



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Espectro antimicrobiano de *Pediococcus acidilactici*
ATCC 8042

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

JACQUELINE HERNÁNDEZ OLVERA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. AMELIA FARRÉS GONZALEZ - SARAVIA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2005



m351321



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Espectro antimicrobiano de Pediococcus acidilactici ATCC 8042"

realizado por Hernández Olvera Jacqueline

con número de cuenta 09731211-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Amelia Farrés González Saravia

Propietario

Dra. Laura Kawasaki Watanabe

Propietario

Biól. Alfonso José Vilchis Peluyera

Suplente

Biól. Alicia Marmolejo Flores

Suplente

I. B. Q. Hector Quezada Pablo

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

La admiración es para aquellos que realmente se esfuerzan por ser alguien importante en la vida.

Y el éxito es el premio del esfuerzo personal y se obtiene solo con pensamiento firme y seguro de saber lo que se quiere llegar a ser.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado la oportunidad de ser parte de ella, por haberme guiado y preparado para realizarme personal y profesionalmente.

A mis padres: José Juan Hernández Vázquez y Alicia Olvera Ocaña, sabiendo que no existirá una forma de agradecer toda una vida de sacrificios y esfuerzos, quiero que sepan que el objetivo logrado también es suyo y que la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue su apoyo. Mil gracias por todo.

A mis hermanos: Miriam, Nestor y Katheryn por ser tan importantes e indispensables en mi vida, con quienes he compartido muchas vivencias que quedarán en mi memoria y corazón. Y espero que este fruto de esfuerzo y perseverancia sea de ejemplo para ellos.

A mis familiares en general que de alguna u otra forma han contribuido para mi formación personal y profesional.

A Edgar, que eres parte de mis días y poemas, que has sabido aceptar y respetar mis virtudes y defectos, y porque siempre has estado cuando te he necesitado, gracias por tu apoyo y sinceridad.

A mis amigos y compañeros, por su motivación y amistad, por eso y por más, mil gracias.

A la Dra. Amelia Farrés, por su gran trayectoria profesional y porque ha sido un pilar indiscutible en mi formación, mil gracias por haber creído en mí, por

apoyarme, por guiarme y ayudarme siempre que la necesite. Mis más sinceras bendiciones para usted y su familia.

A mis sinodales: la Dra. Laura Kawasaki, el Biól. Alfonso Vilchis, la Biól. Alicia Marmolejo y el I.B.Q. Hector Quezada, por la aceptación y apoyo brindado para que este sueño se haga realidad.

A la M. en C. Idalia Flores por el apoyo incondicional, sus sabios consejos y su acertada guía.

A la M. en C. Adriana Llorente Bousquets por el apoyo y la guía brindada para la realización de este proyecto.

A todos los integrantes del laboratorio 312 del Departamento de Biotecnología y Alimentos de la Facultad de Química, por el apoyo, la guía y la amistad brindada.

A DGAPA por haberme Otorgado una beca en el proyecto IN230103-2, gracias a la cual se pudo realizar este trabajo de tesis.

A todos aquellos que en algún momento de mi vida hicieron presencia con sus consejos y bendiciones.

ÍNDICE

	Pag
Resumen	ii
Justificación	iii
1.0 Marco teórico	1
1.1 ¿Qué es una bacteria?	1
1.2 Características generales de bacterias Gram-negativas y bacterias Gram-positivas	8
1.3 Bacterias Ácido Lácticas	18
1.4 Género <i>Pediococcus</i>	31
1.5 <i>Pediococcus acidilactici</i>	34
1.6 <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	35
1.7 Microorganismos patógenos en alimentos y BAL	37
1.8 Crecimiento bacteriano	57
1.9 Metabolismo bacteriano	61
1.10 Metabolismo primario y metabolismo secundario	66
2.0 Hipótesis	72
3.0 Objetivos	72
3.1 Objetivo general	72
3.2 Objetivos particulares	72
4.0 Metodología	73
4.1 Cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	73
4.2 Obtención de los sobrenadantes de los cultivos de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	77
4.3 Identificación, caracterización y mantenimiento de las cepas microbianas para realizar las pruebas de espectro antimicrobiano	78
4.4 Espectro antimicrobiano de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	80
5.0 Resultados y Discusiones	84
6.0 Conclusiones	101
7.0 Bibliografía	102

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL), sus productos metabólicos, o ambos, son empleados tradicionalmente en la conservación de alimentos, proporcionándoles sabor y textura además de incrementar su valor nutricional. Ciertas sustancias producidas por estas bacterias se utilizan en la industria alimenticia como bioconservadores, ya que ejercen acción antibacteriana que contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos.

Este trabajo muestra el espectro antimicrobiano de sobrenadantes de cultivos de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, evaluado contra BAL relacionadas, como con bacterias Gram-positivas y Gram-negativas mediante pruebas cuantitativas en agar, tras su producción en diferentes medios de cultivo.

Se cultivó *Pediococcus acidilactici* en dos medios nutritivos: MRS y CSTES, con el fin de probar si el crecimiento de este microorganismo en diferentes medios de cultivo permite la producción de sustancias con espectro inhibitorio distinto. Se obtuvieron cultivos a las 8 y 24 horas; a las 8 horas porque es la fase exponencial del microorganismo, y a las 24 horas porque ya se encuentra en fase estacionaria.

Los resultados obtenidos mostraron que se genera un perfil antimicrobiano distinto de los sobrenadantes de los cultivos de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en MRS y CSTES; siendo los cultivos de MRS los que presentan un mayor espectro antimicrobiano. Las cepas más afectadas son las que pertenecen al grupo de las bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* y dentro del grupo de las bacterias Gram-positivas las especies más afectadas son *Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua*. Las BAL relacionadas: *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus* no son afectadas en su crecimiento por ninguno de los sobrenadantes de los cultivos de *Pediococcus acidilactici*.

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la sustancia producida difiere de la previamente reportada para la especie, conocida como pediocina.

JUSTIFICACIÓN

Las BAL han estado presentes en la alimentación del hombre desde hace siglos, pues se encuentran en productos de leches fermentadas, productos cárnicos y hasta en algunas hortalizas. Producen sustancias inhibidoras, cuyo efecto puede ser sinérgico o aditivo y ser de tipo bactericida y/o bacteriostático sobre bacterias susceptibles. Esto representa un gran potencial para la industria alimenticia ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros, que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos, teniendo las ventajas de ser biodegradables y de no formar compuestos secundarios.

El género de *Pediococcus* es uno de los principales de las bacterias ácido lácticas que tiene un efecto de bioconservación y son tradicionalmente usados como cultivos iniciadores en alimentos y bebidas, garantizando mejores características sensoriales y sanitarias. Cepas de *Pediococcus acidilactici* inhiben bacterias patógenas de interés sanitario en alimentos. Sin embargo, para la especie han sido reportadas cepas productoras y no productoras de pediocinas. El trabajo realizado por este grupo de investigación con la cepa *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 indica que si bien su efecto antibacteriano y de bioconservación es claro, no es una cepa pediocinogénica. La naturaleza de la sustancia inhibitoria se encuentra en fase de caracterización, y corresponde, aparentemente, a una enzima peptidolítica. En este trabajo se analizará el espectro antimicrobiano de los sobrenadantes de cultivo producidos por la cepa, lo que contribuirá a la caracterización de la molécula antimicrobiana.

1.0 MARCO TEÓRICO

1.1 ¿QUÉ ES UNA BACTERIA?

Todos los organismos vivos pertenecen a uno de los tres grandes reinos: Eucariotes, Arqueobacterias y Eubacterias (Fig. 1), árbol filogenético universal establecido por Carl Woese y su discípulo Gary Olsen que muestra los tres dominios¹. El término "dominio" refiere a un nuevo taxón filogenético que incluye tres líneas primarias: Eucarya, Archaea y Bacteria (eubacterias). Estos dos últimos se conocen como bacterias y se denomina así a todos los procariontes, es decir, células sin núcleo y con pared celular, de tamaño pequeño. Morfológicamente, las bacterias pueden ser: cocos (esféricos), bacilos (en forma de bastón) y espirilos (de formas onduladas)² (Fig. 2). Las bacterias (figura 4) carecen de membrana nuclear, así como de otras membranas intracelulares. Sin embargo, están equipadas con toda la maquinaria bioquímica para su supervivencia y para dividirse. El material genético está compuesto por una única molécula de ADN y por un único cromosoma. Las bacterias son unicelulares y, aunque pueden encontrarse en grupos, estos nunca se organizan en cooperatividad, es decir que no existe dependencia de unas con otras para sobrevivir³.

La célula bacteriana tiene un contenido en agua del 70 al 85%. Los datos de la composición elemental y la distribución de los compuestos orgánicos integrantes del peso seco se dan en las tablas 1 y 2.

¹ <http://fai.unne.edu.ar/biologia/bacterias/micro1.htm>

² <http://www.clasicas.usal.es/diccioned/bacteria.htm>

³ <http://www.genome.gov/sglossary.cfm?key=Bacteria&action=lea>

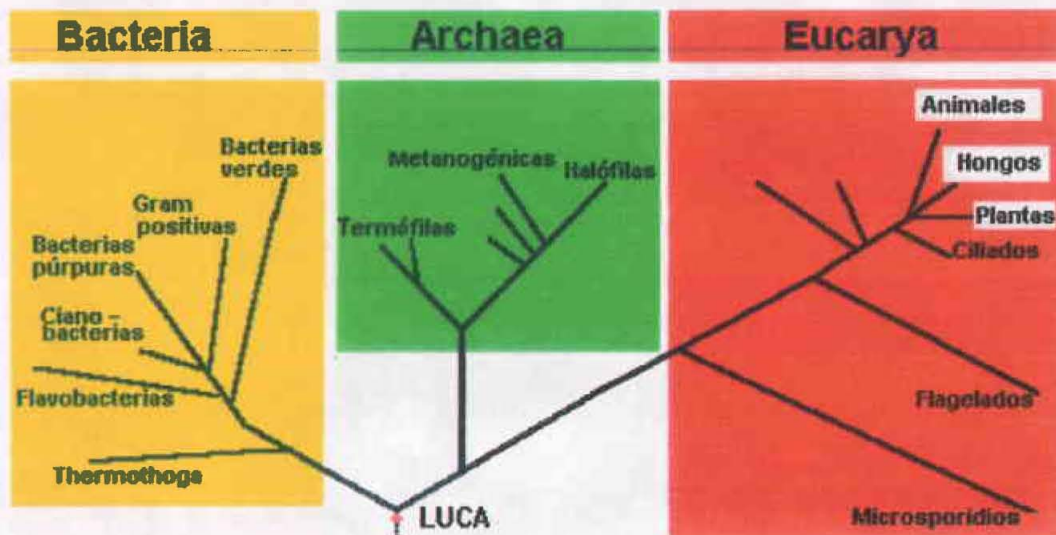


Figura 1. Árbol filogenético Universal establecido por Carl Woese y su discípulo Gary Olsen que muestra los tres Dominios⁴. LUCA (Last Universal Cellular Ancestor): antepasado común de las células modernas, no la primera célula sino una célula ya evolucionada, Término propuesto en un coloquio de la Fundación Treille: <http://www-archbac.u-psud.fr/Meetings/LesTreilles>.

Elemento	Porcentaje
Carbono	50 %
Oxígeno	20 %
Nitrógeno	14 %
Hidrógeno	8 %
Fósforo	3 %
Azufre	1 %
Potasio	1 %
Calcio	0,5 %
Magnesio	0,5 %
Hierro	0,2 %

Tabla 1. Composición elemental de la célula bacteriana⁵.

⁴ <http://fai.unne.edu.ar/biologia/bacterias/micro1.htm>

⁵ <http://fai.unne.edu.ar/biologia/bacterias/micro1.htm#luca>

<u>Polímero</u>	<u>Porcentaje</u>
Proteínas	50 %
Pared celular	10-20 %
ARN	10-20 %
ADN	3-4 %
Lípidos	10 %

Tabla 2. Composición del peso seco⁶.

Las arqueobacterias constituyen un fascinante conjunto de organismos y por sus especiales características se considera que conforman un dominio separado, Archaea.

Si bien su apariencia es de bacterias poseen características bioquímicas y genéticas que las alejan de ellas, por ejemplo:

- no poseen paredes celulares con peptidoglicanos.
- presentan secuencias únicas en la unidad pequeña del ARNr.
- poseen lípidos de membrana diferentes tanto de las eubacterias como de los eucariotas (incluyendo enlaces éter en lugar de enlaces éster).
- algunas de ellas poseen esteroides en su membrana celular (una característica de eucariotas).

Las arqueobacterias hoy se encuentran restringidas a hábitats marginales como fuentes termales, depósitos profundos de petróleo caliente, fumarolas marinas, lagos salinos por lo que pueden considerarse como extremófilos.

⁶ <http://fai.unne.edu.ar/biologia/bacterias/micro1.htm#luca>

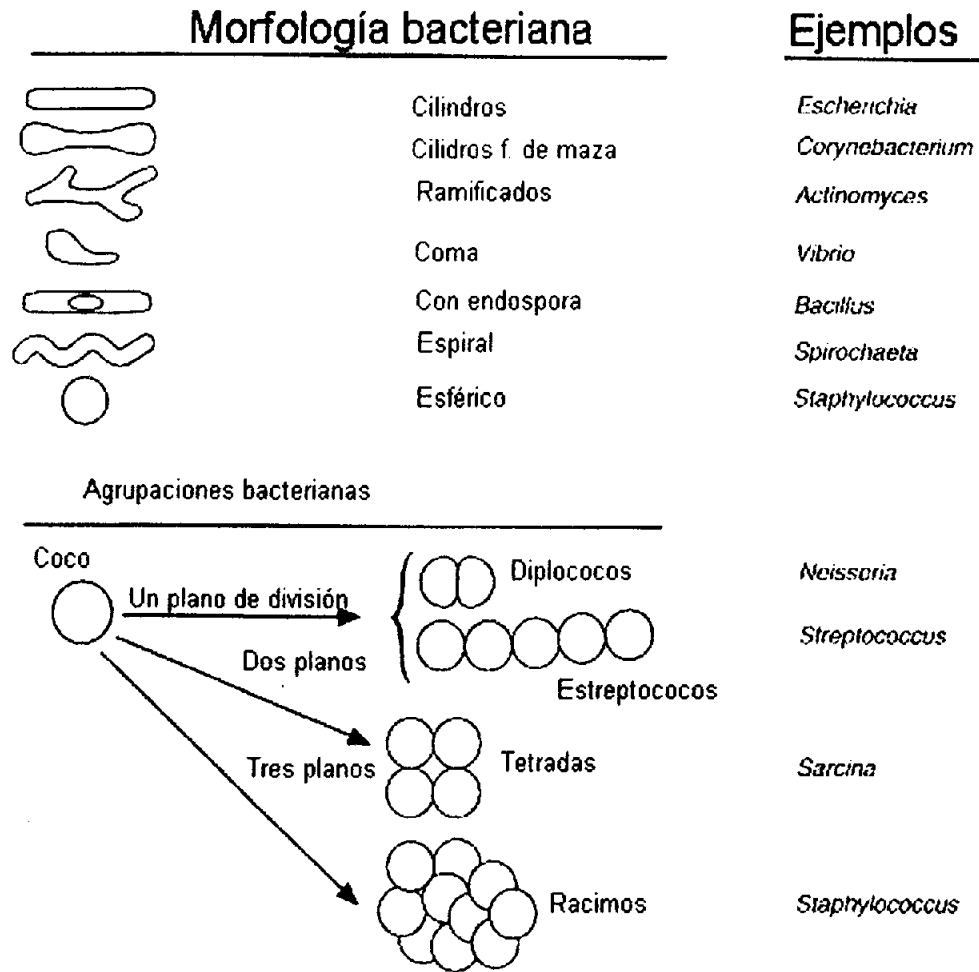


Figura 2. Morfología bacteriana⁷.

Las bacterias (del griego *bakterion* = bastón) son organismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. Su tamaño es del orden de los micrones e implica una relación superficie volumen muy alta: aproximadamente 100.000. Las bacterias se encuentran prácticamente en todos lo ambientes de la tierra, desde las profundas fosas oceánicas hasta el interior de rocas sólidas. La

⁷ <http://129.109.136.65/microbook/ch002.htm>

mayoría de ellas son capaces de una existencia independiente pero existen especies como *Chlamydia* y *Rickettsia* que son organismos intracelulares obligados.

Según la estructura de la pared celular las eubacterias se clasifican en Gram positivas y Gram negativas, basándose en una técnica de tinción, agregando solución de cristal violeta junto con solución de bicarbonato de sodio para acelerar la tinción, después de lavar con agua destilada se aplica solución de yodo, posteriormente se aplica alcohol etílico para eliminar el tinte de las bacterias, y por último se añade safranina. Si la bacteria conserva el tinte de cristal violeta, es Gram positiva, pues posee una pared más gruesa constituida por varias decenas de capas de diversos componentes (figura 11); en el caso de que el tinte de cristal violeta no se mantenga y la safranina sí la bacteria es Gram negativa, la cual posee una pared más simple (figura 11). La tinción emplea como primer paso la diferenciación bacteriana, considerándose bacterias Gram positivas a las bacterias que se visualizan de color violeta y Gram negativas a las que se visualizan de color rojo.

Los microorganismos se clasifican también por su aspecto al microscopio, por el tipo de colonias al crecer en medios de cultivo o por los nutrientes que utilizan. Al surgir la bioquímica otros criterios, como la presencia o ausencia de vías biosintéticas, el tipo de ácidos grasos o de algunas proteínas, como ubiquinonas, permitieron reconocer grupos de bacterias. Sin embargo, la identificación fenotípica no permite diferenciar con certeza el parentesco entre microorganismos, sólo entre las más cercanamente relacionadas (Martínez y Martínez, 2005).

En términos generales, la clasificación bacteriana ha sufrido numerosos cambios pues se han aplicado diferentes criterios. En este momento, la clasificación más empleada es la que utiliza el ARNr 16S como criterio de clasificación.

La biología molecular ha revolucionado nuestra manera de ver a los microorganismos, ya desde 1965 Linus Pauling supuso que las moléculas contienen la historia evolutiva de los seres vivos. Así el análisis y comparación de secuencias de aminoácidos de proteínas o la comparación de las secuencias nucleotídicas de genes permiten no sólo identificar, sino clasificar y establecer las relaciones filogenéticas entre organismos o microorganismos (Martínez y Martínez, 2005).

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias. El ARN ribosómico 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970 (Rodicio y Mendoza, 2004). Los estudios de Woese originaron la división de los procariotas en dos grupos o reinos, eubacteria y archaeobacteria, cuya divergencia es tan profunda como la encontrada entre ellos y los eucariotas. Además, permitieron establecer las divisiones mayoritarias y subdivisiones dentro de ambos reinos. Posteriormente, Woese

introdujo el término dominio para sustituir al reino como categoría taxonómica de rango superior, y distribuyó a los organismos celulares en tres dominios, como ya se vio anteriormente. Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas. Los ARNr 16S pueden caracterizarse en términos de secuencia parcial, mediante el método de catalogación de oligonucleótidos (Rodicio y Mendoza, 2004). En la figura 3 se muestra el árbol filogenético de las bacterias, basado en la comparación de la secuencia de ARNr 16S.

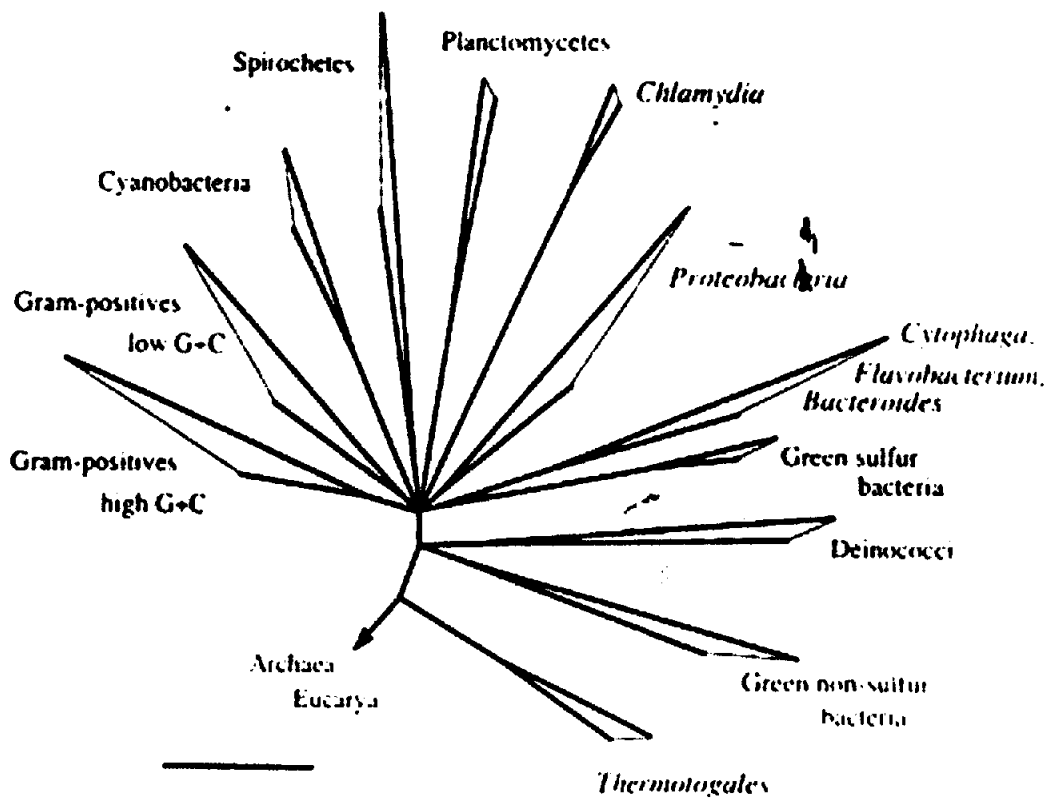


Figura 3. Árbol filogenético de las bacterias basado en la comparación de las secuencias de ARNr 16S. La barra del extremo inferior izquierdo indica el 10% de divergencia entre las diferentes secuencias. (Wood y Holzapfel, 1995).

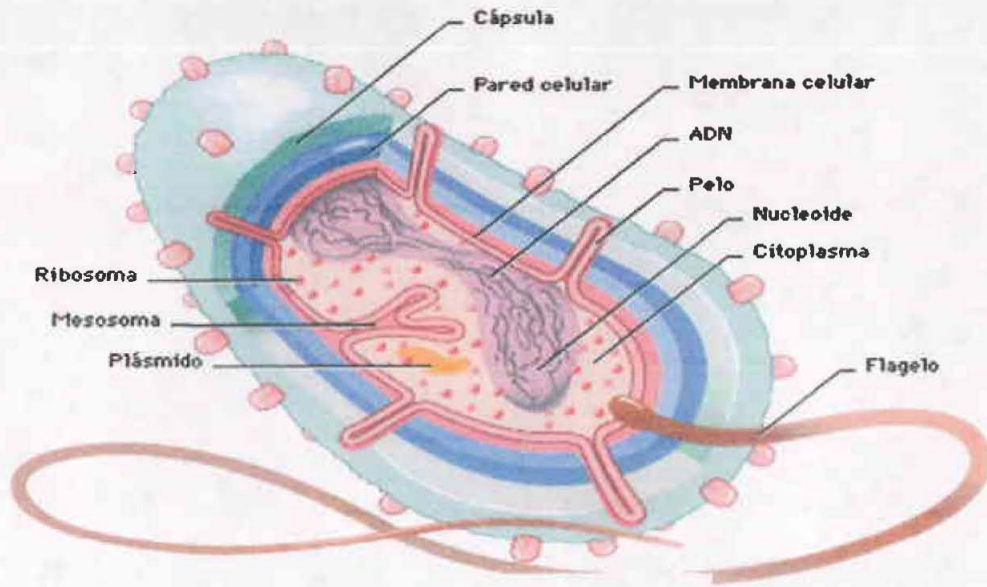


Figura 4. Representación esquemática de una bacteria y sus componentes.

1.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS Y BACTERIAS GRAM-POSITIVAS.

La pared celular de las Eubacterias son polímeros ramificados de estructura compleja. Según la estructura de la pared bacteriana, las eubacterias se clasifican en Gram positivas y Gram negativas, en función de que den positivo o no a un procedimiento de tinción desarrollado por el microbiólogo danés Gram (1853-1938).

La pared celular consiste de una capa que está íntimamente relacionada con la membrana citoplasmática que alcanza distintos niveles de complejidad

dependiendo de la especie. En la Tinción de Gram la diferencia se debe a la estructura de la pared celular, como a su composición química (tabla 3).

Las bacterias Gram positivas tienen peptidoglucano como componente mayoritario de sus paredes celulares (hasta el 90%), mientras que en las Gram negativas no lo es y no alcanza el 20% del total relativo. La pared celular de las Gram negativas es una estructura en capas múltiples de bastante complejidad, mientras que en las Gram positivas suele ser más gruesa y estar formada por un solo tipo de molécula (figura 11). La membrana externa está unida al peptidoglucano por enlaces iónicos, interacciones hidrófobas y enlaces covalentes.

En la pared celular de las Gram negativas el peptidoglucano está inmerso en un espacio llamado espacio periplasmático, que está delimitado por la membrana citoplasmática y la membrana externa. La membrana externa es una bicapa lipídica muy asimétrica. En la monocapa externa hay proteínas y lipopolisacárido, mientras que en la monocapa interna el lipopolisacárido es sustituido por fosfolípidos y lipoproteínas. El resultado es una membrana con una fluidez menor que la membrana plasmática.

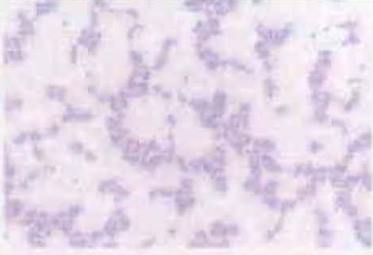

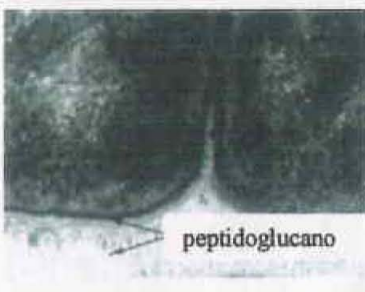
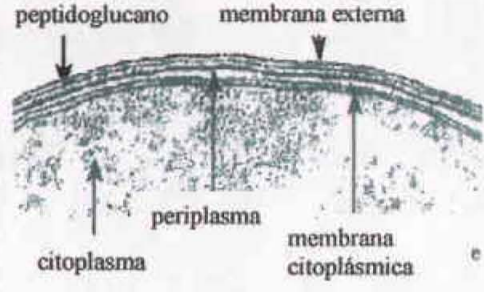
Tipo de bacteria	Gram (+)	Gram (-)
Composición	Peptidoglicano Ácidos teicoicos	Peptidoglicano Lipopolisacárido
Aspecto de la bacteria al microscopio óptico		
Aspecto de la pared celular al microscopio electrónico	 peptidoglicano	 peptidoglicano membrana externa citoplasma periplasma membrana citoplásmica

Tabla 3. Comparación entre bacterias Gram positivas y Gram negativas⁸.

PEPTIDOGLUCANOS

Los peptidoglicanos mejor estudiados son los que aparecen en bacterias Gram-positivas. Su estructura es la de una trama de estructuras polisacáridas paralelas constituidas por residuos alternativos de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico (figura 5). Estas cadenas están unidas covalentemente a un tetrapéptido (segmento de 4 aminoácidos) de composición variable, pero que se caracteriza por poseer D-aminoácidos. Los distintos tetrapéptidos están unidos entre sí a través de puentes de pentaglicina (pentapéptido formado por 5 glicinas) (figura 7), dando lugar a una estructura rígida y covalente en forma de jaula que rodea la totalidad de la célula, y que hace del peptidoglicano una de las moléculas de mayor tamaño que se conocen (figura 6).

⁸ http://www.Hidratosdecarbono_Clasificación_Polisacáridos.Derivados.mht

Estas cadenas se unen entre ellas formando una ultra estructura a través de enlaces peptídicos entre los aminoácidos terminales generando una estructura rígida y continua que es la pared celular bacteriana. Las bacterias Gram positivas tienen diversas capas del peptidoglicano y las Gram negativas solo una, esto permite hacer una distinción empleada en sistemática. El resultado de la unión del peptidoglicano en Gram negativas es una capa única que presenta zonas carentes de enlaces peptídicos. Los entrecruzamientos suelen ser enlaces peptídicos directos entre el grupo amino o el ácido diaminopimélico con el grupo carboxilo de la D-alanina terminal. En Gram positivas la unión se establece por entrecruzamientos del péptido, tanto con las cadenas del mismo nivel como de niveles distintos, cuya forma varía entre las especies.

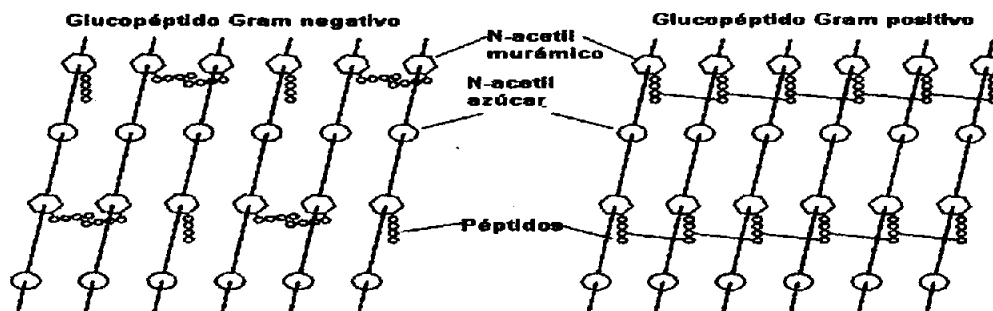


Figura 5. Representación esquemática de los peptidoglucanos⁹.

⁹ <http://fai.unne.edu.ar/biologia/bacterias/micro4.htm>

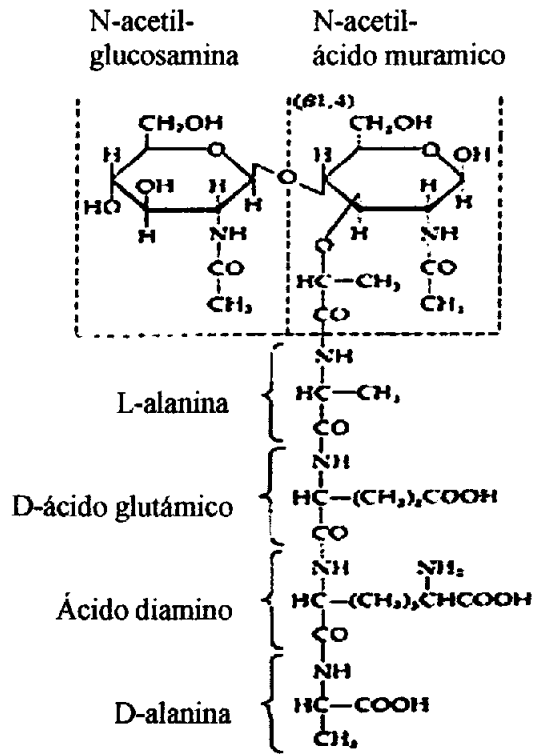


Figura 6. Disacárido + Tetrapéptido¹⁰.

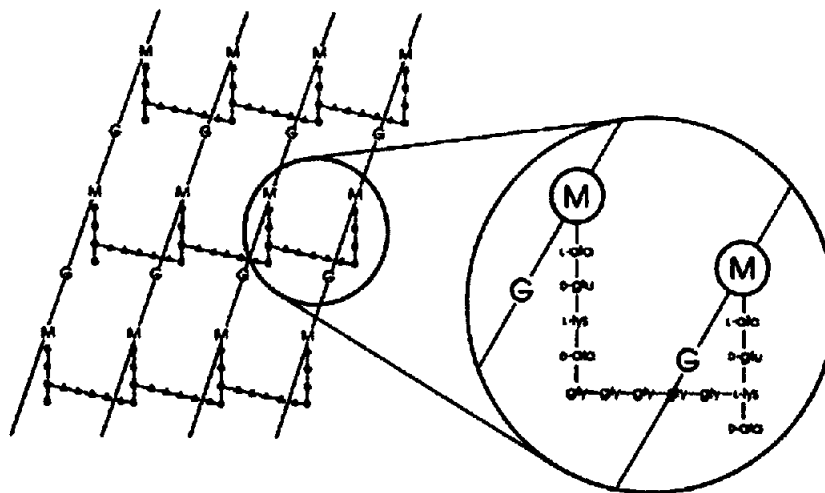


Figura 7. Puentes de pentaglicina¹¹.

¹⁰ <http://www.Hidratosdecarbono Clasificación Poliacáridos.Derivados.mht>

¹¹ <http://www.Hidratosdecarbono Clasificación Poliacáridos.Derivados.mht>

La acción de antibióticos como la penicilina y la cefalosporina se basa en el hecho de que impiden la síntesis del peptidoglucano, y por tanto, de la pared bacteriana.

ÁCIDOS TEICOICOS

Los ácidos teicoicos junto a los peptidoglucanos, forman parte de la pared de bacterias Gram-positivas. Son polímeros de N-acetilglucosamina, un polialcohol y fosfato (figura 8). El polialcohol (marcado en la figura 8 como alditol) puede ser glicerol o ribitol, y se une mediante enlaces éster con el ácido fosfórico, formando una cadena lineal. Los hidroxilos libres del polialcohol se unen covalentemente a monosacáridos simples o derivados, o a D-aminoácidos. Los ácidos teicoicos se unen covalentemente al ácido murámico y pueden así conectar diversas capas de peptidoglucano.

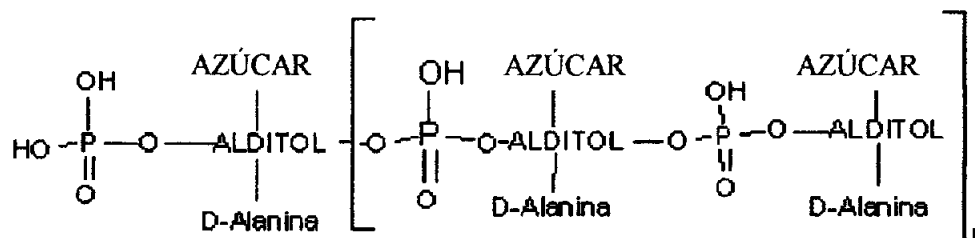


Figura 8. Ácidos teicoicos¹².

LIPOPOLISÁCARIDOS

Los lipopolisacáridos (LPS), junto a los peptidoglucanos, forman parte de la pared de bacterias Gram-negativas. Tienen carácter anfipático, presentan carga negativa, y repelan moléculas hidrofóbicas. Son tóxicos para el hombre, y también se llaman endotoxinas.

¹² <http://www.Hidratosdecarbono Clasificación Poliacáridos.Derivados.mht>

La presencia de lipopolisacáridos le confiere algunas de las propiedades biológicas a estas bacterias, también se le llama endotoxina y está formada por tres dominios: el lípido A (indispensable para que sobreviva la célula y es el responsable de la menor fluidez de la membrana externa), el oligosacárido y una cadena lateral que le confiere propiedades antigénicas, el antígeno O (figura 9). Las funciones del lipopolisacárido son de tipo estructural por las propiedades del lípido A, la membrana es más resistente a los disolventes orgánicos y menos permeables a moléculas de carácter hidrofóbico, entre las que se encuentran los antibióticos, y constituye la endotoxina de las bacterias Gram negativas. La endotoxina es la responsable de los síntomas clínicos de muchas enfermedades como la inducción a la fiebre, hipotensión y actividad necrótica de los tejidos, entre otras.

Endotoxina bacteriana Gram negativa (lipopolisacárido, LPS)

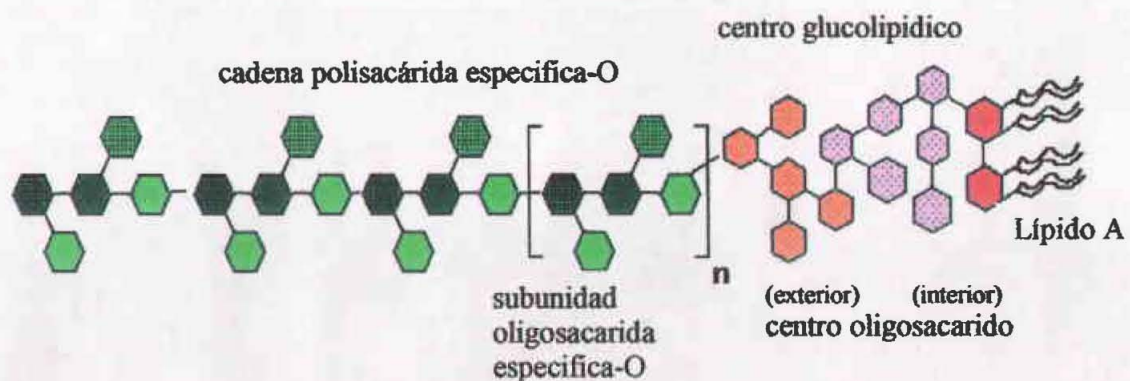


Figura 9. Lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas¹³.

¹³ http://www.Hidratosdecarbono_Clasificación_Polisacáridos.Derivados.mht

El LPS se compone de dos partes:

1. El lípido A está formado por dos N-acetilglucosaminas (NAG) fosforiladas unidas con 6 ó 7 cadenas saturadas de ácido graso (figura 10), que sirven para anclar toda la estructura en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. La figura 10 muestra la estructura del lípido A en la enterobacteria *Escherichia coli*.

2. Una cadena de polisacárido compleja, en la que se distinguen dos zonas:
Un núcleo formado por ácido 2-ceto-3-deoxioctonoico (KDO), heptosa, glucosa y glucosamina, que está unida a una de las NAG del lípido A y de un Antígeno-O (figura 9): una serie de 3 a 5 monosacáridos que se repiten (hasta 40 veces, en algunos casos), y que es distinta según las especies. Es el causante de la respuesta inmunológica que provocan estas bacterias.

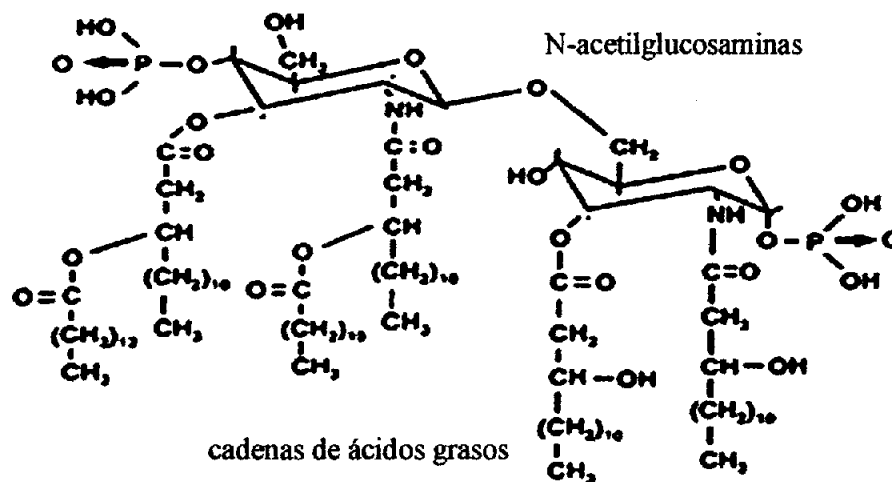


Figura 10. LPS¹⁴.

¹⁴ http://www.Hidratosdecarbono_Clasificación_Polisacáridos.Derivados.mht

Entre otros componentes de la membrana externa de bacterias Gram negativas, destacan unas proteínas llamadas porinas, se trata de unos trímeros que generan canales que permiten el paso de sustancias, reguladas por un complejo mecanismo genético que responde a la concentración de solutos en el medio.

La membrana externa es un filtro que permite el paso exclusivo de moléculas pequeñas, lo que es en sí una protección contra muchas sustancias que tienen actividad antibacteriana, por ejemplo la lisozima, cuya diana es el peptidoglucano. Regula tanto las propiedades de la superficie, como la carga eléctrica. El espacio periplasmático está delimitado por la membrana externa y la membrana celular. Consiste en un gel en el que se encuentra inmerso el peptidoglucano que contiene RNAasa, fosfatasa, moléculas de acción contra antibióticos como la penicilinasa, proteínas de transporte, y mensajeros de señales. Al tratarse de un gel, es una solución densa que parece que tiene como función adicional ayudar a la osmorregulación celular.

Gram negativa

Gram positiva

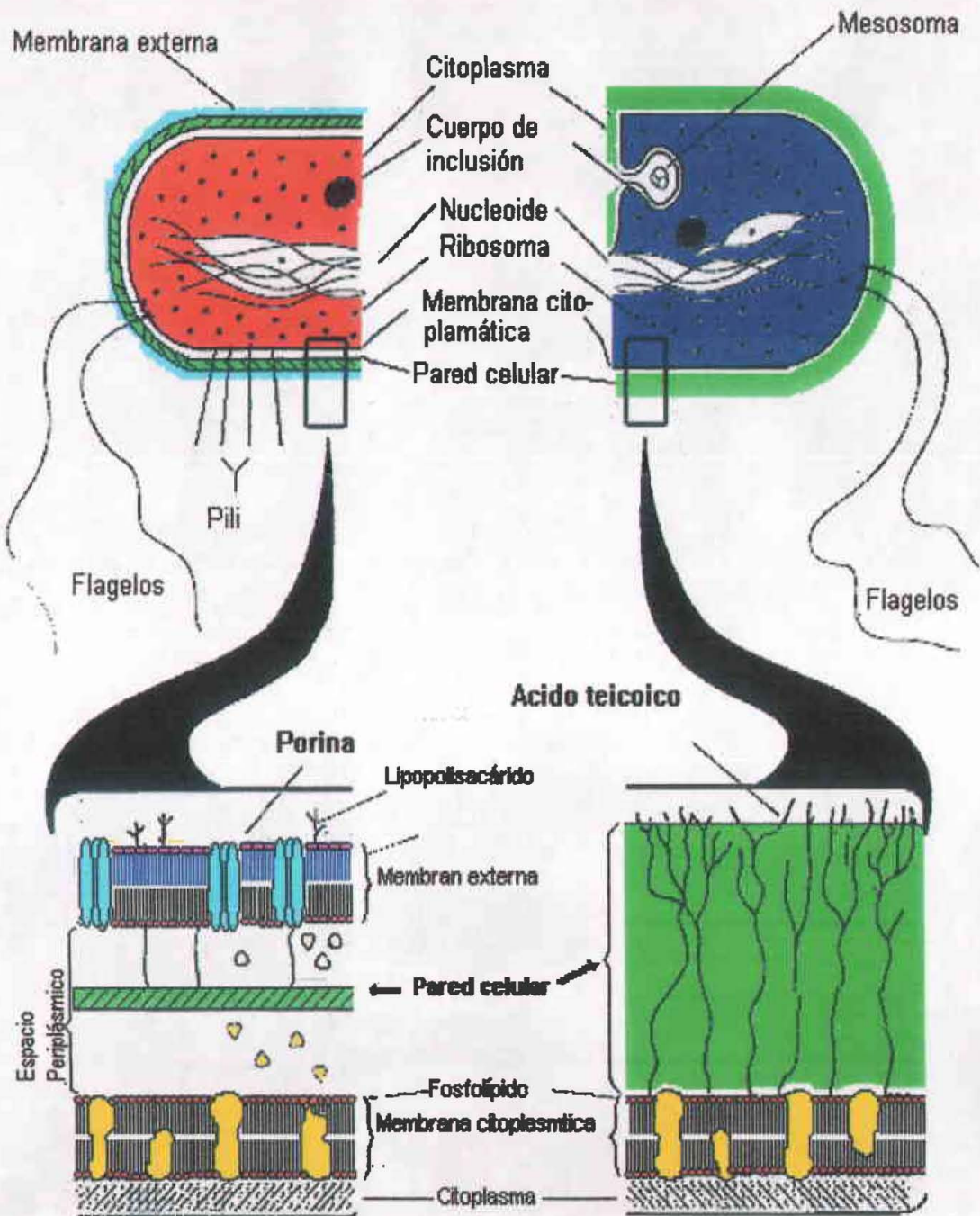


Figura 11. Características de la pared celular de una bacteria Gram-negativa y una bacteria Gram-positiva¹⁵.

¹⁵ <http://fai.unne.edu.ar/biologia/bacterias/micro4.htm>

1.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL).

Las BAL constituyen un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista taxonómico (Fig. 12). Tienen como característica común la de producir ácido láctico como metabolito único o mayoritario (más de la mitad) en la fermentación de los azúcares. Las BAL son cocos o bacilos Gram-positivos, agrupados en tétradas y/o pares, no formadoras de esporas, no poseen actividad de catalasa, ni poseen citocromos. Las BAL pueden ser caracterizadas por su capacidad de fermentación homoláctica (único producto formado es el ácido láctico) o heteroláctica (forma otros compuestos a parte del ácido láctico, como: el ácido acético, etanol, CO₂, etc.), según el tipo de fermentación se habla de bacterias homofermentativas y/o heterofermentativas respectivamente (Word y Holzapel, 1995).

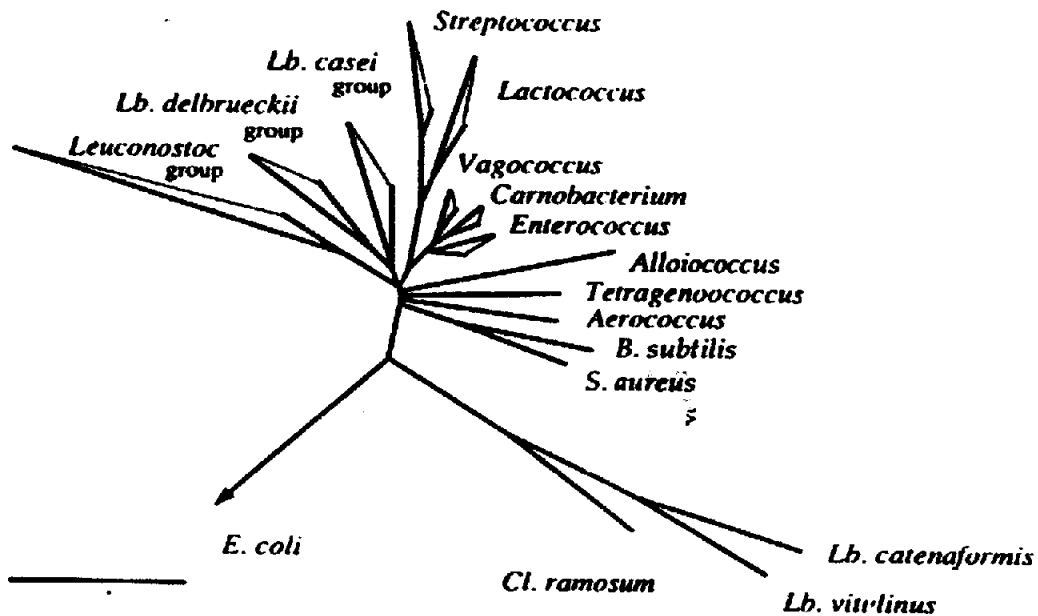


Figura 12. Árbol filogenético de las bacterias ácido lácticas y bacterias relacionadas. La barra del extremo inferior izquierdo indica el 10% de divergencia entre las diferentes secuencias (Wood y Holzapel, 1995).

Los principales géneros que comprenden las BAL son:

1. *Lactococcus*
2. *Leuconostoc*
3. *Streptococcus*
4. *Lactobacillus*
5. *Pediococcus*
6. *Carnobacterium*
7. *Enterococcus*
8. *Vagococcus*
9. *Aerococcus*
10. *Tetragonococcus*
11. *Alloiococcus*
12. *Bifidobacterium*
13. *Bacillus*
14. *Sporolactobacillus*
15. *Propionibacterium*

La mayoría de los géneros son filogenéticamente grupos distantes. Se emplean actualmente nuevas herramientas para la clasificación de las BAL. Las subdivisiones entre los géneros y especies relacionadas han sido determinadas usando taxonomía numérica y métodos quimiotaxonómicos; la técnica más prometedora consiste en la hibridización del ADN y la secuenciación de los genes del ARNr, en particular la fracción 16S. La comparación de estas secuencias es la técnica más poderosa y más segura para determinar las relaciones filogenéticas de microorganismos (Raccach, 1999).

Los cocos Gram positivos se distribuyen en tres grupos: aerobios, facultativos y anaerobios. Los primeros se distinguen por una prueba de oxidación / fermentación, como la de Hugo y Leifson, que da +/-, a diferencia de los facultativos que dan +/+. Los anaerobios sólo se desarrollan en anaerobiosis estricta. Sin embargo, dentro de los facultativos debemos distinguir aquellos que tienen la capacidad de alternar un metabolismo oxidativo aerobio con otro

fermentativo, de aquellos otros que nunca pueden utilizar el O_2 como aceptor final de electrones, pero que fermentan indistintamente en presencia y en ausencia de aire. Por ejemplo, los estafilococos son verdaderos facultativos, capaces de presentar dos fisiologías alternativas, como ocurre con las levaduras del género *Saccharomyces*. Algunos cocos del grupo láctico crecen mal en condiciones estrictamente anaerobias, aunque nunca utilizan el O_2 . Otros crecen bien sólo a bajas presiones parciales de oxígeno y por ello se les denomina microaerófilos. Finalmente, muchas bacterias lácticas crecen mejor en una atmósfera que contenga del 5 al 10% de CO_2 y algunas no crecen sin este requisito (Parés y Juárez, 1997).

Otra característica de las bacterias ácido lácticas, que abarca tanto a cocos como bacilos, es la de presentar unos requerimientos nutritivos complejos. Esto lleva a la necesidad de utilizar medios especiales como el agar de sangre, el de Edwards, el de jugo de tomate o el de Rogosa. Las características comunes de todos estos medios son la presencia de azúcar, la adición de productos naturales complejos apropiados a cada caso y, para el aislamiento, la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento de otros microorganismos. Es esencial tener en cuenta que en las bacterias lácticas el azúcar se utiliza sólo como fuente de energía, en tanto que el carbono para el crecimiento se toma de aminoácidos (Parés y Juárez, 1997).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido ampliamente utilizadas desde la antigüedad como conservadores en varios alimentos fermentados, sin embargo, actualmente se utilizan como probióticos. Los probióticos son

microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero (Schrezenmeir y Vrese, 2001).

La aplicación de las BAL como cultivos iniciadores en alimentos, garantizan mejores características sensoriales y sanitarias del producto final. El espectro de la actividad de las BAL puede ser dividido en nutricional, fisiológico y antimicrobiano. Se ha demostrado que varias especies de las BAL ejercen acción antagonista contra microorganismos patógenos en alimentos (Gibson, et al., 1997).

Las BAL son capaces de prevenir la adherencia, establecimiento, replicación y/o acción patogénica de enteropatógenos específicos (Saavedra, 1995). Contribuyen a la inhibición de bacterias responsables del deterioro de alimentos sin cambiar la naturaleza físico-química de éstos. Estas propiedades antagonistas pueden ser manifestadas por:

1. Producción de ácidos grasos de cadena corta volátiles (SCFA):

Las fermentaciones involucradas en la acumulación de ácidos orgánicos, como el ácido acético, ácido propiónico y principalmente ácido láctico son el producto final del metabolismo de carbohidratos (Naidu, 2000).

Los ácidos orgánicos constituyen metabolitos intermediarios y productos finales del metabolismo microbiano y se encuentran en grandes cantidades en muchos productos lácticos, cárnicos y vegetales fermentados. Nuestros antepasados descubrieron que los cambios deseables desarrollados sobre el aroma y la

textura de estos productos y la acidez provocada por la formación de ácidos orgánicos constituía un medio valioso para retrasar o evitar la alteración proteolítica. Ello permitió conservar almacenados muchos alimentos perecederos y hacer la dieta más variada. Hoy en día muchos fabricantes utilizan ciertos ácidos orgánicos para ayudar a la conservación de diversos productos. Por su solubilidad, sabor y baja toxicidad los ácidos orgánicos de cadena corta, como el acético, benzoico, cítrico, propiónico, y sórbico son muy utilizados como conservadores o acidificantes.

Al considerar la posible aplicación como conservadores de otros ácidos orgánicos conviene recordar que la actividad antimicrobiana de estos compuestos suele ser superior a medida que se alarga la longitud de su cadena molecular. La actividad antimicrobiana de un ácido orgánico o su éster se debe a las moléculas no disociadas del compuesto. Algunos ácidos orgánicos en su estado no disociado son muy solubles en las membranas celulares. Únicamente los ácidos orgánicos lipófilos muestran actividad antimicrobiana. Según una hipótesis, estos compuestos inhiben el crecimiento de los microorganismos, o los matan, por interferir con la permeabilidad de la membrana celular al producir un desacoplamiento en el transporte de sustratos y en la fosforilación oxidativa del sistema transportador de electrones. Los ácidos orgánicos saturados, como el ácido sórbico y los ésteres del ácido parahidroxibenzoico, también inhiben el sistema de transporte de electrones. Este fenómeno da lugar a la acidificación del medio intracelular, que es

probablemente la principal causa de la inhibición y muerte de los microorganismos.

El pKa (el pKa es igual al pH en el cual el 50 % del ácido se halla no disociado) de los ácidos orgánicos empleados como conservadores se halla en el rango de pH de 3-5. Al bajar el pH de un alimento, aumenta la proporción de las moléculas no disociadas de un determinado ácido orgánico, aumentando de esta forma su efectividad como agente antimicrobiano. Estas consideraciones limitan la utilidad de los ácidos orgánicos a aquellos alimentos de pH inferior a 5.5. Los ácidos orgánicos se utilizan principalmente como agentes micostáticos. Sin embargo, a concentraciones elevadas, son muy eficaces frente a diversos microorganismos (incluidos los virus). La mayor parte de los ácidos orgánicos son muy poco eficaces como inhibidores del crecimiento microbiano a valores de pH de 5,5-5,8 en los que crecen la totalidad de las bacterias causantes de toxiinfecciones y la mayor parte de las causantes de alteración de alimentos. Constituyen una excepción los ésteres del ácido parahidroxibenzoico, con un pKa = 8.5, que muestran actividad antimicrobiana a valores de pH próximos a la neutralidad, y los ácidos propiónico y sórbico que también poseen cierta actividad a pH = 6.0 ó 6.5.

La eficacia de un ácido orgánico en un alimento se halla afectada de una forma especial por la actividad de agua, el pH, el potencial redox, la disponibilidad de sustrato y el contenido graso. De igual importancia para la selección de un determinado ácido orgánico es la microflora que se pretende inhibir o destruir, y tiene importancia el número de microorganismos, el tipo, la resistencia relativa

del microorganismo normalmente presente, así como su habilidad para crecer en las condiciones normales de uso y almacenamiento. Por lo tanto, la elección de un determinado ácido orgánico depende, no sólo de las características inherentes al mismo (por ejemplo, actividad antimicrobiana adecuada, solubilidad, estabilidad y compatibilidad con las propiedades organolépticas) sino también de las condiciones microambientales y de almacenamiento del alimento.¹⁶

2. Ácido láctico

El ácido láctico fue aislado e identificado por Scheele en 1780, reconociéndose como un producto de fermentación por Blondeaur en 1847. Pasteur en 1855 publicó su célebre memoria titulada "Mémoire sur la fermentation appelée lactique", la cual se considera la base de la teoría microbiana de la fermentación. Lister en 1877 obtuvo el cultivo puro de *Streptococcus lactis*, el primero de una bacteria láctica. Pocos años después, en 1881, Littleton iniciaría la producción industrial de este ácido por fermentación (Parés y Juárez, 1997).

El ácido láctico es el principal metabolito que producen las BAL, el cual es responsable por los cambios del pH en su medio de crecimiento, suficiente para atacar a otros microorganismos (Wood, 1992). Además del pH, tiene un efecto antimicrobiano al colapsar el gradiente de protones electroquímicos, causando bacteriostasis y muerte en bacterias susceptibles (Eklund, 1989).

¹⁶ <http://www.geocities.com/ohcop/acorgani.html>

3. Ácido acético y ácido propiónico

Estos ácidos son producidos en cantidades pequeñas por una gran variedad de BAL, la disponibilidad de oxígeno indudablemente juega un papel importante en el control de la producción de éstos. El ácido acético y propiónico tiene un valor de pK superior que el ácido láctico, y por lo tanto tiene una alta disociación, esta diferencia puede ser una razón en su eficacia antimicrobiana comparada al ácido láctico (Wood, 1992).

Del mismo modo el ácido láctico, acético y propiónico interactúan con la membrana celular para neutralizar el potencial electroquímico (Freese, et. al., 1973; Eklund, 1989). El ácido acético puede también causar desnaturalización proteica (Reynolds, 1975) y reduce el pH intracelular en *Clostridium acetobutylicum*, y también en membranas fúngicas se puede mostrar como son afectadas por el ácido propiónico causando inhibición del transporte de aminoácidos (Wood, 1992).

El ácido acético y propiónico son ampliamente usados como aditivos en alimentos, algunos alimentos fermentados cuentan con acción antimicrobiana de este ácido en combinación con el ácido láctico, y esto muestra que el ácido acético tiene un efecto sinérgico junto con el láctico (Wood, 1992).

4. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un agente oxidante que puede originarse en el metabolismo de muchas BAL aeróbicas y anaeróbicas. En el caso de las bacterias aeróbicas y aeróbicas facultativas el H_2O_2 es a su vez roto

intracelularmente por medio de la enzima catalasa. Se puede, no obstante, reconstruir el peróxido de hidrógeno en el producto si la actividad de las enzimas que lo rompen, por ejemplo la catalasa de micrococos y estafilococos es insuficiente. El peróxido de hidrógeno inhibe o destruye las bacterias por medio de la inactivación de enzimas. Se encontró en condiciones experimentales que *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas* son claramente inhibidas por la producción y la acumulación de peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno puede también reaccionar con otros componentes que también tienen un efecto inhibitorio. Hårnolv et al., 1984, reportaron que la vida útil de la leche cruda podría extenderse por esta vía. La capacidad para formar peróxido de hidrógeno también ha sido notado en el caso de los cultivos iniciadores para embutidos crudos curados ya en uso y con *Lactobacillus* que han sido sugeridos como cultivos protectores en embutidos crudos curados. Lücke y Hechelmann (1986) reportaron que muchas cepas de *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus sake* son capaces de formar peróxido de hidrógeno en presencia del oxígeno del aire.¹⁷

5. Diacetilo

El diacetilo ($\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_3$) y la acetoina ($\text{CH}_3\text{-CO-CHOH-CH}_3$), son productos de la fermentación no ácidos. El diacetilo es familiar debido a su aroma de la mantequilla. Está involucrado en el perfil del "flavour" (sabor y olor) de los productos lácteos fermentados. Los cultivos iniciales usados en elaboración de productos lácteos influyen en el desarrollo del aroma en forma positiva a través de la producción de diacetilo, que también tiene un efecto

¹⁷ http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2001819/lecciones/cap06/cap06_01.html

antibacteriano. Las levaduras y bacterias gram-negativas y gram-positivas son inhibidas por medio del diacetilo. Es importante mencionar que las BAL (Gram positivas) son tolerantes a diacetilo. Este compuesto es un producto intermedio que puede ser producido en el metabolismo a partir del citrato y a través del piruvato. Las BAL individuales pueden producir diacetilo y por lo tanto muchas de las cepas pueden usarse como cultivo inicial. Se puede asumir que el diacetilo producido por medio de las BAL está involucrado en el desarrollo del aroma de los productos crudos curados.¹⁸

Existe la posibilidad de que el diacetilo pueda actuar de forma sinérgica con otros agentes antimicrobianos, por lo tanto, esto contribuye y combina la preservación en alimentos fermentados (Wood, 1992).

6. Dióxido de carbono.

El dióxido de carbono (CO₂) es un gas incoloro e insaboro. Cuando se disuelve en agua se produce ácido carbónico (inestable). El dióxido de carbono puede producirse por medio de las bacterias ácido lácticas heterofermentativas. La producción de CO₂ es también indeseable en los embutidos crudos curados por razones sensoriales. El CO₂ provoca que se formen poros y fisuras en el producto. En casos extremos los embutidos de diámetros más grandes pueden estallar. Sin embargo, desde el ángulo bacteriológico la producción de dióxido de carbono puede ser vista como positiva. Se ha reportado que el CO₂ tiene un efecto antibacteriano. Las bacterias aeróbicas Gram negativas, caso de

¹⁸ http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2001819/lecciones/cap06/cap06_03.html

Pseudomonas, son inhibidas por CO₂. El CO₂ es usado en técnicas de atmósferas modificadas para carne fresca en cortes y otros alimentos (Weber, 1991)¹⁹.

7. Bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por numerosos organismos, incluyendo las BAL. Las bacteriocinas purificadas o las BAL productoras de bacteriocinas podrían utilizarse, solas o en combinación con otras barreras, para asegurar la calidad higiénica y sanitaria de muchos alimentos (Hernández et al., 2005).

Son compuestos específicos inhibitorios, tradicionalmente se considera a las bacteriocinas como péptidos biológicamente activos que tienen propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora, sin embargo recientemente este concepto se ha modificado ya que se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distantes filogenéticamente de la cepa productora (Sablon et al., 2000). Con la posible excepción de la lactocina 27 (*Lactobacillus helveticus*) las bacteriocinas de BAL son bactericidas, no bacteriostáticas.

El uso propuesto de las bacteriocinas no se propone como un método primario de conservación de alimentos. La mayoría de los investigadores consideran que estas sustancias contribuyen a la tecnología de barreras ("hurdle approach") para la seguridad y preservación de los alimentos. Esta tecnología

¹⁹ http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2001819/lecciones/cap06/cap06_03.html

se basa en el uso de un número de factores intrínsecos (ejemplo: tratamiento térmico, pH, sales, otros conservadores) y extrínsecos (ejemplo: temperatura de almacenamiento, atmósfera del empaque) que actúan como obstáculos frente al crecimiento o supervivencia de microorganismos patógenos o causantes de deterioro del alimento (Nuñez, A. G. et al., 2002). A mayor cantidad de barreras, mayor es la dificultad del microorganismo a crecer o sobrevivir (Leistner, 1994). Contrariamente a las barreras biostáticas, las cuales sólo inhiben el crecimiento de los microorganismos contaminantes, las bacteriocinas pueden servir como barreras bactericidas y ayudar a reducir el espectro de microorganismos que pudieran desarrollarse en el alimento (Muriana, 1996).

El efecto de distintos factores físico-químicos sobre la actividad de una bacteriocina no sólo tiene el fin de caracterizarla, sino también sirve para inferir su posible aplicación industrial, ya que las altas temperaturas y las amplias variaciones de pH son, entre otras, algunas de las condiciones que debe resistir una bacteriocina para ser útil como potencial agente inhibidor de microorganismos no deseados en procesos alimenticios (fermentaciones de leche, maduración de quesos, curado de encurtidos, etc.) (Fariás, 1996).

Es importante mencionar, que para prevenir el deterioro de los alimentos por la contaminación de bacterias, hongos y/o mohos se han implementado varios métodos, los cuáles pueden ser físicos, químicos y/o biológicos (tabla 4), los cuales pueden tener un efecto bactericida y/o bacteriostático. Sin embargo, lo importante es considerar a los métodos biológicos como los ideales, ya que incrementan el valor nutricional de los alimentos, el sabor y la textura, y al

utilizarse como bioconservadores pueden reemplazar a los conservadores químicos, pues son biodegradables. Aunque los conservadores químicos o biológicos se complementan con los físicos, para conservar más los alimentos.

CONSERVADORES FÍSICOS	CONSERVADORES QUÍMICOS	CONSERVADORES BIOLÓGICOS
<ul style="list-style-type: none"> • Ebullición • Esterilización • Pasteurización • Enlatado • Ahumado • Irradiación • Refrigeración • Congelación • Deshidratación 	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido sórbico • Sorbatos • Ácido benzoico • Benzoatos • Sulfitos • Parabenos • Cloro • Entre otros 	<ul style="list-style-type: none"> • Nisina • Reuterina • Lisozima • Piramicina • Ácido fórmico • Acetato sódico • Formaldehído • Cloruro de sodio • Antibióticos • Sakacina • Lactacina • Entre otros

Tabla 4. Diferentes métodos de conservación utilizados en alimentos²⁰.

²⁰ <http://www.pasqualinonet.com.ar/Conservantes.htm>

1.4 GÉNERO *Pediococcus*.

El género de *Pediococcus* es un miembro de la familia Streptococcaceae, pertenece al grupo de bacterias Gram positivas, no encapsuladas, homofermentativas, inmóviles, anaerobios facultativos, cuyas células esféricas forman principalmente tétradas, aunque también se les encuentra formando pares (Holt, 1984).

El péptido de la pared celular es L-Lys-L-Ala-D-Asp. Las colonias varían en tamaño de 1.0 mm a 2.5 mm en diámetro; son lisas, uniformes, redondas y blancas-grisáceas.

Todas las especies crecen a 30° C. Con un máximo tolerable a los 52° C. Se destruyen por calentamiento a los 70° C por 10 minutos. El rango de temperatura óptima es de 25 – 40° C. El pH óptimo es de 6.0 a 6.5. Son catalasa negativos, no forman indol, la mayoría no reducen nitratos, no hidrolizan hipurato de sodio y no son patógenos a plantas ni animales. Son quimioorganótrofos requiriendo un medio rico, factores de crecimiento complejos, así como de aminoácidos. Su crecimiento depende de la presencia de carbohidratos y la glucosa es fermentada por la ruta Embden-Meyerhoff a D(+) ó L(-)-lactato, sin formación de gas.

El género *Pediococcus* tiene siete especies, diversas características morfológicas, fisiológicas, nutricionales y genéticas. Ocho especies del género *Pediococcus* fueron listadas en la edición de 1984 del Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática: *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P.*

dextranicus, *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *P. halophilus* y *P. urinaequi*. En 1993 *P. halophilus* fue reclasificado en un nuevo género, *Tetragenococcus*, como la especie *T. halophilus*. Los pediococci tienen una relación filogenética muy estrecha tanto con los lactobacilli como con los streptococci (Raccach, 1999).

Las especies de *Pediococcus* excepto *P. damnosus* crecen en presencia de 4.0% a 6.5% de NaCl, y ninguna de las especies crece en concentraciones de 10% de NaCl (Raccach, 1999).

Algunas cepas de *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* tienen enzimas proteolíticas como las proteasas, dipeptidasas, aminopeptidasas dipeptidil y aminopeptidasas (Raccach, 1999).

Importancia en la industria alimenticia: son usados como cultivos iniciadores en las fermentaciones industriales de carnes y vegetales, tienen potencial como biopreservativo en control del crecimiento de *Salmonella tiphymurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas sp.*, etc. *Pediococcus* es también asociado con la fermentación de la cerveza y el vino.

Entre las sustancias antibacterianas producidas por *Pediococcus* están: pediocinas y ácido láctico. Varios estudios han demostrado la utilidad de bacteriocinas y sus cepas productoras en carne y productos cárnicos (A. S. Naidu, 2000). Sin embargo el efecto protector puede deberse no sólo a la producción de bacteriocinas, sino también a: ácido láctico, sustancias proteicas

conocidas como BLIS (substancias inhibitorias similares a bacteriocinas), ácidos orgánicos, diacetilo, peróxido de hidrógeno, péptidos cíclicos (Magnusson, 2003). Aún más, el efecto puede ser sinérgico o aditivo entre varios de estos compuestos (Monfur, 2003). El término pediocina es usado como péptidos antibacterianos, producidos por ciertas cepas, como es el género *Pediococcus*, el cual es designado dentro del grupo de BAL (tabla 5). Es sintetizada como un pre-péptido de 62 aminoácidos que al ser procesado resulta en un péptido maduro de 44 residuos, anfifílico, con carga positiva y regiones altamente hidrofóbicas y con dos enlaces disulfuro. Dada su alta actividad contra especies de *Listeria* esta bacteriocina tiene un alto potencial para ser utilizado como conservador de alimentos lácteos. *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus* son reportados como productores de pediocinas. (Naidu, 2000).

Se ha demostrado que la biosíntesis de bacteriocinas de *Pediococcus* está asociada con plásmidos (Muñoz, 2004).

<i>P. pentosaceus</i> FBB61 y L7230	Pediocinas
<i>P. cereviceae</i> FBB63	Pediocinas
<i>P. acidilactici</i> PO2 B5627	Pediocina PO2
<i>P. pentosaceus</i> MC-03	Pediocinas
<i>P. acidilactici</i>	Pediocina PAC 1.0
<i>P. acidilactici</i>	Pediocina Ach
<i>P. acidilactici</i>	pediocinas E, F y H

Tabla 5. Algunas bacteriocinas identificadas del género de *Pediococcus* (Llorente, 1998).

Bhunia et al. (1981) observó inhibición de crecimiento contra varias especies y cepas de:

Bacterias Gram (+): *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*;

Bacterias Gram (-): *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas sp.*

El espectro antimicrobiano de algunas pediocinas, por ejemplo son:

Pediocina "A" de *Pediococcus pentosaceus* FBB61, que actúa contra: *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus spp.*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* (Hoover et al., 1989.)

1.5 *Pediococcus acidilactici*

Este microorganismo produce ácido láctico a partir de glucosa, galactosa, arabinosa, maltosa, manitol, y dextrinas; algunas cepas lo producen también a partir de sacarosa y lactosa. La cepa H de *Pediococcus acidilactici* produce una bacteriocina (Bhunia, et al. 1988), la cual después fue designada como pediocina Ach (Bhunia, et al. 1990). La caracterización de *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0 (NRRL B-5627) reveló la presencia de una bacteriocina designada PA-1, asociada con un plásmido de 6.2 MDa (9.4 kb).

El primer cultivo iniciador de *Pediococcus acidilactici* para la conservación de embutidos se utilizó en 1957. Este se conocía con anterioridad como *Pediococcus cereviceae* pero estudios subsecuentes lo reclasificaron como tal

(Manual Berguey's, 1986). Bello y Durán (1992) utilizaron *Pediococcus acidilactici* en la elaboración de salami, y demostraron que los productos elaborados con *Pediococcus acidilactici* tenían mejores características sensoriales (textura, color, aroma) y sanitarias durante la maduración-fermentación, que aquellos lotes a los que no se adicionó el iniciador. Por otro lado se ha reportado que *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidophilus* presentan gran resistencia a la liofilización y un crecimiento rápido en sustratos cárnicos, aspectos que favorecen su uso como cultivos iniciadores en la elaboración de productos cárnicos (Bacus y Brown, 1981; Bello y Durán, 1992 y Motlagh, 1991).

La pediocina Ach es producida por *Pediococcus acidilactici* Ach es de bajo peso molecular y está asociada al plásmido Psrq11. No es inmunogénica ni tóxica en animales de laboratorio y por su actividad antibacteriana ya indicada puede ser considerada como conservador para alimentos (González y Kunka, 1987).

Todas las cepas productoras de pediocinas de *Pediococcus acidilactici* contienen un plásmido de 9.4 kb (6.2 MDa) (Llorente, 1998).

1.6 *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Se sabe que esta cepa produce un efecto de bioconservación; sin embargo aún no se sabe la naturaleza química de la sustancia (s) que produce. Rivera, J. (2004) estudió el efecto de bioconservación en pastas de carne empleando

inóculos de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 a diferentes concentraciones, con *Staphylococcus aureus* como microorganismo indicador, cuantificando una disminución de la población microbiana a diferentes tiempos de incubación (hasta 15 días). El efecto de bioconservación es mayor cuando se emplea el cultivo, lo que indica que pueden ser varias sustancias las que ejercen sobre dichas pastas. El efecto de bioconservación del sobrenadante depende de la dosis empleada.

En esta cepa se ha encontrado un plásmido, pero es mas pequeño que el reportado asociado a la producción de pediocinas ya que tiene un P.M. de 2,700 KDa, que no había sido reportado con anterioridad para otras cepas de *Pediococcus acidilactici* (Llorente, 2003). *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 no tiene el gen que codifica para pediocina (Mora, 2001), lo que fue verificado por Llorente (manuscrito en preparación).

La actividad antimicrobiana se presenta en sobrenadantes neutralizados, por lo que no es atribuible exclusivamente el ácido láctico u otros ácidos orgánicos. En pruebas de difusión en agar utilizando sobrenadantes de cultivos de *Pediococcus acidilactici* en MRS (Man, Rogosa y Sharpe, tabla 6) y *Staphylococcus aureus* como microorganismo de prueba, se observó el efecto aditivo del ácido producido y del compuesto inhibitorio, ya que, al neutralizar y liofilizar los sobrenadantes se obtienen halos inhibitorios de menor tamaño, que si solo se liofilizaran. De igual manera que el punto anterior, pero utilizando cultivos de *Pediococcus acidilactici* en CSTES (Caldo de soya tripticaseína, extracto de levadura sacarosa, tabla 6), se observó que en los sobrenadantes

lío-filizados y neutralizados hay un pequeño halo de inhibición; sin embargo, si sólo es neutralizado no hay inhibición y hay un daño celular en *Staphylococcus aureus* (Llorente, 2003).

1.7 Microorganismos patógenos en alimentos y BAL.

1.7.1 Bacterias Gram-negativas:

Salmonella tiphymurium.

Es uno de los microorganismos patógenos que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos Gram-negativos no esporulados y miden de 0.5 a 2.0 μm de ancho y de 2 a 4 μm de largo, las formas móviles poseen flagelos peritricos, son anaerobios facultativos que fermentan la glucosa cuando se desarrollan en un medio anaeróbico, producen ácido, y a veces gas, son citocromo oxidasa-negativos, catalasa-positivos y reducen los nitratos en nitritos. La mayoría de las cepas, con la excepción de *S. tiphymurium*, son aerógenas, utilizan el citrato como única fuente de carbono, decarboxilan la lisina, la arginina y la ornitina y producen sulfuro de hidrógeno (ICMSF (Internacional Comisión on Microbiological Specifications for Foods), 1996; Walker, 2000).

Salmonella se encuentra ampliamente distribuida en los animales, especialmente en aves, y se aloja en el tracto intestinal de los animales infectados, incluyendo a los seres humanos. Las fuentes de contaminación en

que se puede localizar este microorganismo incluyen el agua, suelo, insectos, superficies de la industria transformadora de alimentos, superficies de las cocinas, heces de animales, carnes crudas, aves crudas, pescados y mariscos crudos, huevos, leche, productos lácteos, ancas de rana, coco, salsas y aderezos para ensaladas, mezclas para pasteles, coberturas en polvo, crema de cacahuate, gelatina, chocolate y cocoa (Palao et al. 1998).

La enteritis por *Salmonella* es la tercera forma de "intoxicación alimenticia" que se reporta con más frecuencia. Se documentan cerca de 50 000 casos de enteritis por *Salmonella* al año, casi todos se deben a *Salmonella* serotipo *tiphymurium*. La infección es zoonótica y las aves de corral son la fuente de la misma en cerca de la mitad de los casos. Las salmonelas se diseminan de la carne de las aves a los humanos si aquélla se consume mal cocida o cuando quienes la manejan no lavan de manera adecuada sus manos o los utensilios. En el pasado las tortugas domésticas eran el principal origen de enteritis por *Salmonella* en niños. Aún más, la tifoidea suele deberse a *Salmonella tiphymurium* y casi siempre procede de una fuente humana, y se adquiere cuando las personas consumen alimentos o agua contaminados con heces u orina humana en la mayor parte de los casos (Walker, 2000).

Las salmonelas invaden la luz del intestino delgado, donde se multiplican. Las cepas invasoras, como *S. tiphymurium*, atraviesan la mucosa intestinal, pasan al sistema linfático y son englobadas por los fagocitos en cuyo interior se multiplican, posteriormente vuelven a entrar a corriente sanguínea. En una enteritis, las náuseas, el dolor abdominal, el vómito y la diarrea se inician 8 a 24

horas tras la ingestión de alimentos contaminados; en la fiebre entérica, los signos y los síntomas de tifoidea comienzan a observarse de 7 a 14 días después de la ingestión de salmonelas e incluyen anorexia, letargo, cefalea frontal sorda, tos no productiva, estreñimiento, dolor abdominal y temperatura que aumenta en forma constante hasta 40° C (Walker, 2000). Además pueden presentarse consecuencias crónicas tales como artritis, después de 3 o 4 semanas de haberse establecido los síntomas severos. La duración de los síntomas puede ser de 1 a 2 días o prolongarse, dependiendo de factores como el huésped, dosis infectiva y características del biotipo. La dosis infectiva, es baja aproximadamente de 15 a 20 células bacterianas, no obstante también depende de la edad y salud del huésped, así como de los biotipos de las especies de *Salmonella* (Palao, et. al. 1998).

El ritmo del crecimiento de las salmonelas se reduce sustancialmente a temperaturas <15° C, mientras que el crecimiento de la mayoría de las salmonelas está inhibido a temperaturas <7° C. La temperatura máxima de crecimiento (49.5° C) es importante como valor por encima del cual deben ser mantenidos los alimentos almacenados calientes para impedir el crecimiento de las salmonelas. Han sido detectadas salmonelas en productos que han estado almacenados en congelación durante años. Algunos alimentos, (por ej. la carne cruda, el pescado, el huevo líquido, el jarabe de maíz, el chow mein ⁽²¹⁾ de pollo) proporcionan una protección considerable de las bacterias tanto durante la congelación como durante el almacenamiento una vez congelados. La actividad de agua (Aw) afecta en gran manera el crecimiento de las

⁽²¹⁾ Plato de la cocina china; se trata de un estofado de carne, en este caso de pollo, desmenuzada o primorosamente cortada en dados, que contiene champiñones y hortalizas al que se añaden condimentos y se sirve acompañado de tallarines fritos.

salmonelas. El límite inferior del crecimiento es 0.94. Las salmonelas son capaces de sobrevivir durante un año o más en los alimentos que tienen una A_w baja (chocolate, pimienta negra, manteca de cacahuete, gelatina en polvo). El pH señalado como mínimo para el crecimiento es 3.8. A medida que el pH sobrepasa el óptimo o desciende por debajo de él, el ritmo de crecimiento de las salmonelas disminuye. Las salmonelas se comportan como bacterias Gram negativas típicas y no suelen ser insólitamente resistentes a los conservadores que se utilizan en los alimentos. Su inhibición se mejora mediante el uso de varios factores conservadores asociados, por ejemplo, un conservante en asociación con pH y temperatura reducidos (ICMSF, 1996).

A pesar de que las salmonelas no forman esporas, son capaces de sobrevivir durante mucho tiempo en los alimentos y en otros sustratos. Las salmonelas sobrevivieron durante más de 10 semanas en mantequilla almacenada a temperaturas entre -23 y 25° C, y durante 6 meses en leche almacenada a temperatura ambiente o dentro de una caja de hielo. En una serie de hortalizas, que incluían judías verdes, remolacha, col, zanahorias, apio, pepinos, lechuga, pimientos, rábanos, espinacas y tomates, las salmonelas sobrevivieron convenientemente durante más de 28 días a $2 - 4^{\circ}$ C y aproximadamente la mitad de ese tiempo a temperatura ambiente. Las salmonelas también sobreviven perfectamente en superficies tales como la cerámica, el vidrio y el acero inoxidable (ICMSF, 1996).

Escherichia coli.

Es representante de la familia Enterobacteriaceae, son bacilos cortos Gram-negativos, no esporulados, catalasa-positivos, citocromo oxidasa-negativos, reducen los nitratos en nitritos, anaerobios facultativos y forma parte de la flora intestinal normal de animales y humanos; tiene movilidad y flagelos peritriquios; fermenta la lactosa, tiene actividad de descarboxilasa de lisina; utiliza el acetato como única fuente de carbono e hidroliza el triptófano para formar indol. Las cepas de *E. coli* se pueden diferenciar serológicamente unas de otras en base a los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). Además, pueden hallarse fimbrias y estructuras emparentadas que desempeñan un papel en la patogenicidad (ICMSF, 1996; Walker, 2000).

Los signos y síntomas de enfermedad dependen del tipo de *E. coli* patógeno intestinal que causa la infección. Existen cuatro tipos:

1. *E. coli* enteropatógeno (EPEC): causan lesión característica en el intestino, enfermedad principalmente de niños: diarrea, fiebre, vómito y dolor abdominal, en adultos: diarrea severa y vómito no sanguinolientos, náusea, jaqueca, fiebre escalofríos. Son serogrupos no relacionados con enterotoxina termolábil, ni invasiva.
2. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC): son la causa principal de la diarrea infantil en los países en desarrollo y son la primera causa de la diarrea del viajero en algunos países desarrollados. Los síntomas son: diarrea acuosa, fiebre ligera, calambres abdominales, náusea; de forma severa, similar al cólera, heces como agua de arroz y deshidratación. Dosis

mínima infectiva de 10^{8-10} de células. Los principales alimentos contaminados son: comida tipo mexicana, queso brie, ensalada de pavo, carne de jaiba, hamburguesas, habiendo diferentes tipos de enterotoxinas.

3. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC): tiene un parecido estrecho con *Shigella* en cuanto a su patología. Es menos reactiva que las demás *E. coli*. Los síntomas son escalofríos, fiebre, jaqueca, dolor muscular, contracción abdominal, diarrea profusa. La dosis mínima infectiva es de 10^8 células. Los principales alimentos contaminados son: salmón, ensalada de papas, asociada con animales.
4. *E. coli* enterohemorrágica (*E. coli* O157:H7): muestra 3 manifestaciones clínicas, colitis hemorrágica (dolor abdominal, diarrea sanguinolenta), Síndrome de uremia hemolítica y Púrpura trombótica trombocitopénica (sistema nervioso central, fiebre sin diarrea, pero hemorragia intestinal, muerte). Los alimentos principales son carne molida, carne roja y leche cruda, por lo tanto, origen animal.

La mayoría de estos brotes han sido relacionados con el consumo de carne picada de vacuno insuficientemente cocida o, en menor grado, con el consumo de leche cruda. Existen pocos datos acerca del predominio de EPEC, de EIEC o de ETEC en los alimentos, en gran parte por causa de la falta de pruebas de laboratorio de fácil ejecución. En los países en desarrollo, han sido identificados determinados alimentos como vehículos de infecciones por ETEC. Una investigación prospectiva de la diarrea del viajero en los médicos que asistían a la Ciudad de México, reveló que ETEC explicaba

aproximadamente el 45% de los casos de diarrea y que la enfermedad estaba relacionada con el consumo de ensaladas que contenían hortalizas crudas. El agua también ha sido identificada como vehículo de ETEC en varios brotes así como en las revisiones realizadas en países en desarrollo. Las revisiones de alimentos con respecto a *Escherichia coli* O157:H7 en Wisconsin revelaron que hasta el 3% de la carne picada de vacuno que se vende al por menor y el 1 – 2% de la carne de cerdo y de aves de corral estaban contaminadas con el organismo (ICMSF, 1996).

Algunas cepas de *E. coli* patógeno son capaces de crecer a temperaturas tan bajas como es la de 7° C y tan altas como la de 46° C, siendo la escala de crecimiento óptimo 35 – 40° C. Los estudios de la inactivación térmica han revelado que *E. coli* O157:H7 es más sensible al calor que las cepas típicas de *Salmonella* spp. El efecto del pH sobre el crecimiento depende del tipo de ácido presente. *E. coli* O157:H7 es capaz de crecer en un medio con un pH 4.5 ajustado con HCl, pero no en un medio cuyo pH haya sido ajustado con ácido láctico. *E. coli* patógeno no crecerá en los quesos fermentados a $\text{pH} \leq 5.4$. Cada vez existen más indicios de que *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir, e incluso crecer, en las hortalizas de las ensaladas. Cuando se conservaron a 5° C, las poblaciones disminuyeron en la lechuga troceada, en el pepino cortado y en la zanahoria troceada. A 12 y 21° C, las cifras de organismos aumentaron rápidamente en la lechuga y en el pepino en atmósferas compuestas por un 3% de oxígeno y un 97% de nitrógeno, parecidas a las que se utilizan a escala comercial. *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir durante mucho tiempo en los alimentos ácidos o fermentados (ICMSF, 1996).

1.7.2 Bacterias Gram-positivas:

Staphylococcus aureus

Especie patógena, son cocos Gram-positivos, que se presentan solos, en pares o racimos, no son móviles, ni esporulados, son anaerobios facultativos. Algunos biotipos son capaces de producir una toxina altamente termoestable que provoca enfermedad en los humanos. Su metabolismo es oxido/fermentativo, catalasa-positivo y puede metabolizar una gran variedad de carbohidratos en condiciones aerobias.

Los estafilococos son comensales de las superficies corporales de los animales de sangre caliente. Las enfermedades que causan incluyen infecciones agudas, por ejemplo septicemia y toxemias agudas, por ejemplo la intoxicación alimentaria estafilocócica (ICMSF, 1996). Generalmente está asociado a casos de artritis, osteomielitis, meningitis, neumonía y en algunos casos puede llegar a ocasionar pérdida del conocimiento. El establecimiento de los síntomas de la intoxicación en los humanos se presenta rápidamente de forma aguda. Los síntomas más comunes consisten en náusea, vómito, dolor o espasmos abdominales y postración; en casos más severos, dolor de cabeza, calambres musculares, así como cambios intermitentes en la presión sanguínea y pulso (Palao, et. al. 1998).

Staphylococcus aureus produce una gama especialmente amplia de sustancias (agresinas y exotoxinas) asociadas con la infecciosidad y con la enfermedad.

Varían desde componentes de la pared celular, por ejemplo ácidos teicoicos, hasta una amplia gama de exoenzimas que incluyen la estafiloquinasa, hialuronidasas, fosfatasas, coagulasas, catalasas, proteasas, nucleasas y lipasas, leucocidinas y hemolisinas y, por último, pero de ningún modo menos importantes, las enterotoxinas que causan la intoxicación alimentaria. Existen cinco enterotoxinas conocidas como A, B, C, D y E, involucradas en intoxicaciones alimentarias, siendo la "A" la más nociva (ICMSF, 1996).

S. aureus es omnipresente, encontrándose en las mucosas y en la piel de la mayoría de los animales de sangre caliente, asimismo, se encuentra también en el aire, polvo y agua residual, y se encuentra principalmente en alimentos de alto contenido proteico. Es un patógeno oportunista y, si bien generalmente es comensal, con frecuencia causará infección a través de una herida abierta o como consecuencia de cambios en la fisiología del hospedador llevados a cabo, por ejemplo, por un desequilibrio hormonal. En algún momento, hasta un 50% de las personas serán portadoras de este organismo. El organismo es resistente a la desecación y puede colonizar el material que se utiliza en la elaboración de alimentos que resulta difícil limpiar y se deja húmedo: por ejemplo, se han encontrado cepas resistentes al cloro en las factorías de aves de corral. Con frecuencia se encontrará en el polvo existente en los sistemas de ventilación y en los aspiradores (ICMSF, 1996).

Las tres condiciones necesarias para su óptimo crecimiento son: pH cercano a la neutralidad, temperatura alrededor de los 30° C y ausencia de microorganismos competitivos, ya que *Staphylococcus aureus* no es

competitivo en presencia de otros microorganismos. El número de *Staphylococcus aureus* necesario para producir suficiente toxina (1.0 microgramo) que provoque una intoxicación en el hombre, se ha estimado que debe ser superior a un millón de UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de alimento. (Palao, et. al. 1998).

S. aureus al no ser competitivo con otros microorganismos rara vez causa intoxicación alimentaria en un producto crudo; una excepción es la leche fresca de una vaca con mastitis, en la que los niveles de *Staphylococcus aureus* pueden ser muy elevados (ICMSF, 1996). Los alimentos perecederos tales como carnes crudas y procesadas, ensaladas, productos de pastelería, así como pasteles rellenos de crema, pies de crema, coberturas de chocolate, leche y sus derivados, rellenos para sándwiches y papas, son los más comúnmente asociados con intoxicaciones estafilocócicas.

Los estafilococos son destruidos fácilmente por la cocción, pero las toxinas que producen resistirán este tratamiento. En los alimentos enlatados de baja acidez, también parece ser que las toxinas resisten el tratamiento de esterilización. La intoxicación alimentaria estafilocócica aparece muy frecuentemente cuando un alimento cocido es contaminado por una persona colonizada y después se guarda en un ambiente caliente (20 – 40° C) durante varias horas. Con frecuencia están implicados los productos de panadería rellenos de nata, las carnes cocidas (especialmente el jamón), el marisco y otros platos preparados con mucha antelación al consumo. Productos tales como los quesos y los salami también pueden fermentar incorrectamente,

permitiendo que los organismos de *Staphylococcus aureus* existentes en los mismos crezcan y elaboren toxinas durante su maduración. El organismo es resistente a la desecación, por lo que puede crecer y producir enterotoxinas en los productos que tienen una actividad acuosa tan baja como 0.85 (ICMSF, 1996).

Staphylococcus aureus es muy resistente a la congelación y a la descongelación y sobrevive perfectamente en los alimentos que se conservan a temperaturas $\leq -20^{\circ}$ C. En los alimentos que se conservan congelados, las enterotoxinas estafilocócicas son muy estables. El crecimiento del organismo es óptimo entre 35 y 40° C, hallándose sus límites aproximadamente en las temperaturas de 7 y 48° C. A temperaturas más bajas, el crecimiento es limitado por las reducciones insignificantes de la actividad de agua o del pH y además se reduce por la conservación en condiciones de anaerobiosis. El organismo suele ser destruido fácilmente a las temperaturas que se utilizan en la pasteurización y en la cocción de los alimentos; en los alimentos secos y en los alimentos con elevado contenido de grasa, la resistencia aumenta. Bajo condiciones por otra parte óptimas, *S. aureus* es capaz de crecer a $\text{pH} < 4.3$ con un ácido inorgánico, por ejemplo con HCl, como acidulante. Sin embargo, en presencia de ácidos orgánicos, los límites del pH de crecimiento son mucho más elevados.

Listeria monocytogenes

Son bacilos cortos, Gram-positivos, asporógenos, catalasa-positivos oxidasa-negativo y anaerobios facultativos. Accidentalmente originan formas cocoides o células aisladas de 10 μm de longitud. Son móviles a 25° C, mostrando una característica movilidad de «volteo», pero no son móviles a 35° C. Fueron identificadas siete especies de *Listeria*, todas ellas emparentadas íntimamente. Una octava especie, anteriormente denominada *Listeria denitrificans*, ha sido reclasificada como *Jonesia denitrificans*. Las especies *L. innocua* y *L. murrayi* son consideradas no patógenas, mientras que *L. seeligeri*, *L. ivanovii* y *L. welshimeri* rara vez causan infección humana, reservando para *L. monocytogenes* la consideración de especie más importante (ICMSF, 1996).

Aproximadamente una tercera parte de las infecciones humanas por *L. monocytogenes* son perinatales, afectando a mujeres gestantes y a sus bebés no nacidos o recién nacidos y las dos terceras partes restantes se presentan en personas no gestantes de todas las edades. La mayoría de las infecciones por *L. monocytogenes* se dan en personas cuya inmunidad ha sido menoscabada por la edad, por enfermedades tales como el cáncer, por el transplante de órganos, por el uso de corticoesteroides o por el SIDA. Es capaz de sobrevivir y multiplicarse fuera de hospederos animales y en medios nutritivos muy simples. Cuando infecta a los animales o a las personas, se multiplica intracelularmente. Parece ser que no todas las cepas de *L. monocytogenes* son patógenas, pero todas las cepas patógenas son hemolíticas y la producción de hemolisina es una de las propiedades asociada a la patogenicidad, ya que todas las cepas

anhemolíticas son apatógenas. *L. monocytogenes* ha sido aislada en una gran diversidad de hábitats, entre los que se incluyen el suelo, el ensilado, las aguas residuales, los ambientes donde se elaboran alimentos, las carnes crudas y las heces de las personas y de los animales sanos, además causa infección en muchos animales a parte del hombre.

A veces *L. monocytogenes* es excretada en la leche. Se puede hallar en un elevado porcentaje de pollos crudos y en otros tipos de carne cruda. En las plantas de elaboración de alimentos, las superficies húmedas albergan listerias y esto, unido a la capacidad para multiplicarse a temperaturas de refrigeración, se refleja en su hallazgo en las neveras y en las unidades de refrigeración. El organismo resiste bien durante varias semanas a -18°C en varios sustratos alimenticios. En condiciones ácidas y en los medios de laboratorio, la supervivencia es más corta. Es posible que en el almacenamiento en congelación (temperaturas comprendidas entre $18 - 19.5^{\circ}\text{C}$) durante un mes mueran pocas listerias. En el pescado o en los camarones que se guardan envasados al vacío en hielo durante 21 días, no existe un aumento del número de microorganismos (ICMSF, 1996).

En presencia de microorganismos competitivos, y a los niveles de pH más bajos que predominan en la carne de vacuno picada y en el hígado (5.5 – 5.9), el organismo a veces sobrevive sin multiplicarse a 4°C , aunque en la carne picada estéril a 4°C , o en la carne picada contaminada de modo natural a 20°C , el organismo crece bien. También se ha observado crecimiento de 4 a 4.4°C en el huevo líquido pasteurizado y en varios productos cárnicos cocidos al

vacio, aunque en la clara de huevo líquida cruda *L. monocytogenes* muere rápidamente a 4 y a 20° C. Por otro lado, aunque generalmente no se multiplica durante la fermentación que se usa en la elaboración de quesos y de productos cárnicos tales como el salami, varias semanas después de que la fermentación es completa, con frecuencia existe un número escaso de supervivientes. Los quesos blandos madurados superficialmente, mantienen el crecimiento de *L. monocytogenes*, especialmente cerca de la superficie, en la que el pH se eleva debido al crecimiento de los mohos de superficie. Entre las bacterias vegetativas Gram negativas *L. monocytogenes* no es insólitamente termorresistente. A no ser que se hallen presentes en cifras iniciales muy elevadas (por ej. $10^5 - 10^6$ UFC/ml) no debería resistir el tratamiento comercial de la pasteurización normal de la leche (71° C durante 15 segundos). La resistencia en la nata es parecida a la correspondiente en la leche desnatada, aunque en las carnes, incluyendo el salami, se observan valores más elevados y se indica que la grasa aumenta la resistencia (ICMSF, 1996).

Enterococcus faecalis y *Enterococcus faecium*

Son cocos, Gram positivos, se presentan en pares o en pequeñas cadenas, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, quimiorganotrofos, el tipo de peptidoglucano es lisina-D-asparagina para la mayoría de las especies del género, excepto *E. faecalis* en la cual el peptidoglucano es lisina-alanina²⁻³.

Los requerimientos nutricionales son generalmente complejos. Las colonias son circulares, pequeñas, blancas-grisáceas.

Enterococcus faecalis: a menudo es dominante en el intestino humano, también ha sido aislado del intestino y de las amígdalas de perros y gatos. Se ha descrito como una especie predominante del género *Enterococcus* en carne de cerdo. Es muy larga la lista de infecciones enterococales en humanos, usualmente representan entre el 80 y 90 % de diferentes casos estudiados. Es principalmente relacionado con endocarditis, infecciones del tracto urinario, infecciones en tejidos blandos, infección biliar, dolores abdominales.

Enterococcus faecium: junto con *Enterococcus faecalis* son de las especies más frecuentemente encontradas en el tracto gastrointestinal, pero algunas diferencias geográficas son evidentes. En aves de corral y ganado la incidencia de este microorganismo decrece con la edad. Este es frecuente en puercos, y ocurre también en perros y gatos. Aunque esta especie es menos frecuente que *E. faecalis* (alrededor del 10%). Esta especie ha recibido mucha atención recientemente, debido a su resistencia a múltiples antibióticos.

Por otro lado, la cepa de *Enterococcus faecium* SF68, es una bacteria comensal del tracto gastrointestinal que pertenece a una de las especies mejor documentadas y es considerada genéticamente estable y segura. El *Enterococcus faecium* es resistente al ambiente ácido durante el paso a través del estómago. El *Enterococcus faecium* SF68 demuestra un tiempo de generación o multiplicación muy corto (< 20 min) comparado con otras bacterias, lo

cual es muy importante para la rápida colonización y competencia con especies patogénicas de rápido crecimiento. El *Enterococcus faecium* produce grandes cantidades de la forma "L" de ácido láctico, lo cual disminuye el pH y le permite tener una acción bacteriostática contra bacterias gram-negativas como la *Salmonella*, *E. coli* y *Shigella* al inhibir su crecimiento. El *Enterococcus faecium* SF68 produce sustancias como bacteriocinas, con efecto bactericida. Se ha visto también que inhibe la adhesión de patógenos entéricos. La especie SF68 promueve el crecimiento de *Lactobacillus reuteri*, un germen típico que habita el duodeno, después de un tratamiento antibiótico. El *Enterococcus faecium* SF68 produce la enzima lactasa, la cual es capaz de transformar a la lactosa en azúcares de fácil metabolización como la glucosa y galactosa; por lo que es útil en intolerancia a la lactosa. La cepa SF68 estimula las funciones digestivas, ya que produce lipasa; enzima que facilita la digestión de los lípidos presentes en los alimentos. Se ha observado también que favorece la biosíntesis fisiológica de coenzimas, cofactores y vitaminas que tienen funciones importantes en el organismo. Se ha encontrado en pacientes con encefalopatía hepática, que la cepa SF68 disminuye el amoníaco sanguíneo al competir y modificar la flora intestinal putrefactora en pacientes con cirrosis hepática, e incluso se ha visto que sus efectos persisten por más tiempo en comparación con el tratamiento con lactulosa, la cual es empleada también para disminuir el amoníaco sanguíneo y mejorar el estado mental del paciente²².

²² <http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm/mex/productos/7543.htm>

1.7.3 Bacterias ácido lácticas (BAL) relacionadas con *Pediococcus acidilactici*:

Lactobacillus plantarum

Pertenece a la familia Lactobacillaceae. Son bacilos rectos o curvos y se presentan individualmente, en pares o en cadenas cortas, Gram-positivos, no formadores de esporas rara vez son móviles, catalasa negativos, negativos a la prueba de la benzidina, anaerobios facultativos. La pared celular contiene además ribitol o glicerol. Forman ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares. Las colonias son blancas, pero en ocasiones son amarillo claro, y muy pequeñas. Crecen a pH 5.0 – 5.8, a una temperatura entre 30 y 37° C, habitualmente no crece a 45° C requieren de altos contenidos de carbohidratos como: lactosa, sacarosa, salicina, manitol, sorbosa, glucosa y xilosa²³. También puede fermentar la amigdalina, celobiosa y rafinosa. Necesita algunos aminoácidos y vitaminas para crecer. Se encuentran en una gran variedad de hábitats, en membranas de mucosa de animales y humanos (cavidades orales, intestinales), en plantas o en materiales de origen vegetal, en estiércol y abonos, y en hábitat hechos por el hombre como aguas residuales, y además en la fermentación de alimentos, como queso y leche, se aíslan también de productos lácteos, ensaladas, entre otros; es uno de los organismos responsables de la fermentación de los encurtidos y de la fabricación de chucrut (Robinson, 1987).

²³ <http://www.trabajos15/micrococcaceae/micrococcaceae.shtml>

Forman parte de la flora intestinal normal y pueden predominar en lactantes e individuos con ingestión elevadas de azúcares, especialmente lactosa. Anteriormente se creía que la flora intestinal de lactobacilo era preferible a una flora proteolítica de coliformes, ya que tendía a inhibir los trastornos degenerativos aumentando la vitalidad en personas de edad avanzada, y que esa flora podía establecerse consumiendo leches fermentadas o leches búlgaras y acidófilos. De esta manera puede alterarse la composición de la flora intestinal, y también mediante el consumo de cantidades equivalentes de leche azucarada, pero el cambio es pasajero, y no está demostrado que esa flora intestinal por sí misma favorezca la salud²⁴.

Los productos lácteos elaborados incluyen leche fermentada, queso y mantequilla. Desde los albores de la civilización se han elaborado estos productos, dado que la fermentación láctica ocurre naturalmente en la leche. Se encontró después que el sabor ácido era producido con más rapidez y uniformidad si se agregaban pequeñas cantidades de producto fermentado a leche fresca y se conservaba la mezcla a temperatura adecuada. Ello fue el origen de los distintos tipos de "cuajos", esto es, sustancias que inician o desencadenan la coagulación de la leche. Tienen un papel prominente entre los microorganismos asociados con la alteración de alimentos en toda escala de pH. Las carnes con pH relativamente alto, experimentan putrefacción debida a gérmenes Gram negativos del grupo *Pseudomonas* – *Acinetobacter* – *Moraxella*, durante al almacenamiento a temperaturas iguales o inferiores a 10 °C; no crecen sin embargo estos microorganismos a pH's iguales o inferiores a 5.3. A pesar de las considerables diferencias en la composición de la pared

²⁴ <http://www.trabajos15/lactobacilos/lactobacilos.shtml>

celular de los organismos Gram positivos y Gram negativos, sus límites de tolerancia de pH son apenas ligeramente diferentes. Sin embargo, las bacterias responsables del deterioro de los alimentos ácidos (pH < 4.5) son todas Gram positivas. Las especies más frecuentemente implicadas pertenecen al género *Lactobacillus* y aparte de su importancia en la alteración, son las que se utilizan como agentes de la fermentación en productos lácteos y vegetales. Entre los organismos Gram positivos, hay algunos particularmente resistentes a la presencia en el medio de altas concentraciones de ácido no disociados; así por ejemplo, los lactobacilos, son resistentes al ácido láctico y acético. Además, algunos lactobacilos pueden producir ácidos débiles lipofílicos en cantidades suficientes para inhibir a las enterobacterias. Los lactobacilos no son perjudiciales, al contrario, muchas veces inhiben el desarrollo de los gérmenes nocivos, como el *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y tienen capacidad de producir sustancias como la proteínosa y la peptídica, y con respecto a la acidificación se encarga de regularlo, rebajando el pH, por todas estas características, los lactobacilos forman la parte esencial de la flora bacteriana tanto del queso como en la leche²⁵.

Pediococcus pentosaceus

Es un miembro de la familia Streptococcaceae, pertenece al grupo de bacterias Gram positivas, no encapsuladas, homofermentativas, inmóviles, anaerobios facultativos, cuyas células esféricas forman principalmente tétradas, aunque también se les encuentra formando pares. Todas las especies crecen a 30° C.

²⁵ <http://www.trabajos15/lactobacilos/lactobacilos.shtml>

con un máximo tolerable a los 52° C. Se destruye por calentamiento a los 70° C por 10 minutos. El rango de la temperatura óptima es 25 – 40° C. El pH óptimo es de 6.0 a 6.5. La mitad de las especies crecen a 4.2. Son catalasa negativos, no forman indol, la mayoría no reducen nitratos, no hidrolizan hipurato de sodio y no son patógenos a plantas ni animales. Son quimioorganótrofos requiriendo un medio rico, factores de crecimiento complejos, así como de aminoácidos. Su crecimiento depende de la presencia de carbohidratos y la glucosa es fermentada por la ruta Embden-Meyerhoff a D(+) ó L(-)-lactato, sin formación de gas (Manual Bergey's, 1984).

Pediococcus pentosaceus es aislado de cebada, malta, frutas cítricas y en otros materiales de plantas. Es usada en procesos de fermentación, por ejemplo, en leche de soya. Esta especie se utiliza como probiótico, así mismo, se ha identificado que algunas cepas de esta especie producen pediocinas, las cuales actúan contra algunos microorganismos descomponedores de alimentos. Se han encontrado en las salmueras de los encurtidos en fase fermentativa, siendo responsables de ciertas alteraciones en las bebidas alcohólicas, por ejemplo, cerveza; se ha usado también como cultivo iniciador en los embutidos fermentados²⁶.

²⁶ <http://www.trabajos15/micrococcaceae/micrococcaceae.shtml>

1.8 CRECIMIENTO BACTERIANO.

La célula bacteriana es esencialmente una maquinaria de síntesis capaz de duplicarse a sí misma. El proceso de síntesis para el crecimiento bacteriano involucra unas 2000 reacciones químicas (²⁷) de una amplia variedad. Una vez sintetizados los polímeros, el crecimiento continúa con el ensamblaje y formación de nuevas estructuras celulares que finalizan con la división en dos células. En un medio apropiado física y nutricionalmente, un cultivo se reproduce continuamente como células vegetativas, los nutrientes absorbidos y metabolizados permiten crecer al microorganismo.

EL crecimiento es definido como un incremento ordenado de todos los constituyentes y estructura celular. En muchos microorganismos, este incremento continúa hasta que la célula se divide en dos nuevas células: Fisión binaria. El crecimiento microbiano conlleva usualmente a un incremento en el número de células. Es importante distinguir entre el crecimiento individual de células y el crecimiento de poblaciones de células.

El crecimiento individual: es el incremento en el tamaño y peso, y es usualmente un prelude a la división celular. El crecimiento poblacional: es el incremento en el número de células como una consecuencia del crecimiento y división celular. La tasa de crecimiento: Es el cambio del número de células o masa por unidad de tiempo. La generación es: el intervalo para la formación de dos células provenientes de una. El tiempo de generación es: el tiempo que tarda una población en duplicarse. Se puede definir también como la cantidad de tiempo requerida para completar un ciclo de división.

Los factores que influyen el crecimiento microbiano son: Factores externos: 1) Condiciones ambientales y de cultivo: pH, T°, Aw (actividad acuosa), O₂, CO₂ y 2) Condiciones nutricionales: Tasa C/N 10:1, 12:1. Factores internos: Capacidad metabólica.

CICLO DEL CRECIMIENTO POBLACIONAL.

Si analizamos el crecimiento microbiano en el tiempo, éste describe una típica curva de crecimiento que puede ser dividida en diversas fases (figura 13):

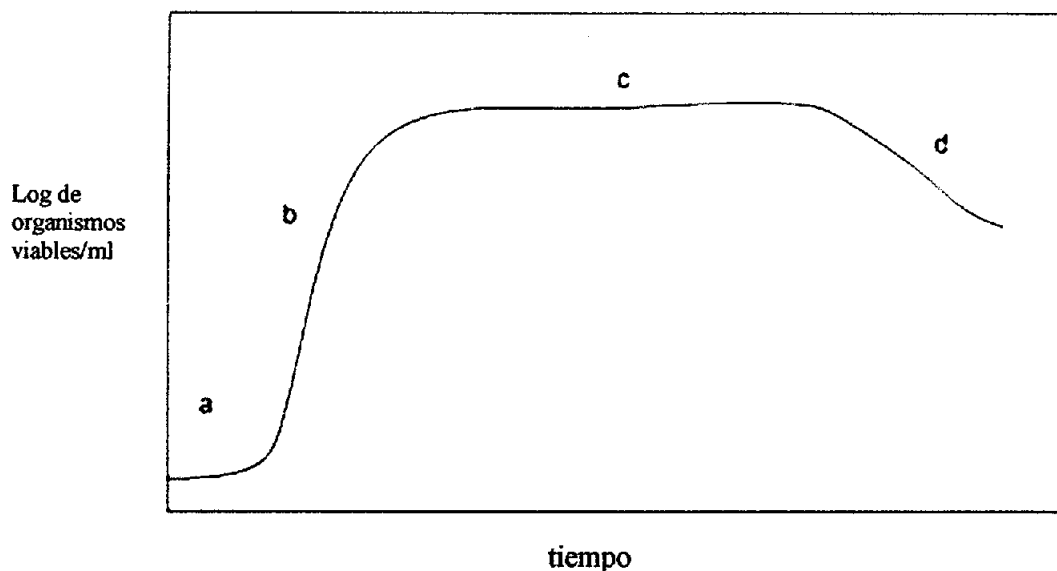


Figura 13. Curva de crecimiento microbiano. a) fase lag, b) fase exponencial, c) fase estacionaria y d) fase de muerte.²⁷

a) Fase lag o de retraso.

Cuando una población microbiana es inoculada en medio fresco, el crecimiento generalmente no principia de inmediato sino después de un cierto tiempo, llamado fase lag que puede ser breve o largo, dependiendo de las condiciones.

Si un cultivo que crece exponencialmente es inoculado al mismo medio bajo las

²⁷ http://www.geocities.com/roberto_raul/crecimiento.html

mismas condiciones de crecimiento no se observa la fase lag y el crecimiento exponencial continúa a la misma velocidad. Sin embargo, si el inóculo se toma de un cultivo viejo (fase estacionaria) y se inocula en el mismo medio, generalmente se presenta la fase lag, aún cuando las células del inóculo estén vivas. Esto se debe a que las células generalmente agotan diferentes coenzimas esenciales u otros constituyentes celulares y se requiere de cierto tiempo para su resíntesis. Un retraso también se presenta cuando el inóculo está formado por células dañadas (pero, no muertas) por tratamientos con calor, radiación o sustancias químicas, debido al tiempo necesario para que las células puedan reparar dicho daño. También se observa cuando una población se transfiere de un medio de cultivo rico a uno pobre. Esto sucede debido a que para que continúe el crecimiento en un medio de cultivo en particular, es necesario que las células tengan un complemento íntegro de enzimas para la síntesis de los metabolitos esenciales que no están presentes en dicho medio. Cuando se les transfiere a un medio diferente, se requiere cierto tiempo para la síntesis de nuevas enzimas. Es una fase de preparación y adaptación al medio, su duración depende del medio de cultivo y el estado fisiológico de las células vivas²⁸.

b) Fase exponencial.

Es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide para formar dos células, cada una de las cuales también se divide para formar dos células más y así sucesivamente. La mayor parte de los organismos unicelulares crecen exponencialmente. La velocidad de crecimiento exponencial varía mucho de un

²⁸ http://www.geocites.com/roberto_raul/crecimiento.html

organismo a otro. Por ejemplo: *Salmonella typhi* crece muy rápidamente en cultivo, con un tiempo de generación de 20 – 30 minutos, *Mycobacterium tuberculosis*, crece muy lentamente, con sólo una o dos duplicaciones por día. Las condiciones ambientales, temperatura, composición del medio de cultivo, afectan a la velocidad de crecimiento exponencial así como las características del microorganismo. En general, las bacterias crecen con mayor rapidez que los organismos eucariotas. La tasa de crecimiento es exponencial²⁹.

c) Fase estacionaria.

El crecimiento exponencial se detiene, los nutrientes indispensables se agotan, no hay incremento o decremento en el número de células o masa, hay limitación de nutrientes y acumulación de sustancias tóxicas. Los microorganismos son fisiológicamente activos y viables. En un sistema cerrado no se puede llevar a cabo indefinidamente el crecimiento exponencial. El crecimiento exponencial se detiene. Lo que sucede es que algunos de los nutrientes indispensables se agotan o algún producto de desecho fabricado en el medio llega a un nivel en el que es inhibitorio y cesa el crecimiento exponencial. La población ha alcanzado la fase estacionaria³⁰.

d) Fase de muerte.

Si la incubación continúa después que una población alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero lo más probable es que mueran. Si esto último sucede, la población se encuentra en la fase de muerte. Durante esta fase, el conteo microscópico directo puede

²⁹ http://www.geocites.com/roberto_raul/crecimiento.html

³⁰ http://www.geocites.com/roberto_raul/crecimiento.html

permanecer constante pero la viabilidad disminuye lentamente. En algunos casos, la muerte se acompaña por lisis celular, dando lugar a una disminución del conteo de viabilidad³¹.

1.9 METABOLISMO BACTERIANO.

En condiciones naturales, los microorganismos se desarrollan en diferentes hábitats y frecuentemente en poblaciones mezcladas o junto a otros seres vivos. Sin embargo, la mayor parte de la información que poseemos de los microorganismos se deriva del estudio de cultivos puros de los mismos. La bioquímica de los microorganismos se centra fundamentalmente en el estudio de sistemas constituidos por una biofase reducida a un conjunto de individuos idénticos, el medio propiamente dicho y una fase gaseosa. El cultivo puro es un sistema dinámico que puede caracterizarse en función del aumento de la biomasa, de la formación de nuevos productos que se acumulan en el medio y de la desaparición o consumo de componentes originales del mismo (Parés y Juárez, 1997).

El metabolismo microbiano tiene un alcance mayor, abarcando la integración de la totalidad de las transformaciones químicas que se realizan en el microbio. A parte de la biosíntesis y la regulación metabólica, dentro del metabolismo se incluyen los fenómenos de permeabilidad, la diferenciación celular y molecular,

³¹ http://www.geocites.com/roberto_raul/crecimiento.html

el trabajo osmótico, la motilidad, los tactismos, la luminiscencia y el mantenimiento de la forma y estructura en ausencia de crecimiento. Estos aspectos, junto a la reproducción, el crecimiento celular y la adaptación, son parte del metabolismo por cuanto presuponen de algún modo determinados cambios químicos (Parés y Juárez, 1997).

Las condiciones de cultivo y la actividad de los microorganismos difieren de un caso a otro. De este modo puede reconocerse una diversidad importante de microorganismos, cada uno con características peculiares. Estos aspectos son relevantes en relación con la distribución taxonómica de los diferentes microorganismos, si bien la caracterización completa requiere del conocimiento de otros aspectos relativos a su forma y estructura, propiedades antigénicas y genéticas, características de los ácidos nucleicos y de otras moléculas estructurales.

El grupo taxonómico básico es la especie. En microbiología la especie queda generalmente definida por una cepa tipo. Todas las cepas lo suficientemente semejantes a una cepa tipo se incluyen en una misma especie, mientras que las cepas lo suficientemente distintas de esta cepa tipo se comprenden en otras especies. Esto siempre puede implicar criterios subjetivos que exigen un cierto compromiso provisional. Las especies parecidas se incluyen en el mismo género, y así se forman sucesivamente categorías superiores. Por lo que respecta a la relación entre actividad química y grupos taxonómicos, hay que considerar que una misma actividad química puede hallarse en microorganismos muy diferentes. No obstante, existe una relación significativa

entre los grupos de microorganismos que presentan actividades químicas globales equivalentes y la proximidad taxonómica de los mismos (Parés y Juárez, 1997).

El metabolismo microbiano comprende miles de transformaciones distintas, incluso considerando exclusivamente las que se llevan a cabo en una sola cepa bacteriana. El rasgo más distintivo de la integración del metabolismo es que dichas transformaciones se llevan a cabo en una estructura altamente organizada y que gracias a su actividad esta estructura organizada se perpetúa e incrementa, manteniéndose fundamentalmente idéntica a sí misma.

Otra característica fundamental de la integración de la actividad química es que todas las reacciones aparecen ordenadas en secuencias muy bien definidas en las que el producto final de una es el sustrato de la siguiente. Estas secuencias de reacciones se llaman vías metabólicas y algunas se inician en algún material del medio exterior, que debe pasar al protoplasma a través de las envolturas celulares. Otras terminan en productos que se liberan al medio exterior.

Muchas vías metabólicas tienen carácter cíclico, esto es: cualquier producto de la misma puede considerarse el final y el punto de partida. Casi todas las vías metabólicas están relacionadas unas con otras y un mismo intermediario puede obtenerse por distintos caminos.

Clásicamente, las vías metabólicas pueden tener una función catabólica o anabólica. Estrictamente, las primeras serían aquéllas que partiendo de ciertos materiales exteriores terminan en otros productos más simples que se devuelven totalmente al medio exterior, es decir, son procesos convergentes que parten de un número amplio de macromoléculas, degradables a un número menor de unidades constituyentes que, a su vez se transforman en otro número menor de intermedios metabólicos, que continúan la degradación hasta llegar a una fracción de dos átomos de carbono (acetil CoA). La única finalidad de estas vías es la producción de energía. Los productos finales son de menor peso molecular y globalmente la reacción tiene carácter oxidante. La secuencia bioquímica de carácter anabólico conduce al incremento de protoplasma y por lo tanto supone siempre un balance de materia positivo para la fracción celular. Sigue caminos divergentes utilizando usualmente vías diferenciadas de las catabólicas, lo que favorece la regulación metabólica. Tiene carácter reductor y forma moléculas de mayor peso molecular que las de partida (Parés y Juárez, 1997; Lozano, et.al, 2000).

En los microorganismos encontramos una gran diversidad de otras vías metabólicas que conducen a la formación de materia que no forma ninguna estructura esencial para la célula bacteriana. Esta materia se encuentra en proporción variable y generalmente pueden ser reutilizados para la formación de subunidades destinadas a la biosíntesis o para la obtención de energía, sin participación de ningún sustrato exterior. Se trata de los metabolitos de reserva (Parés y Juárez, 1997).

En determinadas condiciones de crecimiento muchos microorganismos pueden también dar lugar a la formación de grandes cantidades de algunos productos que no tienen función estructural ni de reserva. Generalmente se liberan al medio exterior, pero no son productos finales de reacciones degradativas sino de vías biosintéticas específicas. Entre ellos se encuentran antibióticos y otras sustancias que pueden ser de utilidad para el hombre. En algunos casos pueden ser artefactos metabólicos, pero en otros pueden tener sentido adaptativo. De forma general, estos productos se denominan metabolitos secundarios (Parés y Juárez, 1997).

Las reacciones biosintéticas requieren suministro energético. Este suministro suele llevarse a cabo generando un sustrato activo con el cual la reacción puede tener lugar espontáneamente. Para la formación de sustratos activados es esencial la producción de dadores de energía libre cuyo tipo más general es el ATP. Las reacciones biosintéticas son muy parecidas no sólo entre distintos microorganismos sino incluso a las de los organismos pluricelulares. Mucha mayor diversidad encontramos en los sistemas suministradores de energía, los cuales pueden ser divididos en tres grandes tipos: la fotosíntesis, la oxidación de compuestos inorgánicos y el catabolismo o el metabolismo degradativo de sustratos orgánicos.

En general, la actividad química que conduce a la producción de energía es cuantitativamente mayoritaria. Además, si se comparan las bacterias o las levaduras con las células de los organismos superiores, en las primeras existe

de modo característico una proporción aún mayor respecto de la actividad química total.

La biosíntesis es totalmente dependiente de la integridad metabólica, esto es, de la estructura y del sistema químico suministrador de energía. En cambio, la actividad de este último puede tener lugar en ausencia de biosíntesis y se mantiene en gran parte en los sistemas libres de células. De acuerdo con el segundo principio de la termodinámica, cuando una reacción química libera energía, sólo una parte de la misma, llamada energía libre (ΔG), puede ser utilizada para desarrollar trabajo. El resto se pierde en forma de calor.

En la biosíntesis intervienen otros intermediarios que tienen un efecto activador parecido al ATP. En su formación participa generalmente el ATP, pero algunas veces se forman directamente como resultado de reacciones catabólicas. A este grupo pertenecen el GTP, UTP, CTP, dTTP (desoxitimidina trifosfato) y acetil-CoA.

1.10 METABOLISMO PRIMARIO Y METABOLISMO SECUNDARIO.

La actividad metabólica microbiana no tiene siempre como consecuencia la proliferación celular. Si se considera la actividad metabólica de un cultivo microbiano a lo largo de toda la curva de crecimiento, se diferencian aquellos procesos metabólicos asociados al crecimiento celular (metabolismo primario)

de aquéllos que tienen lugar en la fase estacionaria, una vez que ha cesado el crecimiento de la biomasa (metabolismo secundario) (Parés y Juárez, 1997).

Es decir, considerando el crecimiento microbiano tal como ocurre en un proceso industrial. Se refiere en primer lugar, a aquellos procesos en los que el producto deseado es un metabolito microbiano. Hay dos tipos fundamentales de productos metabólicos: primarios y secundarios. Un metabolito primario es el que se forma durante la fase primaria del crecimiento del microorganismo, mientras que un metabolito secundario es el que se forma cerca del final de la fase de crecimiento, frecuentemente en la fase estacionaria (figura 14).

Metabolitos primarios microbianos. Un proceso microbiano típico, en el que el producto se forma durante la fase primaria del crecimiento, por ejemplo, el alcohol (etanol) obtenido por fermentación. El etanol es un producto del metabolismo anóxico de la levadura y de algunas bacterias y se forma como parte del metabolismo de la energía. Debido a que el crecimiento sólo puede tener lugar si puede producirse energía, la formación de etanol tiene lugar en paralelo con el crecimiento³².

Metabolitos secundarios microbianos. Un tipo más complejo de productos industriales, es aquel en el que el producto deseado no se produce durante la fase primaria del crecimiento sino durante la fase estacionaria. Los metabolitos producidos durante la fase estacionaria se denominan metabolitos secundarios y son algunos de los metabolitos más comunes y más importantes de interés

³² <http://es.geocities.com/joakinicu/apartado12b.htm>

industrial. Los más conocidos y más ampliamente estudiados son los antibióticos. Mientras que el metabolismo primario es generalmente similar en todas las células, el metabolismo secundario presenta claras diferencias entre un organismo y otro. Las características reconocidas del metabolismo secundario son³³:

1. Cada metabolito secundario sólo lo forman relativamente pocos organismos.
2. Los metabolitos secundarios, aparentemente no son esenciales para el crecimiento y la reproducción.
3. La formación de metabolitos secundarios es extremadamente dependiente de las condiciones de crecimiento, especialmente de la composición del medio. Con frecuencia, se produce la represión de la formación del metabolito secundario.
4. Con frecuencia, los metabolitos secundarios se producen como un grupo de moléculas estrechamente relacionadas. Por ejemplo, se ha visto que una sola cepa de una especie del *Streptomyces* produce 32 antibióticos distintos pero relacionados, del tipo antraciclina.
5. Con frecuencia es posible obtener una espectacular superproducción de metabolitos secundarios, en tanto que los metabolitos primarios, ligados como están al metabolismo primario, usualmente no se pueden superproducir de una manera tan espectacular.

³³ <http://es.geocities.com/foakinicu/apartado12b.htm>

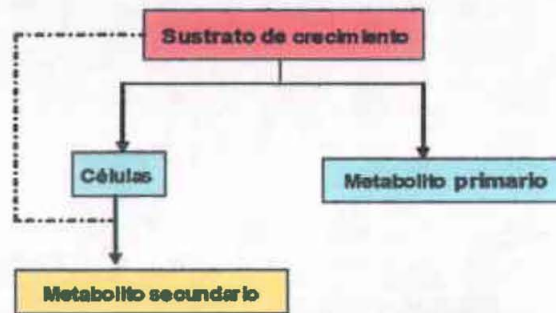
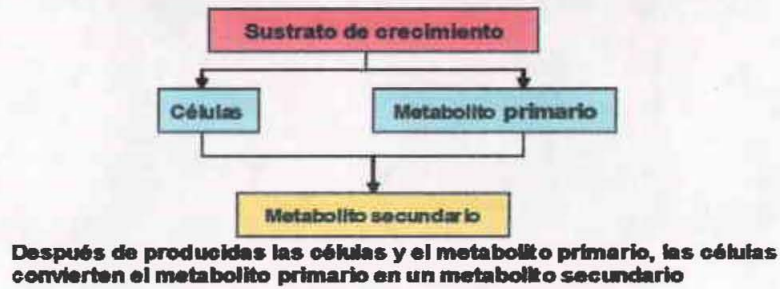
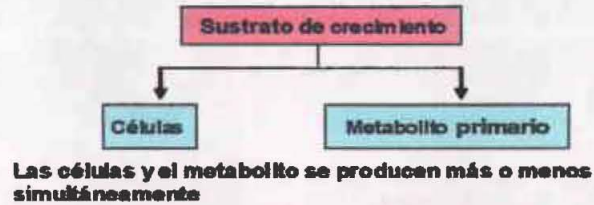


Figura 14. Diferencias entre un metabolito primario y un metabolito secundario.³⁴

En el metabolismo secundario, las dos fases distintas del metabolismo se denominan trofofase e idiofase. La trofofase es la fase de crecimiento (el prefijo *trofos*, significa "crecimiento") mientras que la fase de producción de

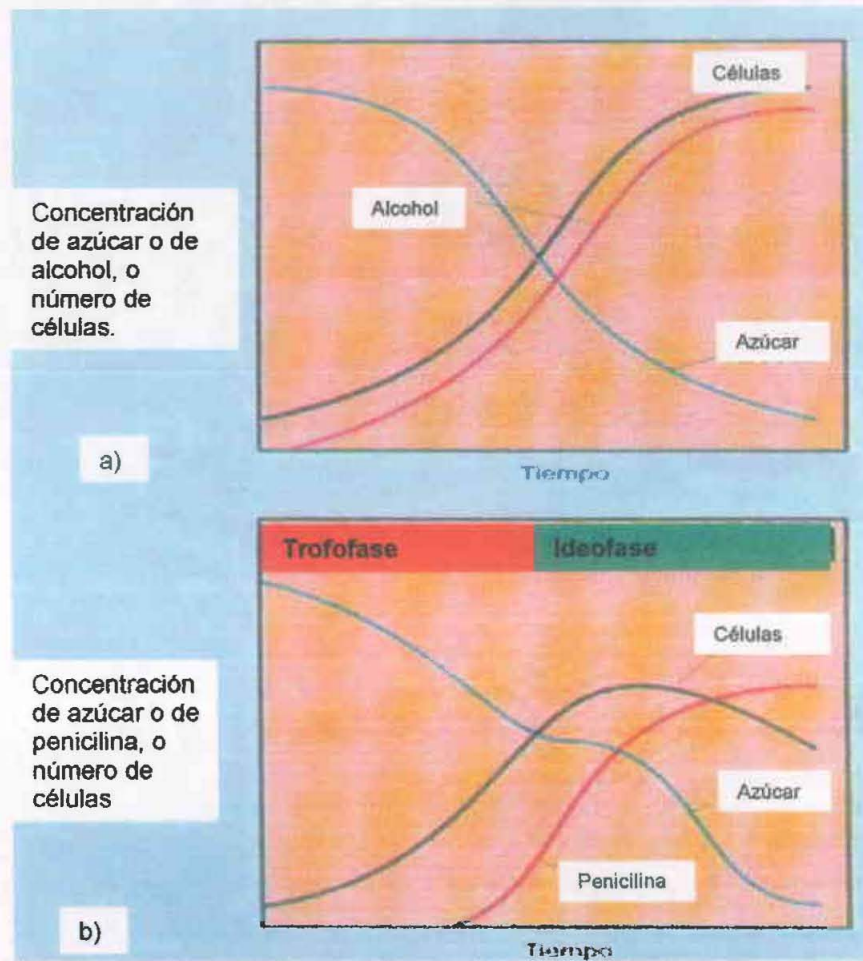
³⁴ <http://es.geocities.com/joakinicu/apartado12b.htm>

metabolitos es la idiofase. Si estamos tratando con un metabolito secundario debemos asegurar que durante la trofofase se proporcionen las condiciones apropiadas para un excelente crecimiento y que las condiciones se alteren adecuadamente y en el momento oportuno para que la formación del producto sea excelente. En el metabolismo secundario, la producción en cuestión puede no derivarse del sustrato primario del crecimiento, sino a partir de un producto que él mismo formó a partir del sustrato primario del crecimiento. Por tanto, el metabolito secundario se produce, generalmente, a partir de varios productos intermedios que se acumulan, bien en el medio de cultivo o bien en las células, durante el metabolismo primario. Una característica de los metabolitos secundarios es que las enzimas implicadas en la producción del metabolito secundario están reguladas separadamente de las enzimas del metabolismo primario. En algunos casos se han identificado inductores específicos de la producción de metabolitos secundarios. Por ejemplo, se ha identificado un inductor específico de la producción de estreptomicina, un compuesto denominado Factor A³⁵.

Relación entre el metabolismo primario y el secundario (figura 15). La mayoría de los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas complejas que para su formación requieren un gran número de reacciones enzimáticas específicas. Se sabe, por ejemplo, que en la síntesis del antibiótico tetraciclina están implicados al menos 72 pasos enzimáticos separados y más de 25 en la síntesis de la eritromicina, y que ninguna de estas reacciones tiene lugar durante el metabolismo primario. Sin embargo, las vías metabólicas de estos metabolitos secundarios arrancan del metabolismo primario porque los

³⁵ <http://es.geocities.com/joakinicu/apartado12b.htm>

materiales de partida para el metabolismo secundario vienen de las vías biosintéticas principales. Muchos metabolitos secundarios estructuralmente complejos, se originan a partir de precursores estructuralmente muy similares.



(a) Metabolismo primario: formación de alcohol a partir del azúcar. (b) Met. secundario: formación de penicilina, mostrando la separación entre la fase de crecimiento (trofofase) y la fase de producción (idiofase).

Figura 15. Metabolismo primario y metabolismo secundario.³⁶

³⁶ <http://es.geocities.com/joakinicu/apartado12b.htm>

2.0 HIPÓTESIS

Pediococcus acidilactici ATCC 8042 produce sustancias diferentes a bacteriocinas que inhiben el crecimiento de microorganismos nocivos.

3.0 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el espectro antimicrobiano de sustancias producidas por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en diferentes fases de crecimiento y medios de cultivo.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar el espectro antimicrobiano contra:

- ❖ BAL relacionadas: *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*;
- ❖ Bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*;
- ❖ Bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella thyphymurium*.

2. Evaluar el espectro antimicrobiano de las sustancias producidas en dos fases de crecimiento y en dos medios de cultivo.

4.0 METODOLOGÍA

4.1 Cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

CEPA: La cepa MIT-B-41 P-60 ATCC 8042 de *Pediococcus acidilactici* fue obtenida en Agar MRS del cepario del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), la cual se mantuvo en refrigeración a 4° C, y se realizó resiembra de la misma, así como Tinción de Gram.

MEDIOS DE CULTIVO: los medios de propagación de *Pediococcus acidilactici* son MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y CSTES (Caldo de Soya Trypticaseína, Extracto de levadura, Sacarosa) (Llorente, 1998 y 2003), y la fórmula de cada uno de ellos se presenta en la tabla 6.

MRS	(gramos/litro)	CSTES	(gramos/litro)
Sacarosa	10.0	Sacarosa	10.0
Ácido ascórbico	1.5	Ácido ascórbico	1.0
Polisorbato 80	1.0	Polisorbato 80	1.0
Sulfato de magnesio	0.1	Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.25	Sulfato de manganeso	0.2
Citrato de amonio	2.0	Extracto de levadura	10.0
Acetato de sodio	5.0	Soya trypticaseína	10.0
Fosfato dipotásico	2.0		
Extracto de levadura	5.0		
Extracto de carne	10.0		
Pentona proteasa	10.0		

Tabla 6. Composición de los medios nutritivos de MRS y CSTES. El Ácido ascórbico y la Sacarosa se esterilizan por separado.

DIAGRAMA DE PROPAGACIÓN Y CULTIVO: en la figura 16 se muestra el procedimiento seguido para la propagación de inóculos y cultivo de *Pediococcus acidilactici*, así como los parámetros fisicoquímicos evaluados.

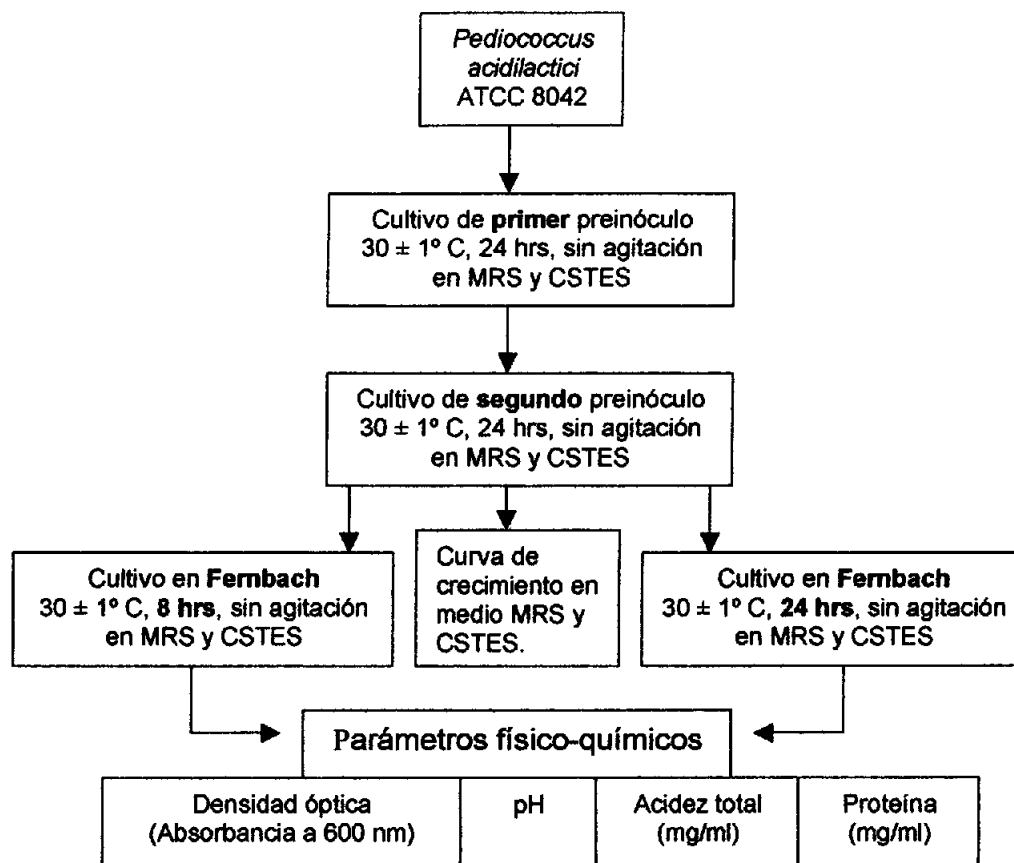


Figura 16. Diagrama del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y parámetros físico-químicos evaluados.

Se partió de la cepa conservada en chaquiras, y se realizó un primer preinóculo para ambos medios, agregando de 2 a 3 chaquiras en 30 ml de cada uno. Ambos matracas se incubaron a $30 \pm 1^\circ \text{C}$, sin agitación por 24 horas en una incubadora Precision Gravity Convection Incubator modelo 4. Se realizó un segundo pase a medio fresco inoculando el 1% del cultivo del primer preinóculo, incubando bajo las mismas condiciones este segundo preinóculo.

Se realizó una curva de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* en CSTES (gráfica 2 en Resultados), tomando muestras del cultivo en alícuotas de 2 ml por duplicado a las 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas para poder determinar las fases con las cuales se trabajara el espectro antimicrobiano, la curva se realizó midiendo la densidad óptica en un Espectrofotómetro Milton Roy Modelo Spectronic 21D a una longitud de onda de 600 nm. No se realizó curva de crecimiento en medio MRS, pues ya se tenía un modelo realizado por Llorente (1998) (gráfica 1 en Resultados), donde los datos reportados son reproducibles. De esta manera se decidió realizar fermentaciones a las 8 horas porque se encuentra en fase exponencial y a las 24 horas por que se encuentra en fase estacionaria, y así poder analizar el espectro antimicrobiano en base a la hipótesis ya mencionada.

Posteriormente, en matraces Fernbach, también con medio MRS y CSTES, con capacidad de 3.8 litros con un volumen de trabajo de 1.0 litro, se inoculó a cada uno el 1% de cultivo de un segundo preinóculo de MRS y CSTES respectivamente. Todos los matraces Fernbach se incubaron a $30 \pm 1^\circ \text{C}$, sin agitación, en incubadora Precision Gravity Convection Incubator modelo 4. Se obtuvieron los cultivos a las 8 horas y a las 24 horas. Todo este procedimiento se realizó por duplicado.

De los cultivos obtenidos de *Pediococcus acidilactici* en los medios de MRS y CSTES a las 8 y 24 horas de cada uno, se midió absorbancia, en alícuotas de 2 ml, utilizando un Espectrofotómetro Milton Roy Modelo Spectronic 21D a una

longitud de onda de 600 nm. Se empleó un Potenciómetro Beckman Modelo 34pHMETER y alícuotas de 20 ml para determinar pH. Las mismas muestras se titularon con NaOH 0.1 N para obtener el valor de acidez titulable y así calcular el ácido total producido (mg/ml). Se cuantificó proteína soluble (mg/ml) por Lowry Modificado -Manual Bio Rad- midiendo a una longitud de onda de 750 nm en el espectro ya mencionado. Es importante mencionar, que exclusivamente para determinar proteína se utilizaron los sobrenadantes ya procesados y liofilizados de los cultivos de MRS y CSTES de *Pediococcus acidilactici*.

4.2 Obtención de los sobrenadantes de los cultivos de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

DIAGRAMA DE OBTENCION DE SOBRENADANTES: en la figura 17 se muestra el procedimiento de la obtención de los sobrenadantes de los cultivos de *Pediococcus acidilactici* de MRS y CSTES a las 8 y 24 horas para cada uno.

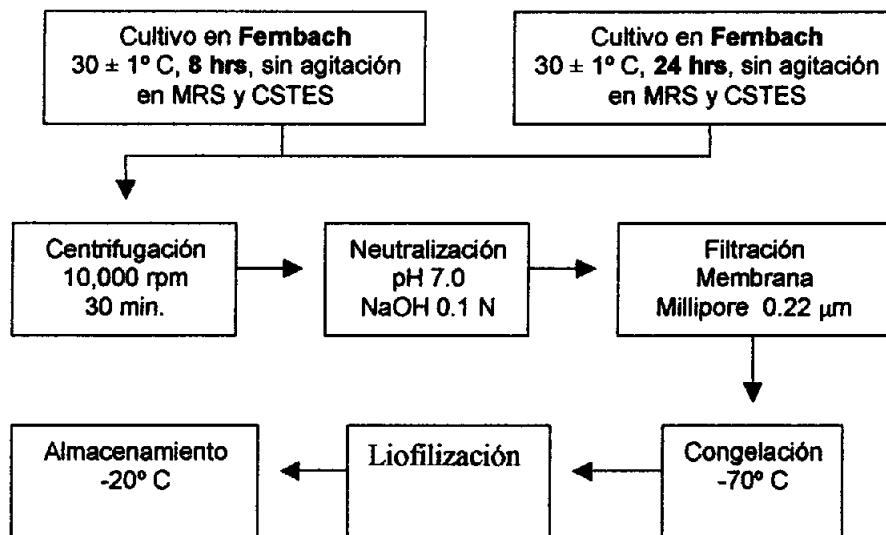


Figura 17. Diagrama de la obtención de los sobrenadantes de los cultivos de *Pediococcus acidilactici* ATCC.

Para obtener los sobrenadantes, se centrifugaron los cultivos en botellas estériles en una Centrífuga Beckmann Modelo J2-MC a 10000 rpm por 30 minutos a 4° C, los sobrenadantes se decantaron y se neutralizaron a pH 7.0 con NaOH 0.1 N, posteriormente se filtraron en un sistema de filtración Millipore estéril con membrana de 0.22 µm, estos sobrenadantes se depositaron en botes de plástico estériles con una capacidad de 30 a 40 ml y

se sellaron con papel parafilm, se mantuvieron a congelación a -70°C en un Ultracongelador NUAIRE por 24 horas, posteriormente se liofilizaron las muestras en una Liofilizadora Labconco Mod Freezer Dry System Freezone 4.5, y por último los sobrenadantes ya liofilizados se mantuvieron a -20°C en un congelador LAB-LINE Instruments Inc. Modelo 3552-10.

4.3 Identificación, caracterización y mantenimiento de las cepas microbianas para realizar las pruebas de espectro antimicrobiano.

Las cepas microbianas que se utilizaron para determinar el espectro antimicrobiano son las siguientes:

1. BAL GRAM (+) estrechamente relacionadas con *Pediococcus acidilactici*

- ❖ *Pediococcus pentosaceus* (Cepario, UAM)
- ❖ *Lactobacillus plantarum* (C. Wachter, F.Q. UNAM)

2. Bacterias GRAM (+)

- ❖ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p (A. Llorente, F.Q. UNAM)
- ❖ *Listeria innocua* ATCC 33099 (A. Llorente, F.Q. UNAM)
- ❖ *Enterococcus faecium* (Cepario, UAM)
- ❖ *Enterococcus faecalis* (Cepario, UAM)

3. Bacterias GRAM (-)

- ❖ *Escherichia coli* (C. Wachter, F.Q. UNAM)
- ❖ *Salmonella tiphymurium* (C. Wachter, F.Q. UNAM)

La caracterización y propagación de estas cepas se muestra en la figura 18.

Cabe señalar que para determinar el espectro antimicrobiano, no se utilizó *Listeria monocytogenes* sino *Listeria innocua*, por cuestiones de salud y condiciones de laboratorio.

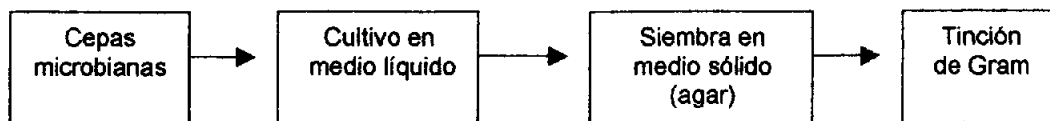


Figura 18. Diagrama de la propagación y caracterización de las cepas microbianas a prueba.

Cada una de estas cepas se cultivó en medio líquido y de ahí se hizo un pase a medio sólido (agar) para corroborar que la cepa no estuviese contaminada y así mismo, identificarlas por sus características morfológicas como al microscopio óptico realizando Tinción de Gram. Todas las cepas se mantuvieron a -20°C . Los medios nutritivos óptimos para cada una de las cepas microbianas son³⁷:

- ❖ MRS (Man, Rogosa, Sharpe) marca DIFCO para *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus plantarum*;
- ❖ BHI (Infusión de Cerebro Corazón) marca BIOXON para *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*;
- ❖ ST (Soya Trypticaseína) marca BIOXON para *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*.

³⁷ <http://www.atcc.org/>, Llorente, 1998 y MERCK, 1994.

4.4 Espectro antimicrobiano de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

DIAGRAMA PARA DETERMINAR EL ESPECTRO ANTIMICROBIANO: la figura 19 muestra el procedimiento que se llevó a cabo para evaluar el perfil antimicrobiano de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en diferentes cepas microbianas.

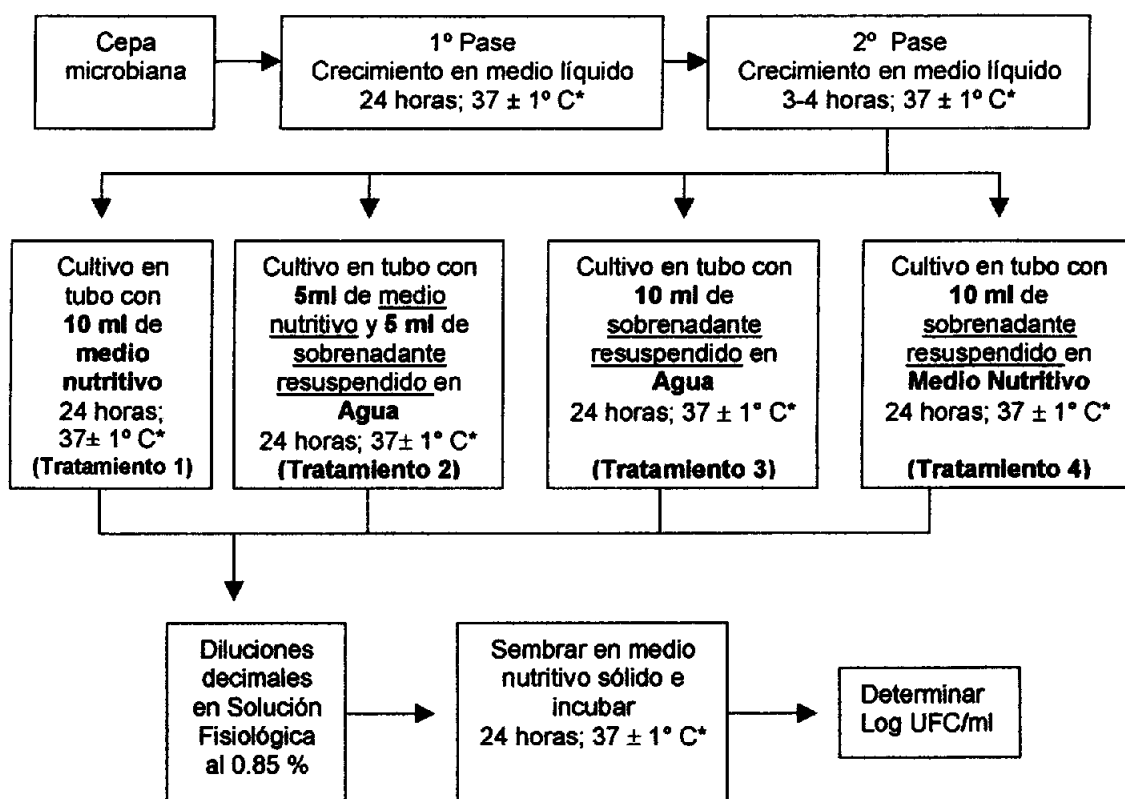


Figura 19. Diagrama para determinar el espectro antimicrobiano.

Cada una de las cepas microbianas se cultivó en 10 ml de su respectivo medio nutritivo ya mencionado, se incubó por 24 horas a $37 \pm 1^\circ \text{C}^*$ (Fig. 20, num.1) en una incubadora Gravity Convection Incubator Modelo E-71. Se realizó un segundo pase a medio fresco inoculando el 1% y se llevó a fase logarítmica (3 a 4 horas) bajo las mismas condiciones (Fig. 20, num. 2).

Del cultivo se realizó un factor de dilución 1:100 (Fig. 20 num. 3 y 4) y posteriormente se inocularon 20 μl a cada uno de los tratamientos con los sobrenadantes obtenidos del cultivo de *P. acidilactici* y se incubaron por 24 hrs. a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ (Fig. 20 num. 5, 6, 7 y 8).

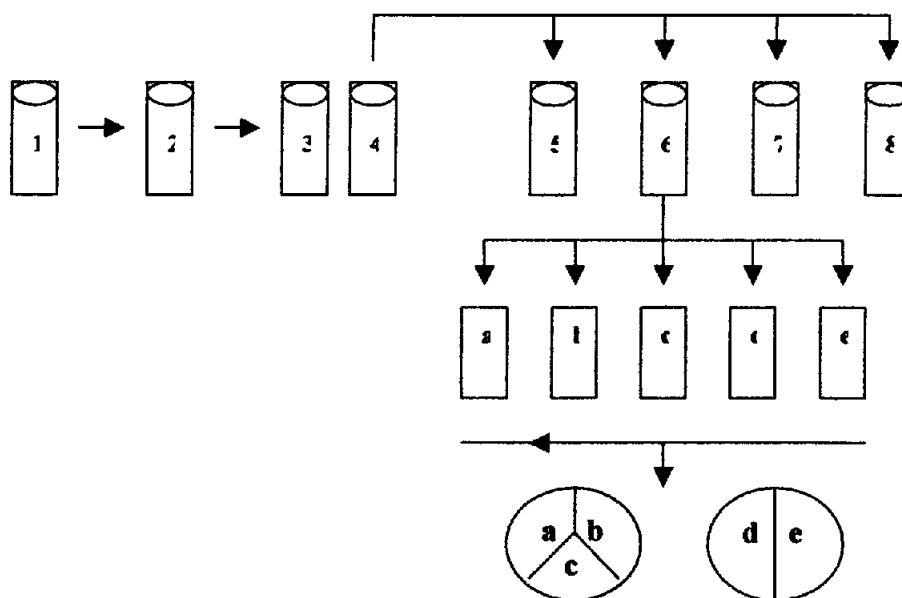


Figura 20. Diagrama que ilustra el procedimiento para determinar el espectro antimicrobiano.

Num. 5 Cultivo en 10 ml de medio nutritivo para el microorganismo.

* La mayoría de las cepas microbianas se cultivaron a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ por ser la temperatura óptima para su crecimiento; sin embargo para la cepa de *Pediococcus pentosaceus* su temperatura óptima de crecimiento es de $30 \pm 1^\circ \text{C}$.

(Tratamiento 1). El objetivo en este caso es evaluar el crecimiento en condiciones óptimas.

Num. 6 Cultivo en 10 ml de sobrenadante resuspendido en agua concentrado 10x y liofilizado.

(Tratamiento 2). El objetivo en este punto es evaluar el efecto del sobrenadante sobre el microorganismo blanco.

Num. 7 Cultivo en 5 ml de medio nutritivo y 5 ml de sobrenadante resuspendido en agua concentrado 10x y liofilizado.

(Tratamiento 3). El objetivo es ver si la dosis del sobrenadante tiene un efecto en la respuesta.

Num. 8 Cultivo en 10 ml de sobrenadante resuspendido en medio nutritivo concentrado 10x y liofilizado

(Tratamiento 4).

Para determinar el número de células viables (UFC-Unidades Formadoras de Colonias-/ml) se prepararon diluciones decimales de los tratamientos de cada microorganismo a prueba, para el caso del Tratamiento 1 (Control), se eligió la dilución que permitiera contar entre 20 y 200 colonias; para los demás tratamientos donde se aplican los sobrenadantes se decidió realizar solo hasta cinco diluciones (Fig. 20 a, b, c, d y e) y de igual modo, se eligió la dilución que permitiera contar entre 20 y 200 colonias. De cada dilución se aplicaron por triplicado 20 μ l en placas de agar con medio nutritivo correspondiente para cada cepa microbiana, incubando a $37 \pm 1^\circ$ C por 24 horas. Para obtener las UFC/ml se multiplicó el número de las colonias contables por el inverso de la dilución y se dividió entre la alícuota (en ml) y se obtuvo el logaritmo (Log UFC/ml).

El procedimiento que se muestra en la figura 20 se realiza para cada una de las cepas microbianas a prueba (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecium*,

Enterococcus faecalis, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*) y para cada uno de los tiempos de fermentación de cada cultivo de *Pediococcus acidilactici* (MRS t8, MRS t24, CSTES t8 y CSTES t24).

Cabe aclarar que los sobrenadantes de los cultivos de *Pediococcus acidilactici* se resuspendieron en agua destilada estéril tras liofilizar, pues estudios previos demostraron que se percibía mejor el efecto inhibitorio si los sobrenadantes se concentraban 10X (Llorente, 1998). Se comparó su efecto contra el crecimiento obtenido en medio nutritivo óptimo para los microorganismos a prueba.

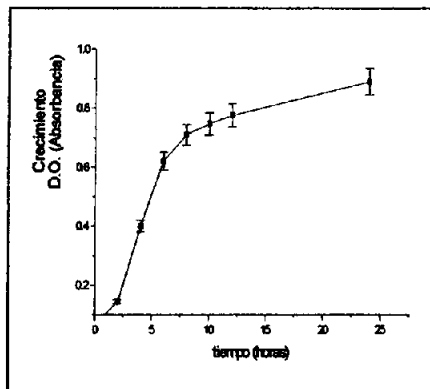
5.0 RESULTADOS Y DISCUSIONES.

La primera etapa del trabajo consistió en cultivar el microorganismo de estudio en dos medios de cultivo diferentes, de los que se cosechó en dos momentos metabólicos distintos para obtener la sustancia antimicrobiana.

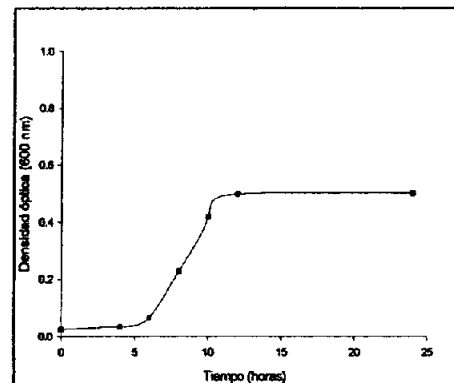
Tanto el medio MRS como el medio CSTES contienen la misma fuente de carbono, en la misma cantidad; sin embargo, se diferencian en la fuente de nitrógeno y minerales, habiendo más en MRS. La fuente de nitrógeno de MRS consta principalmente de extracto de levadura, extracto de carne y peptona proteasa; mientras que CSTES consiste solamente de extracto de levadura y soya tripticaseína. Ambos medios de cultivo tienen un factor de crecimiento adicional, el ácido ascórbico, el cuál existe en mayor cantidad en MRS, proporcionando un mejor y mayor crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (Llorente, 1998). En cuanto a los minerales disponibles, MRS tiene alrededor del doble que hay en CSTES (tabla 6), destacando el sulfato de magnesio, el sulfato de manganeso, acetato de sodio, fosfato dipotásico, entre otros. La composición de los medios nutritivos son esenciales para la producción de la (s) sustancia (s) producidas por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. El hecho es que, esta cepa produce sustancias distintas con un efecto de inhibición de crecimiento diferente, como se muestra en las siguientes páginas.

En las gráficas 1 y 2 se puede apreciar el perfil de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* en los dos medios. Con los resultados obtenidos en un trabajo anterior con el medio MRS (Llorente, 1998), se reporta una fase

exponencial aproximadamente iniciada a las 2.5 horas, y se logra una absorbancia de aproximadamente 0.1, en tanto la fase estacionaria inicia alrededor de las 10 horas, con una absorbancia por arriba de 0.7 (gráfica 1). En comparación en una curva de crecimiento en medio CSTES (gráfica 2), la fase exponencial inicia aproximándose a las 5 horas de fermentación, con una absorbancia por debajo de 0.1, y la fase estacionaria empieza alrededor de las 10 horas con una absorbancia aproximadamente de 0.5.



Gráfica 1. Crecimiento de P. acidilactici en MRS. (Llorente, 1998)



Gráfica 2. Crecimiento de P. acidilactici en CSTES.

Esto quiere decir que el medio CSTES soporta menor cantidad de biomasa, pues la densidad óptica alcanzada es menor. También se obtienen diferentes velocidades de crecimiento, y en el medio MRS en la fase estacionaria puede apreciarse un incremento bajo y lento en densidad óptica. Esto podría deberse al uso de algún nutriente o a la producción de alguna sustancia, lo que no se puede saber con el trabajo realizado aquí.

Hay que recordar que se realizó una curva de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* solamente en CSTES, con la cual se determinaron las fases para trabajar el espectro antimicrobiano. Por lo tanto, fue que se realizaron las fermentaciones a las 8 y a las 24 horas para ambos medios, para poder así comparar y analizar la posible sustancia (s) producida (s) por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Como indicadores del estado metabólico, en la tabla 7 se muestran los parámetros fisico-químicos evaluados a las 8 y 24 horas del cultivo de *Pediococcus acidilactici* en ambos medios.

Sobrenadantes	pH	Acidez total (mg/ml)	Densidad óptica (600 nm)	Proteína (mg/ml)
MRS t8	5.63 ± .077	1.85 ± .206	0.5205 ± .0063	1.103 ± .022
MRS t24	5.61 ± .028	1.9 ± .439	0.555 ± .048	1.204 ± .046
CSTES t8	4.5 ± .049	2.15 ± .048	0.467 ± .066	0.613 ± .011
CSTES t24	4.59 ± .318	2.09 ± .156	0.577 ± .106	0.74 ± .077

Tabla 7. Parámetros evaluados en dos medios de cultivo a dos tiempos de fermentación.

La curva de crecimiento (grafica 1) indica que en MRS a las 8 como a las 24 horas se tienen dos etapas de crecimiento distintas, en cambio en la tabla 7 los parámetros fisicoquímicos evaluados son muy parecidos y constantes para ambos tiempos de fermentación, lo que pareciera indicar que a las 8 horas ya estaba en fase estacionaria. Para el medio CSTES dentro de los parámetros evaluados, la densidad óptica y la proteína producida son mayores a las 24

horas; sin embargo, el pH y la acidez se mantienen para ambos tiempos de fermentación.

Se genera más acidez en el medio CSTES para ambos tiempos; sin embargo se detecta casi el doble de proteína en medio MRS en ambos tiempos de fermentación. Los resultados indican que las dos condiciones de cultivo generan productos metabólicos distintos, lo que puede incidir en la naturaleza o el efecto bioconservador, e incluso el sinergismo, de la o las sustancias antibacterianas producidas por la cepa.

Con el fin de obtener más información con respecto a la naturaleza de la sustancia antibacteriana y al efecto que esas diferencias metabólicas pudieran ejercer, se llevó a cabo el estudio del espectro de inhibición de crecimiento, utilizando los sobrenadantes de los cultivos de *Pediococcus acidilactici* en MRS y CSTES a tiempos de 8 y 24 horas de fermentación para cada uno. Se realizaron pruebas cuantitativas en agar contra los microorganismos ya señalados en materiales y métodos, que corresponden a bacterias ácido lácticas relacionadas, bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas de interés en alimentos.

El efecto inhibitorio se evaluó al contabilizar la disminución de Log UFC/ml con respecto al control en el crecimiento de cada microorganismo.

En la tabla 8 se muestra el espectro inhibitorio de diferentes bacteriocinas y sustancias antimicrobianas contra diversos microorganismos de prueba (Naidu, 2000), con el fin de emplearla como referencia en el análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Efecto sobre bacterias ácido lácticas relacionadas.

Pediococcus pentosaceus y *Lactobacillus plantarum* no son afectados por ninguno de los sobrenadantes de los cultivos de *Pediococcus acidilactici* (MRS y CSTES: 8 y 24 horas c/u). Y no se presentan gráficas porque el resultado muestra que alcanzan el mismo crecimiento logarítmico que el control. Este resultado permite dudar que la naturaleza de la sustancia inhibitoria corresponda a una pediocina, en particular por la ausencia de efecto sobre *Pediococcus pentosaceus*, que es la cepa filogenéticamente mas cercana. Como ya se mencionó antes, el concepto de bacteriocina implica que existen propiedades antimicrobianas contra especies estrechamente relacionadas con la cepa productora (Sablon, et al., 2000).

Efecto sobre bacterias gram-positivas.

Efecto del sobrenadante MRS t8: la bacteria que presenta mayor susceptibilidad es *Listeria innocua*, pues tanto para el tratamiento T2 y T4 disminuye alrededor de 6 a 7 logaritmos; sin embargo el T3, que contiene medio nutritivo, le permite recuperarse en su totalidad al microorganismo. Lo mismo sucede con *Staphylococcus aureus*, pero disminuye alrededor de 3 logaritmos. En cambio *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* son afectados por el T2 y el T4 (cuando el sobrenadante se resuspende en el medio nutritivo) ya que la población se reduce alrededor de 6 logaritmos. Resulta paradójico que el sólo uso del medio nutritivo (T2) no le permite a ninguno de los dos enterococos alcanzar el nivel de la población control (T1) (gráfica 3).

Efecto del sobrenadante MRS t24: para el T3 *Listeria innocua* sigue creciendo en su totalidad, pero *Staphylococcus aureus* no. Sin embargo, a diferencia de MRS t8, son un poco más afectadas por el T2 y T4, incluyendo *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*. La respuesta para los tratamientos provenientes de los dos tiempos de cosecha es muy similar, lo que apoyaría la idea de que se produce una sola sustancia y que quizá algún componente del medio module ligeramente el resultado (gráfica 4).

Efecto del sobrenadante CSTES t8. los resultados obtenidos con este medio de cultivo son muy diferentes al caso anterior, ya que *Listeria innocua* presenta una fuerte inhibición por el T2, pero el T4 no le afecta en lo más mínimo, y lo curioso es que el T3 no le da oportunidad de crecer sino todo lo contrario, la población disminuye hasta 7 logaritmos. Con *Staphylococcus aureus* tampoco hay crecimiento en el T3, pero sí hay inhibición por el T4. Sin embargo, *Enterococcus faecalis* solo presenta respuesta de inhibición para el T2, crece excelentemente en el T3 y el T4 no le afecta. A pesar de la cercanía filogenética, el comportamiento de *Enterococcus faecium* es diferente, ya que en T4 se mantiene el nivel de la población control (T1) (gráfica 5).

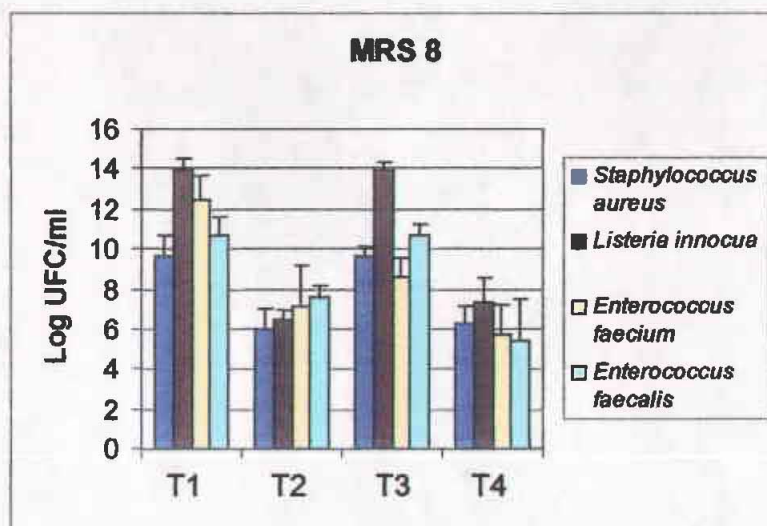
Efecto del sobrenadante CSTES t24: en este caso *Listeria innocua* no responde diferente ante los tratamientos empleados. Como en el caso anterior, ni *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* son afectados por el T4, pero *Enterococcus faecalis* también vuelve a crecer para el T3. El microorganismo más afectado es *Staphylococcus aureus* puesto que la población disminuye alrededor de 5 logaritmos (gráfica 6).

Con todo lo anterior se deduce la posibilidad de que se están produciendo sustancias distintas por parte de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, tanto en MRS como en CSTES. Asimismo, en el caso de CSTES la respuesta de algunos microorganismos difiere ante sobrenadantes provenientes de los dos tiempos de fermentación. Se puede afirmar que en este medio se producen sustancias distintas, porque el espectro de inhibición es muy diferente en ambos tiempos, a diferencia de lo que sucede en MRS, donde pareciera que a tiempos de 8 y 24 horas se sigue produciendo la misma sustancia, porque el espectro inhibitorio no muestra mayores cambios.

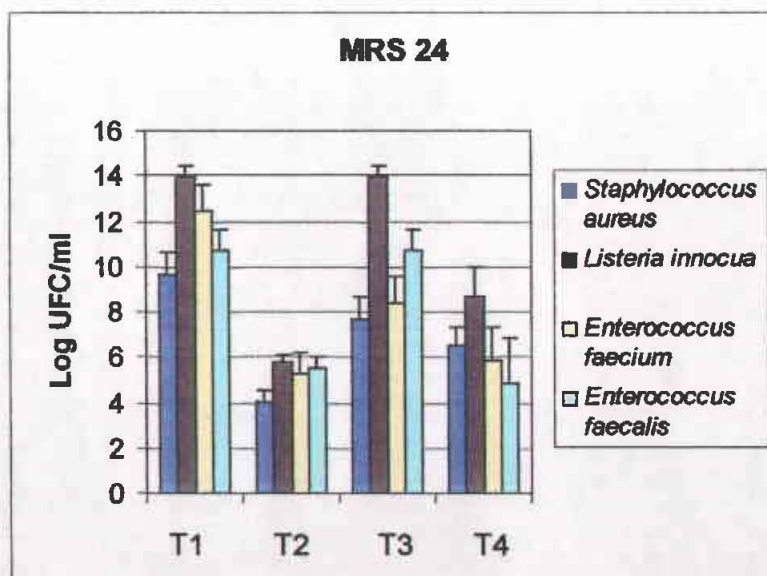
Microorganismo	LF	LP	LZ	NI	PE	RE	SA	AL, L	AS	AC
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	+			+	+		+	+	+	+
<i>Listeria innocua</i>					+		+			+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+			+	
<i>Lactobacillus plantarum</i>		+	+	+		+			+	
<i>Clostridium botulinum</i>			+	+	+			+		
<i>Clostridium perfringens</i>	+		+	+	+					
<i>Micrococcus luteus</i>	+			+					+	
<i>Streptococcus bovis</i>	+		+							
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>				+		+				
<i>Lactococcus cremoris</i>										
<i>Lactococcus lactis</i>					+					
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	+		+	+		+		+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+		+	+		+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+			+		+	+	
<i>Pediococcus acidilactici</i>					+					
<i>Pediococcus pentosaceus</i>				+	+				+	
<i>Pediococcus damnosus</i>				+						

Tabla 8. Espectro inhibitorio contra bacterias. LF= lactoferrina, LP=lactoperoxidasa, LZ=lisozima, NI=nisina, PE=pediocina, RE=reuterina, SA=sakacina, AL, L= ácido láctico y lactato, AS= ácido sórbico, AC= ácido cítrico (Naidu, 2000).

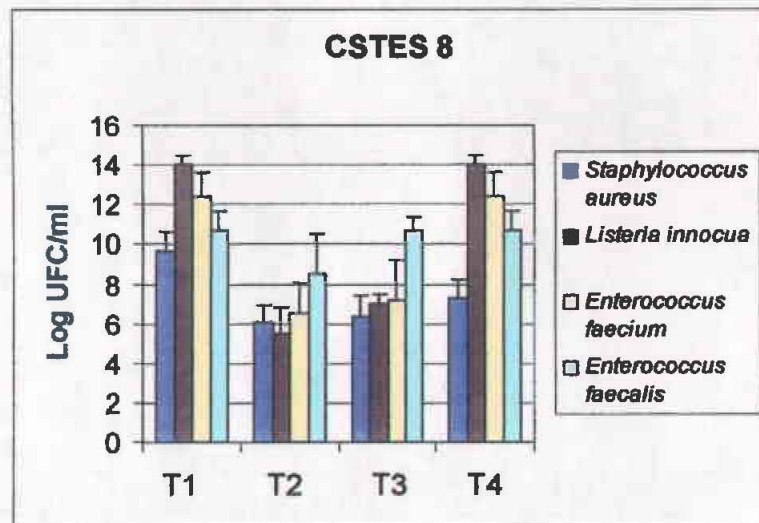
5.1 ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE SOBRENADANTES DE *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 EN BACTERIAS GRAM POSITIVAS.



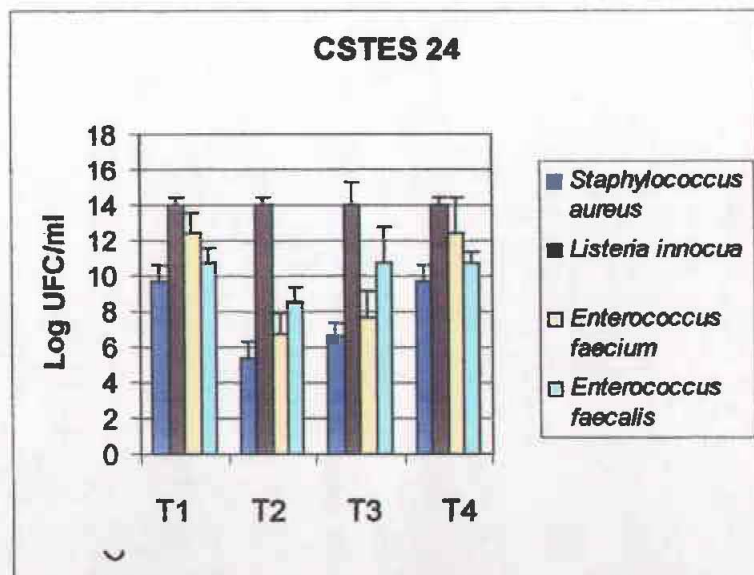
Gráfica 3. Espectro inhibitorio de crecimiento (log) a las 24 horas a 37° C, bajo diferentes tratamientos de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* del cultivo en MRS a las 8 horas.



Gráfica 4. Espectro inhibitorio de crecimiento (log) a las 24 horas a 37° C, bajo diferentes tratamientos de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* del cultivo en MRS a las 24 horas.



Gráfica 5. Espectro inhibitorio de crecimiento (log) a las 24 horas a 37° C, bajo diferentes tratamientos de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* del cultivo en CSTES a las 8 horas.



Gráfica 6. Espectro inhibitorio de crecimiento (log) a las 24 horas a 37° C, bajo diferentes tratamientos de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* del cultivo en CSTES a las 24 horas.

Efecto sobre bacterias gram-negativas.

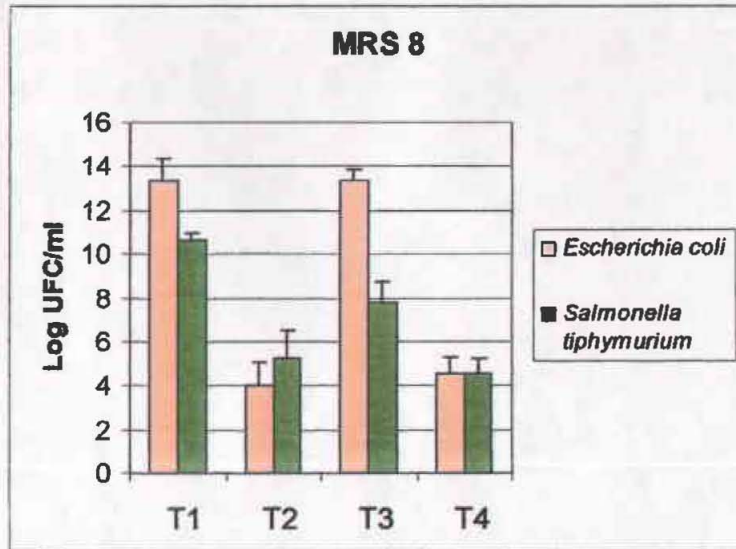
Efecto del sobrenadante MRS t8: tanto *Escherichia coli* como *Salmonella tiphyurium* presentan una fuerte inhibición en el T2y T4, donde disminuyen hasta más de la mitad de su crecimiento logarítmico. En cambio, en el T3 solo logra crecer en su totalidad *Escherichia coli* (gráfica 7).

Efecto del sobrenadante MRS t24: sucede lo mismo que en MRS t8 (gráfica 8).

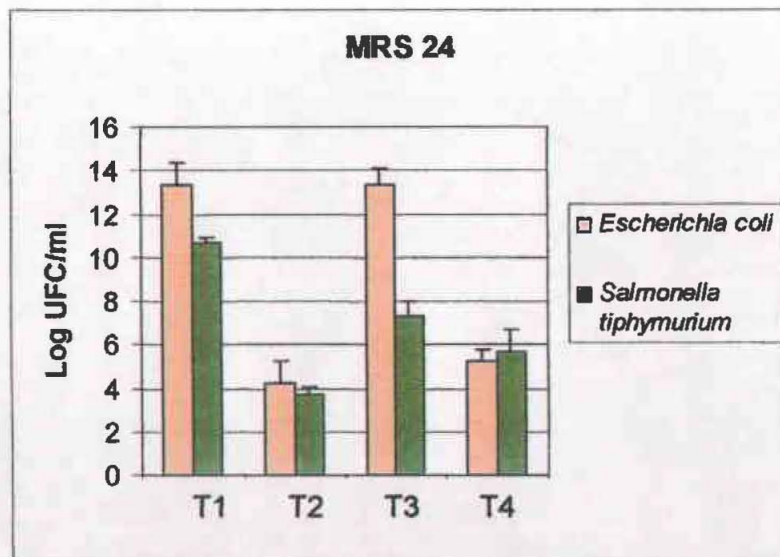
Efecto del sobrenadante CSTES t8: *Salmonella tiphyurium* y *Escherichia coli* se afectan en forma similar por el T2 y el T4, y a diferencia de MRS, estos dos microorganismos no pueden crecer en su totalidad en el T3; además, el efecto de inhibición es menor en este medio que en MRS (gráfica 9).

Efecto del sobrenadante CSTES t24: *Escherichia coli* solo presenta efecto inhibitorio para el T2 y *Salmonella tiphyurium* para el T2 y T3. Mientras que el T4 no afecta a ninguno de los dos (gráfica 10).

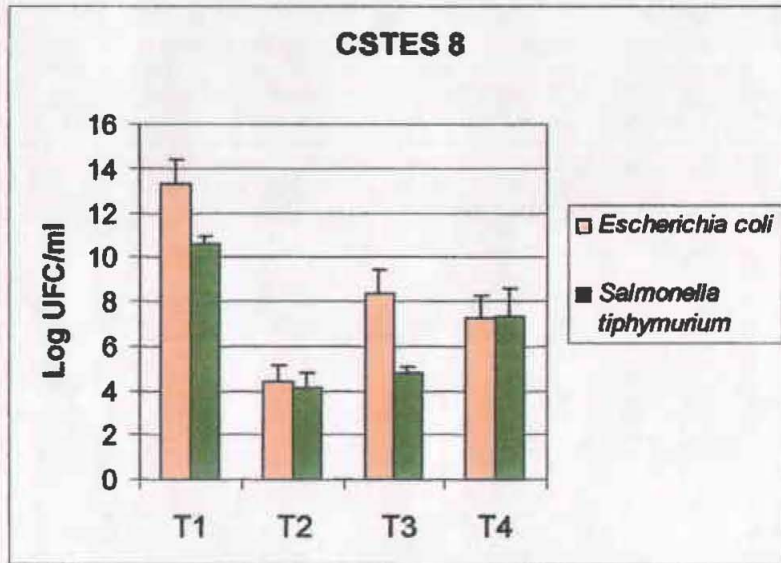
5.2 ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE SOBRENADANTES DE *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.



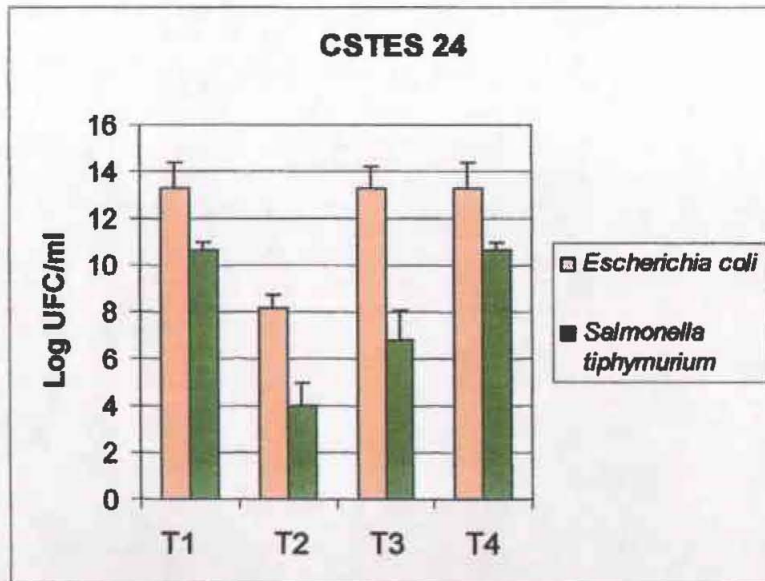
Gráfica 7. Espectro inhibitorio de crecimiento (log) a las 24 horas a 37° C, bajo diferentes tratamientos de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* del cultivo en MRS a las 8 horas.



Gráfica 8. Espectro inhibitorio de crecimiento (log) a las 24 horas a 37° C, bajo diferentes tratamientos de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* del cultivo en MRS a las 24 horas.



Gráfica 9. Espectro inhibitorio de crecimiento (log) a las 24 horas a 37° C, bajo diferentes tratamientos de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* del cultivo en CSTES a las 8 horas.



Gráfica 10. Espectro inhibitorio de crecimiento (log) a las 24 horas a 37° C, bajo diferentes tratamientos de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* del cultivo en CSTES a las 24 horas.

Las respuestas son similares a las presentadas en las bacterias gram-positivas, pues se presentan diferentes efectos de inhibición entre sobrenadantes provenientes de MRS y CSTES; el efecto de los cultivos provenientes de diferentes tiempos de cosecha en MRS es parecido y en ambos también *Escherichia coli* se recupera en su totalidad en el T2. En cambio en CSTES no es tan fuerte el efecto inhibitorio como en MRS, y de nuevo vuelve a surgir la idea de que entre CSTES t8 y CSTES t24 se puedan producir sustancias distintas, recordando que solo en CSTES t8 en el T2 es donde *Escherichia coli* no se puede recuperar, y por otro lado, este mismo microorganismo no lo afecta el T3 en el medio de CSTES t24.

Resumiendo lo relacionado a los efectos inhibitorios de las cepas de bacterias lácticas relacionadas con *Pediococcus acidilactici*, diversos autores han reportado que el espectro antimicrobiano de pediocinas incluye a:

1. *Pediococcus acidilactici*
2. *Staphylococcus aureus*
3. *Lactococcus lactis*
4. *Pediococcus pentosaceus*
5. *Lactobacillus* spp.
6. *Clostridium botulinum*
7. *Clostridium perfringens*
8. *Clostridium sporogenes*
9. *Clostridium tyrobutyricum*
10. *Bacillus cereus*
11. *Listeria innocua*
12. *Listeria monocytogenes*

(Hoover et al., 1989)

En relación con los resultados obtenidos en esta tesis, se puede señalar que *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 muestra el mismo espectro antimicrobiano, contra *Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua* que el obtenido por otros

autores (lista anterior, Hoover et al., 1989); esto parecería indicar que se trata de una pediocina, sin embargo el hecho de que no presente espectro antimicrobiano contra *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus* spp., que son las cepas más cercanas, descarta la posibilidad de una pediocina (Sablon, et al., 2000).

Por otro lado Bhunia et al. (1981) observó inhibición de crecimiento contra varias especies y cepas de: bacterias Gram positivas: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*; y bacterias gram (-): *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas* sp. Entonces se vuelve a apoyar la idea de que *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 produce otra sustancia que no es pediocina, puesto que inhibe el crecimiento de *Enterococcus* para bacterias Gram positivas, pero no a *Pediococcus* y *Lactobacillus*; y a bacterias Gram negativas como *Salmonella* y *Escherichiacoli*.

También se descarta la idea de que sea una pediocina porque el plásmido asociado a pediocinas es más pequeño que el reportado, siendo de un peso molecular de 2,700 KDa (73 Kb), que no había sido reportado con anterioridad para otras cepas de *Pediococcus acidilactici* (Llorente, 2003. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería).

Sin embargo, se sabe que algunas cepas de *Pediococcus acidilactici* tienen enzimas proteolíticas como las proteasas, dipeptidasas, aminopeptidasas dipeptidil y aminopeptidasas (Raccach, 1999), y esto representa otra

posibilidad sobre la naturaleza de la (s) sustancia (s) producidas por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Entre las posibles sustancias que ejercen efectos antimicrobianos están las lisozimas, las cuales son también producidas por microorganismos, aunque no sea la fuente más abundante de esta enzima, que comercialmente se produce a partir de la clara de huevo. Las lisozimas son enzimas que lisan la pared celular de bacterias Gram-positivas (Naidu, 2000), teniendo un mecanismo de defensa natural endógeno para muchos alimentos, siendo así específico de pared celular bacteriana. Las bacterias Gram-positivas son muy susceptibles porque su pared celular es cerca del 90% de peptidoglicano. El efecto antimicrobiano de las lisozimas se ejerce principalmente contra la mayoría de las especies de las familias Micrococcaceae, Lactobacillaceae, Streptococcaceae, Leuconostoc, *Pediococcus*, Bifidobacterium, Bacillaceae, y Clostridium de las bacterias gram-positivas; sin embargo, sobre las bacterias gram-negativas, también actúa, aunque la pared de éstas sólo contenga de un 5 a un 10% de peptidoglucano, las principales familias afectadas son: Enterobacteriaceae y Pseudomonadiaceae (Naidu, 2000).

Aunque la sustancia antimicrobiana que produce *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, muestra efecto negativo contra cepas pertenecientes a las familias Enterobacteriaceae, no afecta a las especies pertenecientes a la familia Lactobacillaceae y *Pediococcus*. Esto sugeriría descartar la posibilidad de que se trate de una lisozima convencional, pero se debe señalar que no están bien caracterizadas enzimas líticas de bacterias lácticas que tienen un efecto

importante en la autólisis, por lo que podría ser una de ellas o semejante (Mora, 2003). Es importante señalar que la enzima lítica que ejerce el efecto antibacteriano es extracelular, lo que no está reportado.

Sobresale el hecho de que las bacterias Gram-negativas presentan un mayor efecto negativo que las bacterias Gram-positivas, considerándose la principal razón la composición de su pared celular. Dentro de las bacterias gram-negativas el microorganismo más afectado es *Salmonella typhimurium*, y dentro de las bacterias gram-positivas es *Staphylococcus aureus*.

De igual modo, la importancia del medio de cultivo para *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 ofrece la posibilidad de obtener la producción de sustancias distintas, enfatizando sobre todo, que el azúcar disponible en ambos medios de cultivo, al estar presente en iguales cantidades, no influye en la producción de diferentes sustancias, sino que se involucraría más la fuente de nitrógeno y los minerales, recordando que son mayores en MRS que en CSTES. Y esto es lo que podría permitir un espectro antimicrobiano distinto, incluyendo los tiempos metabólicos.

Los sobrenadantes que causaron un más amplio espectro antimicrobiano son los de MRS. De antemano no se sabe si influye el hecho de que MRS t24 y MRS t8 hayan producido mayor cantidad de proteína, casi el doble de lo que produjo CSTES, siendo la densidad óptica relativamente parecida. Por otro lado la acidez total producida por MRS y CSTES fue prácticamente la misma, al igual que el pH obtenido en todos los tiempos de fermentación de ambos

medios. Lo más interesante es el espectro que se presenta entre CSTES t8 y CSTES t24, donde pareciera que se producen sustancias diferentes al actuar como antimicrobianos distintos.

Finalmente, pareciera haber en MRS t8 y t24 un efecto bacteriostático tanto para bacterias gram-positivas y gram-negativas, porque hay recuperación del microorganismo. Mientras que en CSTES t8 parece haber un efecto bactericida, porque hay una recuperación muy baja, lo que no ocurre en CSTES t24

Por último, hay que resaltar que la actividad antimicrobiana que presentan los sobrenadantes de los cultivos de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 son neutralizados, por lo que no es atribuible el ácido láctico u otros ácidos orgánicos.

6.0 CONCLUSIONES

1. Sí existe un efecto antimicrobiano de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, con un perfil distinto para cada uno de los sobrenadantes de los cultivos en MRS y CSTES a los tiempos de 8 y 24 horas.
2. Los sobrenadantes de los cultivos de MRS presentan un más amplio espectro que CSTES, pues la inhibición del crecimiento de los microorganismos a prueba es mayor a 2 logaritmos referente al control. En MRS t8 y t24 parece haber un efecto bacteriostático tanto para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, porque hay recuperación del microorganismo. Mientras que en CSTES t8 parece haber un efecto bactericida, porque hay un crecimiento muy bajo; sin embargo, en CSTES t24 es todo lo contrario.
3. *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 pareciera producir sustancias distintas en los medios de cultivos de MRS y CSTES a diferentes tiempos de fermentación, considerando que MRS tiene mayor contenido de nitrógeno y minerales.
4. Posiblemente la (s) sustancia (s) que produce *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 no se encuentren las pediocinas porque no hay un efecto antimicrobiano contra *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus plantarum* por ninguno de los sobrenadantes.
5. Las cepas más afectadas son las que pertenecen al grupo de las bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli* y *Salmonella tiphymurium* por el sobrenadante de MRS, tanto a las 8 como a las 24 horas.
6. Dentro del grupo de las bacterias Gram-positivas las especies más afectadas son *Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua*, de igual manera por el sobrenadante de MRS, tanto a las 8 como a las 24 horas.

7.0 BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. R. y Hall, C. J. 1988. Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science and Technology*, 23 (3), 287-92.
- Austin, B. 1992. Taxonomía Bacteriana Moderna. Edit. Limusa. Grupo Noriega. pp. 13-29, 143-161.
- Bacus, J. N. y Brown, W. L. 1981. Use of microbial cultures: meats products. *Food Technol.*, 35(1): 71-78.
- Ballows, A., et al. 1991. Manual of Clinical Microbiology. Capítulo 7. 5º ed. American Society for Microbiology. Washington D.C. U.S.A.
- Banwart J.G. 1982. Microbiología básica de los alimentos. Ediciones Bellaterra, S.A. España. pp. 33-104.
- Bello, H. H. y Durán, B. I. 1992. Aplicación de *Pediococcus acidilactici* en la elaboración de un embutido tipo salami. Tesis. Ingeniería en Alimentos. F.E.S.C. U.N.A.M., México.
- Bhunia, A. K., et al. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*; *J. Appl. Bacteriol.*, 65: 261-268.
- Bourgeois, C.M., J. P. Larpent. 1989. Microbiología alimentaria. Vol. II. Fermentaciones alimentarias. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Brent, R., et al. Short Protocols in Molecular Biology. 4º ed.
- Clinical Microbiology Procedures. Hand Book. Vol. I; Ed. Inerberg H. D. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- Eklund, T. 1989. Organic acids and esters. In Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures. , ed. G.W. Gould. *Elseiver Scientific Publishers*. London, U.K., pp 161-200.
- Farías, M.E. 1996. Estudios bioquímicos y genéticos de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. Tesis doctoral. Univ. Nacional de Tucumán.
- Fleet, H. G. 1999. Microorganisms in food ecosystems. *Internacional Journal of Food Microbiology*. 50: 101-117.
- Frazier, W. C. 1993. Microbiología de los Alimentos. 4º ed. Edit. Acribia, S. A. España. 681 p.

- Freese, E., et al., 1973. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241, 321-5.
- Gibson, G. R. y Robertfroid, B. M. 1997. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* Bethesda, v. 125, n. 6, p. 1401-1412.
- Gilmore, S. M., et al. 2002. The Enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance. ASM Press, Washington D. C. pp. 1-11, 24-33.
- González-Martínez, B. E., et al. 2003. Bacteriocinas de Probióticos. Facultad de Salud Pública y Nutrición, y Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de Nuevo León.
- González, C. F. y Kunka, B. 1987. Plasmad-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(10):2534-2538.
- Green, G., et al. 1997. Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. *Journal of Applied Microbiology*. 83: 127-132.
- Hernández, P., et al. 2005. La construcción de quimeras génicas del gen estructural de la enterocina A (enta) al péptido señal de la enterocina P (entp), permiten la clonación y producción funcional de la "enta" en cepas de *Lactococcus lactis* de origen lácteo. Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Madrid. NUTRICIÓN HOSPITALARIA. Vol. XX • Suplemento 1 • 2005.
- Holt, J. 1984. Bergey's. Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I.
- Hoover, D. G. y L. R. Steenson. 1993. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Edit. Academia Press, INC. 275 p.
- Hoover, D. G., et al. 1989. Antagonistic effect of *Pediococcus* spp. Against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnol.*, 3:183.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1996. Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos. Edit. Acribia, S. A. Zaragoza, España. 410 p.
- Krasner, I. R. 2002. The microbial challenge. Human-Microbe Interactions. Edit. ASM Press, Washington, D. C. 433 p.
- Leistner, L. 1994. Further developments in the utilization of hurdle technology for food preservation. *J. Food eng.* 22: 421-432.

- Llorente, B. A. 1998. Evaluación de la producción de bacteriocinas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis de Maestría en Microbiología. FESC. UNAM. 92 p.
- Llorente, B. A. 2003. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco.
- Loessner, M., et al. 2003. A Pediocin-Producing *Lactobacillus plantarum* Strain Inhibits *Listeria monocytogenes* in a Multispecies Cheese Surface Microbial Ripening Consortium. *Applied and Environmental Microbiology*. p.1854-1857.
- Lozano, J.A., et al. 2000. Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud. 2º ed. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. 522 p.
- Lücke, F. E. y Hechelmann, H. 1986. Starter cultures for dry sausages and raw ham. Composition and effects. *Fleischwirtsch.* V. 67, p. 307-314.
- Marshall, H. S. y G. Arenas. 2003. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6(2): 1-14.
- Martínez, R. E. y J. C. Martínez R. 2005. Microbios. Centro de Investigación de Fijación de Nitrógeno (CIFN) UNAM. <http://biblioweb.dgsc.unam.mx/libros/microbios/index.html>
- Mateos, J. A. 2002. Aspectos básicos de la tecnología de las leches fermentadas. En alimentos funcionales. Probióticos. Edit. Médica Panamericana. Capítulo 6.
- Merchant, E. M., et al. 2003. Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 136: 505-513.
- MERCK, 1994. Manual de medios de cultivo. Darmstadt, Alemania. 364 p.
- Mora, D., et al. 2003. Autolytic activity and pediocin – induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strain. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 561-570.
- Motlagh, A. M., et. al. 1991. Viability loss of food borne pathogens by starter culture metabolites. *J. Food Prot.*, 54(11):873-884.
- Muñoz, R. J. 2004. 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. 20 p.

- Muriana, P.M. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *J. Food Protection*, suppl.: 54-63.
- Naidu, A. S. 2000. Natural Food Antimicrobial Systems. CRC Press. New York, Washington D. C. 818 p.
- Nuñez, A. G., et al. Efectividad y modo de acción de nisina sobre *Lactobacillus fructivorans*. Cátedra Microbiología de Alimentos - Facultad de Agroindustrias - UNNE.
- Palao, M., et al. 1998. Técnicas Microbiológicas de Aplicación en el Control de Calidad de Alimentos. Departamento de Biología. Facultad de Química. UNAM. 209 p.
- Parés, Ramón y Antonio Juárez. 1997. Bioquímica de los microorganismos. 1º ed. Editorial Reverté, S. A. 380 p.
- Raccach, M. 1999. Pediococcus. Food Science Program, School of Agribusiness and Resource Management. Arizona State University. East Arizona, U.S.A.
<http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/PEDIOCOCCUS.doc>
- Reynolds, A. E. 1975. The mode of action of acetic acid on bacteria. Dissertation Abstracts B, 35, 4935-6.
- Rivera, Q. J. 2004. Evaluación del efecto de bioconservación en salamis al adicionar *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como cultivo iniciador. Tesis de Maestría en Microbiología. FESC. UNAM. 96 p.
- Robinson, R. K. 1987. Microbiología Lactológica. Vol. I. Microbiología de la Leche. Edit. Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 37-57.
- Rodicio M. R. y M. C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 22(4):238-45.
- Rodríguez, J. M., et al. 2002. Pediocin PA-1, a Wide- Spectrum Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 42(2): 91-121.
- Saavedra, J. M. 1995. Microbes to fight microbes: a not so novel approach to controlling diarrheal disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 21(2): 125-129.
- Sablon, E., et al. 2000. In Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology.

- Schrezenmeir, J. y M. Vrese. 2001. Probiotics, prebiotics, and symbiotic-approaching a definition. *Am J Clin. Nut.* 73 (suppl) 361-364.
- Simpson, P. J., et al. 2002. Genomic Diversity within the Genus *Pediococcus* as Revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology.* 68(2):765-771.
- Skyttá, E., et al. 1993. Production and characterization of antibacterial compound produced by *Pediococcus damnosus* and *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Applied Microbiology.* 74:134-142.
- Stuart, W. T. 2000. Microbiología. 1º ed. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. 532 p.
- Tay, Z. J., et al. 2003. Microbiología y Parasitología Médicas. 3º ed. Editores Méndez. México, D.F. 843 p.
- Vandamme, E. J. y L. De Vuyst. 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology, Genetics and Applications.* Blackie Academic and Professional. pp. 1-9, 92-107.
- Wachter, C. 2002. Curso-Microbiología de Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- Walker, Stuart T. 2000. Microbiología. 1º ed. Editorial MacGraw-Hill Interamericana. 532 p.
- Wood, B. J. 1992. The Lactic Acid Bacteria. Vol I. The lactic acid bacteria in health y disease. 5º ed. Edit. Blackie Academic and Professional. pp. 211-232.
- Wood, B. J. y W. H. Holzapfel. 1995. The genera of lactic acid bacteria. Vol. II. Edit. Blackie Academic and Professional. pp. 1-7, 123-163, 325-343.