la cepa Fv-15 en el cultivo mixto (curva naranja) disminuyó ligeramente su crecimiento al estar en contacto con el indicador, pero logró mantener una tendencia cercana a la del control (curva verde), alcanzando una concentración de 10^7 UFC/mL al final de la fermentación.

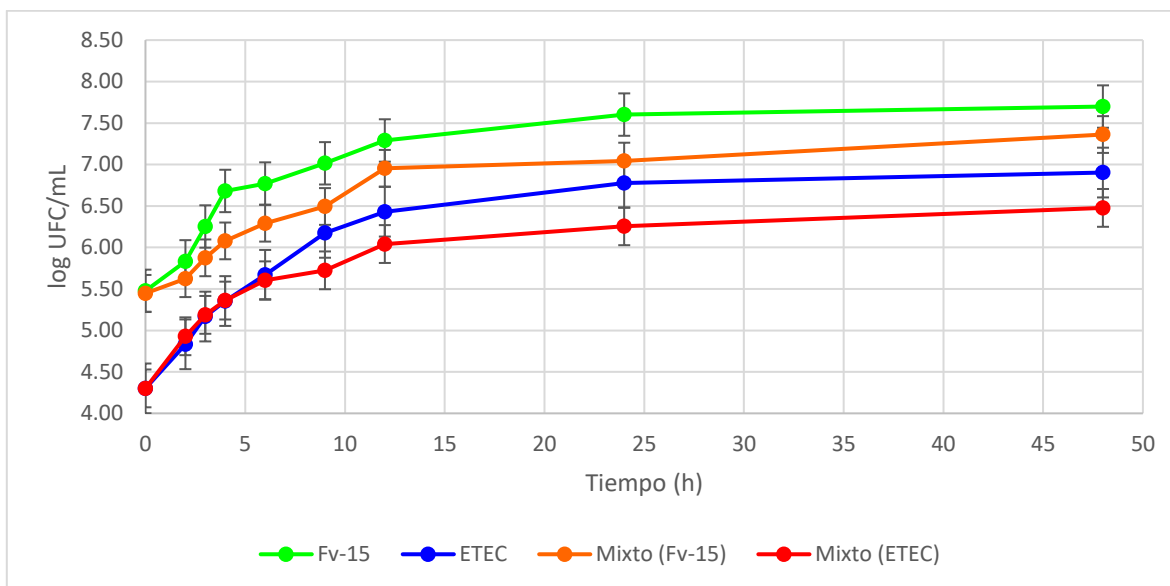


Figura 16: Prueba de reto de *Escherichia coli* O8:H10 frente a cepa Fv-15 en el medio MRS. Control (+) para la cepa de BAL: curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo mixto: curva naranja, *E. coli* en cultivo mixto: curva roja. El experimento para cada uno de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado.

7.7.4. Curvas de pH de pruebas con cepas de *Escherichia coli*

En la Figura 17, se presentan los valores de pH que se registraron a lo largo de las pruebas de reto con las cepas O8:H10 y O88:H25 de *E. coli*. En la curva verde se puede apreciar al control positivo para la cepa Fv-15, la cual alcanzó un valor aproximado de 4.0, acidificando el medio al ser una BAL. Por otra parte, los controles para las dos cepas indicadoras de *E. coli* se presentan en color azul y rosa; se observa que iniciaron en un valor aproximado de 7.3, correspondiente al tiempo cero en el medio BHI. Se ha reportado que algunas cepas de este microorganismo, tal y como la O157:H7 desarrolla tolerancia a bajos pH, hasta llegar al punto de realizar su crecimiento en alimentos como sidra de manzana, salchichas

fermentadas, yogurt o mayonesa (Besser *et al.*, 1993; CDC, 1995; Morgan *et al.*, 1993) y que en el caso del pulque, el contenido de alcohol, el bajo pH y la actividad de las BAL durante la fermentación (Gómez-Aldapa *et al.*, 2012) sean el principal mecanismo de defensa contra este tipo de microorganismos. Finalmente, en las curvas roja y café, se aprecia el crecimiento de ambas cepas en cultivo mixto y a pesar de que se alcanzaron valores de 4.18 y de 4.21 para la O88:H25 y O8:H10 respectivamente a las 48h, se aprecia que entre las 6 y las 9 horas de incubación es el punto en el que se presentó el menor descenso del pH frente al desarrollo de la cepa Fv-15, aunque en el caso de ésta, al alcanzar valores tan cercanos al control de la misma, puede decirse que realiza la acidificación del medio sin importar que la cepa de *E. coli* esté en el mismo medio de cultivo, lo cual es un indicativo de que *E. coli* no se elimina y es una referencia clara que presenta este indicador a la acidez en el medio.

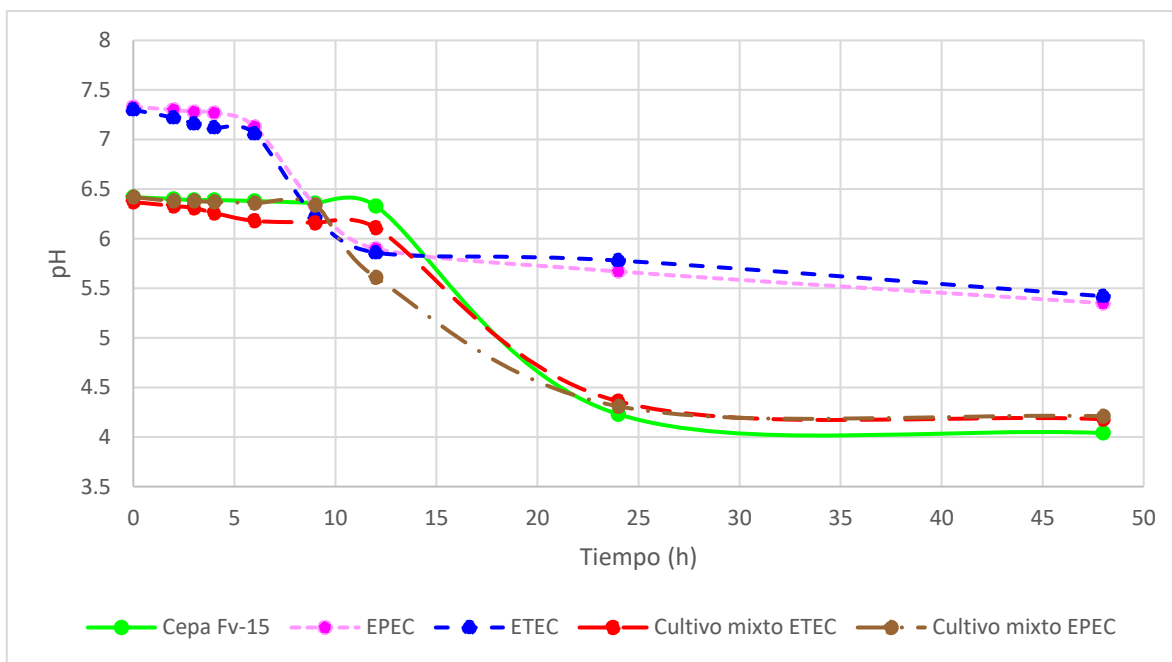


Figura 17: Curva de pH durante la prueba de reto de *E. coli* O88:H25 y O8:H10 frente a cepa Fv-15. Curva verde: cepa Fv-15, curva rosa: *E. coli* O88:H25, curva azul: *E. coli* O8:H10, curva roja: cultivo mixto de *E. coli* O88:H25 y curva café: cultivo mixto de *E. coli* O8:H10.

7.7.5. *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans es un microorganismo conocido como una de las principales causas de la formación de la placa dental y de las caries (Abdus *et al.*, 2004). En la figura 18 se presenta la curva obtenida tras realizar la prueba de reto, donde se puede apreciar en color verde y en

color azul los controles para la cepa Fv-15 y el indicador respectivamente; teniendo en cuenta que cada uno fue ajustado a una concentración inicial de 10^6 y 10^4 UFC/mL. Se observó que tuvieron un comportamiento homogéneo ya que alcanzaron un crecimiento de dos ciclos logarítmicos más y servirían como punto de comparación para los cultivos mixtos. En la curva naranja se presenta el crecimiento del cultivo mixto de la cepa de BAL, observándose que existe una reducción de un ciclo logarítmico, respecto al crecimiento de la cepa control, a partir de las 12 horas de incubación, alcanzando una concentración de 10^7 UFC/mL y manteniéndose hasta las 48 horas, teniendo relación con lo que se presentó en la curva roja del cultivo mixto para el indicador, pues a las 12 horas de incubación comenzó un efecto bactericida que ocasionó que a las 48 horas existiera una reducción cercana a 3 ciclos logarítmicos con respecto al control para *Str. mutans*. Debido a la competencia entre uno y otro, ocasionó que la actividad de la cepa Fv-15 se viera disminuida. De igual forma tras realizar esta prueba de reto puede decirse que a pesar de que se tuvo un efecto bactericida contra el indicador, en las pruebas de difusión en agar no se presentó halo de inhibición posiblemente porque que el cultivo utilizado fue de 24 horas y no se llevó a cabo la acción de la posible bacteriocina liberada por la cepa de BAL.

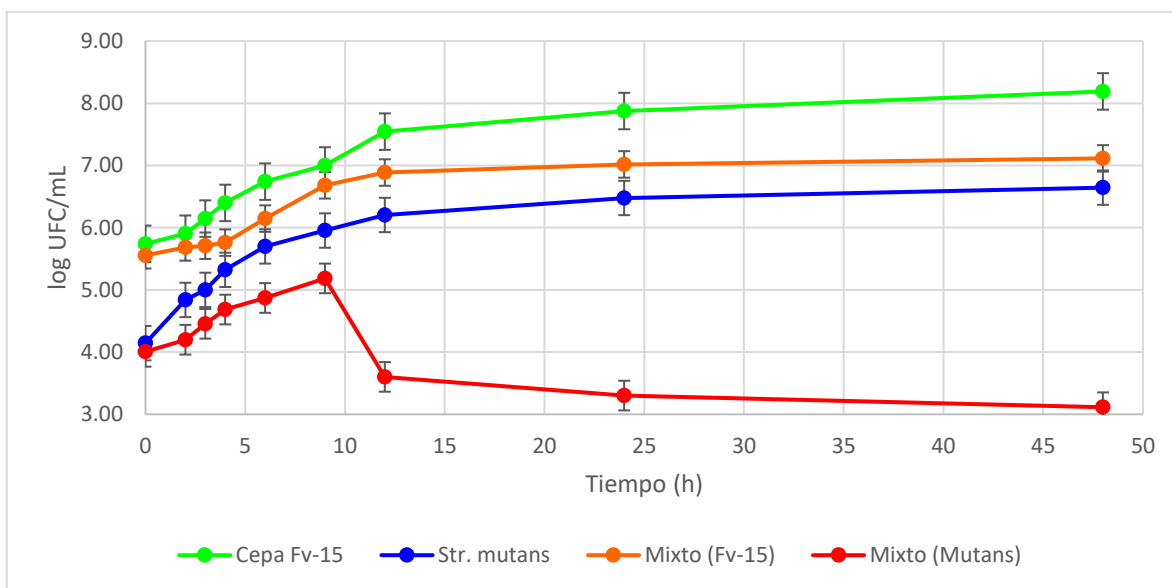


Figura 18: Prueba de reto de *Streptococcus mutans* frente a cepa Fv-15. Control (+) para la cepa de BAL: curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo mixto: curva naranja, *Str. mutans* en cultivo mixto: curva roja. El experimento para cada uno de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado.

Además de la prueba de reto, se realizó la curva de comportamiento de pH a lo largo de la misma y se presenta a continuación en la Figura 19. En la curva azul se observó el desarrollo de pH del indicador, en este caso *Str. mutans* y se aprecia que hasta las 12 horas de incubación mantuvo un valor aproximado de entre 7.05 y 7.27. Este microorganismo se caracteriza por ser acidúrico (tolerante a la acidez), pero de igual forma puede ser acidógeno (productor de ácido) y que es lo que hace que reduzca el pH en la placa bacteriana (Menaker *et al.*, 1986) y estas dos características se pudieron presentar en el cultivo mixto. En el caso de la curva roja (cultivo mixto), el valor de pH se mantuvo durante las primeras 6 horas, pero posterior a esto tanto por acción de la cepa Fv-15 de BAL como de *Str. mutans*, se alcanzó un valor de pH de 4.24 a las 48 horas de incubación; el cual es un valor muy cercano al pH final del control para la cepa Fv-15 (curva verde) que como se esperaba, llevó a cabo la acidificación del medio de manera progresiva a lo largo de la prueba de reto.

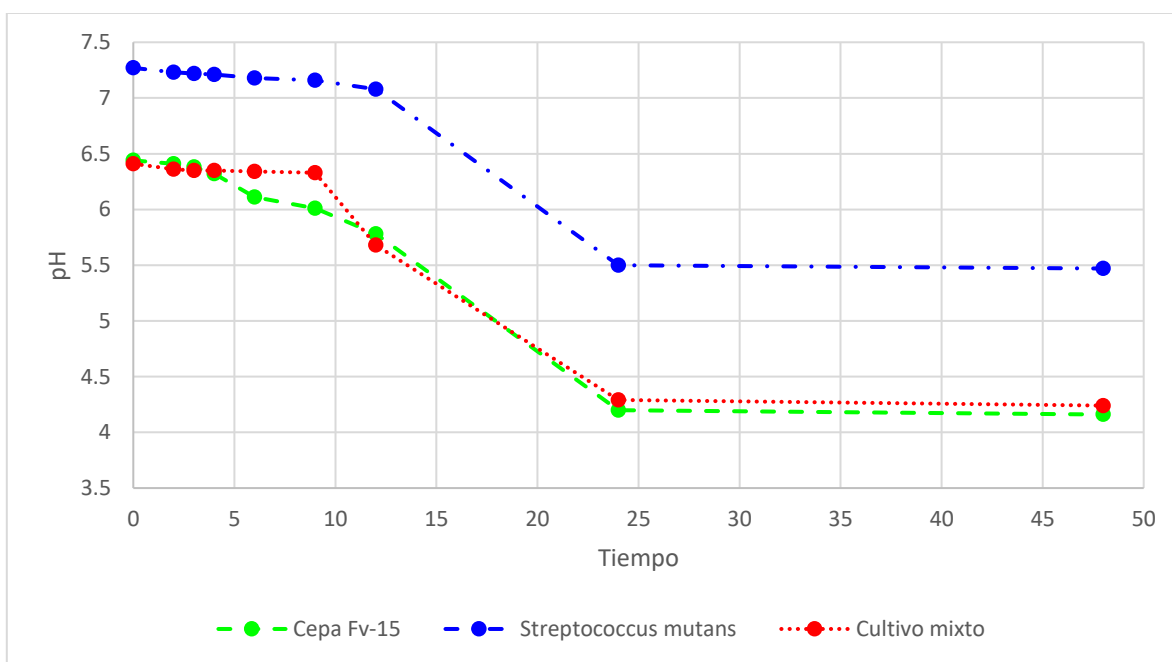


Figura 19: Curva de pH durante la prueba de reto de *Streptococcus mutans* frente a cepa Fv-15. Curva verde: cepa Fv-15, curva azul: *Streptococcus mutans*, curva roja: cultivo mixto.

7.7.6. *Streptococcus oralis*

A continuación, en la figura 20 se presentan los resultados obtenidos para la prueba de reto de *Streptococcus oralis* frente a la cepa Fv-15, siendo esta una de las dos cepas que se vieron

inhibidas en las pruebas de difusión en agar, tal como se mencionó en la sección 7.3. En primer lugar, en la curva verde y azul están los controles para la cepa de BAL y el microorganismo indicador, las cuales fueron ajustadas para tener dos ciclos logarítmicos de diferencia y alcanzando concentraciones de 10^8 y 10^6 UFC/mL respectivamente. Por otra parte, al igual que en el caso de la prueba contra *Streptococcus mutans* y como se observó en la curva naranja, el comportamiento de la cepa Fv-15 se vio ligeramente disminuida al estar en competencia con el microorganismo indicador, haciendo que tuviera una reducción de un ciclo logarítmico, respecto al cultivo control y manteniéndose a partir de las 9 horas en una concentración de 10^7 UFC/mL y hasta el término de la prueba. En el caso del cultivo mixto del indicador (curva roja). Se apreció una disminución significativa en su crecimiento, pues fue a las 6 horas de incubación el punto máximo de crecimiento y posterior a este comenzó un efecto bactericida progresivo que permitió tener una reducción cercana a 3 ciclos logarítmicos de *Streptococcus oralis* y que se mantuvo prácticamente a partir de las 24 horas de ser iniciada la prueba. Es importante mencionar que en los tiempos probados en el ensayo no se llevó a cabo la inhibición de este indicador por completo.

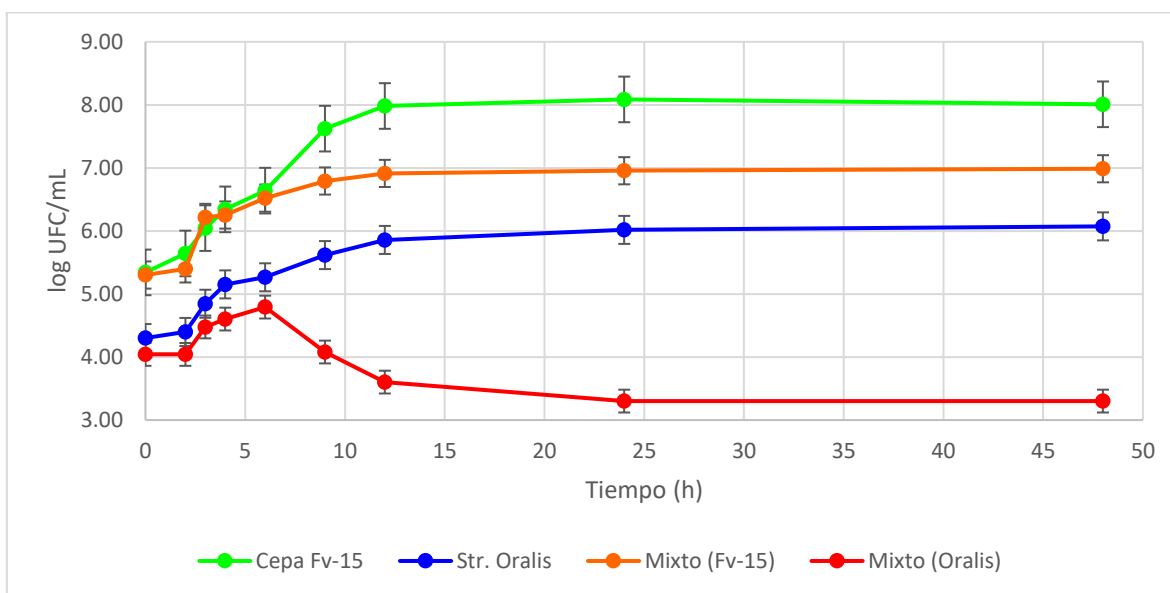


Figura 20: Prueba de reto de *Streptococcus oralis* frente a cepa Fv-15. Control (+) para la cepa de BAL: curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo mixto: curva naranja, *Str. oralis* en cultivo mixto: curva roja. El experimento para cada uno de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado.

En el caso del desarrollo del pH para *Streptococcus oralis* y tal como se observa en la figura 21, el microorganismo indicador (curva azul), muestra un comportamiento uniforme hasta las 12 horas de incubación, estableciendo un rango de pH de entre 7.25 y 7.3 y posterior a este tiempo realiza una ligera disminución del pH hasta alcanzar un valor aproximado de 5.5, por lo que probablemente pueda realizar una acidificación en la placa bacteriana. A esta bacteria se le considera una bacteria de poca virulencia, pero no por ello quiere decir que no participe en procesos de bacteremias y endocarditis (Johnson *et al.*, 2005). En el caso del cultivo mixto (curva roja), puede notarse el efecto de la cepa Fv-15 al disminuir el valor de pH desde las 6 horas de incubación y que permite alcanzar un valor cercano a 4.3. Al comparar con la prueba de reto, puede observarse una relación pues conforme disminuye el pH, el efecto bactericida mencionado anteriormente se lleva a cabo. Para la medición del pH de la cepa de BAL en el cultivo puro (curva verde), de igual forma se logró apreciar una disminución progresiva del pH, corroborando que la acción de acidificar el medio se llevó a cabo tal y como se esperaba.

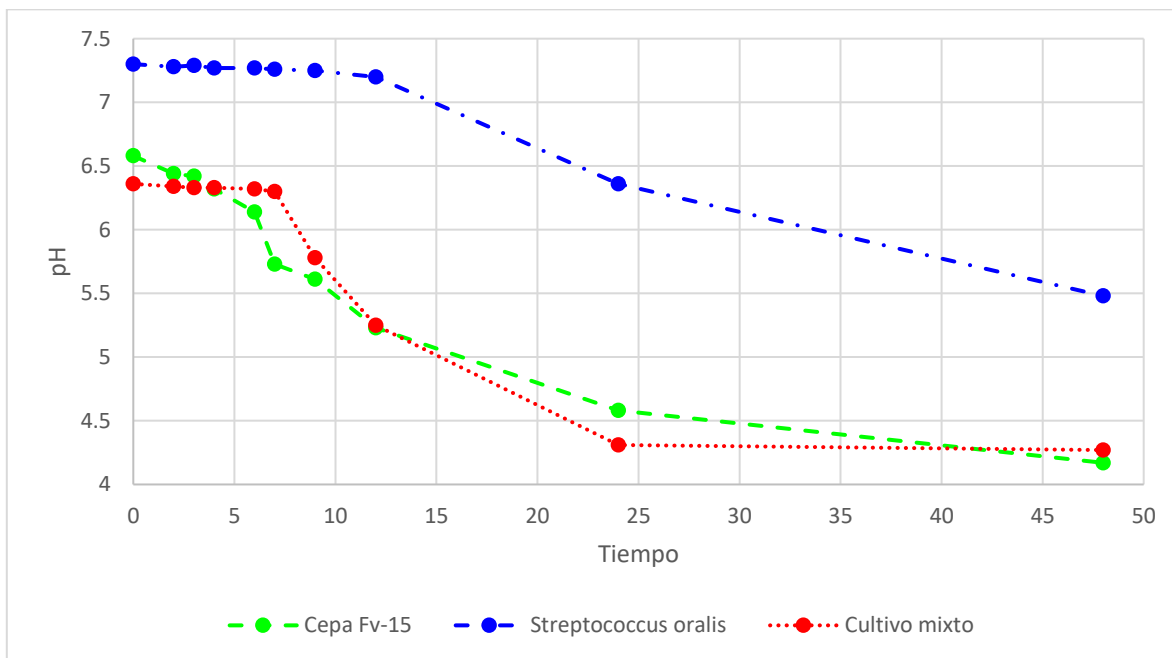


Figura 21: Curva de pH durante la prueba de reto de *Streptococcus oralis* frente a cepa Fv-15. Curva verde: cepa Fv-15, curva azul: *Streptococcus oralis*, curva roja: cultivo mixto.

7.7.7. *Streptococcus salivarius*

Como continuación, en la Figura 22 se presentan los resultados obtenidos para la prueba de reto de *Streptococcus salivarius* frente a la cepa Fv-15, siendo esta la cepa, además de *Streptococcus oralis* que se vio inhibida en las pruebas de difusión en agar, tal como se mencionó en la sección 7.3. En primer lugar, dentro de la Figura 22 en la curva verde y azul se observan los controles para la cepa de BAL y el microorganismo indicador, las cuales fueron ajustadas inicialmente para poder tener dos ciclos logarítmicos de diferencia y se alcanzaron concentraciones de 10^8 y 10^6 UFC/mL, respectivamente. Enseguida encontramos en la curva naranja que el comportamiento de la cepa Fv-15 se vio un poco disminuida al estar en competencia con el microorganismo indicador con una disminución de un ciclo logarítmico y mantuvo una cuenta uniforme a partir de las 6 horas de incubación y alcanzando una concentración de 10^7 UFC/mL hasta el término de la prueba; mientras que en el caso del cultivo mixto del indicador (curva roja) se apreció un efecto de tipo bactericida, pues transcurridas 4 horas de incubación y tras alcanzar el punto máximo de crecimiento se tuvo una reducción de más de 2 ciclos logarítmicos de *Streptococcus salivarius* y así se mantuvo a partir de las 24 horas y hasta las 48h. El efecto observado tanto en las pruebas de difusión en agar como en esta prueba de reto, se pudo dar por la producción de algún tipo de bacteriocina u otros compuestos antimicrobianos. *Str. salivarius* es una BAL que se encuentra principalmente en la boca de los seres humanos y es la primer bacteria que aparece en esta cavidad oral de los recién nacidos y que coloniza el tracto respiratorio (Aas *et al.*, 2005), no es un microorganismo que produzca algún tipo de enfermedad, y no compitió bien frente a la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* estudiada.

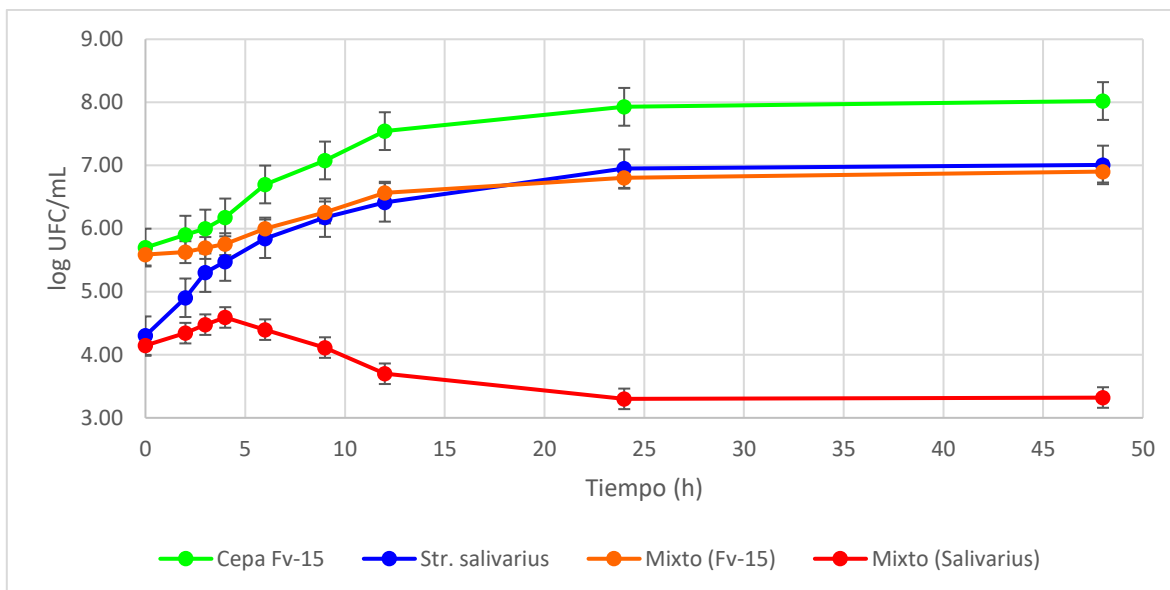


Figura 22: Prueba de reto de *Streptococcus salivarius* frente a cepa Fv-15. Control (+) para la cepa de BAL: curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo mixto: curva naranja, *Str. salivarius* en cultivo mixto: curva roja. El experimento para cada uno de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado.

Con respecto al desarrollo del pH a lo largo de la prueba de reto y como se observa a continuación en la figura 23, el comportamiento obtenido tanto en el caso de la cepa Fv-15 (curva verde) como en el caso del cultivo mixto (curva roja) fue muy similar, pues la disminución del pH se llevó a cabo de manera progresiva y uniforme, hasta alcanzar valores de pH de 4.2 y 4.3. *Streptococcus salivarius*. Lejos de ser una bacteria patógena de cavidad oral, se ha observado en algunos estudios, por ejemplo con la cepa K12, que puede jugar un papel probiótico al producir dos bacteriocinas, como lo es la salivaricina A y la salivaricina B (Tagg, 2004), que pueden ayudar a la inhibición de algunas bacterias patógenas y que al estar en competencia con la cepa Fv-15 logró disminuir el pH de manera muy parecida. La diferencia en compuestos antimicrobianos producidos por la cepa Fv-15 en estudio tuvo un mayor impacto sobre el indicador. Esto de igual forma se puede corroborar con el comportamiento del pH de *Str. salivarius* (curva azul), pues logró disminuir de manera significativa el pH del medio, alcanzando un valor final de 5.2 y siendo el que alcanzó el valor más bajo con respecto a los otros dos indicadores de cavidad oral probados.

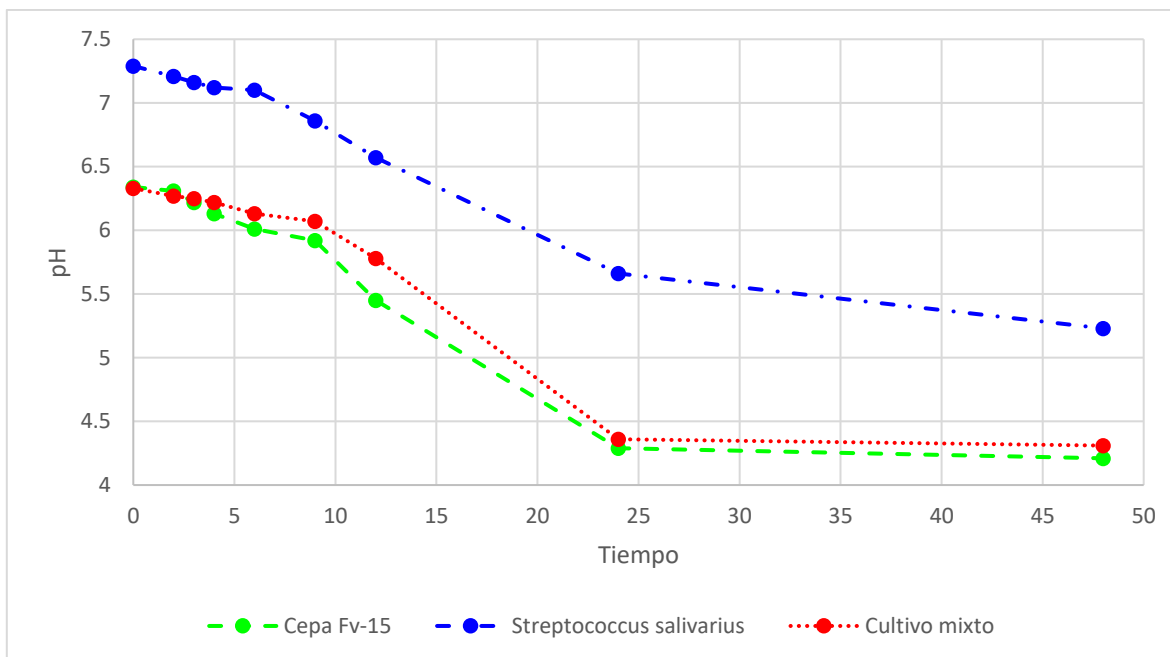


Figura 23: Curva de pH durante la prueba de reto de *Streptococcus salivarius* frente a cepa Fv-15. Curva verde: cepa Fv-15, curva azul: *Streptococcus salivarius*, curva roja: cultivo mixto.

7.8. Prueba de reto entre cepa Fv-15 de BAL frente a *Listeria monocytogenes* en aguamiel pasteurizado obtenido de la región de Huitzilac, Morelos.

Como parte importante del desarrollo experimental, se consideró necesario realizar una prueba de reto de la única cepa con producción de compuesto antimicrobiano, es decir, la cepa Fv-15 identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* frente a *Listeria monocytogenes* pero inoculándolas en aguamiel obtenido de la región de Huitzilac, Morelos con una estandarización previa, tal y como se menciona en la sección 6.11.

En la Figura 23, se presenta la gráfica con los resultados de la prueba de reto y en primer lugar, al observar el comportamiento que tuvo la cepa Fv-15, tanto en el control (curva verde) como en el cultivo mixto (curva naranja), podemos notar que a partir de las 6 horas de incubación alcanza su punto máximo de crecimiento y es a partir de ahí y hasta las 48 horas que mantiene una concentración de 10^8 UFC/mL, lo cual es algo que se esperaba pues se ha encontrado que en el aguamiel hay una elevada concentración de azúcares (75%) y fructo-oligosacáridos, siendo la fructosa el azúcar principal (32.4%), seguido por la glucosa (26.5%) y la sacarosa (8.8%) (Ortíz-Basurto *et al.*, 2008), todos esos carbohidratos son la

base para que la fermentación en este producto se lleve a cabo y posteriormente se obtenga el pulque; además de que constituye un medio favorable para la proliferación y desarrollo de numerosas especies de microorganismos, entre las que se encuentran obviamente las BAL. A lo largo de la prueba, la cepa Fv-15 creció uniformemente, inclusive en el cultivo mixto, lo que indica que no se ve afectado o disminuida su actividad por la presencia de *L. monocytogenes*. Con respecto al crecimiento del control para el indicador (curva azul) y del cultivo mixto (curva roja), se ajustó la concentración inicial del mismo para que se tuviera una diferencia de dos ciclos logarítmicos. No se observó inhibición de la cepa de BAL sobre el patógeno; debido a que el crecimiento del control alcanzó una concentración de aproximadamente 10^6 UFC/mL y con respecto a este, el cultivo mixto se vio mínimamente disminuido a partir de las 6 horas y manteniendo la misma concentración hasta el término de la prueba, ocasionando que no se presentara efecto bactericida o bacteriostático alguno. Comparando estos resultados con los obtenidos en las pruebas en medio MRS puede decirse entonces que la composición del medio de cultivo en el que se inocule podría afectar su desarrollo, ya que el medio MRS posee algunos componentes como el tween 80, las sales de sodio, manganeso y magnesio que afectan la pared celular de *Listeria monocytogenes* y ocasionen entonces que en conjunto con la liberación del compuesto antimicrobiano por parte de la cepa Fv-15 lleven a cabo el efecto bactericida observado y que ocurre un efecto contrario en el aguamiel, pues al ser un medio rico en azúcares y no poseer componente alguno que afecte su composición, le permita seguir desarrollándose a pesar de estar en un mismo cultivo con la cepa Fv-15.

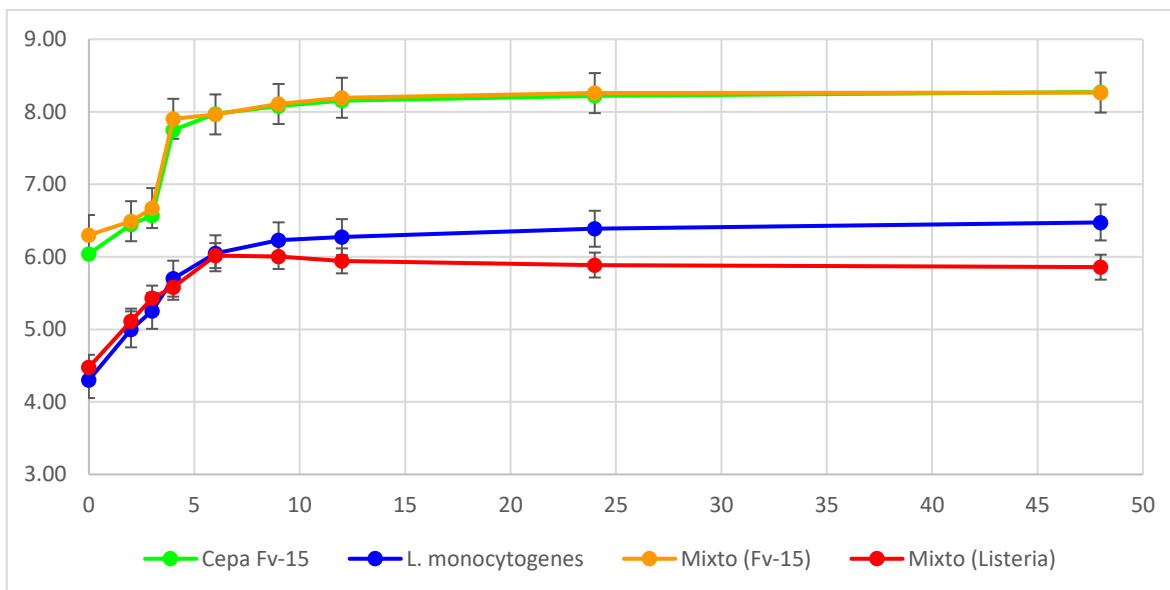


Figura 24: Prueba de reto de *L. monocytogenes* frente a cepa Fv-15 en aguamiel pasteurizado de la región de Huitzilac, Morelos. Control (+) para la cepa de BAL: curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo mixto: curva naranja, *L. monocytogenes* en cultivo mixto: curva roja. El experimento para cada uno de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado y se empleó medio Oxford para el conteo del indicador.

Debido a que como se mencionó anteriormente, no se obtuvo ningún efecto en contra de *L. monocytogenes* en la prueba de reto en aguamiel y debido al comportamiento uniforme que obtuvo en el cultivo mixto, se decidió entonces realizar un ajuste a la concentración inicial del microorganismo, pues se pensó que posiblemente este comportamiento en el aguamiel pudo deberse a que se encontraba en un número muy elevado, lo cual le facilitó su crecimiento y su estabilidad frente a la cepa Fv-15. Por lo previamente mencionado y tal como se aprecia en la figura 24, se inició con una concentración inicial aproximada de 10^2 UFC/mL en el control y el cultivo mixto (curva azul y curva roja respectivamente), obteniéndose que a partir de las 2 horas en ambos casos, comenzó la fase exponencial y continuando así hasta alcanzar a las 12 horas la fase estacionaria, la cual se mantuvo hasta las 48 horas de incubación y teniendo un crecimiento de dos ciclos logarítmicos, es decir, una concentración de 10^4 UFC/mL. A pesar de que en contraste con la cepa de BAL, la cual alcanzó concentraciones de 10^8 UFC/mL para el control y el cultivo mixto (curva verde y curva naranja respectivamente), no se presentó efecto inhibitorio alguno y por el contrario, al realizar un ajuste inicial lo único que se logró es que el patógeno se encontró en una menor

proporción pero no por ello le impidió que pudiera adquirir los nutrientes necesarios para su crecimiento.

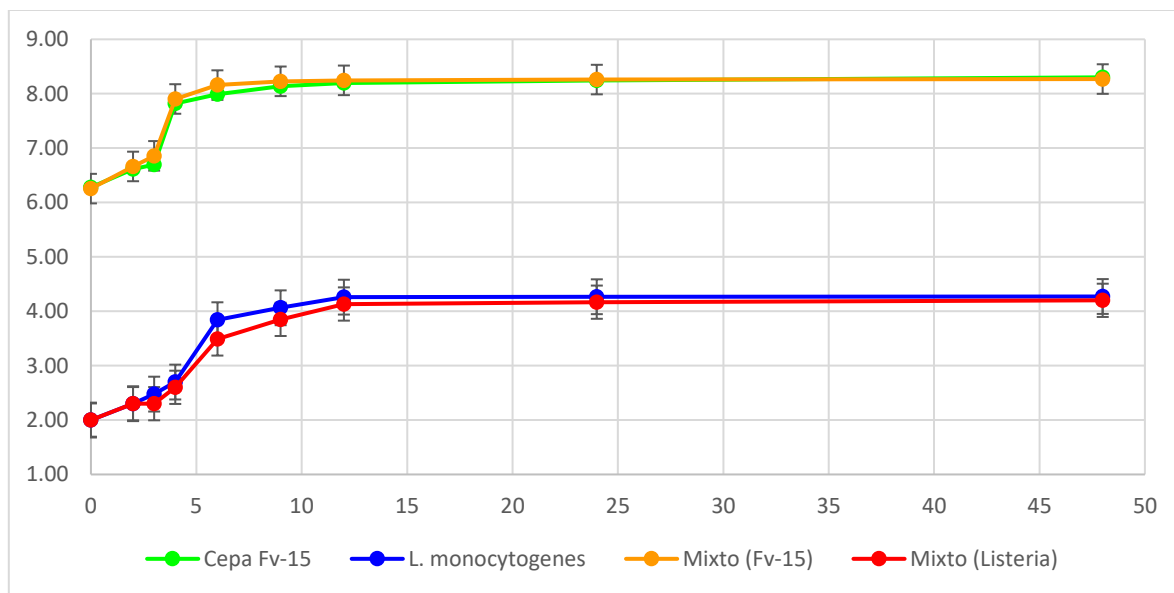


Figura 25: Prueba de reto de *L. monocytogenes* frente a cepa Fv-15 con ajuste en la concentración inicial en aguamiel pasteurizado de la región de Huitzilac, Morelos. Control (+) para la cepa de BAL: curva verde, control (+) para el indicador: curva azul, cepa Fv-15 en cultivo mixto: curva naranja, *L. monocytogenes* en cultivo mixto: curva roja. El muestreo de los diferentes tiempos de cada cultivo se realizó por duplicado y se empleó medio Oxford para el conteo del indicador.

Por último, en la Figura 25 se presenta la gráfica de pH que se tuvo a lo largo del desarrollo del pH empleando la concentración de 10^4 UFC/mL de *L. monocytogenes*, correspondiente al primer ensayo realizado; en la curva verde se aprecia que prácticamente al iniciar la prueba (2 horas), comienza a disminuir el pH y es hasta las 48 horas, cuando alcanza su nivel más bajo, tal y como se presenta de manera natural en el aguamiel, por acción de las bacterias ácido lácticas que están presentes en el mismo es que el pH disminuye y por lo tanto la fermentación se lleva a cabo. En este caso, la cepa Fv-15 alcanzó un pH final de 4.15. Igualmente, en la Figura 25 en la curva azul, se presenta el desarrollo del pH para *L. monocytogenes* y a pesar de que realizó un decremento del pH de manera progresiva, fue entre la hora 9 y 12 en la que se tuvo la disminución más considerable, al final de la prueba el pH fue de 4.5. Finalmente, en la curva roja, la cual corresponde al cultivo mixto, se tuvo desde la hora 2 y hasta la hora 12, un comportamiento prácticamente igual al de la BAL, sin embargo, después de las 12 horas se mantuvo un decremento mínimo en el valor del pH y

llegó hasta un valor cercano a 4.3, poniéndose de manifiesto la resistencia que presentó *L. monocytogenes* al estar en contacto con la bacteria láctica y que se vio reflejado en los resultados del crecimiento de la prueba de reto.

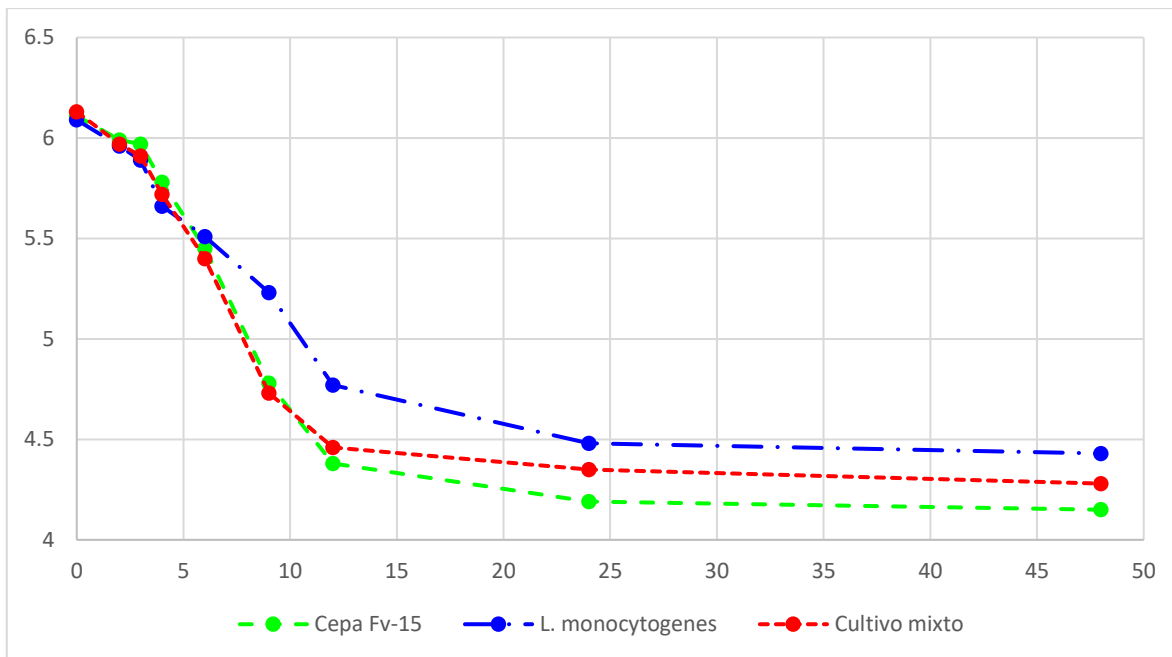


Figura 26: Curva de pH durante la prueba de reto de *Listeria monocytogenes* frente a cepa Fv-15 en aguamiel pasteurizado de la región de Huitzilac, Morelos. Curva verde: cepa Fv-15, curva azul: *L. monocytogenes*, curva roja: cultivo mixto.

8. Conclusiones

De las 39 cepas de BAL aisladas de pulque y aguamiel de una zona productora en Milpa Alta, Ciudad de México; únicamente una produjo sustancias con actividad antimicrobiana en las condiciones ensayadas.

La cepa Fv-15 identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inhibió a *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus salivarius*, por medio de pruebas de difusión en agar. Además, inhibió el crecimiento de otras bacterias lácticas tales como *Weissella paramesenteorides*, *Streptococcus* sp., *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus pentosus*.

La actividad antimicrobiana de la cepa Fv-15 contra *Listeria monocytogenes* se mantuvo después de neutralizar y dar un tratamiento térmico a los sobrenadantes de sus cultivos.

Ninguna de las 39 cepas aisladas de pulque y aguamiel de una zona productora de Milpa Alta, Ciudad de México, inhibió a *Salmonella enterica* Typhimurium, *Escherichia coli* O88:H25, *Escherichia coli* O8:H10, *Streptococcus mutans* ni *Streptococcus mitis*.

Se observó la reducción de la actividad antimicrobiana de la cepa Fv-15 de BAL al ser sometido a un tratamiento con tripsina (EC 3.4.21.4) Tipo IX-S SIGMA® T-0303, Proteasa Tipo XIV de *Streptomyces griseus* SIGMA® P5147-1G, α -Quimotripsina de páncreas bovino Tipo II SIGMA® C4129-1G y Proteasa de *Bacillus licheniformis* SIGMA® P4860 empleando a *Listeria monocytogenes* como microorganismo indicador; lo que sugiere la naturaleza proteica de las sustancias antimicrobianas producidas por la BAL.

Se realizaron las pruebas de reto en medio MRS de la cepa Fv-15 frente a microorganismos patógenos de importancia en alimentos y de cavidad oral. *L. monocytogenes* se inhibió entre las 6 y 9 horas de incubación, para *Streptococcus oralis* fue entre las 6 y 9 horas mientras que para *Streptococcus salivarius* se dio entre las 4 y 6 horas de incubación.

Se realizaron pruebas de reto de la cepa Fv-15 frente a *E. coli* O88:H25 y *E. coli* O8:H10 determinándose su crecimiento microbiano en cultivos puros y en cultivos mixtos y se observó que no se presentó un efecto bactericida ni bacteriostático considerable, pues únicamente existió una disminución mínima de su desarrollo, con lo que el compuesto

antimicrobiano liberado no es capaz de realizar la inhibición de estos microorganismos indicadores.

Se realizaron pruebas de reto de la cepa Fv-15 frente a *Streptococcus mutans*. Se observó inhibición en medio líquido, aunque no se presentó en las pruebas de difusión en agar. Por lo tanto al determinar su crecimiento microbiano en cultivos puros y en cultivos mixtos no se presentó un efecto bactericida ni bacteriostático considerable.

Se realizó una prueba *in situ* en aguamiel pasteurizado y neutralizado a un pH de 6 de la región de Huitzilac, Morelos empleando a *L. monocytogenes* como microorganismo indicador, encontrándose que sin importar el ajuste de la concentración inicial del patógeno, no se ve afectado por la presencia de la cepa Fv-15 de BAL.

La cepa Fv-15, identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* perteneciente a una colección de cepas de pulque y aguamiel de una zona productora de Milpa Alta de la Ciudad de México fue la única que logró llevar a cabo la inhibición de los microorganismos indicadores *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus salivarius* tanto en pruebas de difusión en agar como en las pruebas de reto y el compuesto antimicrobiano liberado para realizar esta inhibición, logró mantener su actividad tras aplicarle un tratamiento térmico al sobrenadante y de igual forma reducir su actividad con la aplicación de cuatro diferentes enzimas, pudiendo indicar la naturaleza proteica del antimicrobiano y que al realizarse las pruebas *in situ* en aguamiel de la región de Huitzilac, Morelos empleando a *L. monocytogenes* como indicador se pudo concluir que la cepa Fv-15 no logra inhibir el crecimiento del patógeno a pesar de realizar una variación en su concentración inicial.

9. Perspectivas

Llevar a cabo pruebas de difusión en agar y de reto con una mayor gama de bacterias Gram positivas, las cuales se ha observado que son las que mayor inhibición tienen por la acción de bacteriocinas o compuestos antimicrobianos de origen no proteico.

Aislar, identificar y secuenciar la bacteriocina producida por la BAL de la cepa Fv-15, correspondiente a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* que presentó actividad antimicrobiana frente a los patógenos empleados como microorganismos sensibles.

Realizar un estudio más exhaustivo del sobrenadante de la cepa que presentó actividad antimicrobiana y por lo tanto un efecto bactericida sobre *Streptococcus mutans*, el cual se considera el microorganismo causante o fundamental para que se desarrolle la caries, además de bacterias Gram negativas, de las cuales su erradicación y control es de vital importancia para el campo de los alimentos.

Realizar pruebas *in situ* más exhaustivas tanto en aguamiel como en pulque, con el propósito de observar si es posible llevar a cabo un efecto bactericida total tanto con *Listeria monocytogenes* como con algunos otros microorganismos patógenos que pueden presentarse en el proceso de fermentación de estas matrices alimentarias.

10. Anexos

Anexo A: Medios de cultivo y reactivos empleados

1. Caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS) Difco®

Tabla A.1: Composición de caldo Man Rogosa Sharpe Difco®

Caldo Man Rogosa Sharpe (MRS)	
<i>Objetivo: Empleado para el crecimiento de bacterias ácido lácticas</i>	
Componente	g/L
Peptona	10.0
Extracto de carne	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Tween 80	1.0 mL
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio trihidratado	5.0
Citrato triamoniaco	2.0
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2
Sulfato de manganeso tetrahidratado	0.05
Condiciones: pH final = 6.5 ± 0.2	
Esterilización: 121 °C por 15 minutos, Antes de uso: Incubar a 30 °C por 24 horas	

2. Agar Man-Rogosa-Sharpe (MRS) Difco®

Tabla A.2: Composición de agar Man Rogosa Sharpe Difco®

Agar Man Rogosa Sharpe (MRS)	
<i>Objetivo: Empleado para el crecimiento de bacterias ácido lácticas</i>	
Componente	g/L
Peptona	10.0

Extracto de carne	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Tween 80	1.0 mL
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio trihidratado	5.0
Citrato triamoniaco	2.0
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2
Sulfato de manganeso tetrahidratado	0.05
Agar	15.0
Condiciones: pH final = 6.5 ± 0.2	
Esterilización: 121 °C por 15 minutos, Antes de uso: Incubar a 30 °C por 24 horas	

3. Caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI, OXOID®)

Tabla A.3: Composición de caldo Infusión Cerebro-Corazón OXOID®

Caldo BHI	
<i>Objetivo: Permitir el crecimiento de microorganismos sensibles</i>	
Componente	g/L
Sólidos infusión cerebro de buey	12.5
Sólidos infusión cerebro de ternera	5.0
Proteosa peptona	10.0
Glucosa	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	2.5
Condiciones: pH final = 7.4 ± 0.2	
Esterilización: 121 °C por 15 minutos, Antes de uso: 30 °C por 24 horas	

4. Agar Infusión Cerebro-Corazón (BHI, OXOID®)

Tabla A.4: Composición de agar Infusión Cerebro-Corazón OXOID®

Agar BHI	
<i>Objetivo: Permitir el crecimiento de microorganismos sensibles</i>	
Componente	g/L
Sólidos infusión cerebro de buey	12.5
Sólidos infusión cerebro de ternera	5.0
Proteosa peptona	10.0
Glucosa	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	2.5
Agar	10.0
Condiciones: pH final = 7.4 ± 0.2 Esterilización: 121 °C por 15 minutos, Antes de uso: 30 °C por 24 horas	

5. Base de Agar Oxford para *Listeria* (Acumedia®)

Tabla A.5: Composición de agar Acumedia®

Base de Agar Oxford Acumedia®	
<i>Objetivo: Medio base para llevar a cabo el crecimiento de especies de Listeria</i>	
Componente	g/L
Base de agar Columbia	39.0
Esculina	1.0
Citrato férrico de amonio	0.5
Cloruro de litio	15.0
Agar	2.0
Condiciones: pH final = 7.2 ± 0.2 Esterilización: 121 °C por 15 minutos, Antes de uso: 30 °C por 24 horas	

6. Suplemento para *Listeria* Dalynn Biologicals®

Suplemento distribuido en viales de 5 mL. Para llevar a cabo la resuspensión y adicionarlo asépticamente, se adicionan 2.5 mL de etanol absoluto, se agita y posteriormente se adicionan 3.5 mL de agua destilada previamente estéril y se agita de nuevo. El vial con los 5 mL finales se adiciona de manera aséptica a 500 mL del medio Oxford Acumedia® estéril y se deja atemperar a 45-50 °C; se homogeniza para que se incorpora a todo el medio y se lleva a cabo el vaciado en cajas Petri estériles.

Tabla A.6: Composición de complemento para agar Acumedia®

Complemento de agar Oxford Acumedia®	
Componente	5 mL/vial
Acriflavina	2.5 mg
Colistina	10.0 mg
Ciclohexamida	200.0 mg
Cefotetano	1.0 mg
Fosfomicina	5.0 mg

7. Solución salina 0.85%

Para preparar un volumen de 100 mL se pesan 0.85 g de NaCl marca J. T. Baker®, se colocan en un matraz aforado de 100 mL y se agrega agua destilada hasta la marca de aforo; se homogeniza y posteriormente se coloca 4.5 mL de esta solución en viales. Se esteriliza en autoclave a 121 °C/1 atm de presión por 15 minutos. Se somete por último a prueba de esterilidad en incubadora de 30 °C por 24 horas.

8. Enzimas utilizadas

Tabla A.7: Descripción de las enzimas empleadas en los ensayos enzimáticos

Enzima	Buffer	Referencia	Marca
Proteasa de <i>Streptomyces gryseus</i>	Glicina-NaOH pH: 9	P5147	Sigma-Aldrich



Tripsina de páncreas porcino	Glicina-NaOH pH: 9	T0303	Sigma-Aldrich
Proteasa de <i>Bacillus licheniformes</i>	Glicina-NaOH pH: 9	P3910	Sigma-Aldrich
α -Quimotripsina de páncreas bovino	Buffer de fosfatos pH: 7	C4129	Sigma-Aldrich








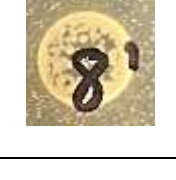
9. Buffer Gly-NaOH (pH 9.0)











Se pesan 0.934 g de lentejas de NaOH grado analítico de la marca Mallinckrodt AR[®], se colocaron en un matraz aforado de 50 mL y se homogeneizó lentamente con agua destilada hasta una total disolución; continuándose hasta el aforo y por último se coloca en un frasco ámbar etiquetado. Por otra parte se preparó solución de glicina 0.2 M pesando 15.01 g de glicina para buffer grado analítico de la marca Mallinckrodt AR[®] colocándose en un matraz aforado de 50 mL y homogeneizando con agua destilada hasta llegar a la marca de aforo y depositando en un frasco previamente etiquetado. Se toman entonces 50 mL de la solución de glicina y 8.8 mL de la solución de NaOH 0.2 M, se colocan en un matraz aforado de 200 mL y se lleva con agua destilada hasta la marca de aforo, se agita y se vierte en un frasco, se lleva a cabo la medición del pH y se ajusta hasta llegar a un valor de 9.0 con NaOH.






Anexo B: Registro fotográfico de pruebas de difusión en agar

Tabla B.1: Resultados de pruebas de difusión en agar de 39 cepas de BAL frente a *L. monocytogenes*.

Microorganismo sensible	Cepa	Radio inhibición (cm)	Observaciones	Imagen
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-01	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-15	0.1	Halo transparente	

<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-03	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-61	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-148	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-a16	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-a18	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-a28	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-158	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-a08	No presentó	-----	

<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-a88	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-a11	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-b18	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-29	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-b11	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-119	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-71	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-100	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-115	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-107	No presentó	-----	

<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-97	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-109	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-123	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-122	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-105	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-150	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-b28	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-134	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-154	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-139	No presentó	-----	










<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-140	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-163	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-164	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-151	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-146	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-160	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-129	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-a141	No presentó	-----	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fv-b141	No presentó	-----	

Tabla B.2: Resultados de pruebas de difusión en agar de 5 cepas de BAL frente a *Salmonella enterica typhimurium*.


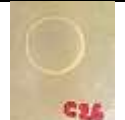









Microorganismo sensible	Cepa	Radio inhibición (cm)	Observaciones	Imagen
<i>Salmonella enterica typhimurium</i>	Fv-01	No presentó	-----	
	Fv-15	No presentó	-----	
	Fv-03	No presentó	-----	
	Fv-61	No presentó	-----	
	Fv-148	No presentó	-----	

Tabla B.3: Resultados de pruebas de difusión en agar de cepa Fv-15 de BAL frente a *L. innocua* y cepas de cavidad oral.

Microorganismo sensible	Cepa	Radio inhibición (cm)	Observaciones	Imagen
<i>Listeria innocua</i>	Fv-15	0.1	Halo transparente	
<i>Streptococcus mutans</i>	Fv-15	No presentó	-----	

<i>Streptococcus oralis</i>	Fv-15	0.5	Halo transparente	
<i>Streptococcus mitis</i>	Fv-15	No presentó	-----	
<i>Streptococcus salivarius</i> FM	Fv-15	0.4	Halo transparente	
<i>Streptococcus salivarius</i> FQ	Fv-15	0.2	Halo transparente	

11. Bibliografia

- Aas J. A., Paster B. J., Stokes L. N., Olsen I., Dewhirst F. E., 2005. Defining the normal bacteria flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5721-5732.
- Abdus M., Matsumoto N., Matin K., Tsuha Y., Nakao R., Hanada N., Senpuku H., 2004. Establishment of an animal model using recombinant NOD. B10. D2 mice to study initial adhesion of oral streptococci. *Clinic Diagnostic Laboratory Immunology*, 11: 379-386.
- Alakomi H. L., Skyttä E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K., Helander I. M., 2000. Lactic acid bacteria permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 2001-2005.
- Arbique J. C., Poyart C., Trieu-Cuot P., Quesne G., Carvalho M. G., Steigerwalt A. G., Morey R. E., Jackson D., Davidson R. J., Facklam R. R., 2004. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *S. pseudopneumoniae* sp. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4686-4696.
- Axelsson L. T., 1990. *Lactobacillus reuteri*, a member of the gut bacterial flora. In *Department of Microbiology*; University of Agricultural Sciences: Uppsala, Sweden, 64 pp.
- Axelsson L. T., Chung T. C., Dobrogosz W. J., Lindgren S. E., 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease Journal*, 2, 131-136
- Axelsson L., Salminen S., Von Wright A., 1993. Lactic acid bacteria classification and physiology. *Marcel Dekker Inc.*, New York.
- Baird-Parker A. C., 1980. Organic acids. In *Microbial Ecology of Foods*, ed. Silliker J. H., Elliott R. P., Baird-Parker A. C., Bryan F. L., Christian J. H. B., Clark D. S., Olson Jr. J. C., Roberts T. R. Academic Press, New York, pp. 126-135.
- Besser R. E., Lett S. M., Weber J. T., Doyle M. P., Barrett T. J., Wells J. W., Griffin P. M., 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *Journal of the American Medical Association*, 269, 2217-2220.

- Blom H., Mörtvedt C., 1991. Anti-microbial substances produced by food associated microorganisms. *Biochemical Society Transactions*. 19: 694-698.
- Bochud P. Y., Cornetta A., Francioli P., 1997. Virulent infections caused by alpha-haemolytic streptococci in cancer patients and their management. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 10: 422-430.
- Brock T. D., Peacher B. & Pierson D., 1963. Survey of the bacteriocins of enterococci. *Journal of Bacteriology*, 86, 702-707.
- Carlsson J., Iwami Y., Yamada T., 1983. Hydrogen peroxide excretion by oral streptococci and effect of lactoperoxidase thiocyanate-hydrogen peroxide. *Infection and immunity*, 40, 70-80.
- Carminati D., Giraffa G. & Bossi M. G., 1989. Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52, 614-617.
- Carranza F. A., 1986. Periodontología Clínica. 6ª edición. México: Interamericana, pp. 383-392.
- Castro L., Rovetto C., 2006. Probióticos: utilidad clínica. *Colombia Médica*, 37: 15-22
- CDC, 1995. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami Washington and California, 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 44, 157-160.
- Chen H., Hoover D. G. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Institute of Food Technologists. Vol. 2, pp. 82-100.
- Chung T. C., Axelsson L. T., Lindgren S. E., Dobrogosz W. J., 1989. In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease Journal*, 2, 137-144.
- Cilano L., Bossi M. G. & Carini S., 1990. Bacteriocin production by *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Microbiology and Nutritional Alimentation*, 8, 21-30.
- Cole M. B., Jones M. V., Holyoak C., 1990. The effect of pH, salt concentration and temperatura on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*. 69: 63-72.

- Conner D. E., Scott V. N., Bernard D. T., 1990. Growth inhibition and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. *Journal of Food Protection*. 53: 652-655.
- Cotter P. D., Hill C., Ross P. R., 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews in Microbiology*. Vol. 3, 777-788.
- Cravioto R. O., Massieu H. G., Guzmán J., Calvo de la Torre J., 1951. Composición de alimentos mexicanos. *Ciencia México* 11: 129-156.
- Daba H., Pandian S., Gosselin J. F., Huang J., Lacroix C., 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:12, 3450-3455.
- De Vuyst L. & Vandamme E. J., 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Microbiology, Genetics and Applications. Chapter 4: Bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. *Springer Science + Business media, LLC*, 143-149.
- De Vuyst L. & Vandamme E. J., 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Microbiology, Genetics and Applications. Chapter 5: Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. *Springer Science + Business media, LLC*, 151-186.
- De Vuyst L., Vandamme E. J., 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications. 1st edition. *Springer science and Business Media, LLC*. Chapter 3: Antimicrobial potential of lactic acid bacteria (De Vuyst & Vandamme).
- Deegar L. H., Cotter P. D., Colin H., Ross P., 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16: 1058-1071.
- Devine D. A., 2003. Antimicrobial peptides in defense of the oral and respiratory tracts. *Molecular Immunology*. 40: 431-443.
- Dobrogosz W. J., Casas I. A., Pagano G. A., Talarico T. L., Sjöberg B-M., Karlsson M., 1989. *Lactobacillus reuteri* and the enteric microbiota. In *The Regulatory and Protective Role of the Normal Microflora*. New York, 1989, 283-292.

- Doyle M. P., Zhao T., Meng J., Zhao S., 1997. *Escherichia coli* O157:H7. In “*Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers.*” Ed. Doyle M. P., Beuchat L. R., Montville T. J., pp. 171-191. ASM Press, Washington D. C.
- Dunne C., *et al.*, 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antoine Van Leeuwenhoek*, 76: 279-292.
- Escalante A., Giles M., Hernández G., Córdova M. S., López A., Gosset G., Bolívar F., 2008. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124:126-134.
- Farber J. M., Peterkin P. I., 2000. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55(3), 476-511.
- Fontaine E. A., Claydon E., Tayler-Robinson D., 1996. Lactobacilli from women with or without bacterial vaginosis and observations on the significance of hydrogen peroxide. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 9, 135-141.
- García-Mendoza A., 1995. El maguey una planta maravillosa. En torno al pulque y al maguey. (Cofradía en Apoyo de la Mayora Mexicana AC), pp.38-42. Grupo Editorial Siquisiri, México.
- García-Mendoza A., 1998. Con sabor a maguey: Guía de la colección nacional de Agaváceas y Nolináceas el Jardín Botánico. Instituto de Biología, Jardín Botánico, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gibbons E. J., Van Houte J., 1971. Selective bacterial adherence to oral epithelial surfaces and its role as an ecological determinant. *Infection and Immunity*, 3, 567-573.
- Giraffa G., 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*. 28 (2): 251-260
- Gómez-Aldapa C. A., Díaz-Cruz C. A., Villaruel-López A., Torres-Vitela M. del R., Rangel-Vargas E., Castro-Rosas J., 2012. Acid and alcohol tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 in pulque, a typical Mexican beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 79-84.

- Gonçalves de Lima O., 1990. Pulque, balché y pajauarú. Fondo de Cultura Económica, México.
- Guglielmetti S., Taverniti V., Minuzzo M., Arioli S., Stuknyte M., Karp M., Mora D., 2010. Oral bacteria as potential probiotic for the pharyngeal mucosa. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3948-3958.
- Harris L. J., Daeschel M. A., Stiles M. E., Klaenhammer T. R., 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 52: 384-387.
- Hersberg M. C., Brinteenhafa L. K., Clause C. C., 1982. Aggregation of Human Platelets and Adhesion of *Streptococcus sanguinis*. *Infection and immunity*. 39:3, 1457-1469.
- Hirsch A., 1951. Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. *Journal of General Microbiology*, 5, 208-221.
- Holzapfel W, H., Geisen R., Schillinger U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*. 24, 343-362.
- HPA, 2009. Pyogenic and non-pyogenic streptococcal bacteraemias, England, Wales and Northern Ireland: 2008. *Health Protection Report* [serial online], 3 (49): bacteraemia.
- Jay J. M., 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 525-532.
- Kailasapathy K., 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT*, vol. 39, pp. 1221-1227.
- King A. D J., Nagel C. W., 1975. Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Food Science*, 40, 362-366.
- Klaenhammer T. R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12 (1-3). Pp- 39-85.
- Lappe O. P., Moreno T. R., Arrizó G. J., Herrera S. T., 2008. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast research*, 8, 1037-1052.

- Larse A. G., Vogensen F. K. & Josephsen J., 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 113-122.
- Leroy F., De Vuyst L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science Technology*; 15:67-78.
- Lewus C. B., Sun S. & Montville T. J., 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 5, 143-149.
- Lindgren S. E., Dobrogosz W. J., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 87, 149-163.
- Little Wayne A., Thompson A. L., Biwen H. W., 1978. Antibiotic Susceptibility of *Streptococcus mutans*. Comparison of Serotype Profiles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 15:3, pp. 440-443.
- Liu W. & Hansen J. N., 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2551-2558.
- Liu, S., 2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 83:115-131.
- Llanos A. C. (2015). Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol y su efecto en la inhibición de bacterias patógenas presentes en alimentos y en la cavidad oral. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Ciudad de México.
- López, A., García G. M., López-Munguía, C. A., 2004. *Biología Alimentaria*. Madrid, Limusa Pp. 301-306
- Loyola-Montemayor E., 1956. La industria del pulque. *Departamento de investigaciones industriales*. Banco de México S. A., México.
- Maldonado Bolaños Christopher. 2016. Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactococcus* aisladas de alimentos fermentados tradicionales. Tesis.

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Ciudad de México. 103p.

- Marciset O. & Mollet B., 1993. Characterization of thermophilin 13, a bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* Sfi13. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, P129, G25.
- Marteau P., Rambaud J. C., 1993. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiology Reviews*. 12, 207-220.
- Mattick A. T. R. & Hirsch A., 1947. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, 2, 5-7.
- Mckay L. L., 1985. Roles of plasmids in starter cultures. In *Bacterial Starter Cultures for Foods*, ed. S. E. Gililand. CRC Press Inc., Boca Raton , Florida, pp. 159-174.
- Menaker L., Morhart R. E., Navia J. M., 1986. Bases biológicas de la caries dental. España: Salvat, pp. 223-227.
- Mikolajcik E. M. & Hamdan I. Y., 1973. Growth, viability and antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 56, 683.
- Mikolajcik E. M. & Hamdan I. Y., 1975. *Lactobacillus acidophilus*. Growth and characteristics and metabolic products. *American Journal in Culture Dairy Products*, 10, 10-16.
- Mitchell J., 2011. *Streptococcus mitis*: walking the line between commensalism and pathogenesis. *Molecular Oral Microbiology*, 26, 89-98.
- Monroy M. C., Castro Barrera T., Fernández Oerrinom F. J., Mayorga Reyes L., 2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contacto S*. 73: 63-72.
- Morgan D., Newman C. P., Hutchinsons D. N., Walker A. M., Rowe B., Majid F., 1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of yogurt. *Epidemiology and Infection* 111, 2: 181-187.
- Morris J. G., 1976. Oxygen and the obligate anaerobic. *Journal of Applied Microbiology*, 40, 229-244.
- Mulders J. W. M., Boerrigter I. J., Rollema H. S., Siezen R. J. & de Vos, W. M., 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *European Journal of Biochemistry*, 201, 581-584.

- Muñoz-Rojas J., 2003. Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. *Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre fijación de nitrógeno*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Murata R. M., Branco-de-Almeida L. S., Franco E. M., Yatsuda R., Dos Santos M. H., de Alencar S. M., Koo H., Rosalen P. L., 2010. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries *in vivo* by 7-epiclusianone and fluoride. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 26:7, 865-872.
- Ortíz-Basurto R. I., Pourcelly G., Doco T., Williams P., Dornier M., Belleville M. P., 2008. Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 3682-3687.
- Parra R., Rodríguez J., Martínez G., 2008. Efecto de la stevia y gelatina como aditivos en la elaboración de un yogurt probiótico durante el periodo de incubación. 4°. *Coloquio Internacional y Nacional de Investigación en Alimentación y Nutrición*. Universidad de Antioquía. Página 53.
- Parra R. A., 2010. Review. Bacterias Ácido Lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia*, Vol. 8, no. 1, pp. 93-105.
- Pascual L. M., Giordano W., Pájaro M. C., Barberis I. L., 2008. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology Vol. 56*, pp. 397-402.
- Pérez R. 2006. Agua de las verdes matas. Cienciorama, 1-12. Disponible en: http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/424_cienciorama.pdf Última consulta: 11/08/17
- Philips D., Martin M., Lewis M., Williams D., 2010. Oral Microbiology. Ed. Churchill Livingstone Elsevier, 5a. edición. Gran Bretaña, pp-5-40.
- Piard J. C. & Desmazeaud M., 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 72, 113-142.

- Ramírez J. F., Sánchez-Marroquín A., Álvarez M. M., Valyasebi R., 2004. Industrialization of Mexican pulque. *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*, 2nd edition, pp. 547-586. Marcel Dekker, New York.
- Riley M. A., Wertz J. E., 2002. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annual Reviews of Microbiology*. Vol. 56: 117-137.
- Roger P., Delettre J., Bouix M., Béal C., 2011. Characterization of *Streptococcus salivarius* growth and maintenance in artificial saliva. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 631-641.
- Romero R., 2007. Microbiología y Parasitología Humana. 3^a. Edición, Editorial Panamericana, pp. 790-797.
- Sánchez-Marroquín A., 1970. Investigaciones realizadas en la Facultad de Química, UNAM, tendientes a la industrialización del agave XIV. *Revista de la Sociedad Química Mexicana*, 4:184-188.
- Sánchez-Marroquín A., 1977. Mexican Pulque a Fermented Drink from Agave juice. *Symposium on Indigenous Fermented Foods*. Bangkok, Thailand.
- Savadogo A., Ouattara C. A. T., Bassole I. H. N., Traore S. A., 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria: a mini review. *African Journal of Biotechnology*. 5 (9), 678-683.
- Schlegel H. G., 1985. *Allgemeine Mikrobiologie*, 6th Edition; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 571 pp.
- Schved F., Lalazar A., Henis Y. & Juven B. J., 1993. Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 67-77.
- SECOFI, 1972a. NMX-V-022-1972. Hidromiel. Normas Mexicanas, Dirección General de Normas. Diario Oficial septiembre 26, México.
- SECOFI, 1972b. NMX-V-037-1972. Hidromiel. Normas Mexicanas, Dirección General de Normas. Diario Oficial agosto 17, México.
- Seppo S., Von Wright A., Ouwehand A., 2004. Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3rd edition. *Marcel Dekker Inc*. Chapter 1: Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology.

- Sierra P., 2005. El maguey, el pulque y sus deidades. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
- Simon E. W., Blackman G. E., 1949. The significance of hydrogen-ion concentration in the study of toxicity. *Symposia of the Society for Experimental Biology*: 3, 253-265.
- Steinkraus K. H., 1996. Introduction to Indigenous fermented Foods. 2nd. Edition. New York, New York. Marcel Dekker. Pp. 1-5.
- Steinkraus K. H., 1997. Classification of fermented foods: worldwide review of house-hold fermentation techniques. *Food Control*. 8:311-317.
- Stoffels G., Nissen-Meyer J., Gudmundsdottir A., Sletten K., Holo H. & Nes I. F., 1992. Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1417-1422.
- Suomalainen T. H., Mäyrä-Mäkinen A. M., 1999. Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads. *Lait*, 79, 165-174.
- Tagg J. R., 2004. Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory sub-stances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian Journal of Medical Research*, 119, 13-16.
- Talarico T. L., Dobrogosz W. J., 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33, 674, 679.
- Tamang J. P., Watanabe K., Holzapfel W. H., 2016. Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR): 1-28.
- Tannock G. W., 1997. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends in Biotechnology*. 15, 270-274.
- Tavera F. L. (2010). Producción de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas aisladas de pozol para la inhibición de bacterias patógenas. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Ciudad de México.
- Trame J., 1966. Nisin in food preservation. *Chemistry and Industry*, 11, 446-450.

- Vargas L. A., 1999. El pulque en la cultura de los pueblos indígenas. *Fundación de Investigaciones Sociales A. C. El pulque, la cultura y la salud*. México D. F.: Cuadernos FISAC. 72 p.
- Villani F., Salzano G., Sorrentino E., Pepe O., Marino P. & Coppola S., 1993. Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 380-387.
- Vincent J. G., Veomett R. C. & Riley R. F., 1959. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Bacteriology*, 178, 477-484.
- Von Wright A., Axelsson L., 2012. Lactic acid bacteria: and introduction. En S. Lahtinen, A. Ouwehand S., Salminen S., Von Wright A., *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects* (1-16). Boca Raton, Florida: CRC Press
- Wescombe P. A., Hale J., Cheng CK N., Tagg J. R., 2012. Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*. *Review, Future Microbiology*, 7(12), 1355-1371.
- Wood B. J. B. & Holzapfel W. H., 1995. The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional. London.
- Zacharof M. P., Lovitt R. W., 2012. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria, a review article. *APCBEE Procedia*, 2: 50-56.
- Zacharof M. P., Lovitt, R. W., 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. A Review Article. *APCBEE Procedia*, 2: 50-56.