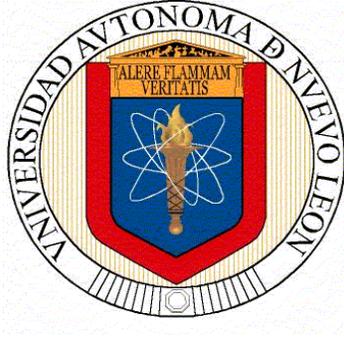


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL MEDIO
CONDICIONADO CON *Lactobacillus sp.* QUE PRESENTA
ACTIVIDAD DE INTERFERENCIA MICROBIANA SOBRE
Entamoeba histolytica HM1-IMSS”**

PRESENTADA POR:

CARLOS ALBERTO MIRELES RANGEL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

AGOSTO 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL MEDIO CONDICIONADO CON
Lactobacillus sp. QUE PRESENTA ACTIVIDAD DE INTERFERENCIA
MICROBIANA SOBRE *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.**

POR

Q.B.P. CARLOS ALBERTO MIRELES RANGEL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

Agosto, 2018

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL MEDIO CONDICIONADO CON
Lactobacillus sp. QUE PRESENTA ACTIVIDAD DE INTERFERENCIA
MICROBIANA**

COMISIÓN DE TESIS

**DRA. MARÍA PORFIRIA BARRÓN GONZÁLEZ
PRESIDENTE**

**DR. EDUARDO SÁNCHEZ GARCÍA
SECRETARIO**

**DR. JOSÉ SANTOS GARCÍA ALVARADO
VOCAL 1**

**M.C. JUAN ANTONIO RODRÍGUEZ ARZAVE
VOCAL 2**

**DR. RAMÓN GERARDO RODRÍGUEZ GARZA
VOCAL 3**

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL MEDIO CONDICIONADO CON
***Lactobacillus sp.* QUE PRESENTA ACTIVIDAD DE INTERFERENCIA**
MICROBIANA

COMISIÓN DE TESIS

DRA. MARÍA PORFIRIA BARRÓN GONZÁLEZ
PRESIDENTE

ÁREA DE TRABAJO

Éste trabajo se desarrolló en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el Laboratorios de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética, en la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento (LGAC) de Biología Celular del Cuerpo Académico Consolidado de Biología Celular y Genética.

ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS	I
LISTA DE TABLAS	II
LISTA DE FIGURAS	III
NOMENCLATURA	V
1. RESUMEN	VI
2. INTRODUCCIÓN	1
3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	3
4. HIPÓTESIS	4
5. OBJETIVO GENERAL	4
5.1 Objetivos particulares	5
6 ANTECEDENTES	6
6.1 Generalidades de <i>Entamoeba histolytica</i> y amibiasis	6
6.1.1 Ciclo de vida	7
6.1.2 Tratamiento para la amibiasis	12
6.2 Probióticos	13
6.2.1 Bacterias ácido lácticas	16
6.2.2 Bacteriocinas	20
6.2.3 Antagonismo microbiano	36

7. MATERIAL Y METODOLOGÍA	41
7.1 Material biológico	41
7.2. Preparación de soluciones	41
7.3. Métodos de trabajo para <i>Entamoeba histolytica</i>	44
7.4. Métodos de trabajo para <i>Lactobacillus sp</i>	46
7.5. Bioensayos	47
7.6 Diseño estadístico	48
7.7. Proteínas de MCL	48
7.8. Ácidos grasos de MCL	53
7.9. Bioensayos	53
8. RESULTADOS	56
8.1. Probióticos	56
8.2. Cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i>	69
8.3. Actividad biológica del MCL sobre <i>E. histolytica</i>	70
8.4. Pruebas Bioquímicas de los Medios Condicionados (MC)	79
8.5. Proteínas de los Medios Condicionados	81
8.6. Electroforesis del Medio condicionado de <i>L. acidophilus</i>	86
8.7. Análisis Bromatológicos de los Medios condicionados	88
9. DISCUSIÓN	95
10. CONCLUSIÓN	112
11. PERSPECTIVAS	113
12. BIBLIOGRAFIA	114
13. RESUMEN BIOGRÁFICO	140

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios, bajo el convenio de UANL-CONACYT, con el No de registro 350933.

Así mismo Agradezco a la **Dra. Diana Reséndez Pérez, Dr. Pablo Zapata Benavides** y al Comité Académico de Maestría y al personal de Posgrado por el apoyo brindado siempre para llevar a buen término éste proyecto.

A mi padre **Dios**, por abrazarme con su amor y disfrutar del regalo más importante, la vida y a la vez, permitirme llegar a este momento especial en mi plano profesional.

A mis padres: **Sr. Juan Manuel Mireles Herrera y Sra. María Ventura Rangel Rivera**, por que gracias a sus consejos, apoyo, comprensión, y esfuerzo, permitieron que logre alcanzar una meta y que siga cosechando triunfos y éxitos profesionales.

Mis hermanos, **Juan José y Perla Ivonne**, quienes han depositado su confianza en mí, por tenerme paciencia, amarme, comprenderme y sobre todo por haberme ayudado a seguir adelante.

A mis sobrinos, **Jaime Jair Mireles Mendoza, Juan Miguel y Eduardo Manuel Juárez Mireles**, quienes han dado luz, alegría, desvelo, preocupación a cada uno de mis días, desde que han formado parte de mi familia.

Al chaparro, **Abraham Marcelino Rivera Vargas**, que me ha apoyado, aconsejado, y animado en los momentos que he perdido la confianza en mí y ha sabido utilizar las palabras adecuadas para alentarme a seguir adelante. Además, le agradezco por tener paciencia, por su amistad, sabiduría y sobre todo por confiar en mí.

A mi abuelito **Jesús Mireles Muños**, que me bendice desde el cielo y por darme su amor incondicional.

A mis abuelitas **Vicenta Barbosa Herrera**, que se ha preocupado día de mi bienestar y darme su amor incondicional. **María de Jesús Rivera Salas**, quien me ama y nunca ha juzgado cada una de mis acciones. Las amo, que Dios me las conserve muchos años más.

A la **Dra. Maria Porfiria Barron Gonzalez**, Al Teacher **M.C. Juan Antonio Rodríguez Arzave, Dra. Pola Becerril Montes**, por depositar en mí su confianza, su apoyo y brindarme su sabiduría sin importar nada, pero sobre todo por su paciencia y amistad. Por ser piezas claves en el desarrollo de este trabajo de investigación, pues gracias a su insistencia y exigirme cada día a dar más de mí, porque me han forjado a ser un profesionista excelente y de gran calidad. Les agradezco por permitirme trabajar a su lado y aprender de ustedes.

Al **Dr. Ramón G. Rodríguez Garza** por el apoyo brindado siempre durante el desarrollo de éste proyecto,

y al **Dr. José Santos García Alvarado** por el apoyo siempre brindado y el gran ejemplo que me brinda como profesionista y gran ser humano, y al **Dr. Eduardo Sánchez García** por aceptar formar parte de mi Comité de Tesis y el apoyo a la misma.

A **Diana Elizabeth Moreno Garza**, mi alumna y posteriormente mi amiga. A Ella quiero agradecer por su tiempo, paciencia, confianza, amistad, cariño, dedicación, apoyo, consejos, no tengo las palabras adecuadas para expresar la entrega y dedicación que mi "Hermosa" me ha brindado para culminar este trabajo de investigación. Quiero agradecerle por hacerme esas mañanas, tardes, noches e inclusive madrugadas largas y cansadas, divertidas, porque tus platicas y chistes eran interminables. Hermosa, sabes todo lo que hemos vivido juntos, todo lo que pasamos para realizar esta tesis, y que sinceramente te expreso, **NO TENGO CON QUE PAGARTE**, pues gran parte de este trabajo, fue realizado por ti. Y ahora te digo, tienes muchas habilidades y destrezas para desarrollarte en un laboratorio. Recuerda, que nadie debe apagar la llama de esa mujer sabia, alegre, entusiasta, proactiva, emprendedora, independiente, soñadora, en un solo contexto, una mujer ideal y perfecta para mí, porque ese día que se apague, dejarás de ser la dama que yo conocí.

A la **M.C. Martha Sofía Rodríguez**, por ser colega, compañera, amiga, por confiar en mí y por apoyarme y ayudarme a la culminación de una meta más trazada en mi vida.

Con todo mi cariño, para cada uno de ellos.

"Nunca olvides que basta una persona o una idea para cambiar tu vida para siempre, ya sea para bien o para mal"

Brown, J:

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Incidencia de amibiasis intestinal en México 2005-2007.....	6
2	Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular obtenidos a partir de bacterias ácido lácticas.....	19
3	Microorganismos productores de bacteriocinas	21
4	Clasificación de bacteriocinas propuesta.....	26
5	Composición del gel de poliacrilamida (12%).....	44
6	Relación de análisis realizados al MCL.....	55
7	Probióticos y fuente de carbono seleccionada.....	69
8	Concentración de resultados de la interferencia amibiana de los MC con <i>Lactobacillus sp</i> y la fuente óptima de carbono.....	74
9	Pruebas Bioquímicas de los Medios Condicionados.....	79
10	Contenido de proteínas presentes por cada 200 mL de medio condicionado.....	82
11	Pruebas bioquímicas de los precipitados y sobrenadantes de los MC de las BAL.....	83
12	Análisis Físicoquímicos de los Medios Condicionados.....	88
13	Análisis físicoquímico de acidez del MC de <i>L. acidophilus</i>	89
14	Contenido de proteínas por el Método de Bradford.....	89
15	Compendio de resultados del análisis a los MCL con actividad de interferencia amibiana <i>Lactobacillus casei</i>	91
16	Compendio de resultados del análisis a los MCL con actividad de interferencia amibiana <i>Lactobacillus plantarum</i>	92
17	Compendio de resultados del análisis a los MCL con actividad de interferencia amibiana <i>Lactobacillus acidophilus</i>	93
18	Compendio de resultados del análisis a los MCL con actividad de interferencia amibiana <i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>	94

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Morfología del trofozoíto de <i>E. histolytica</i>	8
2	Morfología del quiste de <i>E. histolytica</i>	9
3	Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	10
4	Estructura del metronidazol.....	13
5	Distribución de la microflora intestinal en el sistema digestivo.....	14
6	Tasa de variación y crecimiento de microorganismos de la flora intestinal en función de la edad del hospedero.....	15
7	Acción benéfica producida por los probióticos en el intestino delgado, en presencia de microorganismos patógenos.....	16
8	Rutas de fermentación de azúcares por bacterias ácido lácticas.....	17
9	Diferentes representaciones de la estructura secundaria tipo hélice alfa.....	29
10	Estructura secundaria tipo β -tira plegada antiparalela.....	30
11	Esquema de la formación de poros mediante diferentes mecanismos de acción propuestos para los péptidos antimicrobianos.....	35
12	Cámara de Neubauer.....	45
13	Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i>	57
14	Comparación de las absorbancias de <i>L. casei</i> a las 9 horas de incubación de las 4 fuentes de carbono.....	58
15	Comparación de la absorbancia observada en el cultivo de <i>L. casei</i> en presencia de sacarosa y glucosa al 2%.....	59
16	Cinética de crecimiento de <i>L. plantarum</i>	60
17	Comparación de las absorbancias de <i>L. plantarum</i> a las 9 horas de incubación, de las 4 fuentes de carbono.....	61
18	Comparación de la absorbancia observada en el cultivo de <i>L. plantarum</i> en presencia de lactosa 0.1% y glucosa al 2%.....	62
19	Cinética de crecimiento de <i>L. acidophilus</i>	63

20	Comparación de las absorbancias de <i>L. acidophilus</i> a las 9 horas de incubación, de las 4 fuentes de carbono.....	64
21	Comparación de la absorbancia observada en el cultivo de <i>L. acidophilus</i> en presencia de sacarosa 0.5, 1.0, 2.0 y glucosa al 2%.....	65
22	Cinética de crecimiento de <i>L. casei rhamnosus</i>	66
23	Comparación de la absorbancia observada en el cultivo de <i>L. casei rhamnosus</i> en presencia de sacarosa 0.5, 1.0, 2.0 % y glucosa 2.0%.....	67
24	Comparación de la absorbancia observada en el cultivo de <i>L. casei rhamnosus</i> en presencia de sacarosa 1.0% y glucosa al 2%.....	68
25	Cinética de crecimiento de <i>Entamoeba histolytica</i>	70
26	Actividad biológica del Medio condicionado sobre el crecimiento axénico in vitro de <i>E. histolytica</i>	72
27	Porcentaje de inhibición del MC Lc sobre el crecimiento axénico in vitro de <i>E. histolytica</i>	73
28	Porcentaje de inhibición del MC de Lp sobre el crecimiento axénico in vitro de <i>E. histolytica</i>	75
29	Porcentaje de inhibición del MC La sobre el crecimiento axénico in vitro de <i>E. histolytica</i>	76
30	Porcentaje de inhibición del MC Lcr sobre el crecimiento axénico in vitro de <i>E. histolytica</i>	77
31	Porcentaje de inhibición de los MC a dosis de 0.1 y 1.0% de las BAL sobre el crecimiento axénico in vitro de <i>E. histolytica</i> ($p \leq 0.5$).....	78
32	Inhibición porcentual del crecimiento de <i>E. histolytica</i> por acción del MC La sometido a calentamiento a 80°C.....	81
33	Comparación del rendimiento (g) de proteínas entre los medios condicionados de <i>Lactobacillus sp</i>	82
34	Porcentaje de inhibición con proteínas purificada a dosis de 7%.....	84
35	Electroforesis de proteínas de <i>L. acidophilus</i> en gel de poliacrilamida [12%].....	87
36	Electroforesis de proteínas de <i>L. acidophilus</i> en gel de poliacrilamida [08%].....	87
37	Porcentaje de acidez de acuerdo a la AOAC	90

NOMENCLATURA

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CFA	Citrato férrico de amonio
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
EHEC	<i>Escherichi coli</i> enterohemorrágica
EMA	Entidad Mexicana de Acreditación
FAO	Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas
GRAS	Generally Recognized As safe
h.p.g.	Promedio de huevos por gramo de heces
IA	Interferencia amibiana
IM	Interferencia microbiana
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>L. casei rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Lb.	<i>Lactobacillus</i>
Lcr	<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>
LH	Leucemia humana
MC	Medio condicionado
MCL	Medio condicionado con <i>Lactobacillus sp.</i>
MCL	Medio condicionado de <i>Lactobacillus</i>
MCLa	Medio condicionado <i>Lactobacillus acidophilus</i>
MCLc	Medio condicionado <i>Lactobacillus casei</i>
MCLcr	Medio condicionado <i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>
MCLp	Medio condicionado <i>Lactobacillus plantarum</i>
MO	Microorganismos
N	Concentración Normal
OMS	Organización Mundial de la Salud
PMF	Fuerza proton motriz
PSA	Persulfato de Amonio
SDS	Dodecilsulfato de sodio
spp	Especie
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNESCO	Organización de las naciones unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura

1 . R E S U M E N

La amibiasis es ocasionada por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica*; esta enfermedad representa un problema de salud en México y en países en desarrollo. Para el tratamiento de la amibiasis la droga de elección es el metronidazol, sin embargo, ésta provoca diversos efectos secundarios indeseables en el paciente y se ha reportado la resistencia de *E. histolytica* a esta droga. Recientemente la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) han recomendado la búsqueda de terapias de interferencia microbiana empleando microorganismos probióticos. Este trabajo se suma a las nuevas investigaciones en la búsqueda de terapias de interferencia microbiana a partir de bacterias lácticas. En esta investigación se determinó la fuente de carbono que proporcionó el mejor rendimiento celular de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus casei rhamnosus* para obtener los medios condicionados (MC) con cada una de las bacterias probióticas y se comparó la actividad de interferencia microbiana (IM) que exhibió cada medio condicionado sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*; y en función del potencial amebicida se procedió a la caracterización bioquímica parcial de los metabolitos presentes en el medio condicionado. *Lactobacillus acidophilus* (La) demostró una interferencia microbiana (IM) del 96.49% sobre el crecimiento de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. Así como, la obtención del peso molecular de la proteína de 71 KDaltones (KDa). Estudios anteriores han demostrado que las proteínas (bacteriocinas) son las responsables de la interferencia microbiana. En el medio condicionado (MC) de La, existe la presencia de grasas y ácido láctico, que pueden estar actuando sobre el crecimiento de *E. histolytica*.

A B S T R A C T

Amoebiasis caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*; this disease is a health problem in Mexico and in developing countries. For the treatment of amoebiasis the drug of choice is metronidazole, however, it causes various undesirable side effects in the patient and is reported *E. histolytica* resistance to this drug. Recently the WHO and the Food and Agriculture Organization of the United Nations have recommended the search for therapies for microbial interference by probiotic microorganisms. This work adds to new research in the search for therapies for microbial interference from lactic acid bacteria. In this investigation the carbon source that provided the best cell performance *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus casei rhamnosus* for the conditioned media (CM) with each of the probiotic bacteria and interference activity was determined compared microbial (IM) that exhibited each conditioned medium on the growth in vitro axenic *Entamoeba histolytica*; and depending on the potential ameobicide it proceeded to partial biochemical characterization of the metabolites present in the conditioned medium. *Lactobacillus acidophilus* (La) showed a microbial interference (IM) of 96.49% on the growth of *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. And, obtaining the molecular weight of the protein KDaltones 71 (kDa). Previous studies have shown that proteins (bacteriocins) are responsible for the microbial interference. In the conditioned medium (CM) of *L. acidophilus*, there is the presence of fat and lactic acid, which may be acting on the growth of *E. histolytica*.

2. INTRODUCCIÓN

Se estima que el 10% de la población mundial está infectada por *E. histolytica*, lo que representa aproximadamente 50 millones de casos de amibiasis invasora y hasta 100,000 muertes por año, colocando a la amibiasis en el tercer lugar después de la malaria y la esquistosomiasis en mortalidad por parásitos protozoarios. En países con economía emergente, el 50% de la población está infectada por *E. histolytica*, esta enfermedad ataca al ser humano en cualquier edad, siendo más frecuente en niños y adultos jóvenes (OMS 1997). En México la amibiasis es un problema de salud pública que ocupa el tercer lugar dentro de las enfermedades infecciosas parasitarias en niños y adolescentes. En el año 2007 se reportaron 574,834 casos en la población de niños recién nacidos hasta los 19 años de edad (Villanueva y Herbas 2009).

E. histolytica existe en dos formas evolutivas: el trofozoíto y el quiste. Los trofozoítos exhiben un tamaño de 20-40 μm de diámetro, son muy dinámicos, presentan seudópodos, gran cantidad de vacuolas ricas en glucógeno y en el citoplasma se muestra un núcleo. Los ribosomas presentes en esta fase se arreglan en hélices, los cuales tienden a agregarse para formar barras elongadas con bordes redondeados (conocidos como cuerpos cromatoides). Los trofozoítos representan la fase invasiva, y además han sido ampliamente estudiados, (Diamond y Clarck 1993). Los quistes de *E. histolytica* son esféricos u ovoides y algunas veces aparecen con bordes irregulares. Contiene normalmente cuatro núcleos cuando están maduros y raramente presentan ocho núcleos. El estadio de quiste representa la fase infestiva (Proctor y Gregory 1973).

El tratamiento de elección para la amibiasis es el metronidazol, que se caracteriza por provocar muerte selectiva de procariotes y eucariotes. Por otra parte, se ha demostrado en algunos estudios con ratones que esta droga presenta actividad tanto mutagénica como carcinogénica (Samarawickream *et al.* 1997). Sin embargo, esta droga presenta múltiples efectos secundarios indeseables en los humanos, por ejemplo:

Reacciones gastrointestinales, reacciones alérgicas, reacciones del sistema nervioso, trastornos mentales, trastornos transitorios de la visión y hepatobiliares

(http://www.medizzine.com/pacientes/medicamentos/M/metronidazol_oral.php)

(Accesado el 14 de febrero de 2018).

En los últimos años se han reportado una gran variedad de microorganismos resistentes a las drogas de elección, entre las cuales se encuentra *E. histolytica*. La OMS recientemente ha encomendado la búsqueda de nuevas drogas, teniendo como punto de referencia el empleo de microorganismos que presenten interferencia microbiana sobre microorganismos patógenos. La FAO y la OMS han declarado que existe evidencia científica para indicar el potencial de los probióticos que proporcionan beneficios a la salud y son seguras para uso humano (FAO/OMS 2001).

Los probióticos, pueden incrementar la resistencia contra los patógenos intestinales mediante mecanismos antimicrobianos. Estos incluyen la colonización competitiva y la producción de ácidos orgánicos como el ácido láctico y acético, bacteriocinas y otros metabolitos secundarios como el peróxido de hidrógeno y el dióxido de carbono (Kailasapathy y Chin 2000).

En múltiples trabajos se ha demostrado la inhibición del crecimiento y enquistamiento de *Entamoeba histolytica* por acción de liofilizados del medio condicionado con probióticos (*Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium longum* y *Lactococcus lactis*), (Barrón González *et al.* 2008). Sin embargo, hasta ahora se desconoce con certeza cuál o cuáles son los factores responsables de esta inhibición.

Estos hechos, han permitido el gran interés de conocer la naturaleza bioquímica de los bioderivados de probióticos frente a *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS (Shaudin 1903).

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Recientemente la OMS y la FAO (FAO/OMS, 2001), han recomendado el uso de probióticos para el desarrollo de interferencia microbiana, debido al incremento de la resistencia desarrollada por múltiples microorganismos a las drogas de elección; tal es el caso de *E. histolytica*, la cual ha desarrollado resistencia al metronidazol por lo cual es inminente la búsqueda de nuevas drogas que no presenten efectos secundarios en el humano.

Se ha reportado la interferencia microbiana que presentan *Lactobocillus plantarum*, *Lactobocillus acidophilus*, *Lactobocillus casei* y *Lactobocillus casei rhamnosus* sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* (Barrón *et al.* 2008). Sin embargo, actualmente se desconocen cuál o cuáles moléculas están involucradas en actividad de interferencia microbiana que exhiben los probióticos antes mencionados sobre *E. histolytica* HM1-IMSS. Por lo cual es indispensable la caracterización bioquímica de las sustancias presentes en los medios condicionados con *Lactobacillus* que intervienen en la inhibición del crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS (Schaudinn 1903).

Los resultados obtenidos de la investigación permitirán elucidar la o las moléculas involucradas en el proceso de inhibición del crecimiento del protozooario parásito patógeno al humano: *Entamoeba histolytica* HMI-IMSS.

4. HIPÓTESIS

Los medios condicionados de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum* exhiben interferencia microbiana sobre *Entamoeba histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*, modificando la fuente de carbono.

5. OBJETIVO GENERAL

Seleccionar la fuente de carbono óptima de cuatro cepas de *Lactobacillus*, que incorporada en medios condicionados, exhiban actividad de interferencia microbiana sobre el desarrollo axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* y la caracterización parcial de los metabolitos secundarios.

5.1 Objetivos particulares

- a) Determinar el inicio de la fase preestacionario de cuatro especies de *Lactobacillus* al ser cultivadas en el medio MPT adicionado independientemente con glucosa, lactosa, fructosa o sacarosa como fuente de carbono.
- b) Obtener el medio condicionado de cada especie de *Lactobacillus* a partir de cada medio adicionado con glucosa, lactosa, fructosa o sacarosa.
- c) Establecer la cinética de crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS en el medio MPT bajo condiciones axénicas *in vitro*.
- d) Determinar la interferencia microbiana de los medios condicionados con *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei rhamnosus* y *L. plantarum* sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.
- e) Caracterizar el medio condicionado con análisis cualitativos y cuantitativos de proteínas, ácidos grasos, carbohidratos e índice de acidez total.

6. ANTECEDENTES

6.1 Generalidades de *Entamoeba histolytica* y amibiasis

Entamoeba histolytica es un parásito protozoario, es causante de la amibiasis. Se ha reportado que aproximadamente el 10% de la población mundial está contagiada. Sin embargo, el 90% de las personas infestadas son asintomáticas. Se sabe que cada año a nivel mundial se presentan 50 millones de casos sintomáticos y que 100,000 son fatales. Después de la malaria y la esquistosomiasis, causada por *Plasmodium sp.* y *Schistosoma sp.*, la amibiasis por *E. histolytica* es considerada la tercera causa de muerte por parásitos protozoarios en el mundo (Kucik et al. 2004).

En México, la amibiasis intestinal causada por *E. histolytica* y *E. dispar* ocupa el tercer lugar dentro de las enfermedades infecciosas parasitarias y representa un problema de salud pública, incluso en países en vías de desarrollo. En la Tabla 1, se muestra el compendio del estudio realizado entre los años 2005-2007 acerca de la situación epidemiológica de la amibiasis intestinal en niños y adolescentes en México y se reportaron 574,834 casos en el 2007 (Villanueva y Herbas 2009).

Tabla 1
Incidencia de amibiasis intestinal en México 2005-2007*

Año	Casos	≤ 1 año	1-4 Años	5-9 años	10-14 años	15-19 años
2005	762,937	35,383	150,372	112,916	84,687	50,092
2006	662,197	32,675	122,417	96,274	72,274	44,290
2007	574,834	30,645	106,926	82,757	62,073	39,485

*(Tasa calculada en casos incidentes/100 000 habitantes)

E. histolytica fue identificada por primera vez por Lösch 1875 en las heces de un enfermo con disentería crónica en San Petesburgo, Rusia. Posteriormente, Councilman y Lafleur 1891 describieron las pruebas clínicas y anatomopatológicas

para la evidencia de la asociación de este parásito con la disentería y el absceso hepático. Quincke y Ross describieron la forma quística en 1893, y 1903, Schaudinn nombró al parásito como *Entamoeba histolytica* por su capacidad de lisar tejidos y producir úlceras intestinales; diferenciándola de *Entamoeba coli*, la amiba común del colon (Romero 1994).

6.1.1 Ciclo de vida

E. histolytica presenta dos fases de desarrollo o estadios bien establecidas: el trofozoíto, el cual contribuye en la etapa invasiva y el quiste que representa la fase infestiva y de resistencia.

a) Trofozoíto:

Algunos factores fisicoquímicos, como: el pH, el potencial oxido-reducción y la osmolaridad, afectan la movilidad y morfología del trofozoíto. Además, esta etapa es muy sensible a los jugos gástricos y agentes externos, por lo cual, es frecuente localizarlo en la luz y pared del colon, especialmente ciego y recto (Pumarola *et al.* 1991).

El trofozoíto presenta un tamaño que oscila entre 10 a 60 μm , una membrana citoplasmática dividida en dos porciones: una externa llamada ectoplasma, y una porción interna denominada endoplasma (Petri *et al.* 1993). El ectoplasma, es hialino, retráctil y carece casi por completo de granulaciones (Pumarola *et al.* 1991). Además, posee pseudópodos, prolongaciones del ectoplasma que llegan a medir aproximadamente 50 μm , los cuales le permiten al parásito desplazarse a través del segmento intestinal (Romero 1993). El endoplasma tiene una estructura granular fina y, en las formas mayores, abundantes vacuolas y vesículas que contienen restos celulares y hematíes intactos o en vía de degradación (Pumarola *et al.* 1991), (Fig. 1).

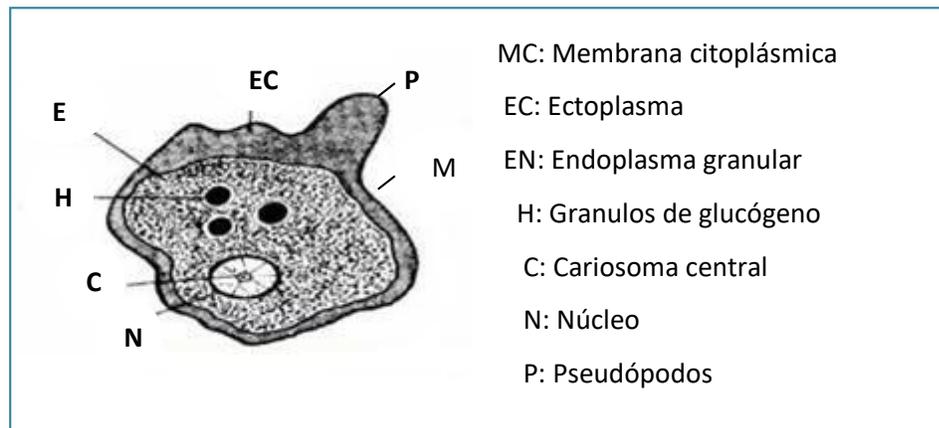


Fig 1. Morfología del trofozoíto de *E. histolytica*

El trofozoíto se nutre, con ayuda de sus pseudópodos, por fagocitosis a expensas de los hematíes y de los tejidos disueltos. Al microscopio electrónico no se detectan mitocondrias, aparato de Golgi, microtúbulos ni retículo endoplásmico rugoso (Pumarola *et al.* 1991).

El núcleo tiene forma esférica con un acúmulo de cromatina pequeño y puntiforme en el centro, encerrado en una cápsula llamado cariosoma o endosoma (Petri *et al.* 1993). Presenta también cromatina adherida a la cara interna de la membrana nuclear, distribuida en forma homogénea (Romero 1993).

Cuando en el medio ambiente se presentan condiciones no propicias para el trofozoíto, genera cambios de forma, deja de emitir pseudópodos, el endoplasma y ectoplasma ya no se diferencian, se pierde la forma irregular característica y la célula toma una forma esférica, al tiempo que aparece una pared gruesa llamada pared quística (Petri *et al.* 1993).

Mientras sucede lo anterior, la célula expulsa todo su contenido vacuolar y empieza a formar material de reserva en forma de vacuolas de glucógeno y barras cromatoidales, a esta fase de transformación del trofozoíto se le denomina prequiste. Posteriormente, las etapas siguientes se le denomina prequiste inmaduro

uninucleado, quiste maduro binucleado, hasta llegar a la etapa de la formación de quiste maduro, el cual es la etapa final de la formación de la fase infestiva (Romero 1993).

b) Quiste

El quiste es redondo u oval con un tamaño de 10-25 μm . Posee una pared de 0.6 μm y es resistente al jugo gástrico y ha factores ambientales externos (Pumarola *et al.* 1991).

El quiste se forma por la evolución del trofozoíto, posee de 1 a 4 núcleos, según la fase de maduración en la que se encuentre. Los quistes jóvenes tienen 1 ó 2 núcleos, algunos cuerpos cromáticos y vacuolas de glucógeno. Cuando el quiste madura presenta 4 núcleos y desaparecen los cuerpos cromáticos. Los cuerpos cromáticos o cromatoides contienen principalmente ácidos nucleicos y fosfatos. Solo los quistes maduros son infecciosos (Pumarola *et al.* 1991), (Fig. 2).

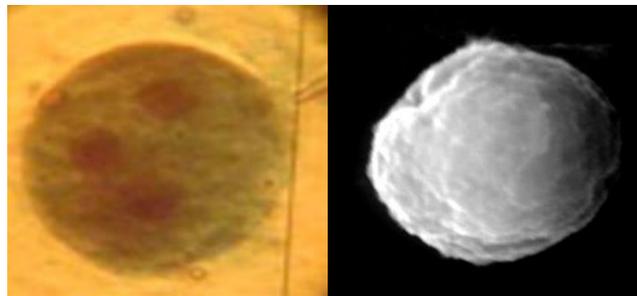


Fig 2. Morfología del quiste de *Entamoeba histolytica*. A) Etapa de quiste, observando la presencia de tres núcleos, B) Imagen de un quiste obtenido a través de microscopía de barrido.

E. histolytica es transmitida por fecalismo, ya que las formas infestivas (quistes), se adquieren al ingerir bebidas, alimentos o al introducir a la boca manos o fómites contaminados con heces de personas parasitadas con los quistes de esta amiba, con sintomatología o sin ella (Romero 1993). Estos últimos son portadores, excretan quistes y son fuente de infestación (Petri *et al.* 1993).

El quiste de *E. histolytica* entra por vía oral y sigue su trayecto por el sistema digestivo, hasta alojarse en el intestino donde se produce el trofozoíto. Esta etapa del protozooario posee su principal mecanismo de acción al generar la producción de enzimas como: mucinasa, hialuronidasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, las cuales lisan la membrana celular, provocando una invasión en tejidos, órganos, aparatos y sistemas del hospedero (Fig. 3).

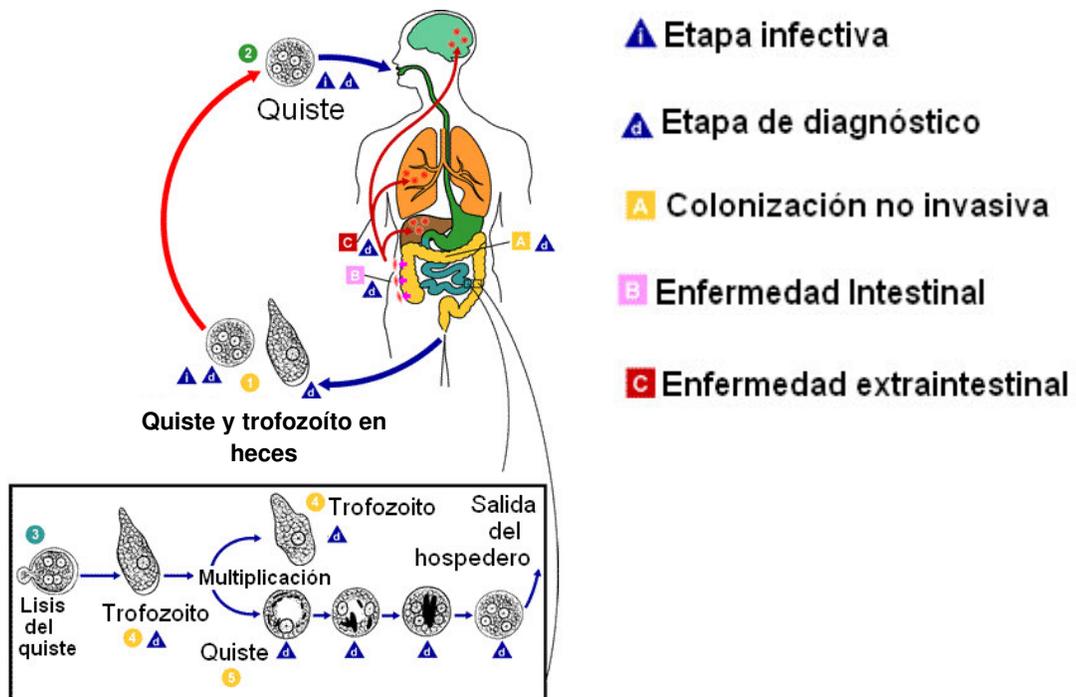


Fig. 3. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. Se observa la invasión de trofozoítos en pulmón, cerebro, hígado. (1) Los quistes maduros tetranucleados son eliminados a través de las heces y (2) son ingeridos a través de agua o alimentos contaminados, (3) el desenquistamiento ocurre en el intestino delgado, (4) A partir de cada quiste emergen ocho trofozoítos metaquísticos, (5) a nivel de colon descendente ocurre el enquistamiento; (B) los trofozoítos que atraviesan la mucosa intestinal, (C) pueden diseminarse vía porta al hígado, pulmón o cerebro y ocasionar amebomas (Imagen tomada de www.dcd.gov).

E. histolytica se adhiere a las células del epitelio intestinal, el cual presenta descamación, lo que genera que las células se lisen y posteriormente la intervención de las enzimas líticas y el movimiento amebiano permiten la penetración e invasión del órgano (Leippe *et al.* 1994).

Otro mecanismo causante de daño es la eritrofagia, en el cual el trofozoíto introduce eritrocitos que posteriormente son destruidos en el citoplasma amebiano. El tercer mecanismo de daño es el traumatismo directo tisular que ejercen los trofozoítos al golpear directa y constantemente los tejidos, separando unas células de otras (Romero 1993).

El daño intestinal es más frecuente a nivel de ciego y recto sigmoides, ya que en estos sitios el tránsito intestinal es menor y con ello se concentra mayor número de trofozoítos, algunos de los cuales llegan a invadir las paredes (Petri *et al.* 1993). Este parásito puede emigrar a zonas adyacentes del intestino y provocar una intensa reacción inflamatoria y dar lugar así a un ameboma (Pumarola *et al.* 1991).

En los casos donde los trofozoítos entran a torrente circulatorio lo hacen a través del sistema portal, pudiendo llegar a cualquier parte del organismo, especialmente al hígado, dando lugar a una amibiasis extraintestinal. Al alcanzar el hígado, las amibas producen inicialmente una reacción inflamatoria con posterior necrosis tisular y formación de uno o varios abscesos. Otras formas de amibiasis extraintestinal suelen ser originados de abscesos hepáticos, los cuales se abren directamente al pulmón, pleura o pericardio, o por vía hemática al pulmón, cerebro, etc. La amibiasis cutánea se presenta normalmente en las proximidades del ano debido a la propagación de los parásitos a partir de úlceras rectales (Pumarola *et al.* 1991).

6.1.2 Tratamiento

Las medidas de prevención para la diseminación de la amibiasis van desde métodos tradicionales (uso de letrinas, higiene personal, calzado, agua potable, educación y saneamiento ambiental) los cuales son medidas que se han adoptado esporádicamente en países pobres y desarrollados; y el uso de drogas antimibianas que actúan contra los trofozoítos de *E. histolytica* pero son incapaces de penetrar la pared de los quistes, la más utilizada es el metronidazol, pero también existen otros amebicidas; y pueden producir toxicidad, efectos secundarios indeseables y resistencias.

El tratamiento de elección para la amibiasis es el metronidazol (Fig. 4), que se caracteriza por provocar muerte selectiva de procariotes y eucariotes. Además, se ha demostrado en algunos estudios con ratones que esta droga presenta actividad tanto mutagénica como carcinogénica (Samarawickream *et al.* 1997). Sin embargo, esta droga presenta múltiples efectos secundarios indeseables en los humanos, por ejemplo: Reacciones gastrointestinales, reacciones alérgicas, reacciones del sistema nervioso, trastorno mentales, así como daños transitorios de la visión y hepatobiliares http://www.medizzine.com/pacientes/medicamentos/M/metronidazol_oral.php

El metronidazol es parte de un listado de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el cáncer como un potencial carcinógeno humano. Aunque se ha cuestionado la metodología de algunos de los ensayos clínicos, se ha demostrado la aparición de cáncer en animales de experimentación.

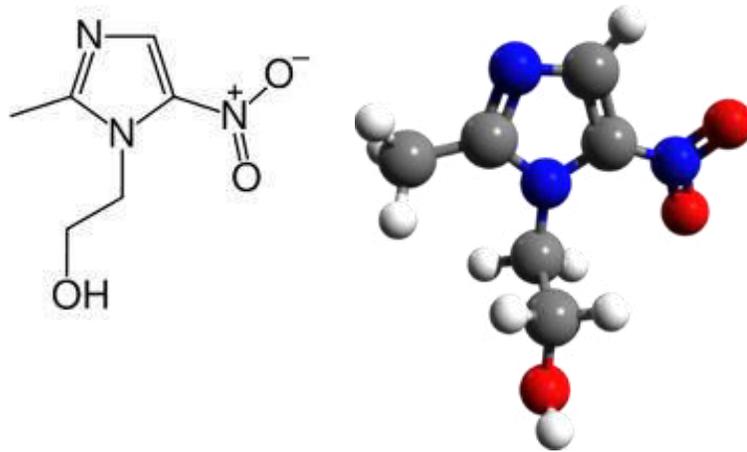


Fig. 4. Estructura del metronidazol

Se ha demostrado en estudios efectuados en ratones que el metronidazol es tanto mutagénico como carcinogénico (Legator *et al.* 1975). Por otro lado, un estudio realizado *in vitro* con leucocitos de ratón demostró que tinidazol a concentración de 100, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ se incrementa el porcentaje de células dañadas conforme aumenta la dosis; *in vivo* se pudo observar que una dosis de 100 mg/kg de peso es capaz de dañar el ADN de los leucocitos de ratón (Rodríguez *et al.* 2001).

También existen otros amebicidas; y pueden producir toxicidad, efectos secundarios indeseables y resistencias, por lo que se ha dado a la búsqueda de tratamientos alternativos para combatir este parásito; La FAO y OMS han indicado con evidencia científica el potencial de los probióticos que proporcionan beneficios en la salud y son seguros para uso humano.

6.2 Probióticos

Por otra parte, la microflora intestinal o microbiota, se refiere a los diferentes microorganismos que habitan en las superficies internas y externas de los seres humanos convencionalmente sanos, de los cuales destacan las bacterias, hongos y protozoarios (Fig. 5). La alteración de la microbiota intestinal causada por las

bacterias ácido lácticas (BAL) o denominados también como probióticos, influyen directa e indirectamente en el estado de salud por la producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta, degradación de sustancias alimenticias no digeridas, estimulación de la respuesta inmune y protección frente a microorganismos enteropatógenos (Lee y Seppo 1995).

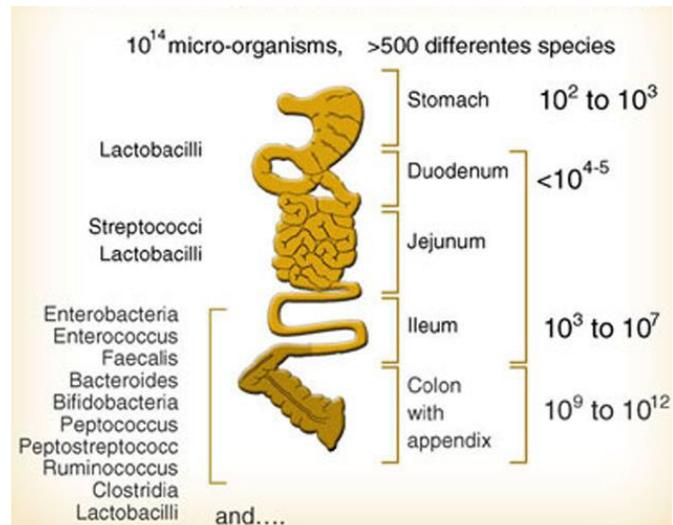


Fig.5 Distribución de la microflora intestinal en el sistema digestivo.

Todas las especies microbianas se encuentran en conflicto constante entre ellas, y el balance intestinal de la microflora depende de las condiciones intestinales. Los microorganismos, que son seres vivos independientes, requieren de condiciones ambientales particulares para su supervivencia.

Estos proliferan gracias al consumo de residuos alimenticios y a los fluidos secretados por los órganos digestivos. Sin embargo, algunos de estos fluidos pueden actuar como factor inhibitorio para los microorganismos, dependiendo su secreción de las condiciones físicas y fisiológicas, y de la edad del individuo Penders J *et al.* 2006 (Fig.6).

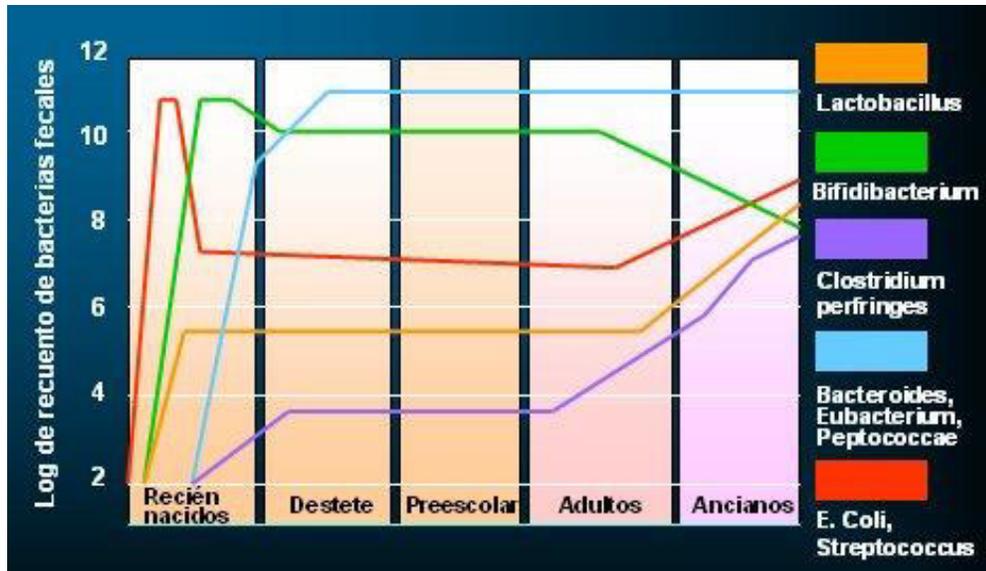


Fig. 6. Tasa de variación y crecimiento de microorganismos de la flora intestinal en función de la edad del hospedero.

Es deseable que los microorganismos benéficos sean dominantes en la flora intestinal. Sin embargo, se debe notar, que al utilizar una terapia con antibiótico para eliminar los microorganismos patógenos, se está eliminando igualmente la flora intestinal, causando síntomas patológicos y enfermedades. Por eso es esencial asegurar el desarrollo de los microorganismos benéficos y el bajo desarrollo de una flora patógena en el intestino, porque se acumula una serie de metabolitos tóxicos, los cuales son absorbidos y liberados a la circulación sanguínea, causando problemas de salud. Este caso se puede igualar a la contaminación ambiental, llamándose "Contaminación ambiental interna". Los únicos microorganismos que no polucionan el ambiente interno son las Bifidobacterias y *Lactobacillus acidophilus*, consideradas como BAL (Penders *et al.* 2006).

Se ha demostrado la eficiencia del uso de las BAL, las cuales son consideradas como probióticos para prevenir las infecciones intestinales, y aportar efectos benéficos para la salud y estimular el sistema inmunológico a nivel intestinal y ayudar a la buena digestión (Fig. 7).

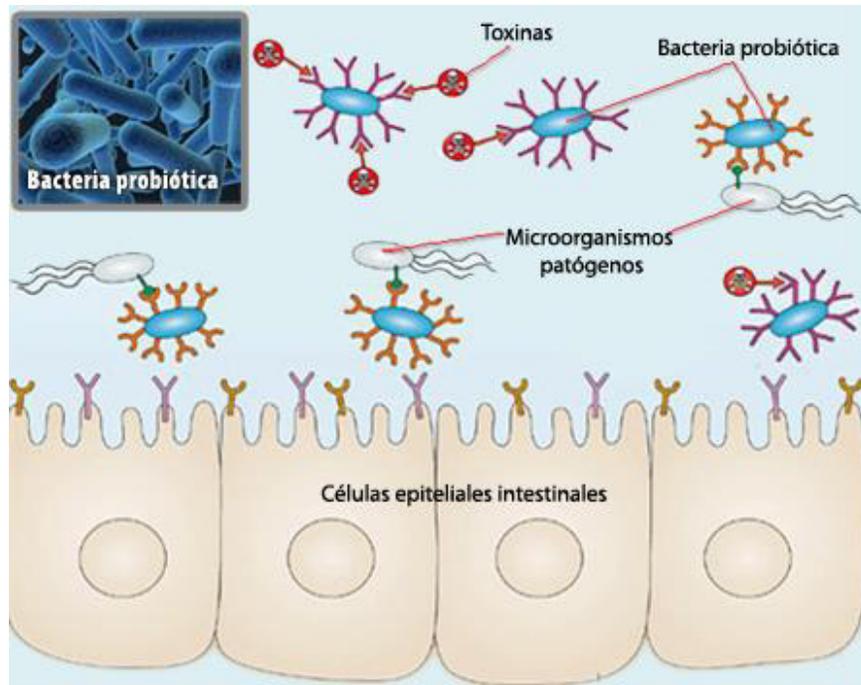


Fig.7 Acción benéfica producida por los probióticos en el intestino delgado, en presencia de microorganismos patógenos.

6.2.1 Bacterias ácido-lácticas

Las BAL se clasifican en los siguientes géneros, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* y *Carnobacterium* (Schleifler 1993). Estas bacterias comprenden un número elevado de microorganismos Gram positivas, cuya característica principal es la producción de ácido láctico a partir de carbohidratos. Las BAL son anaerobias o aerotolerantes, no formadoras de esporas, catalasa negativa, no reductoras de nitratos, tolerantes a la presencia de CO₂, nitritos y concentraciones altas de sal y valores de pH bajos (Salminen y Wright 1993).

Una característica importante para la clasificación de las BAL es su patrón de fermentación. Éste se divide en homo y heterofermentativo de acuerdo con la ruta metabólica seguida y los productos finales formados. Las BAL homofermentativo producen ácido láctico a partir de azúcares de seis carbonos (glicólisis). A

diferencia de éstas, las BAL heterofermentativas tienen la capacidad de utilizar diferentes rutas metabólicas y producen además de ácido láctico, compuesto como dióxido de carbono, ácido acético, acetaldehído, diacetilo y etanol por la ruta de la fosfocetolasa (Fig. 8) (Sharpe y Pettipher 1983).

La colonización de probióticos en el intestino delgado de los humanos ha permitido que en algunos microorganismos patógenos se vea desfavorecida su reproducción en el interior intestinal, generando un fenómeno denominado antibiosis (Babel 1977). Las primeras observaciones de antibiosis microbianas realizadas por Pasteur y Joubert 1877 permitieron vislumbrar las posibilidades terapéuticas de los fenómenos de antagonismo. Posteriormente, Rogers 1928 identificó una sustancia de naturaleza peptídica, llamada nisina, producida por *Streptococcus lactis*, que inhibía a microorganismos Gram positivos, incluyendo patógenos y alterantes de alimentos.

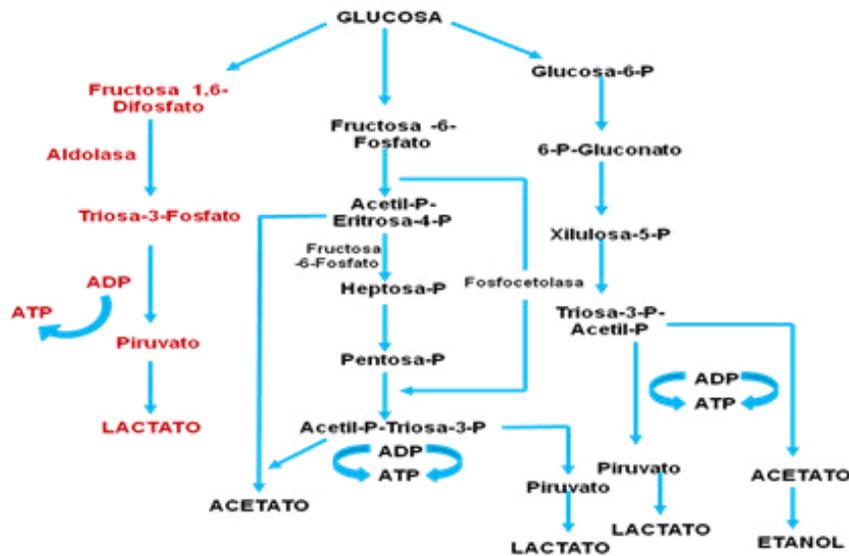


Fig. 8. Rutas de fermentación de azúcares por bacterias ácido lácticas. Se observan las rutas homofermentativa(rojo) y heterofermentativa (azul), (Kandler, D. 1983).

Debido a que la cepa productora era utilizada como cultivo iniciador en la producción de derivados lácteos se plantearon nuevas aplicaciones, no sólo con

finés terapéuticos del antagonismo microbiano. De hecho, la fermentación es una de las técnicas más antiguas utilizadas para aumentar el período de consumo de alimentos perecederos (Mckay y Baldwin 1990).

El complejo sistema antagonista de las bacterias lácticas no sólo se basa en la producción de ácidos, sino que también participan activamente otros metabolitos inhibitorios, que, a pesar de ser sintetizados en menor cantidad, contribuyen significativamente a los fenómenos de antibiosis. Entre ellos se destacan la producción de peróxido de hidrógeno y otros derivados del metabolismo del O_2 (O_2^- , $OH\cdot$), CO_2 , compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), ácidos orgánicos, derivados deshidratados del glicerol (reuterina), benzoato, enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas y antibióticos (Tabla 2), así como otros compuestos inhibitorios por definir o sin identificar (Lindgren y Dobrogosz 1990; Piard *et al.* 1992). Por otro lado, la competencia por sustratos esenciales, la acumulación de D-aminoácidos, el descenso del potencial de óxido-reducción y la coagregación, también participan activamente en la acción inhibitoria (Vuyst y Dandamme 1994).

La producción de ácidos orgánicos por las bacterias probióticas disminuye el pH intestinal y por lo tanto se inhibe el crecimiento de patógenos. Estos ácidos orgánicos incrementan los movimientos peristálticos, lo que de manera indirecta remueve los patógenos acelerando la velocidad con la que atraviesan el intestino. El peróxido de hidrógeno producido puede funcionar a través del sistema lactoperoxidasatiocianato, en el cual el peróxido de hidrógeno oxida el tiocianato para convertirlo en ácido hidrocianico que es perjudicial para los patógenos. El dióxido de carbono y el diacetil sintetizado por las bacterias ácido-lácticas inhiben el crecimiento de patógenos (Kailasapathy y Chin 2000)

Ziauddin *et al.* 1993, reportaron en un estudio realizado *in vitro*, que el ácido láctico inhibe a algunas bacterias patógenas y bacterias relacionadas a la descomposición

descomposición de los alimentos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, entre otros.

Tabla 2
Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular obtenidos a partir de bacterias ácido-lácticas.

COMPUESTO	MICROORGANISMOS PRODUCTORES	MICROORGANISMOS SENSIBLES
Ácido láctico	Todas las BAL	Todos los microorganismos
Ácido acético	BAL heterofermentativas	Todos los microorganismos, dependientes del pH
Alcoholes	Levaduras, BAL heterofermentativas	Todos los microorganismos
Dióxido de carbono	BAL heterofermentativas	La mayoría de los microorganismos
Diacetilo	<i>Lactococcus sp.</i>	Levaduras, Bacterias Gram (-) a [> 200] ppm, bacterias Gram (+) a [> 300] ppm
Peróxido de hidrógeno	Todas las BAL	Todos los microorganismos
Reuterina	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Amplio espectro: Bacterias Gram (+), bacterias Gram (-), hongos
Sidosporas	Algunas bacterias anaerobias facultativas, <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Staphylococcus sp.</i>	Microorganismos dependientes de hierro
Ácido mevalónico Ácido benzoico Lactona Metilhidantoina	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pantonea agglomerans</i> <i>Fusarium avenaceum</i>

La producción de peróxido de hidrógeno por BAL, tienen un efecto bactericida debido a que es altamente oxidante, provocando la peroxidación de los lípidos de la membrana celular y la destrucción de la estructura básica de proteínas celulares (Dahly *et al.* 1989).

El diacetilo es un producto de las BAL fermentadoras de citrato (Hugenholtz 1993) responsable del sabor y aroma a mantequilla. Es un compuesto que presenta un efecto antimicrobiano a concentraciones elevadas, principalmente inhibe a microorganismos Gram negativos, levaduras y hongos (Jay 1982). El mecanismo de inhibición está basado en la reacción del grupo α - α' -dicarbonilo de la molécula con la porción guanido del aminoácido arginina en enzimas microbianas desactivándolas debido a que bloquea o modifica su sitio activo (Lindgren y Dobrosz 1990). La reuterina es un compuesto producido por *Lactobacillus reuteri* que se encuentra principalmente en el tracto gastrointestinal humano y en algunos productos cárnicos. Este compuesto presenta un amplio intervalo de inhibición, es activo contra microorganismos como *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* y algunos protozoarios como *Trypanosoma*. Actúa inhibiendo la enzima ribonucleótido reductasa, lo que puede explicar su amplio espectro de inhibición (Axelsson *et al.* 1989).

6.2.2 Bacteriocinas

Recientemente ha despertado interés otro grupo de compuestos producidos por algunas especies de BAL, las bacteriocinas. Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas producidas por BAL, de naturaleza peptídica y activas, relacionados taxonómicamente con la especie productora (Tagg *et al.* 1976).

Se han definido como un “grupo heterogéneo de péptidos de síntesis ribosómica – con o sin modificaciones posteriores-, que son secretadas extracelularmente y poseen un mecanismo de acción de antibiosis. Se describieron por primera vez en bacterias Gram negativas, en las que se describieron las colicinas producidas por *Escherichia coli* (Gratia 1925) y, posteriormente, en bacterias Gram positivas (Jacob *et al.* 1953; Tagg *et al.* 1976).

Las BAL están consideradas como bacterias Gram positivas y su interés en los últimos quince años se ha centrado en la producción de bacteriocinas para el uso de conservadores naturales de alimentos, con el fin de aumentar la vida útil y

mejorar la calidad higiénica de los mismos. Así como también, se diferencian de los clásicos antibióticos en su estructura molecular, su naturaleza, el modo y espectro de acción, la ausencia de toxicidad y los mecanismos de resistencia inducidos (Cleveland *et al.* 2001).

Las bacteriocinas se han encontrado en casi todas las especies bacterianas estudiadas hasta la fecha (Tabla 3) y se ha observado que dentro de una misma especie se pueden producir diferentes tipos de bacteriocinas, debido a esto existe una enorme diversidad de este tipo de sustancias, González *et al.* 2003, ha considerado a las bacteriocinas como péptidos biológicamente activos que presentan efectos bactericidas.

Tabla 3

Microorganismos productores de bacteriocinas (González *et al.* 2003)

BACTERIOCINAS	MICROORGANISMOS PRODUCTORES
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>
Pediocina PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE-92
Pediocina JD	<i>Pediococcus acidilactici</i> JD1-23
Sakacina A	<i>Lactobacillus sake</i> 706
Sakacina P	<i>Lactobacillus sake</i> LTH673
Curvacina A	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174
Mesentericina Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Plantaricina E/F	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11
Lactococcina A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i>
Lactococcina B	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4
Lactacina F	<i>Lactobacillus jonsonii</i>
Divergicina	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13
Helveticina	<i>Lactobacillus helveticus</i>

De acuerdo a las características estructurales y biológicas de las bacteriocinas de las BAL, Klaenhammer 1993 estableció cuatro clases de bacteriocinas:

- Clase I: Lantibióticos

Péptidos pequeños (<5 kDa), termoestables y que se caracterizan por la presencia de aminoácidos no usuales en su composición. Éstos se generan postraduccionalmente por deshidratación de serina y treonina para dar dehidroalanina y dehidrobutirina, respectivamente

Aunque estos precursores puedan formar parte de la estructura final del lantibiótico, en muchas ocasiones sufren una condensación con el grupo sulfhídrido de las cisteínas presentes en la molécula, formándose puentes cisteína-S-cisteína (lantionina) o ácido aminobutírico-S-alanina (β -metil lantionina) (Jung 1991).

Se distinguen 2 tipos de lantibióticos: i) Tipo A, péptidos de 2164 a 3488 Da, de estructura terciaria tipo sacacorchos, anfipáticos y con 2 a 7 cargas positivas; ii) Tipo B, péptidos de estructura globular, con tamaños comprendidos entre 1959 y 2041 Da, sin carga o cargados negativamente. Hasta el momento, no se han identificado lantibióticos de tipo B dentro de las bacterias lácticas.

La nisina A, fue el primer lantibiótico descrito en 1928, y fue aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis subsp lactis* (Gross y Morell 1971). Es la bacteriocina mejor caracterizada y pertenece al tipo A es un péptido de 34 aminoácidos y bajo peso molecular inferior a 5 KDa y es muy utilizada como conservador de alimentos y la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe). Se produce de forma natural en algunos productos lácteos. Dentro de este grupo se han descrito otros como la nisina Z (Mulders *et al.* 1991), variante natural de la nisina A, la lacticina 481 (Piard *et al.* 1992) de *L. lactis*, la lactocina S (Mørtvedt *et al.* 1991) y la plantaricina C (González *et al.* 1994) sintetizadas por *Lb. sake* y *Lb. plantarum*, respectivamente,

y por último, la carnocina UI49 producida por *Carnobacterium piscicola* (Stoffles *et al.* 1992).

Los lantibióticos no son específicos de las bacterias lácticas, habiéndose descrito, entre otras, la subtilina de *Bacillus subtilis* (Gross *et al.* 1973), la epidermina de *Staphylococcus epidermidis* (Allgaier *et al.* 1985), la estreptococina A-FF22 de *Streptococcus pyogenes* (Jack y Tagg, 1991) y salivaricina A producida por *Streptococcus salivarius* (Ross *et al.* 1993).

- Clase II: Pequeños péptidos termoestables

Péptidos (<15 kDa), estables al calor y que no contienen aminoácidos modificados en su estructura primaria. Junto con los lantibióticos es la clase más numerosa de bacteriocinas. Se caracterizan además porque tienen una señal de procesamiento del péptido líder común (-Gly⁻²-Gly⁻¹). En función de homologías en su estructura primaria, espectro de inhibición y número de péptidos componentes pueden subdividirse en 4 subgrupos:

-Clase IIa: péptidos activos frente a *Listeria* que comparten una secuencia consenso en la región NH₂-terminal: -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-. Tienen un papel importante en la capacidad de reconocimiento de la membrana de la célula blanco. Dentro de este grupo se encuentran: la pediocina PA-1/AcH de *Pediococcus acidilactici* y se utiliza como conservador en productos vegetales y cárnicos y se ha observado una elevada actividad contra especies de *Listeria* por lo que tiene un gran potencial para ser utilizado como conservador en alimentos lácteos (Nieto *et al.* 1992; Motlagh *et al.* 1994); las sakacinas A y P producidas por *L. sake* (Holck *et al.* 1992; Tichaczek *et al.* 1992); algunas bacteriocinas sintetizadas por *Leuconostoc* spp. como la leucocina A

(Hastings *et al.* 1991) y la mesentericina Y105 (Hécharad *et al.* , 1992) y las carnobacteriocinas BM1 y B2 de *C. piscicola* LV17 (Quadri *et al.* 1994).

-Clase IIb: estas bacteriocinas tienen una síntesis compleja cuya actividad biológica depende de la acción complementaria de dos péptidos distintos. Son formadores de complejos de poración y tienen actividad antimicrobiana cuando interactúan como un sistema de 2. En este grupo se incluyen la lactococina M (van Belkum *et al.* 1991a) y la lactococina G (Nissen *et al.* 1992), producidas por cepas de *L. lactis*. Otros ejemplos son la lactacina F (Allison *et al.* 1994) y la plantaricina S (Jiménez, *et al.* 1995), sintetizadas por *L. johnsonii* y *L. plantarum*, respectivamente.

-Clase IIc: este grupo tiene, hasta el momento, un único representante: la lactococina B (Venema *et al.* 1993). Su actividad biológica depende del estado reducido de un residuo de cisteína al igual que ocurre con ciertas toxinas tiol-activadas (Boulnois *et al.* 1991).

-Clase IId: incluye todas aquellas bacteriocinas que no cumplen alguno de los requisitos exigidos en los grupos anteriores como, por citar algún ejemplo, la diplococina/lactococina A (Oxford 1944; Holo *et al.* 1991; van Belkum *et al.* 1991a) producidas por *L. lactis*, la carnobacteriocina A (Worobo *et al.* 1994) y la piscicolina 61 (Holck *et al.* 1994), ambas producidas por *Carnobacterium piscicola*, y la lactacina B (Barefoot y Klaenhammer 1983) sintetizada por *Lb. acidophilus*.

- Clase III: Grandes proteínas termolábiles

Proteínas de más de 15 kDa que están constituidas exclusivamente por aminoácidos no modificados y son sensibles al calor. La helveticina J (Joerger y Klaenhammer 1986) es la principal representante de este grupo, en el que también

se incluyen la acidofilucina A (Toba *et al.* 1991a), las lactocinas A y B (Toba *et al.* 1991b) y la caseicina 80 (Rammelsberg *et al.* 1990). Todas ellas producidas por cepas de *Lactobacillus* spp.

- Clase IV: Bacteriocinas complejas que contienen motivos lipídicos o carbohidratos.

Presentan asociaciones a la porción peptídica, un componente glucídico o lipídico esencial para su actividad biológica. Como ejemplo de bacteriocinas con fracciones glucídicas podemos citar a la leucocina S (Lewus *et al.* 1992) y, de las que poseen lípidos, las lactostrepcinas (Kozak *et al.* 1978).

El descubrimiento y caracterización de nuevas bacteriocinas ha hecho necesario modificar esta clasificación, especialmente la clase II (Cleveland *et al.* 2001; Nes *et al.* 1996; Franz *et al.* 1999; Van Belkum y Stiles 2000; Ross *et al.* 2002; Cotter *et al.* 2005). La Tabla 4 muestra la clasificación de bacteriocinas basada en las propuestas por Diep y Nes 2002 y Cotter *et al.* 2005.

Actualmente se conoce la estructura primaria de numerosas bacteriocinas producidas por BAL, ya sea por secuenciación directa de los péptidos purificados o por traducción del correspondiente ADN. Aunque la mayoría de ellas están constituidas por aminoácidos biológicos, es de destacar la presencia de aminoácidos modificados en la forma activa de aquéllas que reciben el nombre genérico de lantibióticos. Incluso se ha identificado la presencia de D-alanina en la lactocina S, lantibiótico producido por *Lb. sake* (Skaugen *et al.* 1994). No obstante, independientemente de su composición, las bacteriocinas son péptidos catiónicos, con un punto isoeléctrico (pI) alto, que comparten un marcado carácter hidrofóbico.

Tabla 4
Clasificación de bacteriocinas

Clase	Subclase	Ejemplos
Clase I: Lantibióticos	Ia: Péptidos lineales catiónicos	Nisina Epidermina
	Ib: Péptidos globulares sin carga o con carga neta negativa	Lacticina 3147 Mersacidina
Clase II: Bacteriocinas termoestables, no modificadas	IIa: Bacteriocinas anti-listeria, similares a pediocina	Enterocina A Pediocina PA-1
	IIb: Bacteriocinas heterodimérica	Lactacina F Lactococcina G Acidocina J1132
	IIc: Bacteriocinas sec-dependientes	Bacteriocina 31 Enterocina P Acidocina B
	IId: Bacteriocinas sin péptido líder	EJ97 Enterocina L50
	IIe: Bacteriocinas cíclicas	AS-48 Circularina A Gassericina A
Clase III: Grandes proteínas termolábiles		Helveticina J Enterolisina A

Clasificación propuesta por Diep y Nes 2002 y Cotter *et al.* 2005.

Las bacteriocinas se sintetizan en los ribosomas a partir de transcritos procedentes de la expresión del correspondiente gen estructural. Se traducen como prepéptidos inactivos con una extensión aminoterminal de 24 a 30 residuos en el caso de los

lantibióticos o más corta (18-24 residuos) en las bacteriocinas no lantibióticos, que se elimina en un proceso probablemente asociado a la exportación.

Las secuencias líderes de las bacteriocinas no exhiben habitualmente las características propias de los péptidos señal involucrados en los procesos de secreción (von Heijne 1983). Como ya se ha indicado, las bacteriocinas de la clase II, algunos lantibióticos (lacticina 481, salivaricina A, estreptococina A-FF22) y la colicina V se caracterizan por la presencia de un residuo cargado positivamente tras la metionina inicial y la secuencia consenso de excisión -Gly⁻²-Gly⁻¹ (Håvarstein *et al.* 1994). El resto de los lantibióticos también presentan secuencias conservadas en la región de procesamiento: los residuos en las posiciones +2 y +1 son, generalmente, hidrofóbicos; en la posición -1 se sitúa un residuo polar o cargado positivamente precedido de una prolina y, por último, en la posición -4 se encuentra siempre un aminoácido hidrofóbico (Jung 1991).

El péptido líder actúa como sistema protector manteniendo la bacteriocina inactiva en el interior de la célula productora. No obstante, al menos en el caso de la nisina, su presencia es necesaria para que ocurra una biosíntesis correcta siendo, probablemente, reconocido por las proteínas de modificación y transporte (van der Meer *et al.* 1994).

La secreción de las bacteriocinas a través de la membrana citoplasmática se produce por la actividad de transportadores específicos de tipo ABC (Stoddard *et al.* 1992; Marugg *et al.* 1992; Fremaux *et al.* 1993). Estos complejos proteicos presentan dos dominios claramente diferenciados: i) un dominio de unión a ATP en el extremo carboxilo, donde se genera la energía necesaria para el transporte mediante la hidrólisis de ATP y, ii) una región hidrofóbica e integrada en la membrana en el extremo amino que reconoce y transporta el sustrato (Fath y Kolter, 1993).

Los transportadores ABC de las bacteriocinas de la clase II contienen, además, un dominio con actividad proteolítica en su región amino que reconoce específicamente la secuencia consenso Gly⁻²-Gly⁻¹ (Hávarstein *et al.* 1995). Por lo tanto, estos transportadores tienen una doble función: translocar la bacteriocina al exterior y actuar como peptidasas-específicas. En el caso de la nisina y otros lantibióticos, sus transportadores ABC (LanT) carecen de este dominio proteolítico. El péptido líder de la nisina se procesa extracelularmente por la acción de una proteasa específica (NisP) (Kupke y Götz 1996). Recientemente se han descrito bacteriocinas que se ajustan al modelo clásico de secreción de proteínas de modo que sus péptidos señal se procesan tras la secuencia consenso Ala⁻²-Xaa-Ala⁻¹. Esto ocurre con la divergicina A (Worobo *et al.* 1995) y la acidocina B (Leer *et al.* 1995).

Dentro de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas se pueden distinguir 2 grandes grupos a este respecto (Klaenhammer 1988): i) aquéllas que son activas frente a cepas o especies relacionadas (lactococinas A, B, M y G, lactacina B, helveticina J, etc.) y ii) las que inhiben a un rango mucho más amplio de microorganismos, entre los que se incluyen patógenos y alterantes de alimentos Gram positivos (nisina, pediocinas, lactacina F).

Hasta la fecha no se ha descrito ninguna bacteriocina de bacterias lácticas activa frente a microorganismos Gram negativos, excepto en aquellos casos en los que la integridad de la membrana externa ha sido previamente dañada por tratamiento con agentes quelantes (EDTA) o por choque osmótico (Stevens *et al.* 1991).

Los lantibióticos actúan sobre células vegetativas y también inhiben la germinación de esporas. En el primer caso, forman canales iónicos en la membrana plasmática; en el segundo, modifican los grupos sulfhidrilo presentes en la envoltura de la spora (Morris *et al.* 1984) actuando, probablemente, los residuos deshidratados como aceptores de los electrones. Estudios con péptidos mutantes de nisina y subtilina, en

los que la dehidroalanina en posición 5 había sido sustituida por alanina, han confirmado esta hipótesis, ya que pierden su actividad antimicrobiana frente a las esporas germinantes, pero no frente a las células en crecimiento activo (Hansen *et al.* 1991).

Las bacteriocinas antimicrobianas se han clasificado de acuerdo con su estructura secundaria y también según sus estructuras anfipáticas. De acuerdo con su estructura secundaria, los péptidos antimicrobianos se clasifican en varios grupos (Epanand y Vogel 1999; Toke 2005; Bulet *et al.* 2004; Kamysz *et al.* 2003; Lehrer y Ganz 1999; Hancock y Diamon 2000)

- Péptidos lineales formadores de hélices anfipáticas o hidrófobas: son péptidos que presentan la estructura tipo hélices alfa (Fig. 9) anfipáticas al entrar en contacto con las membranas. Un ejemplo son las magaininas de *Xenopus laevis* (Zaslouff 1987) o las cecropinas de insectos (Steiner 1982).

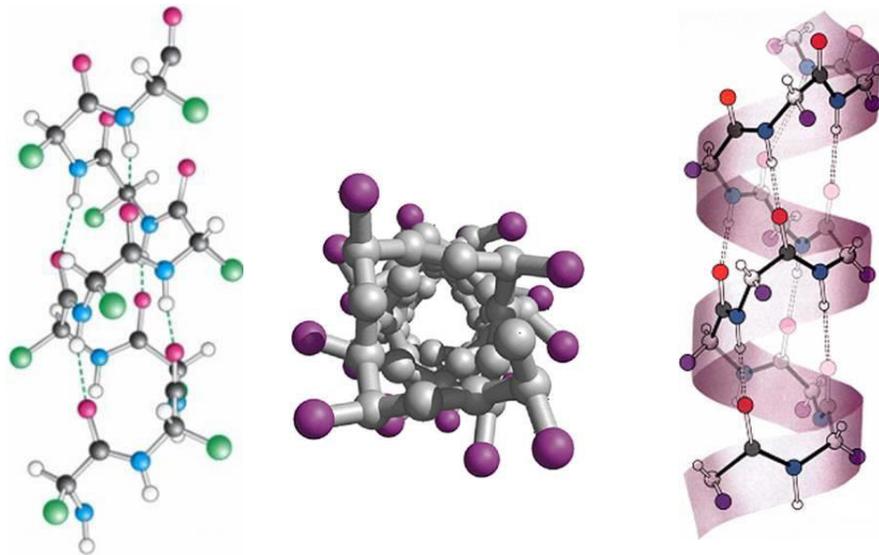


Fig. 9. Diferentes representaciones de la estructura secundaria tipo hélice alfa.

- Péptidos cíclicos y pequeñas proteínas que forman estructuras en lámina beta: se trata de péptidos que presentan una estructura en lámina beta antiparalela (Fig.

10). Este tipo estructuras se ven favorecidas en muchos casos por que los péptidos son cíclicos. La ciclación puede ocurrir por la formación de un puente disulfuro (protegrinas, Kokryakov *et al.* 1993), de tres o cuatro puentes disulfuro (α y β defensinas, Ganz y Lehrer 1998) o por la circularización de la cadena peptídica (Gramicidina S, polimixina B, tirocidinas).

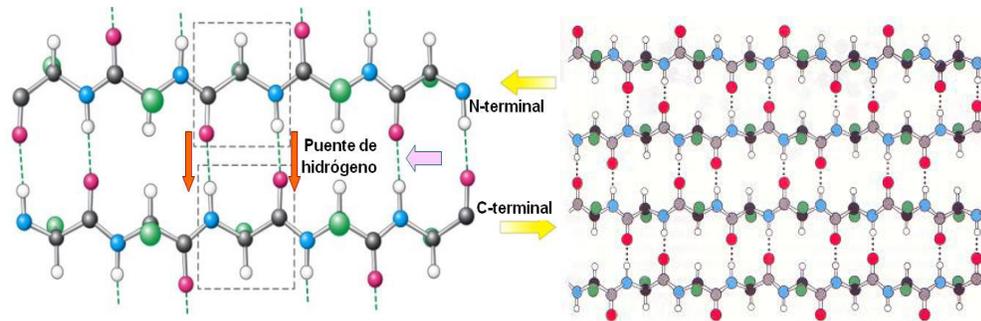


Fig 10. Estructura secundaria tipo β -Tira plegada antiparalela. A) Se observa la unión de dos β -Tira plegada por puentes de hidrógeno coplanares y coaxiales, presentando una gran estabilidad. B) La unión de varias β -Tiras plegadas forman una lámina β u hoja β .

- Péptidos con composición aminoacídica única o irregular: son péptidos que poseen una secuencia rica en algún aminoácido. Como ejemplos aparecen las histatinas, ricas en histidina (Brewer *et al.* 1998; Helmerhorst *et al.* 1999; Tsai y Bobek. 1998), las profeninas, ricas en prolinas (Harwig *et al.* 1995) y las indolicinas, ricas en triptófano (Selsted *et al.* 1992; Falla *et al.* 1996). El triptófano no suele ser muy abundante en las proteínas, pero es importante en la inserción de péptidos antimicrobianos en la membrana pro que tiende a situarse en la interfase hidrófila/hidrófoba de la bicapa lipídica y favorecen el anclaje de la cadena peptídica a las cabezas fosfolipídicas (Yau *et al.* 1998; Persson *et al.* 1998; Ladokhin *et al.* 1997; Schibli *et al.* 2002).

- Lipopéptidos con un grupo amino-alcohol terminal: poseen una gran porción de ácido α -amino-isobutírico (Aib), que favorecen la formación de hélices 3_{10} (Monaco *et al.* 1998). Poseen además un 1,2-aminoalcohol en el extremo C-

terminal y están acilados en el extremo N-terminal. Un ejemplo es la alameticina (Hancock y Lehrer 1998).

- Péptidos macrocíclicos “anudados”: son péptidos cíclicos de unos 30 aminoácidos producidos por la familia de las *Rubiaceae* que poseen un motivo característico llamado “nudo de cistina”, consiste en que un puente disulfuro se abre paso a través de otros dos puentes disulfuro formados en la molécula. Este motivo aparece también en inhibidores de proteasas y en toxinas, y confiere una gran estabilidad a la molécula.

La muerte celular mediada por péptidos antimicrobianos catiónicos ocurre en una serie de pasos, con independencia del tiempo requerido o la especificidad del mecanismo antimicrobiano (Brogden 2005)

Atracción: el péptido catiónico se une mediante interacciones electrostáticas a la superficie de la membrana cargada negativamente (LPS en Gram negativas y ácidos teicoicos en Gram positivas)

Adhesión: a baja relación péptido/lípido, los péptidos en hélice alfa, en lámina beta se adhieren y penetran entre las cabezas fosfolípidos en un estado inactivo que compacta la membrana.

Inserción del péptido y permeabilización de la membrana: a bajas proporciones péptido/lípido, los péptidos se disponen paralelos a la membrana. Según aumenta la proporción, las moléculas se orientan perpendicularmente y se insertan en la membrana, formando poros.

El blanco primario de acción de las bacteriocinas parece ser la membrana plasmática. Éstas alteran la permeabilidad selectiva de la membrana de las células

vegetativas sensibles, provocando la inmediata e inespecífica liberación de iones, compuestos de bajo peso molecular y algo más tarde del ATP intracelular. Estas alteraciones provocan la disipación completa o parcial de la fuerza protón motriz (PMF) ocasionando desórdenes metabólicos secundarios que, en último término, inhiben la generación de energía y la síntesis de macromoléculas, lo que supone la muerte celular (Monteville *et al.* 1995).

La PMF es un gradiente electroquímico compuesto de un potencial de membrana ($\Delta\psi$) y de un gradiente de pH (ΔpH), y es necesaria para llevar a cabo gran parte de los procesos dependientes de energía del metabolismo celular. El desarrollo de diferentes técnicas para estudiar por separado los dos componentes de la misma y los sistemas de membranas artificiales han permitido obtener algunas conclusiones sobre el modo de actuación de las bacteriocinas. Se ha observado que la nisina y otros lantibióticos necesitan un estado energizado de las células para ejercer su acción (Sahl 1991) mientras que otras, como la pediocina PA-1, leucocina S, lactacina F, plantaricina C y las lactococinas A y B (Bruno y Monteville 1993; González *et al.* 1996; van Belkum *et al.* 1991b; Venema *et al.* 1993), actúan independientemente de la existencia de una diferencia de potencial a ambos lados de la membrana.

Por otro lado, los lantibióticos no requieren un receptor proteico específico ya que actúan sobre liposomas (Kordel *et al.* 1989). Sin embargo, algunas bacteriocinas sólo son activas frente a células enteras y/o vesículas derivadas de las mismas, por lo que sí parecen necesitar un receptor localizado en la membrana o en la pared celular (van Belkum *et al.* 1991b; Venema *et al.* 1993; Moll *et al.* 1996).

La hipótesis más aceptada sobre cómo las bacteriocinas desestabilizan las membranas es que, en función de su carácter catiónico, éstas serían inicialmente atraídas electrostáticamente por la superficie celular (las bacteriocinas se adsorben inespecíficamente a células sensibles, resistentes y a las propias células

productoras). Posteriormente, por la presencia de un determinado potencial de membrana (lantibióticos) o por la interacción con un receptor específico o no, adoptarían una conformación tal que les permitiría agregarse entre sí formando aglomerados que se reordenarían para dar lugar a una especie de cilindro hueco (poro) que atravesaría la matriz membranal, manteniendo las zonas hidrofílicas hacia la parte interior del poro. A pesar de que no hay evidencia física de estos poros, los resultados de numerosos experimentos apoyan esta hipótesis frente a la desestabilización de la membrana mediante una acción de tipo detergente (Monteville *et al.* 1995). Además, las bacteriocinas pueden formar láminas β y hélices α anfipáticas, motivos estructurales asociados a proteínas que interaccionan con la membrana plasmática y que abren poros en la misma (Ojcius y Young 1991).

En general, los poros son inespecíficos y permiten la salida de cualquier soluto intracitoplasmático, únicamente limitado por el tamaño. No obstante, en algunas ocasiones, como ocurre con la lactococina G, el poro generado es específico para iones K^+ (Moll *et al.* 1996).

Por último, muchos autores han observado que las bacteriocinas pueden provocar la lisis celular en determinados cultivos sensibles (Pucci *et al.* 1988; Bhunia *et al.* 1991; Motlagh *et al.* 1991; González *et al.* 1994).

Se ha demostrado que la nisina activa las autolisinas de la pared, predominantemente en el área de formación del septo (Bierbaum y Sahl, 1991) y que la acción complementaria de las lactococinas A, B y M provoca la lisis celular en *L. lactis*, en contra de lo que ocurre con cada una por separado (Morgan *et al.* 1995). Todo ello ha llevado a redefinir el concepto de bacteriocina como agentes antimicrobianos de naturaleza peptídica cuya síntesis no es letal para la célula productora (Konisky 1982).

Lo anterior ha permitido que entre los microorganismos ocurran interacciones competitivas, como un modo de establecerse y dominar su microambiente, tanto en el proceso de colonización de las membranas mucosas como en las infecciones clínicas. Algunas de estas interacciones son sinérgicas y otras son antagonistas, de manera que los organismos interfieren con el crecimiento de los otros y compiten por el espacio ecológico.

La formación de poros se ha explicado mediante tres mecanismos (Fig. 11) que dependen de las características fisicoquímicas del péptido antimicrobiano y de la composición de la membrana (Ganz y Lehrer 1999; Chmiel 2001; Brogden 2005; Toke 2005; Kamysz *et al.* 2003). Estos mecanismos son:

- Modelo en Barril
- Modelo en Alfombra
- Modelo Toroidal o en “agujeros de gusano”

Modelo en barril: cuando dominan las interacciones hidrófobas, el péptido se inserta en la membrana perpendicularmente, formando un haz en la membrana a modo de barril con un lumen central, en el que la parte hidrófoba interaccionan con las cadenas de los fosfolípidos y la parte hidrófoba delimita el interior del poro (Yang *et al.* 2001; Ehrenstein y Lecar 1977).

Modelo en alfombra: los péptidos se acumulan en la superficie de la bicapa mediante interacciones electrostáticas de los aminoácidos cargados positivamente con las cabezas aniónicas de los fosfolípidos. A altas concentraciones de péptido, se crea una tensión en la bicapa lipídica que lleva a su disgregación o ruptura, formándose micelas (Shai 1999; Ladokhin y White 2001).

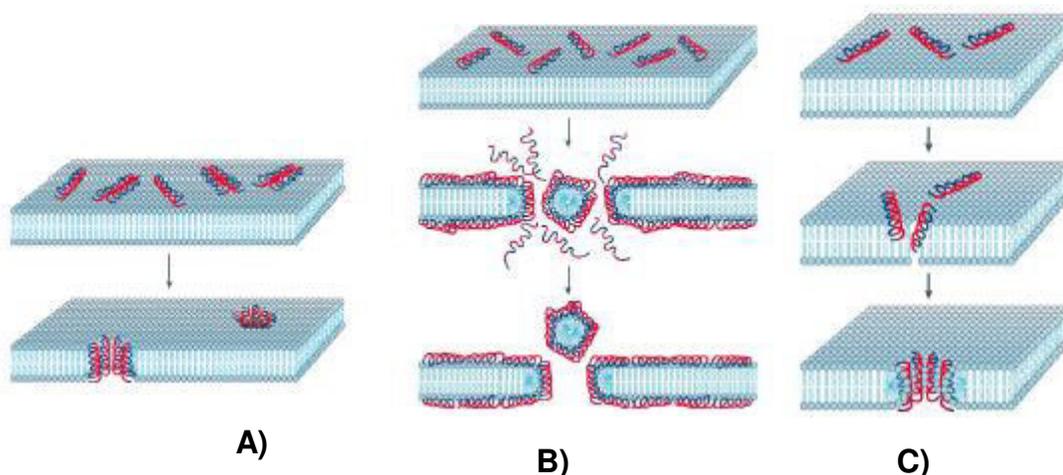


Fig 11. Esquema de la formación de poros mediante diferentes mecanismos de acción propuestos para los péptidos antimicrobianos. A) Modelo en barril, B) Modelo en alfombra, C) Modelo toroidal. Las regiones en color rojo muestran la región hidrófila y en azul la región hidrófoba.

Modelo toroidal o en “agujero de gusano”: las hélices del péptido antimicrobiano se insertan en la membrana y para disminuir la curvatura causada por esta unión, los fosfolípidos se mueven continuamente desde una mitad de la membrana hacia la otra. Las cadenas peptídicas situadas en la membrana son empujadas a los lípidos, de modo que se forma un poro en cuya luz aparecen las cabezas de los fosfolípidos y las cadenas peptídicas.

Las colicinas (Pugsley 1984b), bacteriocinas producidas por *E. coli*, han sido estudiadas en profundidad. Estas bacteriocinas se caracterizan no sólo por su naturaleza proteica y su acción bactericida restringida, en la mayor parte de los casos necesita receptores celulares específicos para ejercer su acción, habitualmente tienen codificación plasmídica y su biosíntesis está asociada a la muerte de la célula productora.

La producción de bacteriocinas parece depender del crecimiento y actividad fisiológica de la cepa productora. De hecho, la mayoría de las bacteriocinas que se han estudiado hasta el momento presentan una cinética de metabolito primario y, en consecuencia, su producción está correlacionada con el aumento de la biomasa.

Por otro lado, el control del pH a lo largo de la fermentación puede resultar en títulos más altos de actividad (Vuyst y Dandamme 1994).

En 1998 Anderssen E., mencionó que las plantaricinas E/F y J/K son bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* que tienen una actividad antimicrobiana cuando interactúan como sistema de péptidos. Moll 1999, mencionó que los poros formados por complejos de poración E/F y J/K presentan diferente selectividad iónica; ya que la plantaricina E/F permiten el paso de cationes monovalentes en contraste con la plantaricina J/K para compuestos aniónicos. Se ha observado que además de tener propiedades contra otras especies estrechamente relacionadas, se ha encontrado que las bacteriocinas tienen una acción inhibitoria contra otras cepas muy distanciadas filogenéticamente de la cepa productora.

6.2.3 Antagonismo microbiano

Bujalance *et al.* 2007 empleó *Lactobacillus plantarum* como inmunomodulador; estimulando significativamente a los esplenocitos en respuesta a la concavalina A y al mitógeno de las células T. En este trabajo se determinó el efecto de los concentrados proteicos derivados de *Lactobacillus plantarum* que ejercen sobre una línea leucémica humana (HL-60), como resultado las concentraciones superiores a los 50 µg/mL dan lugar a una reducción considerable de este parámetro, siendo superior al 95% cuando la concentración es de 100 µg/mL (Puertollano *et al.* 2005).

Rayes *et al.* 2002, mencionan que los pacientes sometidos a cirugía abdominal (resección del hígado, estómago o páncreas) se beneficiaron con *L. plantarum* 299, en términos de un menor número de infecciones, antibióticos y de incidencia de otras complicaciones, así como de una estancia hospitalaria más corta.

La infección es la causa más común de enfermedad en la pancreatitis aguda, debido a la reducción temprana de la flora comensal (particularmente especies de lactobacilos) y al mismo tiempo, el sobrecrecimiento de *Enterobacteriaceae* especialmente *Escherichia coli*. Mangiante *et al.* 2001, determinaron que *Lactobacillus plantarum* 299v reduce efectivamente la traslocación microbiana en experimentos de pancreatitis; por lo que estos investigadores hacen mención a que el tratamiento con probióticos muestra ser una prometedora alternativa a la terapia con antibióticos.

Álvarez *et al.* 2001, estudiaron el efecto de la administración oral de *Lactobacillus casei* y del yogurt en la prevención de las infecciones por *Pseudomonas auroginosa* en ratones de tres semanas de edad. Los resultados mostraron un incremento significativo en los niveles de IgA e IgM.

Algunos estudios informan que las bifidobacterias (cepa Bb12), los *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* reducen la duración o severidad de las enfermedades al igual que la longitud de la progresión rotaviral en las deposiciones. Asimismo, se ha demostrado que cuando se suministran *L. casei*, *L. plantarum* y *Bifidobacterium* (cepa Bb12) por un período extenso, se reduce la incidencia de diarreas agudas en grupos de alto riesgo como niños hospitalizados o niños pequeños que asisten a guarderías (Martin 2000).

Isolauri *et al.* 1995, propusieron una bacterioterapia oral, usando *Lactobacillus rhamnosus*, para tratar la gastroenteritis viral. Posteriormente, Kaila *et al.* 1995, reportaron que *Lactobacillus casei rhamnosus* estimula la respuesta específica de los anticuerpos IgA; Salminen *et al.* 1993, recalcaron la importancia de mantener una microflora intestinal equilibrada para preservar la integridad intestinal. Sato *et al.* 1998; divulgaron el aumento en la resistencia del paciente contra las infecciones de *Listeria* gracias a la administración de *Lactobacillus casei*. Las ventajas de estas bacterias también fueron reveladas por Perdigon *et al.* 1995,

quienes además descubrieron su importante papel protector en la prevención de infecciones entéricas produciendo un aumento en la secreción de anticuerpos IgA. Johansson *et al.* 1998, realizaron experimentos precisos examinando la capacidad de los lactobacilos de adherirse a las células intestinales. El trabajo de Coconnier *et al.* 1998, apoyó esta observación y fueron más lejos divulgando la inhibición de los procesos patógenos de los microbios que provocan la diarrea adhiriendo *Lactobacillus acidophilus*. Esto es la prueba evidente de la capacidad de las bacterias probióticas de adherirse a las células intestinales humanas.

Young y Huffmans 2003; Dunne 2001, encontraron que *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus GG* inhiben la adherencia de *Escherichia coli* enteropatógena, eliminando patógenos de las células epiteliales del intestino por aumento de la mucina intestinal MUC- 2 y MUC- 3.

Benyacoub *et al.* 2005 estudiaron la actividad biológica de *Enterococcus faecium* SF68 sobre *Giardia intestinalis* en infecciones intestinales en ratón. Observaron una respuesta inmunológica en los ratones, a nivel intestinal se incrementó IgA (inmonoglobulina A) y en sangre aumentaron los niveles de IgG. La respuesta humoral de las inmunoglobulinas se reflejó en los niveles celulares al incrementarse el porcentaje de CD4⁺ de células T en los bazos y en las placas de Peyer de los ratones.

El número de trofozoítos de *Giardia* disminuyó en el intestino delgado y decrecieron los antígenos (proteína GSA65) fecales de *Giardia*. Los resultados demostraron un fuerte potencial de la cepa SF68 para prevenir infecciones intestinales causadas por protozoarios.

Casas 2006 demostró efectos inhibitorio de liofilizados de medios condicionados con *Lactobacillus casei rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum* sobre cultivos axénicos *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS, al evaluar concentraciones

de 1, 10, 50 y 100 mg/mL de los liofilizados, no encontrando diferencia significativa en la inhibición sobre dicho parásito mostrada por las cuatro concentraciones evaluadas. Barrón *et al.* 2005, reportaron que liofilizados de medios condicionados con *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus lactis* inhiben el crecimiento de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS cultivada bajo condiciones axénicas *in vitro*.

Draksler *et al.* 2007 reportaron que el uso de las cepas de *Lactobacillus* DDL19 y de *Lactobacillus* DDL48 sobre la interacción de diferentes géneros de nematodos, demostrando un efecto ovicida y/o sobre los primeros estadios larvales de *Trychostrongylus spp* y *Nematodirus spp*. Por otro lado, *Bifidobacterium* DDBA demostró tener una acción larvicida sobre las larvas infestantes en el estadio 3, en donde las muestras de heces presentaban una carga parasitaria menor a 700 grados de infestación (h.p.g.). Los investigadores proponen que la acción de las tres bacterias lácticas se debe a la producción ácidos orgánicos u otros metabolitos que, en el caso de *Lactobacillus* DDL19 y de *Lactobacillus* DDL48, provocan daños a los huevos o a las primeras formas larvales, impidiendo que el ciclo continúe hacia larva infectiva, mientras que en el caso de *Bifidobacterium* DDBA el efecto larvicida se produciría principalmente sobre las L3 de *Strongyloides papillosus* con mayor vulnerabilidad por ausencia de cutícula protectora.

Hugo *et al.* 2008 aplicaron cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (cepa CIDCA 133) y *Lactobacillus plantarum* (cepa CIDCA 83114) para observar la actividad biológica sobre el crecimiento de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) *in vitro*. Las cepas estudiadas presentaron un efecto antagónico sobre EHEC por la modificación del microambiente o al activar la cascada de señalización por el patógeno. Los investigadores proponen el uso de cepas probióticas para la profilaxis y prevención de infecciones intestinales por EHEC.

Coconnier *et al.* 1998, examinaron la actividad antagonista de sobrenadantes de *Lactobacillus acidophilus* en contra de *Helicobacter pylori* *in vitro* e *in vivo*, ya que *Lactobacillus acidophilus* secreta sustancias antibacterianas y que son independientes de la producción de ácido láctico y del pH.

La interferencia microbiana (IM) cumple una función principal en el mantenimiento de la flora normal de la piel y las membranas mucosas al evitar la invasión por potenciales patógenos exógenos. La IM es expresada por medio de diversos mecanismos que incluyen la producción de sustancias antagonistas, cambios en el microambiente bacteriano y reducción de los nutrientes. Sus mediadores incluyen la producción de materiales complejos tales como bacteriocinas, bacteriófagos o enzimas bacteriolíticas y moléculas menos complejas como peróxido de hidrógeno, ácido láctico, ácidos grasos y amonio (Madigan *et al.* 2004).

Ha sido evaluado *in vitro* e *in vivo* el efecto benéfico de los probióticos en estados patológicos como diarreas, infecciones del sistema urinario, desórdenes inmunológicos, intolerancia a la lactosa, hipercolesterolemia, algunos tipos de cáncer y las alergias alimentarias, Sampson 1993; Chandra y Kumari, 1994.

7. MATERIAL Y METODOLOGÍA

7.1 Material biológico

- i) Protozooario parásito: *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS
- ii) Probióticos:
 - *Lactobacillus casei rhamnosus*
 - *Lactobacillus casei*
 - *Lactobacillus acidophilus*
 - *Lactobacillus plantarum*
- iii) Suero Bovino Estéril

7.2 Preparación de soluciones

- Ácido clorhídrico [0.1N]. Se tomaron 0.41 mL de HCL concentrado (12N) y se aforó hasta 50 mL con agua destilada.
- Hidróxido de sodio [10N]. Se disolvió 40g de Hidróxido de Sodio (NaOH) en 100mL de agua destilada
- Citrato férrico de amonio (CFA) [1%]. Se disolvió 0.1g de citrato férrico de amonio en 10mL de agua destilada; y se mantuvo en refrigeración en un frasco ámbar a 4°C, hasta su empleo.
- Solución de Penicilina – Estreptomina
Solución concentrada de penicilina: A un frasco ampula de 1, 000,000 U de Penicilina G sódica cristalina, se le inyectó con aguja y jeringa estéril 5.0 mL de agua bidestilada-desionizada para disolver la penicilina.

Solución patrón de penicilina-estreptomicina: A un frasco ampula de sulfato de estreptomicina, se añadió bajo condiciones de esterilidad, la solución concentrada de penicilina y se mezclaron.

Solución de trabajo de penicilina-estreptomicina (100X): Se transfirió asépticamente toda la solución patrón de penicilina-estreptomicina del frasco ampula a una probeta estéril de 25mL y se aforó a 20mL con agua desionizada estéril. Se almacenó a 4°C en alícuotas de 5mL en tubos cónicos de 50mL que se cubrieron con papel aluminio.

- Buffer tris 1,5 M pH= 8.8. Se pesó 181,65 g de tris base y se aforó con agua bidestilada hasta un volumen de 1 L. Posteriormente, se ajustó a pH= 8.8 con HCl.
- Buffer tris 1,5 M pH= 6.8. Se pesaron 60.55 g de tris base y se aforó con agua bidestilada hasta un volumen de 1 l. Se ajustó a pH = 6.8 con HCl.
- Persulfato de amonio (PSA 10%). Se pesaron 100 mg de PSA y diluyó en un volumen final de 1 mL con agua tridestilada. Este reactivo en polvo es altamente hidrofílico, por lo tanto, es importante mantener el envase herméticamente cerrado. Esta preparación debe ser de 1 semana de antigüedad como máximo.
- Solución de trabajo de azul brillante de Commassie R250. Se disolvió 0.025 g de azul brillante de Commassie R250 en 50 mL de metanol, 50 mL de ácido acético y 45 mL de agua destilada se generó la solución y se filtró a través de un papel Whatman número 1 para eliminar los residuos extraños. Antes de usar dejar en reposo por una día en un frasco oscuro.

- Solución de decoloración rápida. Se mezclaron 10 mL de ácido acético glacial con 50 mL de metanol. Se llevó la solución a un volumen de 100 mL con 40 mL de agua destilada.
- SDS 10%. Se disolvieron 10g de SDS en 80 mL de agua bidestilada, una vez disuelto se ajustó a pH 7.2 con 10N de NaOH, finalmente se completó hasta 100 mL con agua bidestilada. Posteriormente se calentó a 68° c para disolver completamente el SDS.
- Buffer de la muestra 4x para proteínas. Se mezclaron los siguientes reactivos. Se disolvió 2.5 mL de Tris 0.5M a pH 6.8, 2.5 mL de SDS al 10%, 2.5 mL de 2-mercaptoetanol, 2.5 mL de glicerol y 1 mg de azul de bromofenol.
- Buffer de electroforesis tris-glicina 10x para proteínas. Se mezcló 3.038 g de Tris Base, 14.01 g de glicina y 1 g de SDS, se aforó a 100 mL con agua bidestilada y se obtuvo un pH de 8.3
- Solución de trabajo acrilamida/bisacrilamida al 30%. Se mezcló 29.2 g de acrilamida, 0.8 g de bisacrilamida y se disolvió con 100 mL de agua bidestilada, se filtró para remover las impurezas en papel Whatman número 1 y se forró el recipiente con papel aluminio hasta su empleo.
- Preparación de geles de empacamiento al 12%, los componentes se enlistan en la Tabla 5.

Tabla 5
Composición del gel de poliacrilamida (12%)

Reactivos	Cantidades
Componentes de la solución	10.00 mL
Agua tridestilada esteril	4.06 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	3.21 mL
TRIS/HCL pH 8.8	2.50 mL
SDS 10%	100.00 µL
Persulfato de amonio 10%	50.00 µL
TEMED	16.00 µL

7.3 Métodos de trabajo para *Entamoeba histolytica*

- a) Preparación de medio de cultivo MPT para *Entamoeba histolytica*: Se preparó el medio MPT de acuerdo con Barrón *et al.* 2008
- b) Mantenimiento de la cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica*: La cepa se mantuvo mediante resiembras sucesivas, inoculando 2×10^4 trofozoítos/mL a un tubo de borosilicato para cultivo de 16 x 150 mm con tapón de rosca, que contenía 10mL de caldo MPT adicionado con 0.1mL de solución penicilina–estreptomicina y 1.0mL de suero bovino. La cepa se incubo a 37°C por 72 horas. Antes de cada resiembra los cultivos se observaron en un microscopio invertido para comprobar el buen estado de las amibas.

El cultivo que mostró la mejor densidad y el mejor aspecto se colocó en agua-hielo por 20min. Para despegar las células adheridas al tubo, este se agito 10 veces por inversión suave, y el número de trofozoítos se determinó tomando una alícuota del cultivo, se colocó en una cámara de Neubauer (Fig. 7) y se contó el número de trofozoítos/mL. Las resiembras y bioensayos se realizaron

cuando las células se encuentren en la mitad de su fase logarítmica de crecimiento.

- c) Cinética de crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS: Se inocularon 21 tubos de borosilicato para cultivo de 13 x150 mm con medio 5 mL de MPT, 0.05mL de solución de penicilina-estreptomicina y 0.5mL de suero bovino y un inoculo de 1×10^4 trofozoítos/mL. Se incubaron a 37°C y a partir del día 1 cada 24 h se determinó el número de trofozoítos/mL a tres tubos de cultivo hasta el séptimo día de incubación. Se realizaron tres lecturas a cada tubo. El conteo de trofozoítos/mL se realizó en una cámara de Neubauer, como se observa en la figura 12 se presentan 8 cuadrantes en la cámara y se cuenta en cada uno de ellos el número de trofozoítos y se realiza por triplicado. La sumatoria de trofozoítos se divide entre 24, obteniendo un promedio. El promedio se multiplicó por 10,000, obteniendo el número de trofozoítos/mL.

$$\text{cel/mL} = \frac{(\Sigma \text{cuadrantes})}{24} (10,000)$$

Nota: Cada cámara de Neubauer presenta 8 cuadrantes y se leen 3 cámaras. Lo que da un resultado de 24.

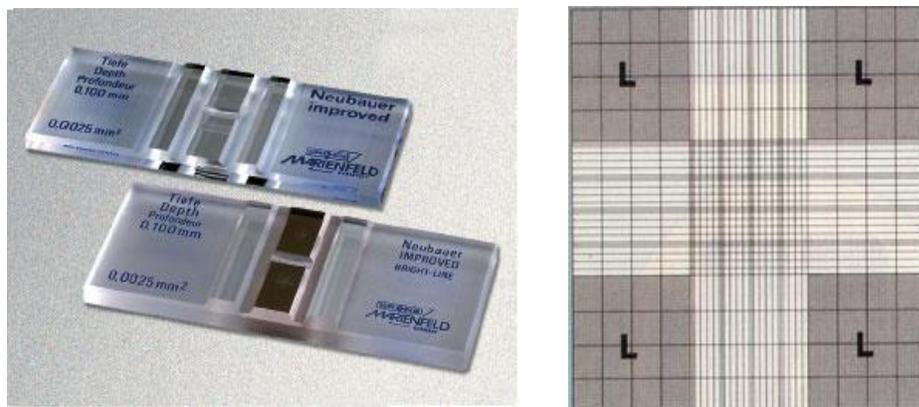


Fig. 12 Cámara de Neubauer. A) Se observa en color café los sitios donde se coloca la muestra para el conteo de de *Entamoeba histolytica*. B) Se indican con la letra “L” los cuatro cuadrantes que se usaron para contar trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (en total 8 cuadrantes, 4 superior y 4 inferior).

7.4 Métodos de trabajo para *Lactobacillus sp.*

- a) Mantenimiento probióticos: Cada cultivo de *L. casei*, *L.c.rhamnosus*, *L. acidophilus* y *L. plantarum* se mantuvo en refrigeración a 4°C en MPT-caldo para probióticos (Barrón y Quiñones 2018), se activó tomando 50µL y se inocularon en 5mL de caldo MPT-caldo para probióticos, y se incubó por 24 - 48 h a 37°C.
- b) Cinéticas de crecimiento de probióticos por el método de turbidimetría. Se dispusieron de nueve tubos con tapón de rosca que contenían 5mL de MPT-caldo, y frente al mechero, se inocularon con 50 µL de cultivo de *L. casei*, *L.c.rhamnosus*, *L. acidophilus* o *L. plantarum*, ajustando la absorbancia a 0.1, posteriormente se incubaron en un baño de agua a 37°C y cada hora se realizaron las lecturas de absorbancia empleando un espectrofotómetro (Spectronic Genesis) a una longitud de onda de 635nm se registraron y se graficaron cada lectura.
- c) Determinación de la óptima fuente de carbono para probióticos. Se dispuso de nueve tubos con tapón de rosca los cuales contenían 5mL de MPT-caldo al cual le fue sustituida la glucosa por alguno de estos azúcares: sacarosa o fructosa o lactosa a las dosis de 0.1, 1.0, 3.0, 5.0 y 10g/L y frente al mechero, se inocularon con una asada de cultivo de *L. casei*, *L.c.rhamnosus*, *L. acidophilus* o *L. plantarum*, se ajustó la absorbancia a 0.1, posteriormente se incubaron en un baño de agua a 37°C y cada hora se realizaron las lecturas de absorbancia y se empleó un espectrofotómetro (Spectronic Genesis) a una longitud de onda de 635nm durante un lapso de 24h, se registró y grafico cada lectura. Conforme a las gráficas obtenidas se selecciono la concentración que proporcione el mayor rendimiento celular.
- d) Obtención del Medio eondicionado de *Lactobacillus sp.* (MCL). A partir de la cepa reactivada previamente del probiótico se tomó una asada y se agregó un inoculó al 10% en 1 L de medio MPT-caldo, se incubó a 37°C por 48 h, se centrifugó 3 veces a 2,500 rpm/20 min, enseguida se separó el precipitado y el

sobrenadante se recuperó, este material recuperado se esterilizó por filtración utilizando filtros millipore de 0.22 μm . Posteriormente, se realizó una prueba de esterilidad, se tomó una alícuota y se agregó en MPT-caldo, incubándolo a 37°C por 24h. El sobrenadante esterilizado por filtración se almacenó a 4°C.

- e) Detección residual de carbohidratos mediante la Prueba de Molish a los MCL: Para realizar la prueba de Molish, se tomaron 20 gotas de cada uno de los medios condicionados de *Lactobacillus sp.* y se agregaron a un tubo de borosilicato de 13x100 mm. Posteriormente, se adicionaron 4 gotas del reactivo Molish y se mezcló vigorosamente. Los tubos se colocaron en una gradilla de manera inclinada y se añadió cuidadosamente 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Los tubos no se deben agitar y se dejaron reposar de manera vertical, hasta la formación de un anillo en la interfase.

7.5 Bioensayos

Evaluación del medio condicionado con *Lactobacillus sp.* (MCL) sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*: Se despegaron las células de *E. histolytica* del vidrio, colocando el tubo fuente de inóculo en agua-hielo durante 20 min, se inocularon 10000 trofozoítos/mL de *Entamoeba histolytica* en 30 tubos de 13x150 mL los cuales contenían 5 mL del medio MPT, 0.5 mL de suero bovino, 0.05 mL de solución penicilina-estreptomicina y se agregó cada una de las concentraciones a evaluar de los medios condicionados de *Lactobacillus casei* (MCLc), *Lactobacillus casei rhamnosus* (MCLcr), *Lactobacillus acidophilus* (MCLa), *Lactobacillus plantarum* (MCLp), se incubaron a 37°C durante 72 h.

Posteriormente se colocaron en agua hielo al congelador por 20 min, enseguida se determinaron en tres eventos independientes por triplicado el número de trofozoítos/mL empleando una cámara de Neubauer. Se graficaron y se analizaron los resultados.

7.6 Diseño estadístico:

El potencial de interferencia microbiana sobre el crecimiento axénico *in vitro* de MCLc, MCLcr, MCLa y MCLp se evaluó sobre el crecimiento de *Entamoeba histolytica*, usando un diseño factorial de 4*4*5*5*2 con tres repeticiones. Se valoró el rendimiento celular de cuatro cepas de *Lactobacillus sp.* en presencia de cuatro variables de fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, fructosa y lactosa) evaluando las dosis de 0.1, 1.0, 10, 50 y 70% de cada sustrato. Con el procedimiento anterior se obtuvo el porcentaje de inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* (interferencia microbiana) del medio condicionado con *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum*.

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) para tres factores con efectos fijos. Las diferencias entre los pares de medias de las variables que mostraron diferencias significativas se analizaron mediante la prueba de diferencia significativa de Tukey. El diseño se analizó con un nivel de confianza del 95%.

7.7 Proteínas de MCL

a) Determinación cualitativa de proteínas mediante la prueba de Biuret: A los medios condicionados obtenidos de cada cepa de *Lactobacillus sp.* se les realizó la prueba de Biuret, para detectar la presencia o ausencia de proteínas por un método cualitativo.

Se agregaron 10 gotas de cada medio condicionado en una placa de porcelana con pocillos y se adicionaron 3 gotas del reactivo de Biuret, considerando una prueba positiva, presencia de proteínas, se observa un vire al de color violeta y la reacción es considerada negativa cuando el color permanece azul.

b) Curva de calibración de proteínas por el método de Bradford: Se prepararon soluciones stock de albúmina sérica bovina a concentraciones de 0.0, 0.1, 0.25,

0.5, 0.75 y 1.00 mg/mL. Además, la solución de Bradford utilizada es de la casa comercializadora BioRad, del cual se tomó 20 mL y se mezcló con 80 mL de agua bidestilada. La solución se filtró con un papel Whatman No. 1 y el filtrado se guardó en un frasco ámbar. De la solución madre se tomó 100 μ L y se adicionaron a un tubo de borosilicato de 13x100. Posteriormente, se adicionó 1 mL de la solución de Bradford y se homogenizó en un vortex por 15 segundos. Los estándares se dejaron reposar por 10 minutos, para permitir la formación del complejo colorido y pasado este tiempo, se realizó la lectura en un espectrofotómetro Spectronic Génesis 5, con una longitud de onda de 595 nm, usando celdas rectangulares desechables de poliestireno con capacidad de 1.5 mL de la marca Daigger. Para cada estándar se realizaron 5 repeticiones.

- c) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford en los medios condicionados de *Lactobacillus sp.* De cada uno de los MCLc, MCLcr, MCLp y MCLa se tomaron 100 μ L y se depositaron en un tubo de borosilicato de 13x100 y se les adicionó 1 mL de la solución de Bradford diluido (1:5), se mezclaron por segundos y se dejó reposar por 10 minutos y la lectura se realizó a una $\lambda=595$ nm en un espectrofotómetro Spectronic Génesis 5. En el procedimiento se sometió un control positivo (0.5mg/mL), para verificar el procedimiento y la habilidad del técnico. Para cada uno de los medios se realizaron 5 repeticiones.
- d) El contenido de nitrógeno de los medios condicionados de *Lacobacillus sp* se realizó por la norma oficial NMX-F-608-NORMEX-2002.
- e) Termo-resistencia de proteínas: Se tomaron 200 mL del medio condicionado de *La* y se sometieron a baño maría por un tiempo de 60 minutos a 80 °C. Durante el período de calentamiento, se realizaron movimientos circulares del matraz que contenía el MC, para permitir que el calor se difundiera de manera homogénea. Terminado el tiempo de calentamiento del MCLa, se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente, se realizaron los bioensayos adicionando a cada tubo

las siguientes concentraciones: 1.0, 0.5 y 0.1 mL del MC termotratado, cada tubo contenía 5 mL del medio MPT, 1.0 mL de amibas, 0.55 mL de suero antibiótico. Después de 7 días de incubación se realizó el conteo de células/mL.

- f) Cuantificación de proteínas mediante el programa para detección de proteínas del equipo Nanodrop: La cuantificación se realiza en un NANO DROP 2000 por triplicado y se realizó un promedio con el fin de reducir cualquier error que se pueda haber producido en la lectura. Se tomó 1 μ L del medio condicionado con ayuda de una micropipeta y se colocó directamente sobre el pedestal. Posteriormente, el brazo del aparato fue movido para cerrar, para permitir la formación de una columna entre la muestra y el brazo. El aparato desplegó la lectura en la pantalla y se registró en la bitácora. Se limpió el pedestal y repitió el procedimiento.
- f) Obtención de proteínas de los medios condicionados por el método de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80% de saturación: Se tomaron 250 mL de cada uno de los medios condicionados de *L. casei*, *L.c. rhamnosus*, *L. acidophilus* y *L. plantarum*, y se agregaron 140.26 g sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ para tener una saturación del 80%. El procedimiento se realizó en un baño con hielo y se dejó en agitación por 24 horas a 4°C. Posteriormente, el contenido de los matraz se dosificó en tubos cónicos con capacidad 50 mL, éstos se llevaron a una centrifuga marca eppendorf y fueron centrifugados a 11,000 r.p.m por 30 minutos. Por decantación se eliminó el sobrenadante y el precipitado de proteínas con sulfato de amonio se resuspendió en buffer de fosfatos 0.1 M a un pH 7.2. Además, se realizó una diálisis para cada uno de los precipitados de *L. casei*, *L.c. rhamnosus*, *L. acidophilus* y *L. plantarum* usando 10 cm de longitud de la membrana (spectrapor[®] membrane tubing por*2 Cat.D1614-11), se humedeció con agua destilada y por un extremo se ató. En el interior del tubo se agregaron 5 mL de la solución de proteína resuspendida y en el otro extremo se ligó, para evitar la salida de las proteínas. Posteriormente, la membrana de diálisis se introdujo en un matraz

erlenmeyer de 500 mL que contenía agua bidestilada y se dejó en agitación por 24, con cambios de agua bidestilada cada 6 h. Terminada la diálisis, se extrajo la membrana del interior del matraz y el contenido se adicionó a un tubo cónico de 15 mL y se guardó para su posterior uso en los bioensayos. Al dializado se le realizó la prueba de Biuret, antes descrito.

h) Caracterización de proteínas por la técnica de electroforesis de Laemmli 1970.

- Preparación de geles de poliacrilamida: Se realizó la electroforesis de proteínas al medio condicionado con sacarosa al 0.5% de *Lactobacillus acidophilus*, control de glucosa al 2% de *Lactobacillus acidophilus* y el medio sin crecimiento de bacterias, después de la precipitación de las biomoléculas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80% de saturación en un sistema discontinuo desnaturizante. Este sistema está conformado por dos geles de poliacrilamida: el gel concentrador y el gel separador, que presentan diferente concentración, composición y pH.
- Preparación del gel separador: Se preparó un volumen de 9.936 mL para la fase separadora del gel. En un vaso de precipitado de 20 mL se adicionaron 4.06 mL de agua tridestilada estéril, 3.21 mL de un solución stock de acrilamida/bisacrilamida al 30% de la casa comercial de Bio Rad, 2.5 mL de Tris en HCl con un pH de 8.8, 0.1 mL de SDS al 10%, las sustancias fueron mezcladas para homogenizarse, posteriormente se agregó 0.05 mL de PSA al 10% y 0.016 mL de TEMED, se mezcló y la mezcla se agregó con una jeringa de 3 mL, entre las placas de vidrios previamente montados. Se marcó el límite hasta donde la matriz de acrilamida fue vertida, se trazó una línea horizontal en el vidrio con un marcador indeleble. Para saber la ubicación exacta de la línea, se colocó el peine entre ambos vidrios y se midió entre uno y cinco centímetros (dependiendo del tamaño de la cámara) por debajo de los dientes del peine.

Se dejó polimerizar a temperatura ambiente por 15 a 30 minutos, usando como control de polimerización la solución de poliacrilamida remanente. Una vez formado el gel, se lavó la parte superior del gel varias veces con agua destilada hasta eliminar completamente los restos de acrilamida no polimerizada.

- Preparación del gel concentrador: Se mezclaron 6.1 mL de agua tridestilada estéril, 1.3 mL de una solución stock de acrilamida/bisacrilamida al 30% de la casa comercial de Bio Rad, 2.5 mL TRIS en HCl con un pH de 6.8, 0.1 mL de SDS al 10%, las soluciones se mezclaron en un vaso de precipitados de 20 mL, para homogenizar la mezcla. Posteriormente se adicionaron los catalizadores, 0.050 mL de PSA al 10% y 0.016 mL de TEMED, se homogenizó y se vertieron entre las placas de vidrio con una jeringa de 3 mL, agregándolo arriba del gel separador. Inmediatamente después, se colocó el peine entre ambos vidrios secando con papel toalla los restos de poliacrilamida que lleguen a derramarse. Se dejó polimerizar la poliacrilamida a temperatura ambiente por 15 a 30 min usando como control de la polimerización la solución de poliacrilamida que quedó remanente en el vaso. Una vez formado el gel, se retiró el peine cuidadosamente y se lavaron todos los pocillos ya formados con chorro suave de agua destilada.
- Coloración y visualización de las bandas de proteínas empleando azul brillante de Azul de Coomasie R-250. Terminado el tiempo de corrimiento, el gel de poliacrilamida se colocó en un recipiente de plástico de 15x15x5 cm y se agregó una solución de azul brillante de Coomasie en un volumen que cubrió completamente el gel. Se dejó incubar por 15-20 minutos en un aparato orbital para generar movimientos rotatorios.
- Decoloración del gel de poliacriamida: El gel de poliacrilamida teñido se colocó en un recipiente de plástico de 15x15x5 cm y se adicionó una solución preparada al 7% metanol y 5% ácido acético, en un volumen que cubrió completamente el gel. Se dejó incubar por 30 minutos en un aparato orbital para generar movimientos

rotatorios. Pasado el tiempo de incubación, la solución se eliminó y se adicionó la misma cantidad de volumen para apreciar las bandas proteicas. Posteriormente, el gel se dejó incubar por 12 horas con movimientos circulares constantes y se observó en un transiluminador (Transilluminator 3uVP KodaK Edas 290), que permitió la toma de la fotografía y el análisis se realizó con el programa computacional Kodak 1D Image Analysis Software.

7.8 Ácidos grasos de MC

- a) El contenido de ácidos grasos presentes en los medios condicionados de cada cepa se realizó en un laboratorio con acreditación EMA (Entidad Mexicana de Acreditación) de acuerdo con la NOM-086-SSA1-1994.
- b) Prueba de Insaturaciones: Se tomó 1 mL de los MCLa, MCLcr, MCLp y MCLc y se agregó a un tubo de borosilicato de 13x100, posteriormente se le adicionó 1 mL de agua, se agitó la mezcla para homogenizarla, pasado el proceso, se añadieron 3 gotas del KMnO₄ al 2%. La prueba se consideró positiva si en menos de 1 min se observa un precipitado de color café (VER Tabla 6).

7.9 Bioensayos

- Proteínas totales precipitadas con (NH₄)₂SO₄ al 80% de Saturación sobre el crecimiento de *Entamoeba histolytica*. Se cuantificó la cantidad de proteína precipitada, (presente en 200 mL de medio condicionado de las cepas de *L. casei*, *L.c. rhamnosus*, *L. acidophilus* y *L. plantarum*,) tanto para la fuente de carbono seleccionada, así como, para el control de glucosa al 2%. Se usaron 0.3 gramos de proteína precipitada y se disolvieron en 1 mL de MPT, para una solución stock al 30%. De la solución stock se tomó 0.330 mL que se adicionaron a un tubo de borosilicato de 13x100 que contenía 5 mL de medio MPT, 0.55 mL suero-antibiótico, los tubos del bioensayo se incubaron por 72h a 37°C. Posteriormente se realizó el conteo de las células empleando una cámara de Neubauer.

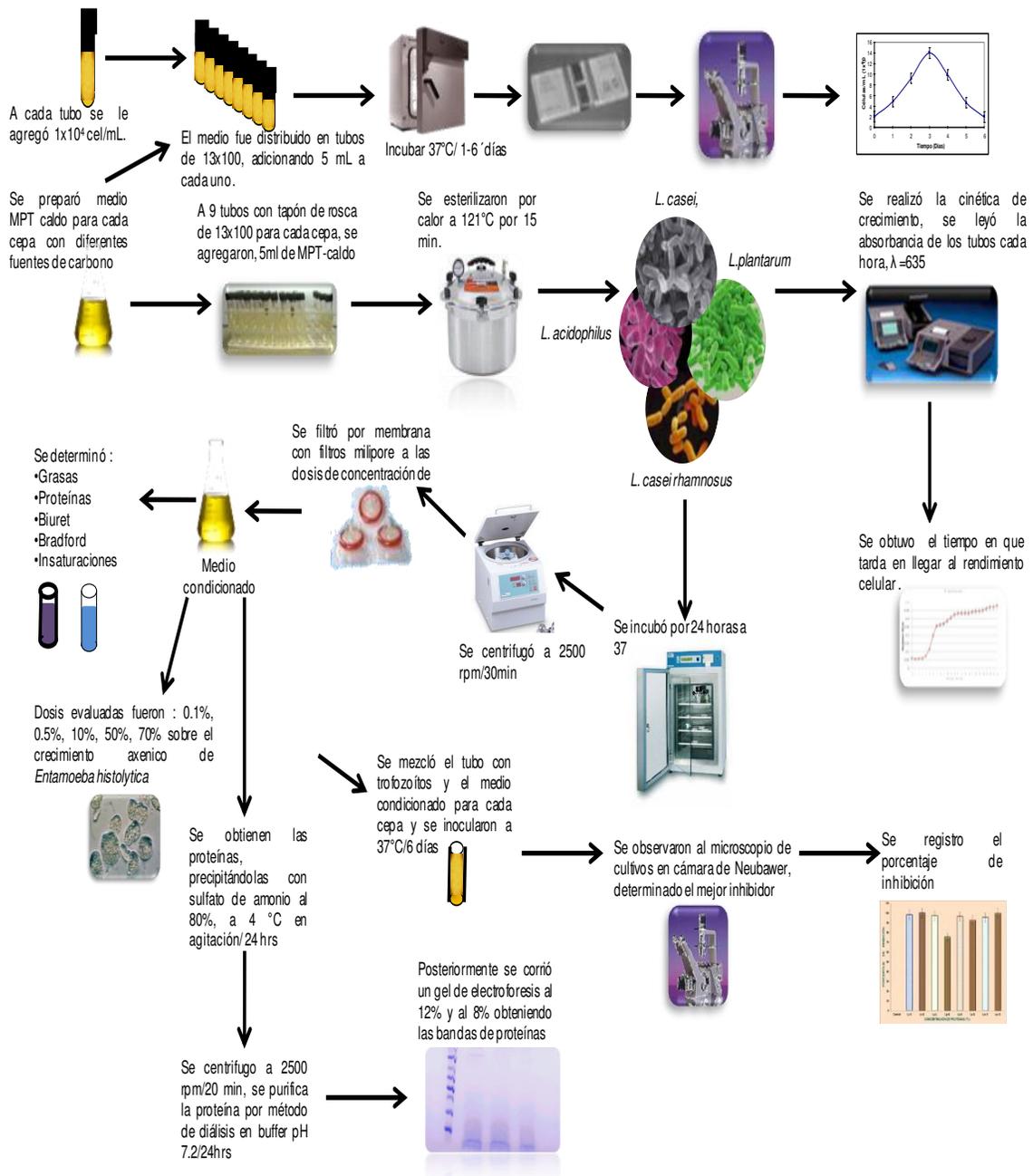


Diagrama de Flujo de la parte experimental (Diseño propio)

Tabla 6
Relación de análisis realizados al MCL

		<i>Lactobacillus casei</i> *									
		Control	Sacarosa			Lactosa			Fructosa		
			0.1 %	1 %	10 %	0.1 %	1 %	10 %	0.1 %	1 %	10 %
IA de MCL	IA del MC sobre <i>E. histolytica</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Proteínas	Biuret	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Bradford	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	NMX-F-608 - NORMEX-2002	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ al 80% de saturación	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Nanodrop	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Termoresistencia	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	IA del MC sobre <i>E. histolytica</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Caracterización	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ácidos grasos	Pruebas coloridas	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	NOM-086-SSA1-1994	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Acidez	El Índice de acidez total por la técnica de la AOAC	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	por potenciómetro	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Carbohidratos residuales	Prueba de Molish	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

IA: Interferencia amibiana

**L. acidophilus* o *L. casei rhamnosus* o *L. plantarum*.

8. RESULTADOS

8.1 Probióticos

a) **Cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas:** En este estudio se trabajaron cuatro cepas del género *Lactobacillus*: *Lactobacillus casei* (Lc), *Lactobacillus acidophilus* (La), *Lactobacillus plantarum* (Lp) y *Lactobacillus casei rhamnosus* (Lcr), consideradas bacterias ácido-lácticas (BAL). Se realizaron cinéticas de crecimiento de las BAL en: lactosa, sacarosa y fructosa, observando el crecimiento celular y se identificaron las fases de cada cinética.

Lactobacillus casei

La figura 13 muestra la cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei*, la cual se realizó por un tiempo de 15 horas; posterior a este tiempo, se observa que en el medio enriquecido con fructosa al 1.0, 2.0%; lactosa 0.1% y glucosa 2.0% se presenta la fase estacionaria, así como también en lactosa 2.0%, fructosa 0.5%, sacarosa 0.5, 1.0 y 2.0%, pero esta etapa se presenta en menos de 11 horas. *Lactobacillus casei* en las fuentes de carbono con sacarosa y fructosa al 0.1% y lactosa al 0.5 y 1.0% presentó la fase de muerte. La cepa exhibe un mayor rendimiento en el medio MPT adicionado con sacarosa al 2.0%, al obtener 1.7037 de absorbancia, a las 9 h de incubación. En el control, medio MPT con Glucosa al 2.0%, a las 9 horas de incubación, se presentó una absorbancia de 1.4218, generando menor rendimiento celular.

Los resultados que se muestran en la figura 14, son las absorbancias obtenidas a las nueve horas de incubación de las fuentes de carbono evaluadas y sus concentraciones, demostrando que *L. casei* tiene facilidad para consumir sacarosa, exhibiendo una diferencia significativa con respecto a fructosa y lactosa.

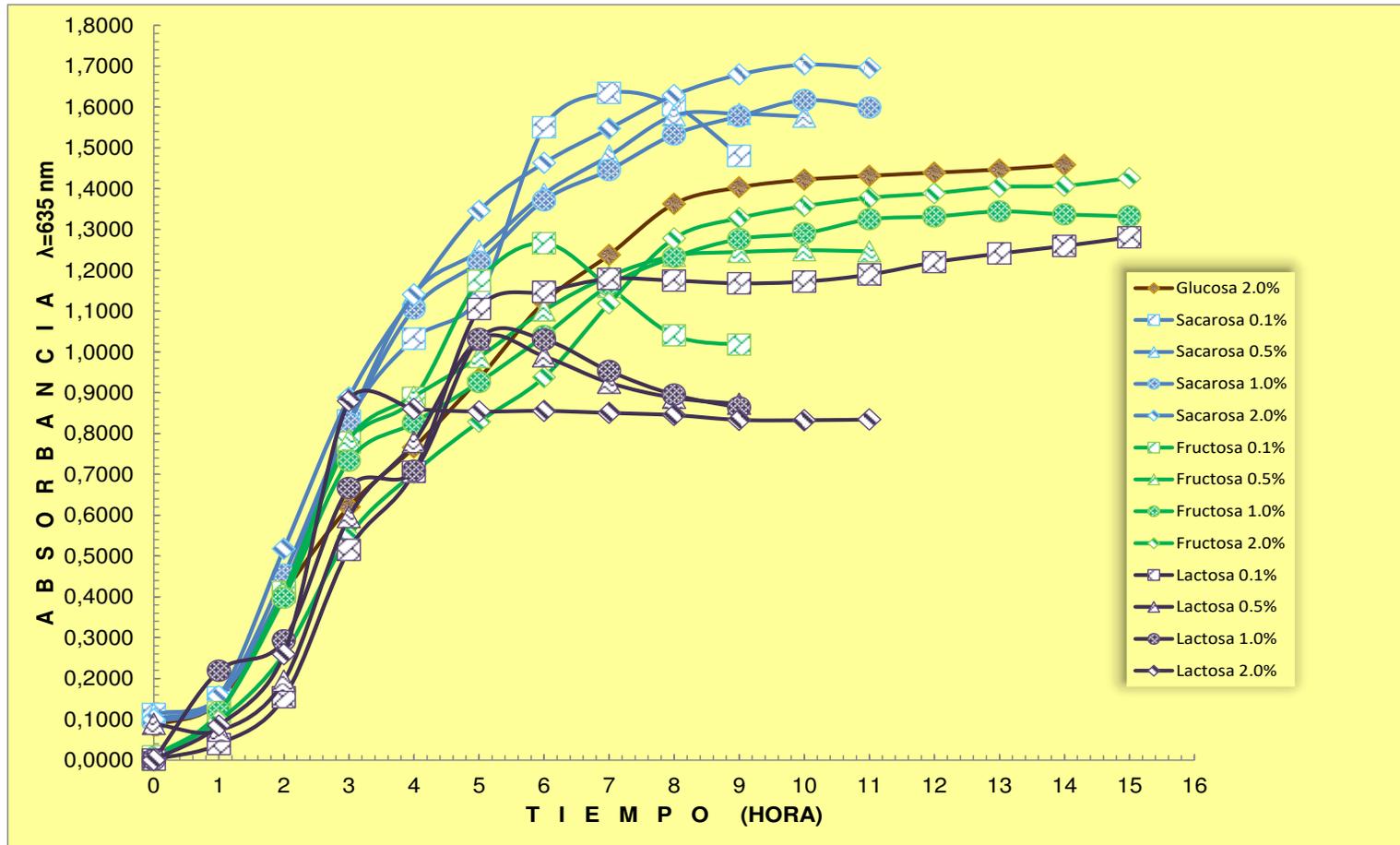


Fig.13 Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei* con diferentes fuentes de carbono y diferentes concentraciones (n=3), tomando como referencia glucosa 2% (control).

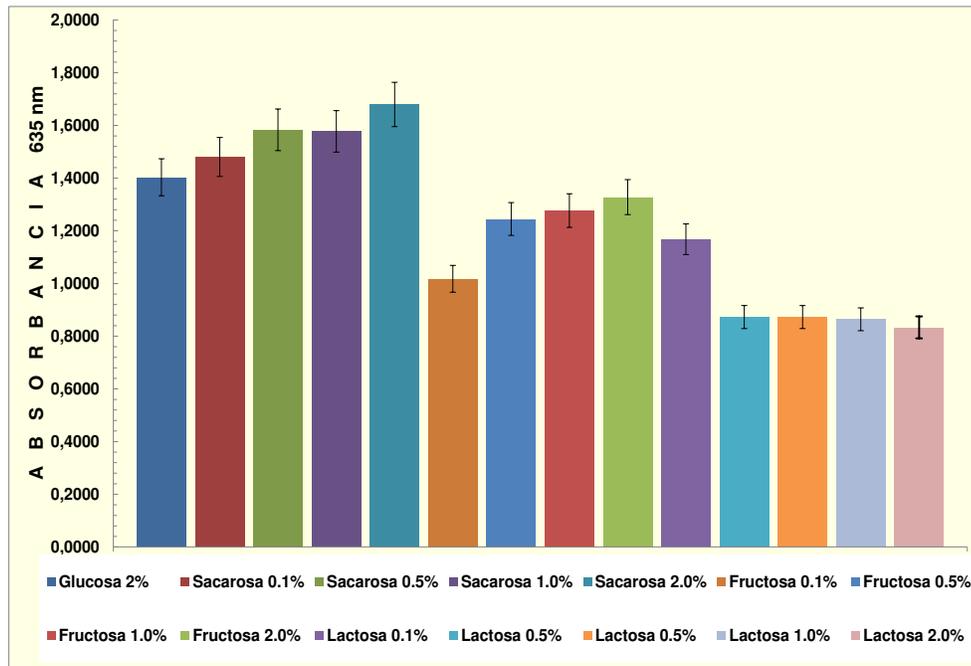


Fig. 14. Comparación del crecimiento de *L. casei* a las 9 h de incubación, de las 4 fuentes de carbono.

En la figura 15 se presenta el análisis del rendimiento celular de *L. casei* en glucosa y sacarosa al 2% a las nueve horas, debido a que es donde se adquiere el mayor rendimiento en ambos azúcares, observando que existe diferencia significativa con $p=0.5\%$, entre el control y la fuente de carbono elegida.

Lactobacillus plantarum

La cinética de *L. plantarum* se realizó por un tiempo de 11 horas, observando que después de las 8 horas, en algunos tratamientos presentaba la fase estacionaria, como: lactosa 0.1, 0.5, 1.0%; sacarosa 0.5, 1.0, 2.0%; fructosa 2.0% y glucosa 2.0%. En el ensayo de lactosa al 2.0% la fase de muerte se observó a las 6 horas, así como, sacarosa 0.1%, fructosa 0.1, 0.5 y 1.0%. Estos resultados se muestran en la figura 16.

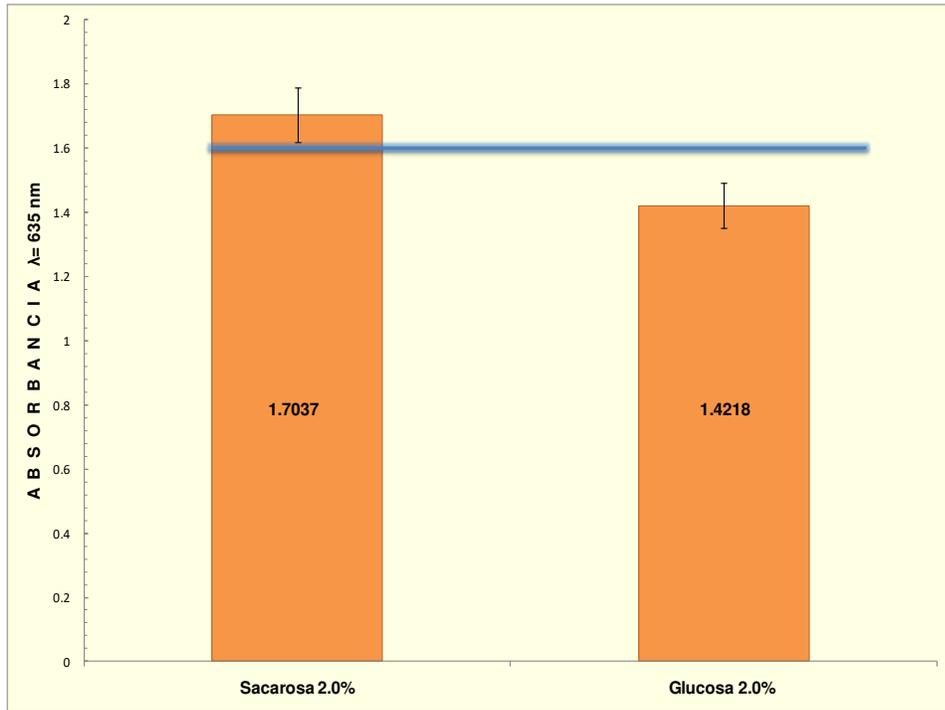


Fig. 15. Comparación del crecimiento en el cultivo de *L. casei* en presencia de sacarosa y glucosa al 2%.

En la figura 17 se muestran las absorbancias obtenidas al incubar a *L. plantarum* en las cuatro fuentes de carbono a las 9 horas de incubación, debido a que la cepa en glucosa al 2% muestra a este tiempo el mayor crecimiento celular. Se observa gráficamente que no existe diferencia significativa entre sacarosa al 1.0% y lactosa 0.1%, pero esta última registra el uso de menor cantidad de azúcar que sacarosa.

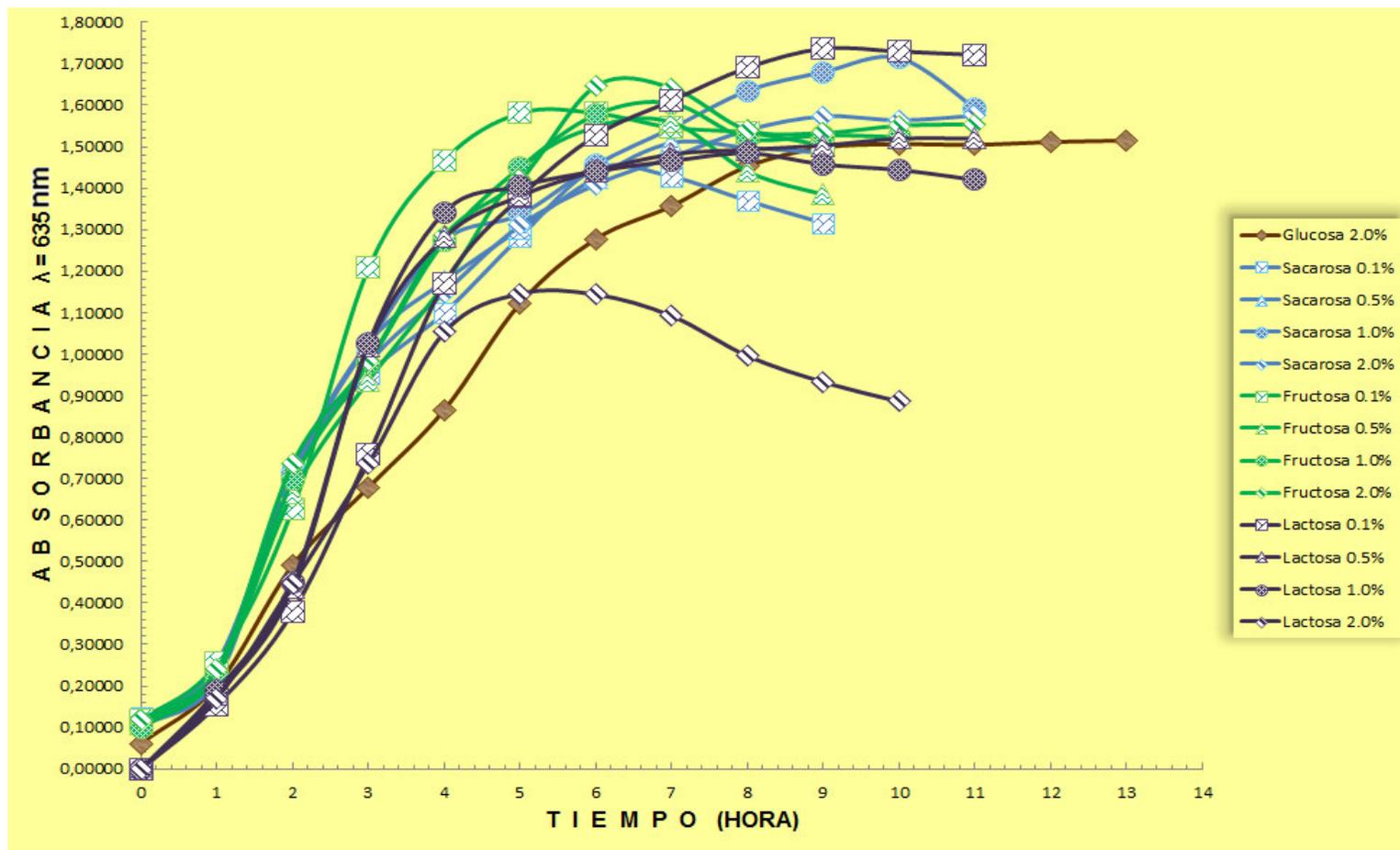


Fig. 16 Cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, con diferentes fuentes de carbono y diferentes concentraciones (n=3), tomando como referencia glucosa 2% (control).

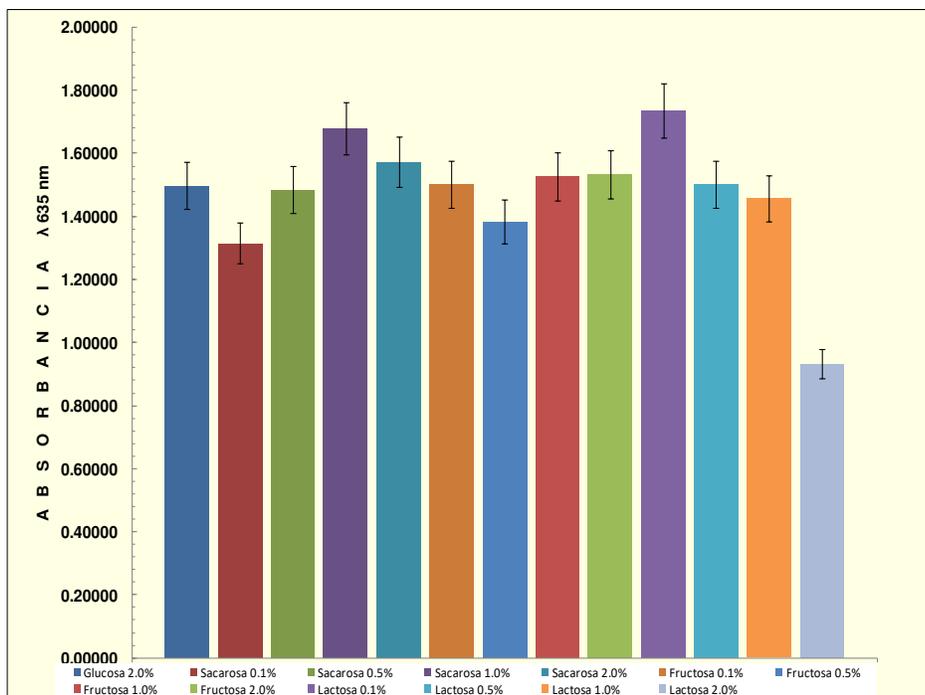


Fig. 17. Comparación del crecimiento de *L. plantarum* a las 9 horas de incubación, de las 4 fuentes de carbono.

En la curva de crecimiento de *L. plantarum* a las 10 h se observa mayor absorbancia en presencia de sacarosa 1.0 y 2.0%, determinando un rendimiento celular de 1.57314 y 1.71386 respectivamente, pero esta BAL desarrolló mayor rendimiento celular en lactosa 0.1%, al estimar una absorbancia de 1.73640 a las 9 horas de incubación. En glucosa al 2.0%, se presentó una absorbancia 1.49800, a las 9 horas de incubación y al termino del ensayo, no exhibió mayor crecimiento celular (Fig. 18).

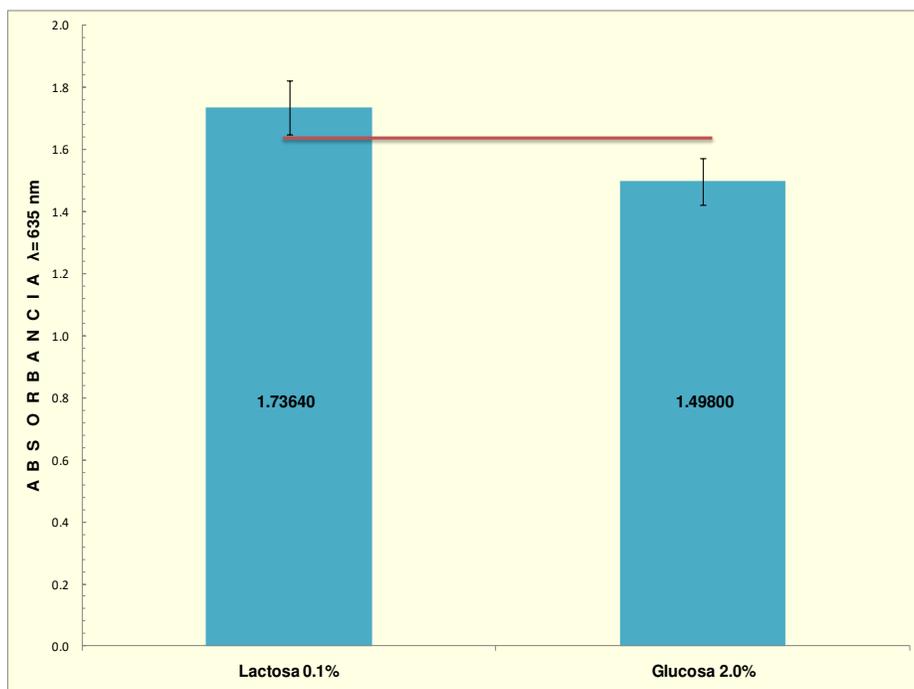


Fig. 18. Comparación del crecimiento de *L. plantarum* en presencia de lactosa 0.1% y glucosa al 2%.

Lactobacillus acidophilus

Se incubó por un período de 13 h. En todos los tratamientos de las fuentes de carbono se observó la fase estacionaria, aproximadamente a las 7 h. de incubación. En ningún tratamiento se exhibe la fase de muerte. Los datos se muestran en la figura 19.

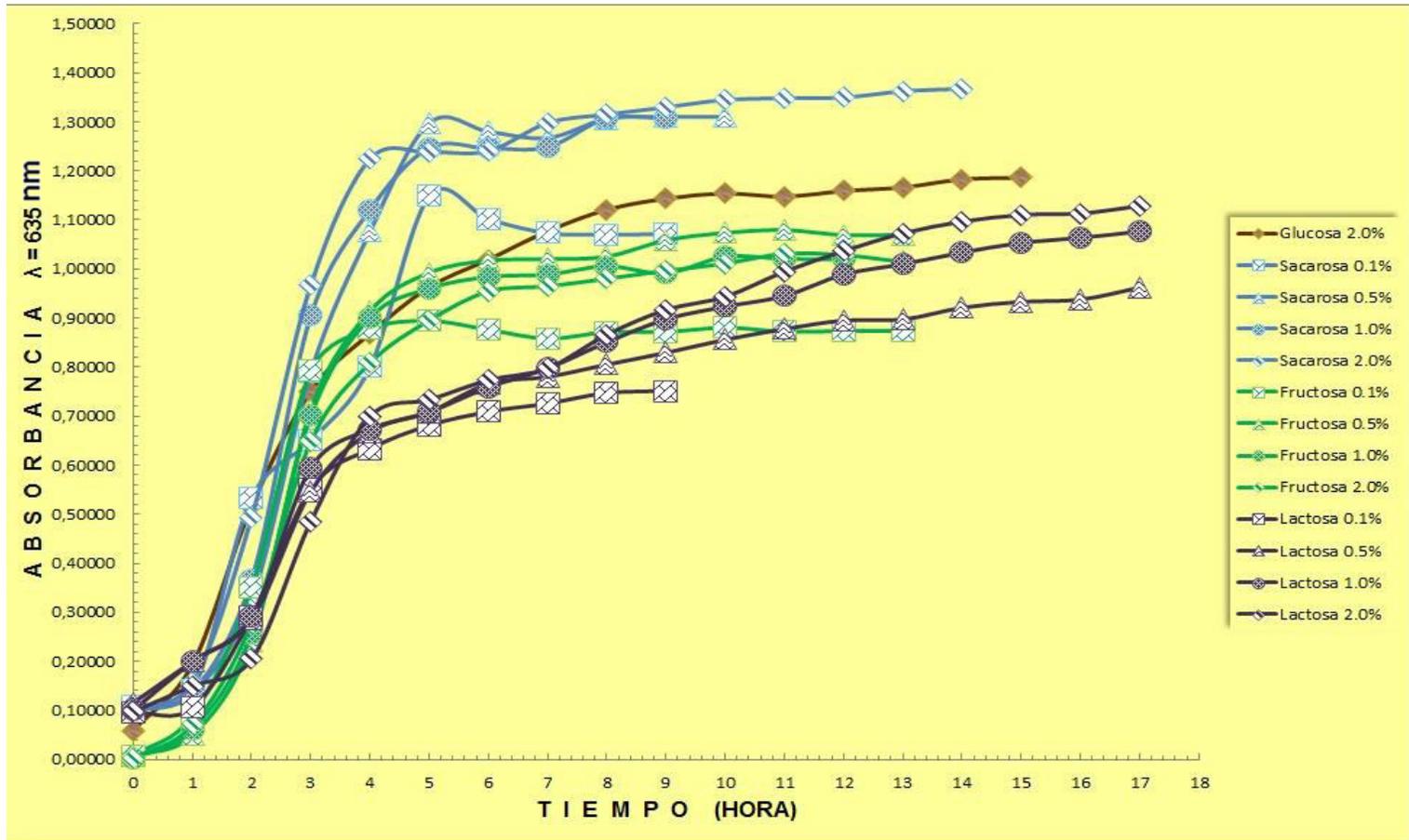


Fig.19 Cinética de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*, con diferentes fuentes de carbono y diferentes concentraciones (n=3), tomando como referencia glucosa 2% (control).

Las absorbancias registradas por *L. acidophilus* a las nueve horas, fueron analizadas, observando que no existe diferencia significativa con una $p = 0.5\%$, entre las concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 % de sacarosa, pero hay diferencia significativa con el control, glucosa 2.0%. Los resultados se muestran en la figura 20.

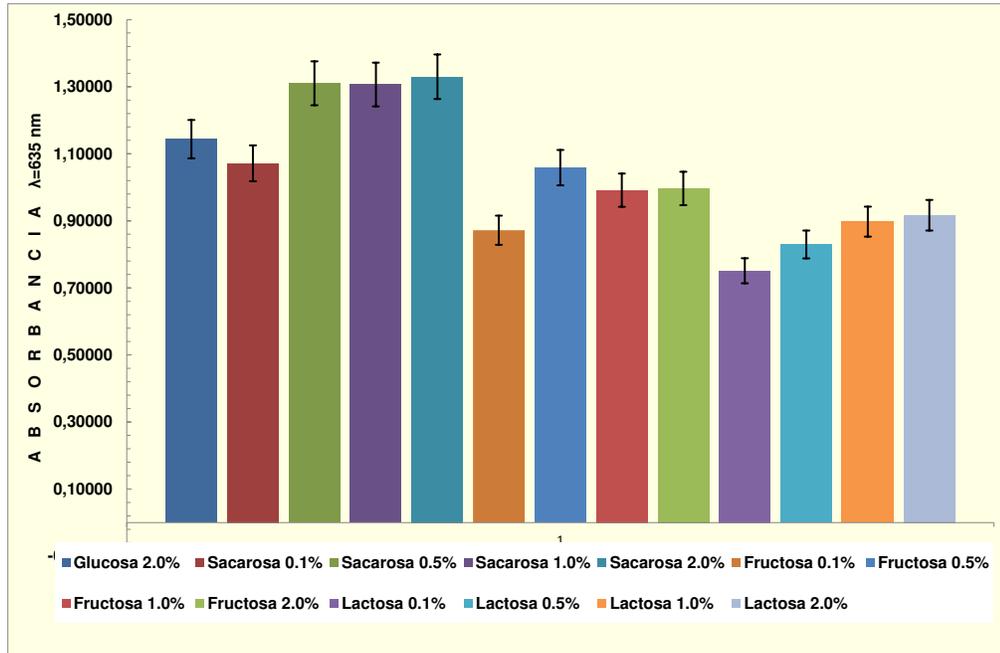


Fig. 20. Comparación del crecimiento de *L. acidophilus* a las 9 horas de incubación, de las 4 fuentes de carbono.

En la figura 21 se observa que existe diferencia significativa con $p \leq 0.5\%$ entre la sacarosa al 0.5 % que presenta una absorbancia de 1.31 a las 9 horas incubación y la glucosa al 2.0% a las 10 horas de inoculado la BAL con una absorbancia del 1.1538, demostrando que la fuente de carbono elegida genera un mayor rendimiento celular.

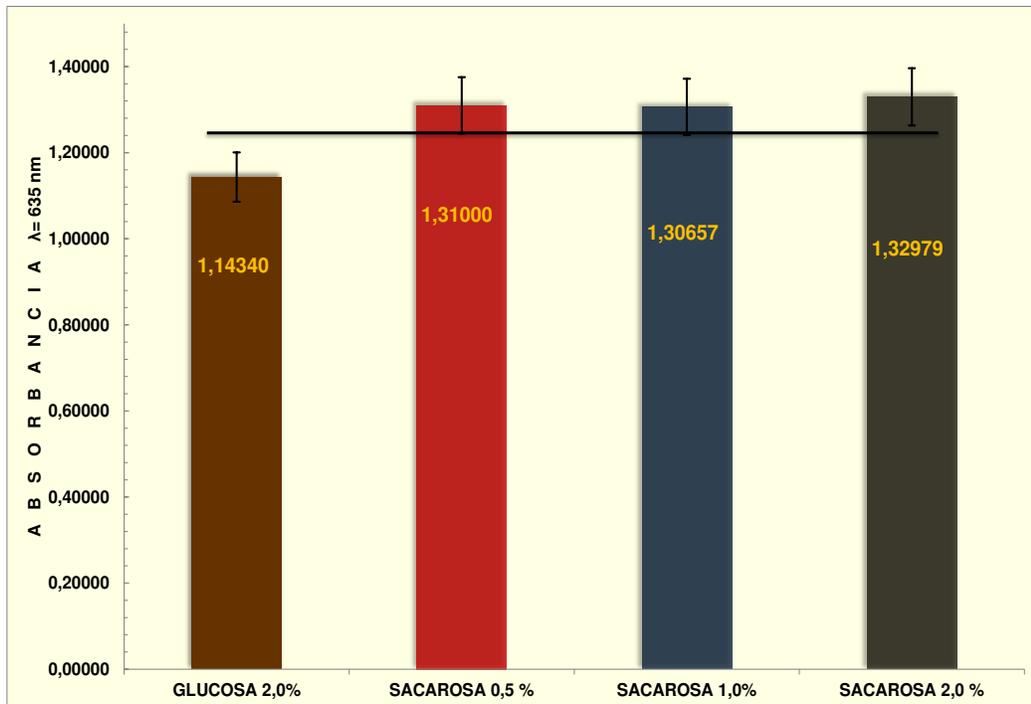


Fig. 21. Comparación del crecimiento de *acidophilus* en presencia de sacarosa 0.5, 1.0, 2.0% y glucosa al 2%.

En lactosa al 0.1% inoculado con *Lactobacillus acidophilus* se observó un menor rendimiento celular, alcanzando su máxima absorbancia a 0.75100 a las 9 h.

Lactobacillus casei rhamnosus

El tiempo de incubación para *Lactobacillus casei rhamnosus* fue de 17 horas, como se muestra en la figura 22. Los ensayos con lactosa y fructosa en sus 4 concentraciones presentaron la fase estacionaria después de las 8 horas, obteniendo una absorbancia de 1.50979

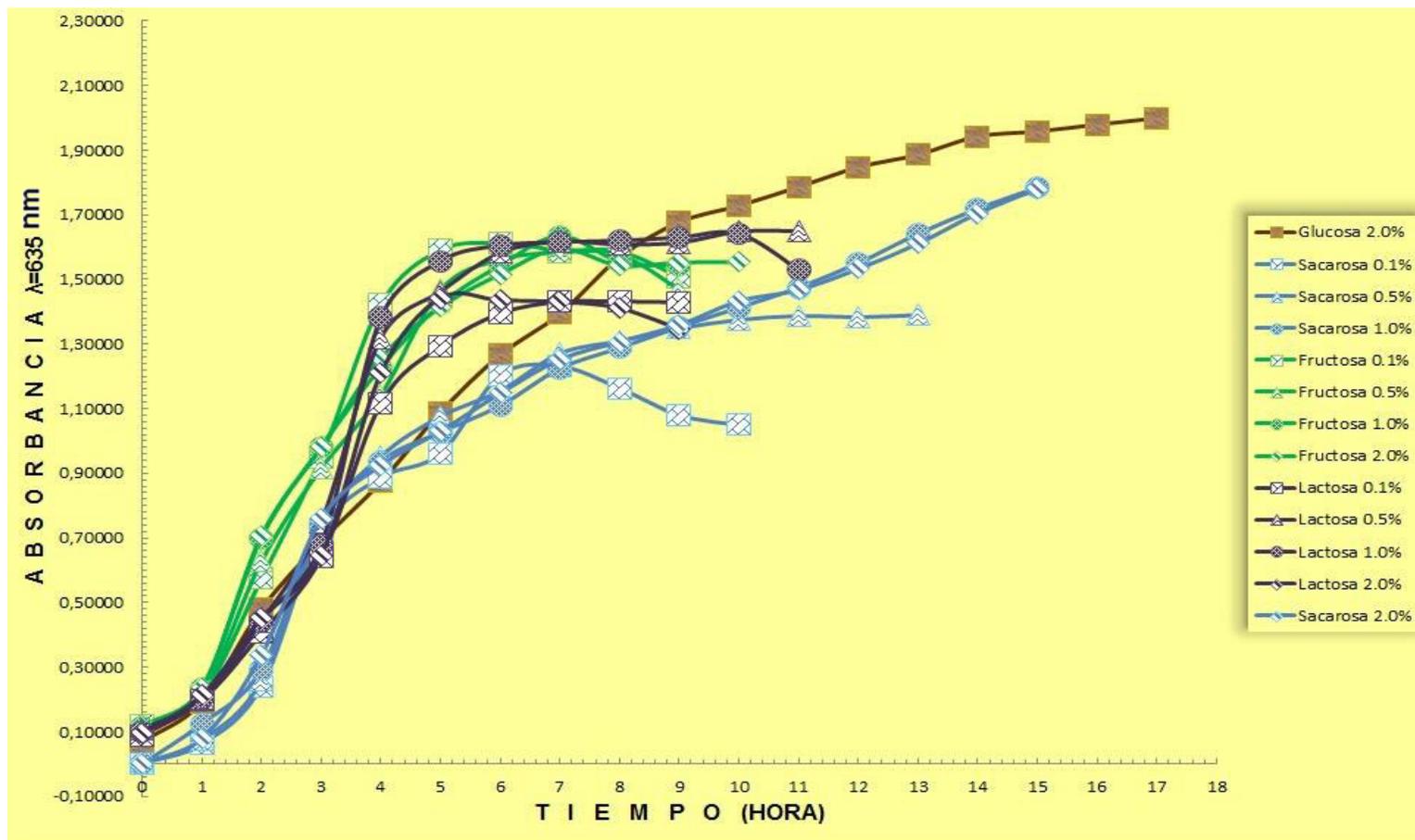


Fig.22 Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei rhamnosus*, con diferentes fuentes de carbono y diferentes concentraciones (n=3), tomando como referencia glucosa 2% (control).

En la figura 23 se analizó las fuentes de carbono a nueve horas de incubación, observando que glucosa al 2.0% presenta la mayor absorbancia, la lactosa 0.5 y 1.0%, fructosa 0.1, 1.0 y 2.0%, con respecto al control no hay diferencia significativa con $p=0.5\%$. Las sacarosas en sus 4 concentraciones tienen diferencia significativa, al comparar con la glucosa al 2.0%.

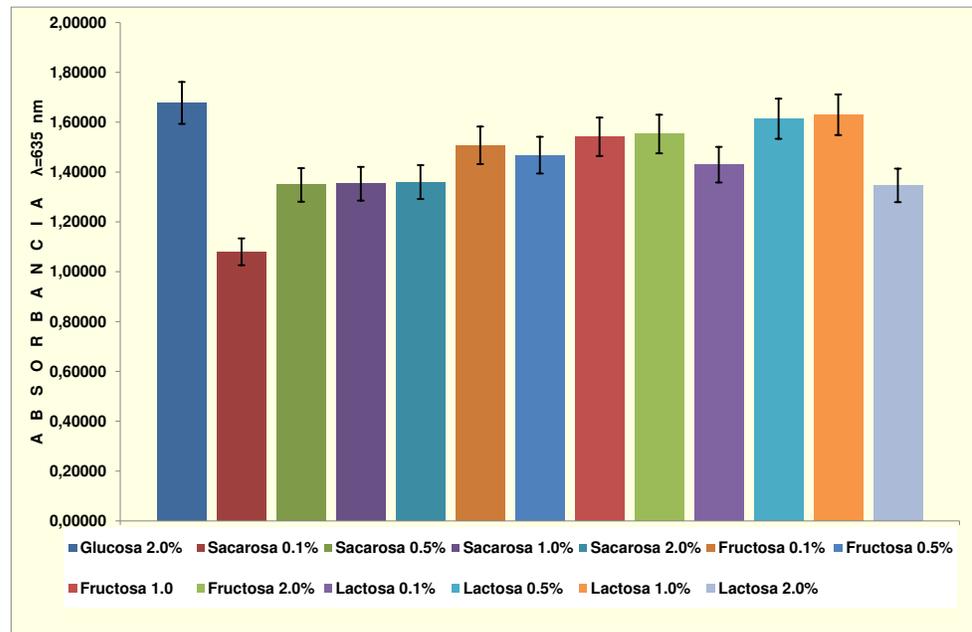


Fig. 23. Comparación del crecimiento *L. casei rhamnosus* en presencia de sacarosa 0.5, 1.0, 2.0% y glucosa al 2%.

En la curva de *L. casei rhamnosus* (Fig. 22) se observa que el control de glucosa al 2.0% muestra la fase exponencial, después de incubar por 17 horas. En sacarosa al 1.0 y 2.0% presentó la misma tendencia, a las 15 horas, con una absorbancia de 1.78.

En el análisis estadístico de sacarosa al 1.0% y glucosa al 2.0 del cultivo de *L. casei rhamnosus* se observa diferencia significativa con $p \leq 0.5\%$, determinando que existe mayor crecimiento celular en glucosa (Fig. 24). En la fig. 22 se observa que la sacarosa al 1.0% y glucosa al 2.0% presentan un desarrollo idéntico, ya que a las 15 horas de incubación en ambas fuentes de carbono la bacteria sigue

crecimiento, mostrando incrementos en la absorbancia, lo que indica que sacarosa, presenta una buena fuente de carbono para el microorganismo.

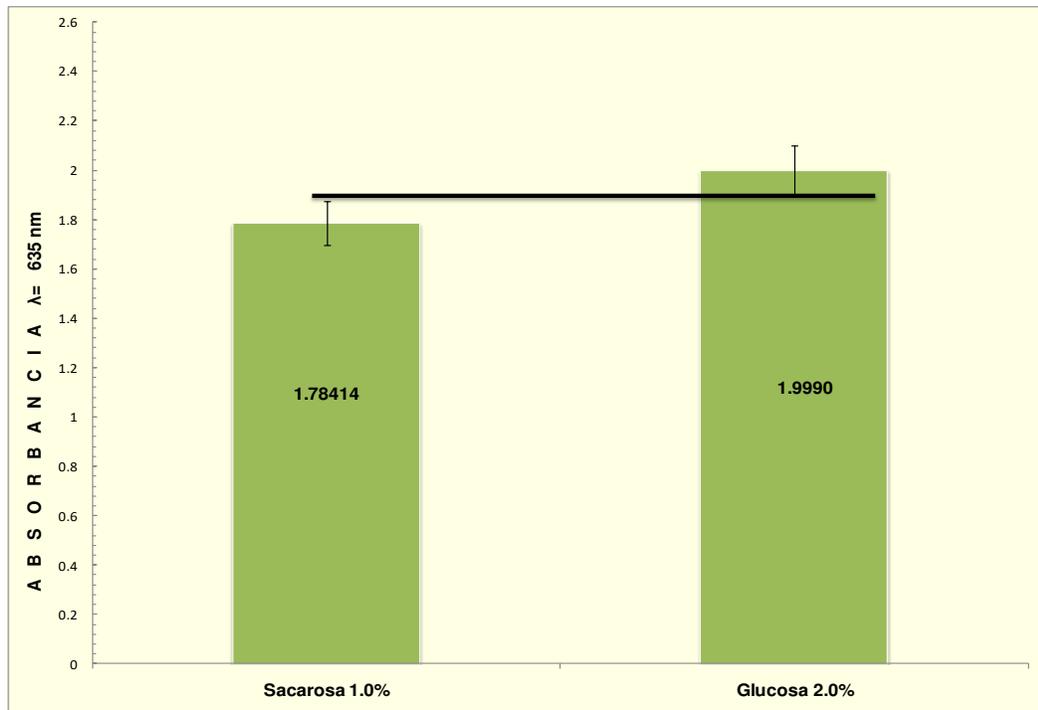


Fig. 24. Comparación del crecimiento de *L. casei rhamnosus* en presencia de sacarosa 1.0% y glucosa al 2%.

En la Tabla 7 se presentan las 4 cepas de probiótico, el azúcar que presentó la mayor absorbancia y su comparación con glucosa como control, así como la concentración. A partir de estos resultados, los experimentos posteriores se trabajaron bajo estas condiciones.

Tabla 7

Probióticos y fuente de carbono seleccionada

Cepa	Fuente de carbono	Concentración (m/v) (%)	Absorbancia
<i>L. casei</i>	Sacarosa	2.0	1.7037
	Glucosa	2.0	1.4218
<i>L. plantarum</i>	Lactosa	0.1	1.73640
	Glucosa	2.0	1.49800
<i>L. acidophilus</i>	Sacarosa	0.5	1.31000
	Glucosa	2.0	1.15380
<i>L. casei rhamnosus</i>	Sacarosa	1.0	1.78414
	Glucosa	2.0	1.99900

8.2 Cinética de crecimiento de *E. histolytica*

En la figura 25, se observa el crecimiento de *E. histolytica*, los datos reflejan las fases de adaptación, exponencial y de muerte, por lo cual no exhibe la etapa estacionaria y desciende drásticamente el número de células, de 95,416 a 19,100 cél/mL, después del sexto día de incubación. La fase de adaptación se desarrolla desde el día cero hasta el segundo día de incubación, alcanzando 7,083 cél/mL., se observa claramente que después de las 50 h de incubación se inicia la etapa exponencial, la cual termina en el sexto día. Durante este tiempo, se exhibe un incremento del número de células, de 18,750 hasta 95,416 cel/mL. en el sexto día y al séptimo día se observa un descenso muy marcado.

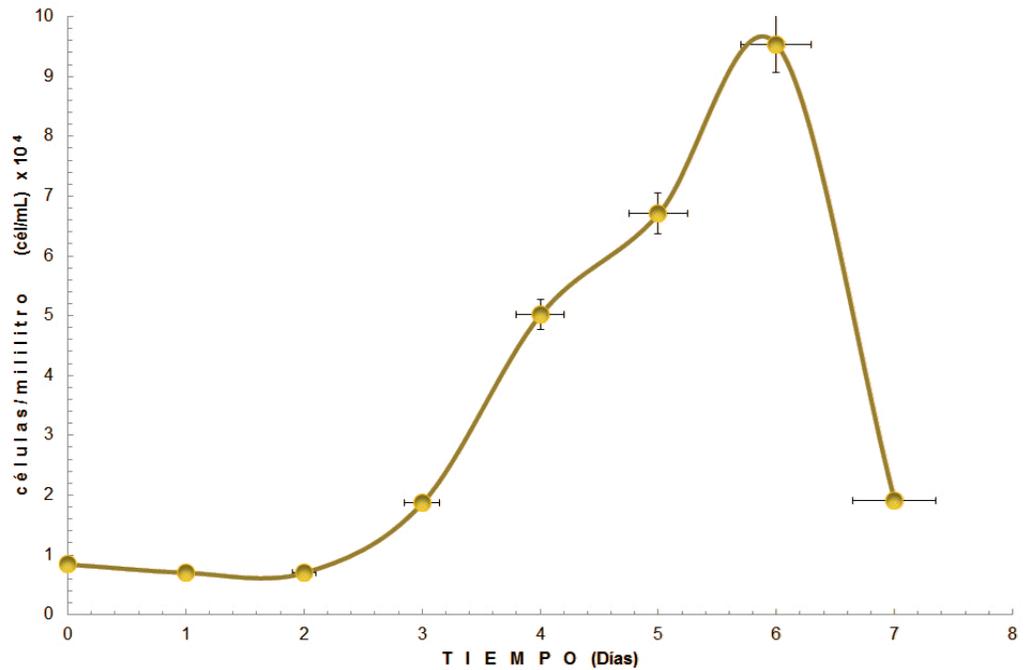


Fig. 25. Cinética de crecimiento de *E. histolytica*.

8.3 Actividad biológica del MCL sobre *E. histolytica*

Los medios condicionados de *L.casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *L. casei rhamnosus*, con la fuente de carbono, la concentración elegida (Tabla 7) y el control se evaluaron sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* al sexto día de incubación, con dosis de 0.1, 1.0, 10.0, 50.0 y 70.0% del medio condicionado. Los bioensayos se observaron al microscopio invertido, para determinar la presencia o ausencia de trofozoítos de *E. histolytica* y se realizaron observaciones morfológicas de *E. histolytica*. En el control se observó un cultivo homogéneo, no se presentaron células redondeadas, los trofozoítos tenían un aspecto pleomórfico y exhibieron movimiento. Al realizar las observaciones de los tubos adicionados con el medio condicionado, se presentaron células móviles, pequeñas, redondeadas, agrupadas y detritus celulares. En las dosis bajas se observó que los trofozoítos se presentaban en red y adheridos en el fondo del tubo.

Las dosis de los medios condicionados de 50 y 70%, presentaron el 100% de inhibición de los trofozoítos de *E. histolytica*, al observar los tubos al microscopio invertido, sólo se presentaron células redondeadas, los datos no se graficaron en la figura 26. Las dosis de 0.1, 1.0 y 10% evaluadas sobre *E. histolytica* exhibieron porcentajes de inhibición menor al 100%. La figura 26 presenta los resultados de inhibición de *E. histolytica*, y se hace destacar que *L. acidophilus*-sacarosa a la dosis de 0.1%; *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *L. casei rhamnosus*- glucosa a la dosis de 1.0% presentaron 98.66% de inhibición. *L. casei*-glucosa 0.1% exhibió 16.52%, demostrando el porcentaje de inhibición más bajo y que no presenta diferencia significativa $p=0.5\%$, con los tratamientos restantes. *Lp* lactosa 1.0% presenta 36.61% de inhibición y *Lcr* glucosa 0.1% exhibe 43.31%, el análisis de los datos, muestra que existe diferencia significativa con $p=0.5\%$, entre los dos tratamientos. *Lc* sacarosa 1.0%, inhibió 68.53% a *E. histolytica*, *Lc* glucosa y *La* sacarosa al 10% exhibieron 72.77 y 73.21% de inhibición, demostrando que no existe diferencia significativa entre estos tratamientos con $p=0.5\%$. *Lp* lactosa y *Lp* glucosa al 10%, no presentaron diferencia significativa en el porcentaje de inhibición, exhibiendo 79.46 y 84.82% de interferencia microbiana. Los tratamientos restantes presentaron interferencia microbiana arriba del 90% y el análisis estadístico muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con $p=0.5\%$.

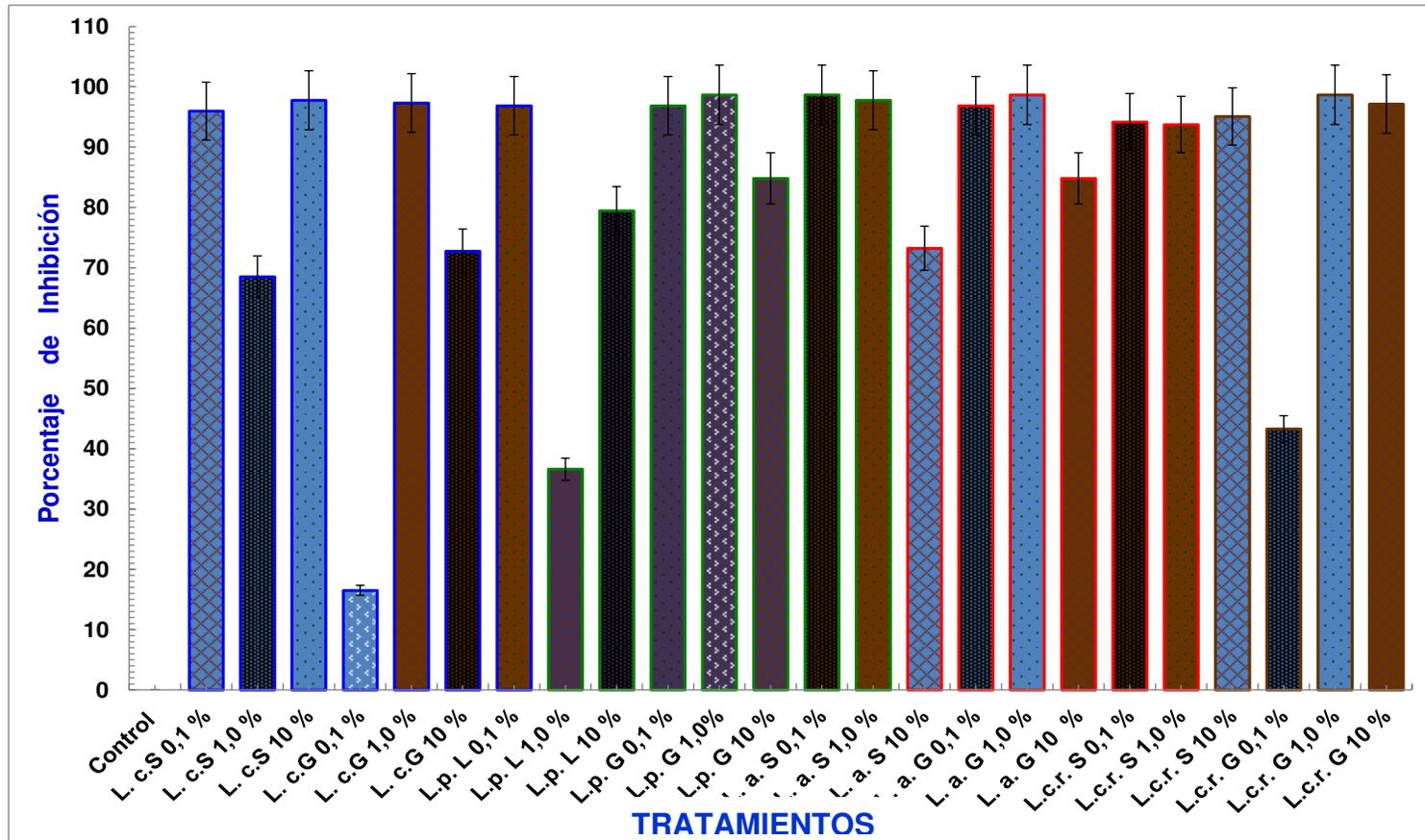


Fig. 26 Actividad Biológica de Medio Condicionado sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica*.

La Tabla 8 muestra el resumen de la interferencia microbiana exhibida por los medios condicionados de *Lactobacillus sp* (MCL), así como la desviación estándar entre la fuente óptima de carbono y el control (glucosa), a la misma dosis, indicada con un “Sí” o un “No”.

El medio condicionado de *L. casei* presentó interferencia microbiana (IM) sobre el crecimiento de *E. histolytica*, al evaluar las dosis de 0.1, 1.0, y 10 %, obteniendo un porcentaje de inhibición de 95.98, 68.53 y 97.77 (Fig. 27). En el MC con glucosa al 2% a las mismas dosis, la IM fue de 16.52, 97.32 y 72.77%, la inhibición en la dosis del 50%, fue total.

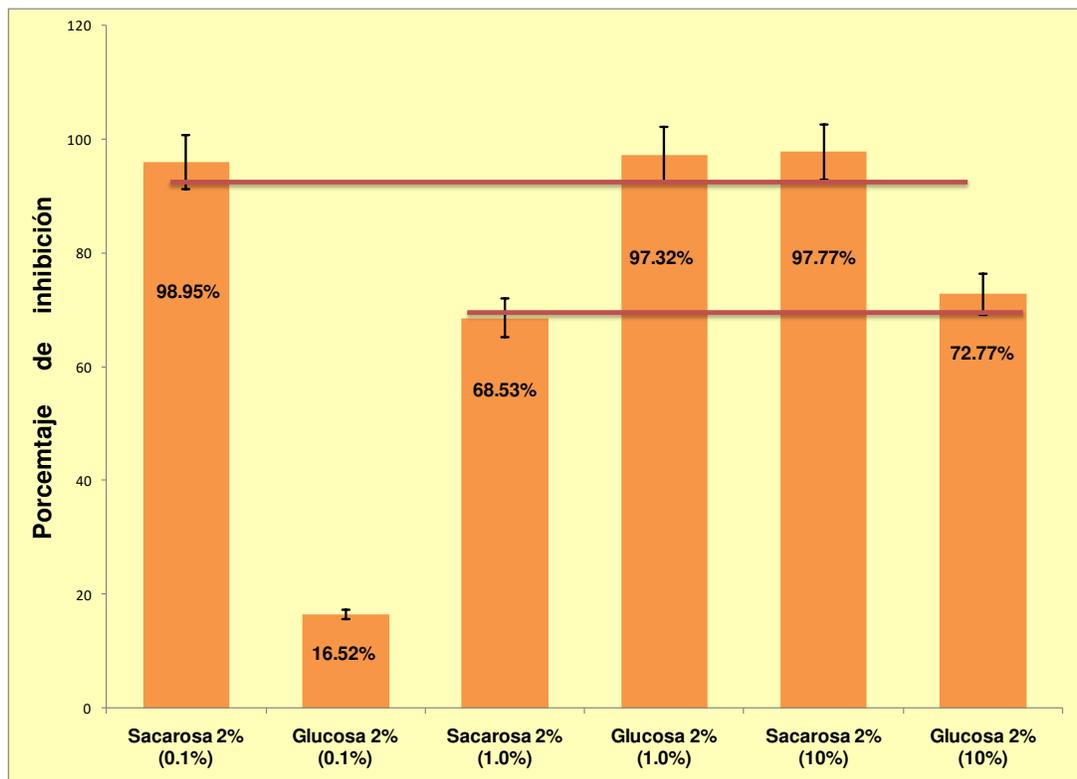


Fig. 27. Porcentaje de inhibición del MCLc sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica*. (p = 0.5)

Tabla 8

Concentración de resultados de la interferencia amibiana de los MC con *Lactobacillus sp* y la fuente óptima de carbono

Cepa	MC condicionado con:	Dosis (%)	Inhibición (%)	DS ±	
<i>L. casei</i>	Sacarosa[2%]	0.1	95.98	S .1 / G .1	Sí
		1.0	68.53		
		10.0	97.77	S 1 / G 1	Sí
	Glucosa[2%]	0.1	16.52		
		1.0	97.32		
		10.0	72.77		
<i>L. plantarum</i>	Lactosa [.1%]	0.1	96.88	L .1 / g .1	No
		1.0	36.61		
		10.0	79.46	L 1 / g 1	Sí
	Glucosa[2%]	0.1	96.88		
		1.0	98.66		
		10.0	84.82		
<i>L. acidophilus</i>	Sacarosa[.5%]	0.1	98.66	S .1 / g .1	No
		1.0	97.77		
		10.0	73.21	S 1 / g 1	No
	Glucosa [2%]	0.1	96.88		
		1.0	98.66		
		10.0	84.82		
<i>L.c. rhamnosus</i>	Sacarosa[1%]	0.1	94.20	S .1 / g .1	Sí
		1.0	93.75		
		10.0	95.09	S 1 / g 1	No
	Glucosa[2%]	0.1	43.31		
		1.0	98.66		
		10.0	97.14		

Los medios condicionados de *L. plantarum* exhibieron Interferencia Microbiana (IM). En las dosis de 0.1%, el MC con lactosa y glucosa presentó 96.88% de inhibición, en el tratamiento con 1.0%, en lactosa la IM fue de 36.61% y en glucosa 98.66% de actividad biológica y en la dosis de 10%, la lactosa presentó actividad amebicida de 79.46 % y en glucosa 84.82% (Fig. 28).

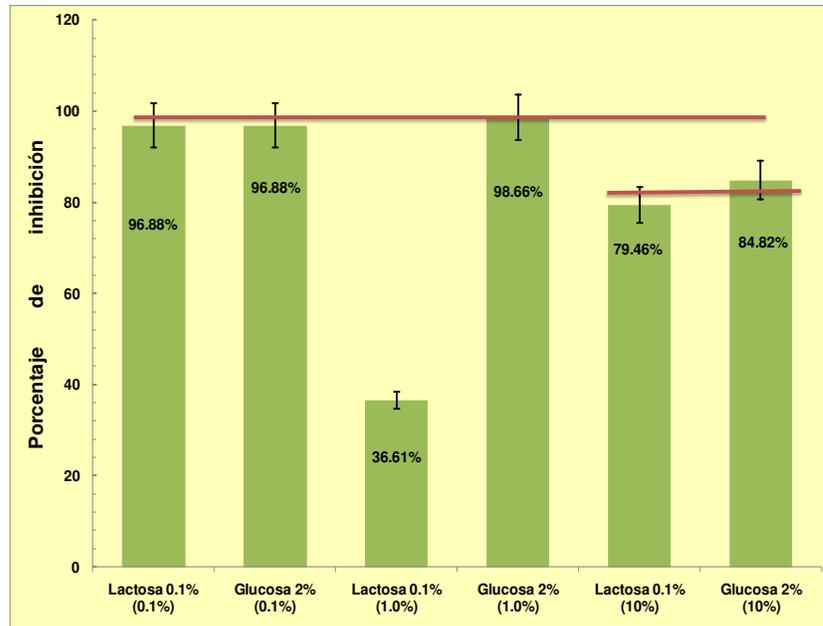


Fig. 28. Porcentaje de inhibición del MC de *Lp* sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* ($p = 0.5$).

El MC con sacarosa de *L. acidophilus* en las dosis 0.1, 1.0 y 10%, presentó los siguientes porcentajes de inhibición: 98.66, 97.77 y 73.21%. En el bioensayo con glucosa a las dosis anteriores, la IM fue de: 96.88, 98.66 y 84.82 %, los resultados se muestran en la figura 29.

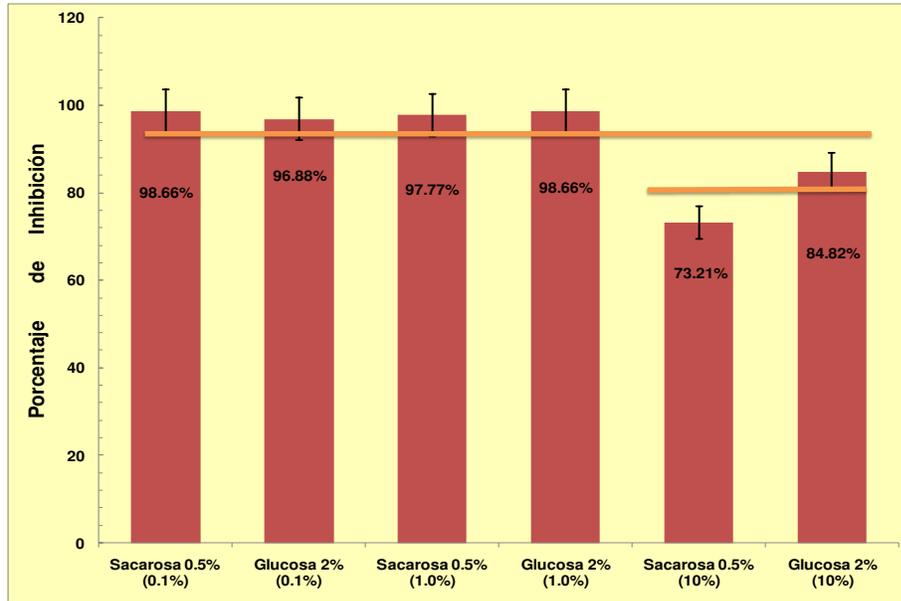


Fig. 29. Porcentaje de inhibición del MCLa sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica*. ($p = 0.5$).

Las dosis de 0.1, 1.0 y 10% del MC con sacarosa de *L.c. rhamnosus* exhibieron IM de 94.20, 93.75 y 95.09, así como en el MC con glucosa, mostrando actividad biológica en un 43.31, 98.66 y 97.14%. En la figura 30 se muestra el análisis estadístico, demostrando que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con una $p = 0.5\%$, entre el MC con sacarosa y el control, glucosa.

La figura 31 muestra el análisis estadístico $p = 0.5\%$ con las dosis de 0.1 y 1.0% de los resultados obtenidos en cada uno de los bioensayos.

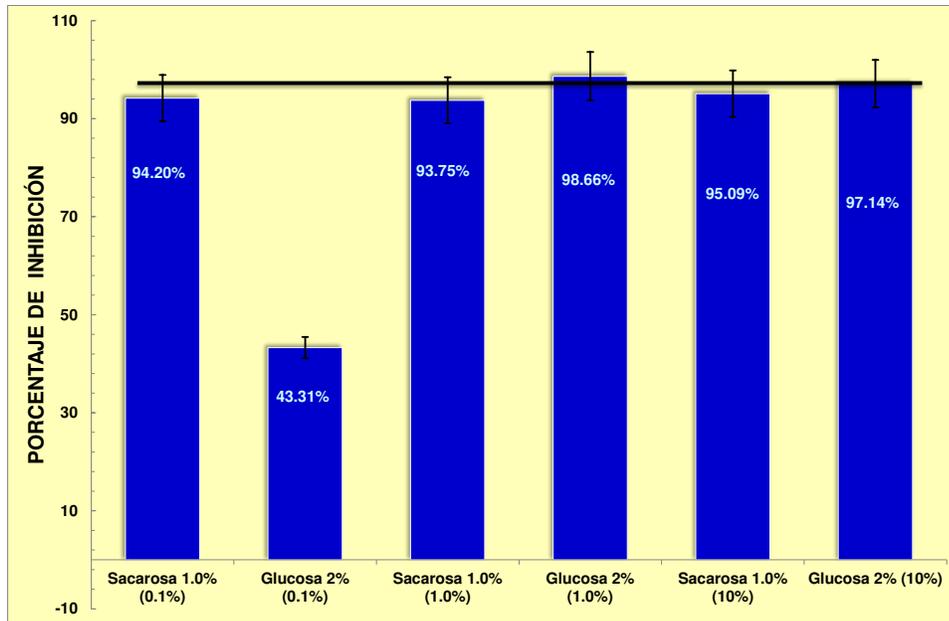


Fig. 30 Porcentaje de inhibición del MCLcr sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica*. ($p = 0.5$)

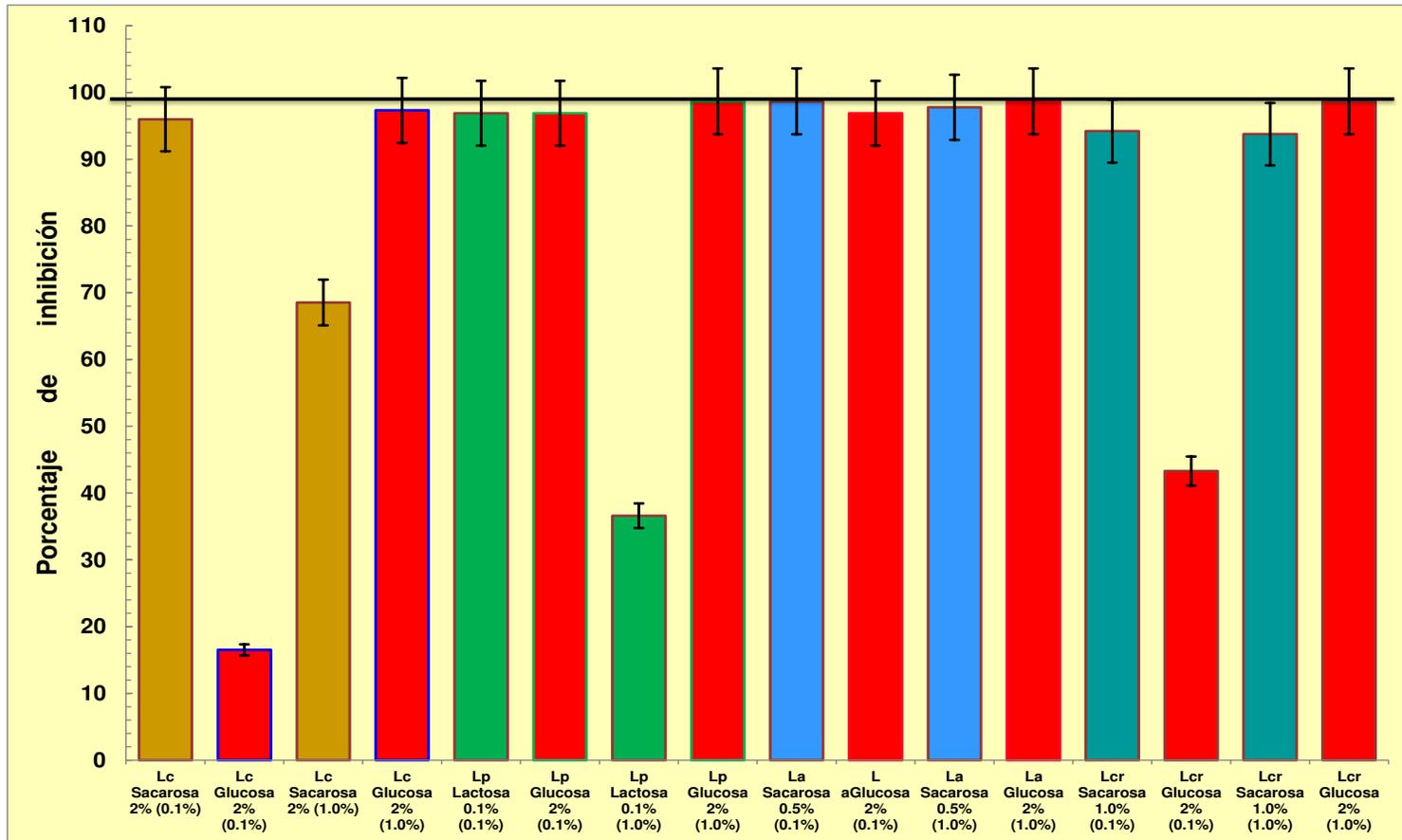


Fig. 31. Porcentaje de inhibición de los MC a dosis de 0.1 y 1.0% de las BAL sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *E. hitolytica*. ($p \leq 0.5$)

8.4 Pruebas Bioquímicas de los Medios Condicionados (MC)

A los medios condicionados de las cuatro cepas, tanto para la fuente de carbono y de glucosa se les realizaron diferentes pruebas bioquímicas coloridas, para observar la presencia o ausencia de biomoléculas, así como, si muestran algún grupo funcional. Se utilizó como control negativo el medio MPT, pero sin crecimiento bacteriano, sólo esterilizado y filtrado.

En la tabla 9 se presentan los resultados de las pruebas de Molish, para carbohidratos; prueba de Biuret, para proteínas; prueba de insaturaciones, para presencia de cadenas hidrocarbonadas con dobles enlaces y prueba de carbonilos.

Tabla 9
Pruebas Bioquímicas de los Medios Condicionados

Cepa F Carbono	Molish	Biuret	Insaturación	Carbonilos	Aromaticidad
Lc-sacarosa	+	+	-	-	-
Lc-glucosa	+	+	-	-	-
Lp- Lactosa	+	+	-	-	-
Lp-glucosa	+	+	-	-	-
La-sacarosa	+	+	+	-	-
La-glucosa	+	+	-	-	-
Lcr-sacarosa	+	+	-	-	-
Lcr-glucosa	+	+	-	-	-
Medio MPT	+	-	-	+	-
Prueba Positivo	Anillo morado	Color violeta	Precipitado café < 1 min	Precipitado amarillo o naranja	Rojo-Violeta

Prueba: (+) positiva, (-) negativo.

Los medios condicionados de las cuatro cepas presentaron pruebas negativas para carbonilos y aromaticidad. La prueba de aromaticidad en el control (MPT) fue negativa, pero en el análisis de carbonilos dio positivo. Al realizar la prueba de insaturaciones en los medios condicionados *L. acidophilus* sacarosa fue el único en presentar la prueba positiva (Tabla 8).

Todos los medios condicionados de los probióticos en estudio presentaron prueba positiva para carbohidratos, pero en diferente intensidad, siendo Lc- sacarosa, Lc- glucosa; Lcr- glucosa y control, los que exhibieron una mayor intensidad en el anillo de color morado, el resto lo presentó de ligero a moderado.

Los MC con las fuentes de carbono y glucosa, de las cuatro BAL, fueron positivas para la prueba Biuret, pero el medio MPT, mostró una prueba negativa, lo que indica que el control, no presenta proteínas. El MC con sacarosa de *L. casei*, demostró mayor intensidad al resto de los medios condicionados su color fue de moderado a débil (Tabla 8).

En la figura 32 se muestra el porcentaje de inhibición de *E. histolytica*, del MC de *L. acidophilus*, después de ser sometido a un tratamiento térmico. Las dosis evaluadas fueron 0.1, 0.5 y 1.0%, para el MC con La-sacarosa 0.5% y La-glucosa 2.0%. El tratamiento de La-sacarosa 0.1% no presentó inhibición, y tienen el mismo número de trofozoítos que el control, 32,000 cel/mL. La-glucosa 0.5 y 1.0%, presentan 87.50 y 96.88% de inhibición, por lo cual no tienen diferencia significativa con $p=0.5\%$. Los tratamientos de La- sacarosa presentaron bajos porcentajes de inhibición, mientras que La- glucosa exhibieron altos índices de interferencia amebicida, obteniendo diferencia significativa entre el control (glucosa) y la fuente de carbono óptima (sacarosa), $p=0.5\%$.

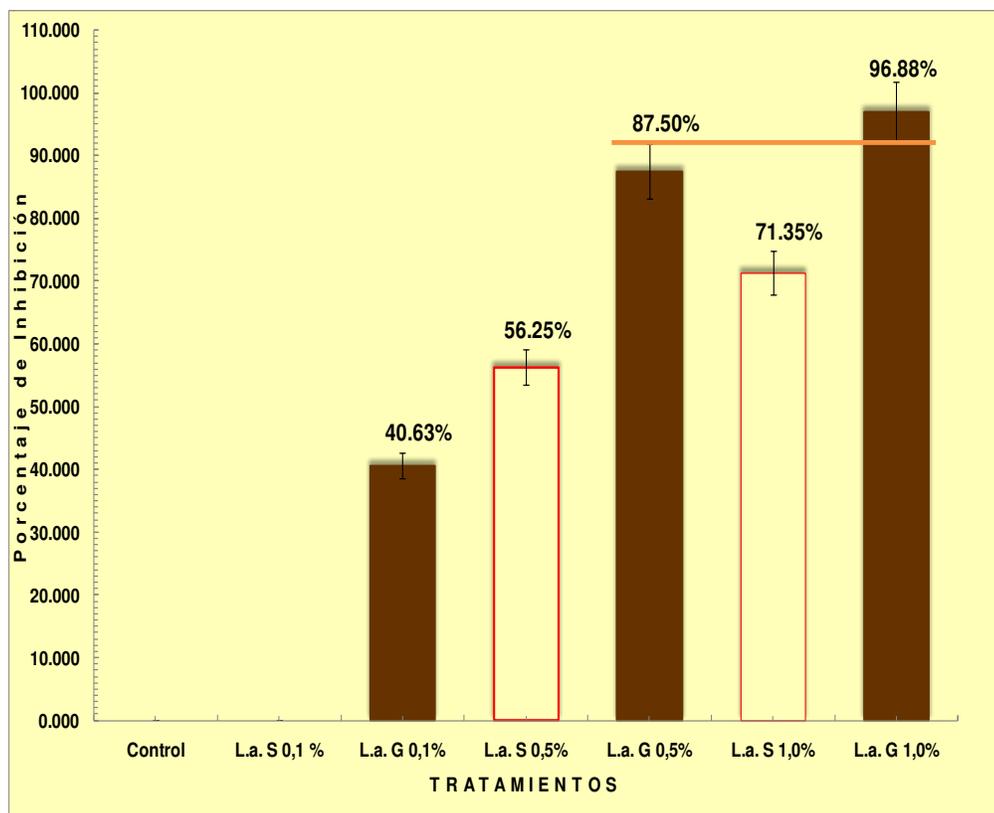


Fig. 32. Inhibición porcentual del crecimiento de *E. histolytica* por acción del MC-La sometido a calentamiento a 80°C/h.

8.5 Proteínas de los Medios condicionados

La tabla 10 presenta el contenido de proteínas obtenido de los MC, después del tratamiento con sulfato de amonio al 80% de saturación. El control presentó mayor contenido de proteínas, al exhibir 0.6347 g. El MC con sacarosa 1.0% de *Lcr* presentó 0.6525 g de proteína y el de glucosa 2.0% tiene 0.6347 g. demostrando que no existe diferencia significativa, $p=0.5\%$. Los MC con glucosa al 2.0% de *Lc*, *Lp* y *La*, mostraron mayor contenido proteico, mientras que las fuentes óptimas contienen menor cantidad. El contenido de proteínas del MC de *Lc* y *La*, entre glucosa y la sacarosa presentan diferencia significativa, $p=0.5\%$ (Fig. 33).

Tabla 10

Contenido de proteínas presentes por cada 200 mL de medio condicionado

Bacteria Ácido Láctica	Fuente de Carbono	Contenido de proteínas (g)
<i>L. casei</i>	Sacarosa	0.3053
	Glucosa	0.3963
<i>L.plantarum</i>	Lactosa	0.3268
	Glucosa	0.3403
<i>L. acidophilus</i>	Sacarosa	0.4506
	Glucosa	0.5367
<i>L. casei rhamnosus</i>	Sacarosa	0.6525
	Glucosa	0.6347
Control MPT	Glucosa	0.6347

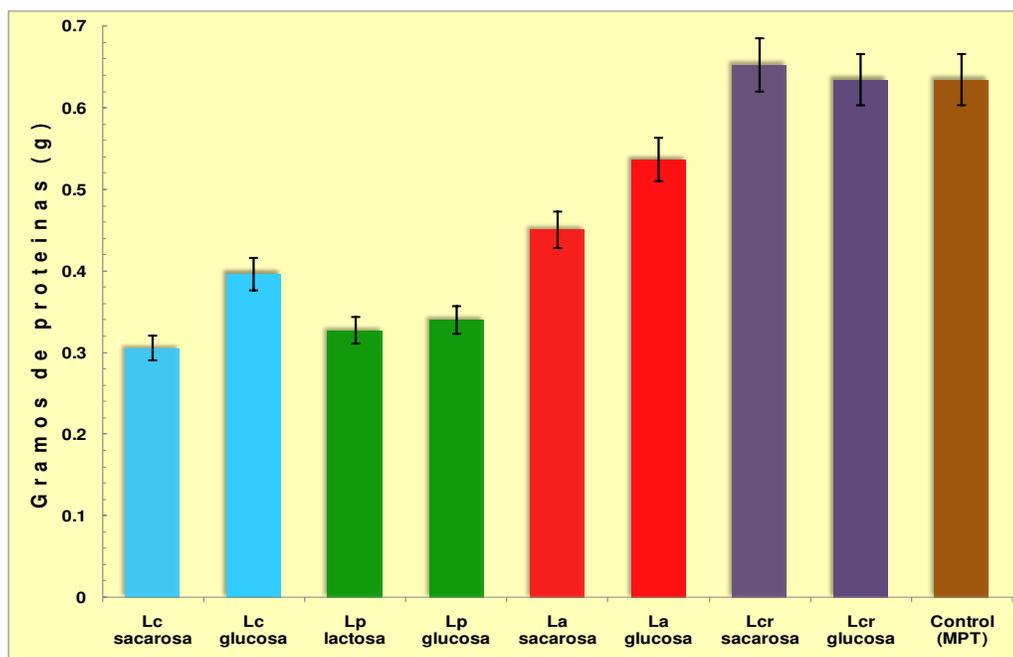


Fig. 33. Comparación del rendimiento (g) de proteínas entre los medios condicionados de *Lactobacillus sp*, con una $p=0.5\%$

La Tabla 11 muestra los resultados de las pruebas de Biuret y de insaturaciones, realizadas a los sobrenadantes y las proteínas precipitadas de los MC de *Lactobacillus sp*. La renina se usó como control positivo para proteínas y agua como control negativo.

Tabla 11

Pruebas bioquímicas de los precipitados y sobrenadantes de los MC de las BAL

BAL	Fuente de Carbono	Realizado en:	Biuret	Insaturaciones
<i>L. casei</i>	Sacarosa	Sobrenadante	-	+
		Precipitado	+	+
	Glucosa	Sobrenadante	-	+
		Precipitado	+	+
<i>L. plantarum</i>	Lactosa	Sobrenadante	-	+
		Precipitado	+	+
	Glucosa	Sobrenadante	-	+
		Precipitado	+	+
<i>L. acidophilus</i>	Sacarosa	Sobrenadante	-	+
		Precipitado	+	+
	Glucosa	Sobrenadante	-	+
		Precipitado	+	+
<i>L. casei rhamnosus</i>	Sacarosa	Sobrenadante	-	+
		Precipitado	+	+
	Glucosa	Sobrenadante	-	+
		Precipitado	+	+
Control Agua			-	-
Control (NH ₄) ₂ SO ₄			-	-
Control Renina			+	-

Prueba: (+) positiva, (-) negativo.

Las proteínas purificadas obtenidas de los MC de las 4 BAL, se evaluaron sobre *E. histolytica*, observando que exhibe interferencia microbiana. La concentración de proteína valorada fue del 7 % m/v (Fig. 34).

Al medio MPT se le adiciona antibiótico, con la finalidad de evitar el crecimiento bacteriano, por lo tanto, dentro del bioensayo se consideró realizar un control con antibiótico y agregando sales de sulfato de amonio, debido a que la sal se usó para precipitar las proteínas. El número de células viables para este control fue de 12,083 y el control que no presentó ninguna adición en el medio MPT presentó 35,833 cél/mL viables de *E. histolytica*. El número de células viables reales fue de 23,750 cél/mL, este valor se usó para determinar el porcentaje de inhibición.

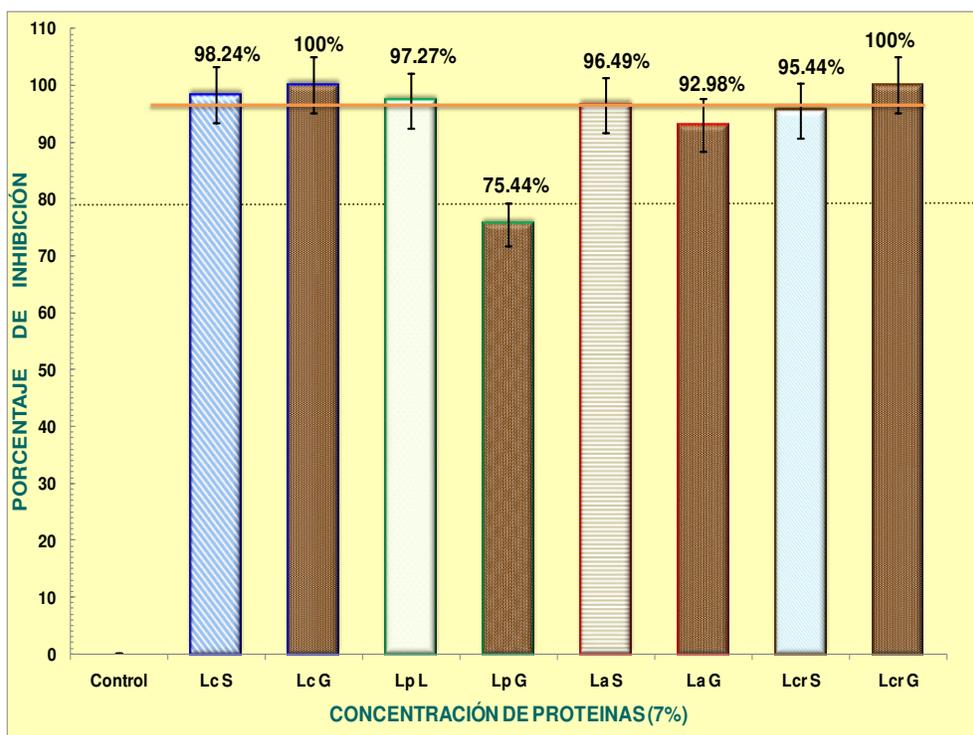


Fig. 34 Porcentaje de Inhibición con proteínas purificadas a dosis de 7%, (p=0.5%).

En la Figura 34 se presentan el porcentaje de inhibición de *E. histolytica* en presencia proteínas purificadas preparadas a una dosis del 7%, al analizando la fuente de carbono seleccionada y glucosa. Además, dentro del estudio se utilizó la droga de elección, el metronidazol, a una concentración de 0.1442 µg/mL, concentración considerada como la DL₅₀. El resultado no se muestra en la gráfica

de la figura 34, pues en las observaciones a microscopio del bioensayo, no se presentaron trofozoítos, sólo células redondeadas, pequeñas y sin movimiento.

Las proteínas totales de los MC a dosis de 7% de las cuatro cepas con sacarosa y lactosa, presentaron IM mayor a 95%. Las proteínas obtenidas de *L. casei*-sacarosa presentó el mayor efecto inhibitorio con una inhibición del 98.244% y el control *L. casei*-glucosa presentó 100% de IM, estos datos no presentan diferencia significativa.

Las proteínas totales obtenidas de *L. plantarum*-lactosa presentó una IM de 97.27%. y el control *L. plantarum*-glucosa presentó una IM de 75.44%, en estos datos sí se observa diferencia significativa entre los porcentajes de IM.

Las proteínas totales obtenidas de *L. acidophilus*-sacarosa presentó una IM de 96.49% y el control *L. acidophilus*-glucosa presentó una IM 92.98% de IM sobre *E. histolytica*, estos porcentajes de IM no exhiben diferencia significativa (ver Fig. 34).

De todos los porcentajes de IM sobre *E. histolytica*, sólo se observó diferencia significativa en el ensayo realizado con las proteínas totales obtenidas del cultivo de *L. plantarum*-glucosa.

8.6 Electroforesis del Medio condicionado de *L. acidophilus*

Los medios condicionados de glucosa, sacarosa y control de esta cepa, se les cuantificó el contenido de proteína por el método de Bradford, determinando que presentan: 14.43 mg/L, 16.756 mg/L y 12.18 mg/L respectivamente (ver Anexo I).

Estos datos permiten concentrar las proteínas del MC para realizar la electroforesis al 8% y al 12%.

En la Figura 35 se observa el bandeo obtenido de las muestras de proteínas totales obtenidas de a) *L. acidophilus*-sacarosa, b) *L. acidophilus*-glucosa y c) Medio de cultivo (MPT) en un gel de poliacrilamida al 12%. En la imagen (a) se presentan dos bandas, la banda superior corresponde a un peso molecular aproximado de 71KDa y la banda inferior corresponde aún peso molecular aproximado de 9.5KDa. En la imagen (b) sólo se observó una banda con un peso molecular aproximada de 9.1 KDa, en la imagen (c) se observó una banda correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 7.6 KDa.

En la Figura 36 se observa el bandeo obtenido de las muestras de proteínas totales obtenidas de a) *L. acidophilus*-sacarosa, b) *L. acidophilus*-glucosa y c) Medio de cultivo (MPT) en un gel de poliacrilamida al 8%.

En la muestra (a) se observa la presencia de 8 bandas bien definidas

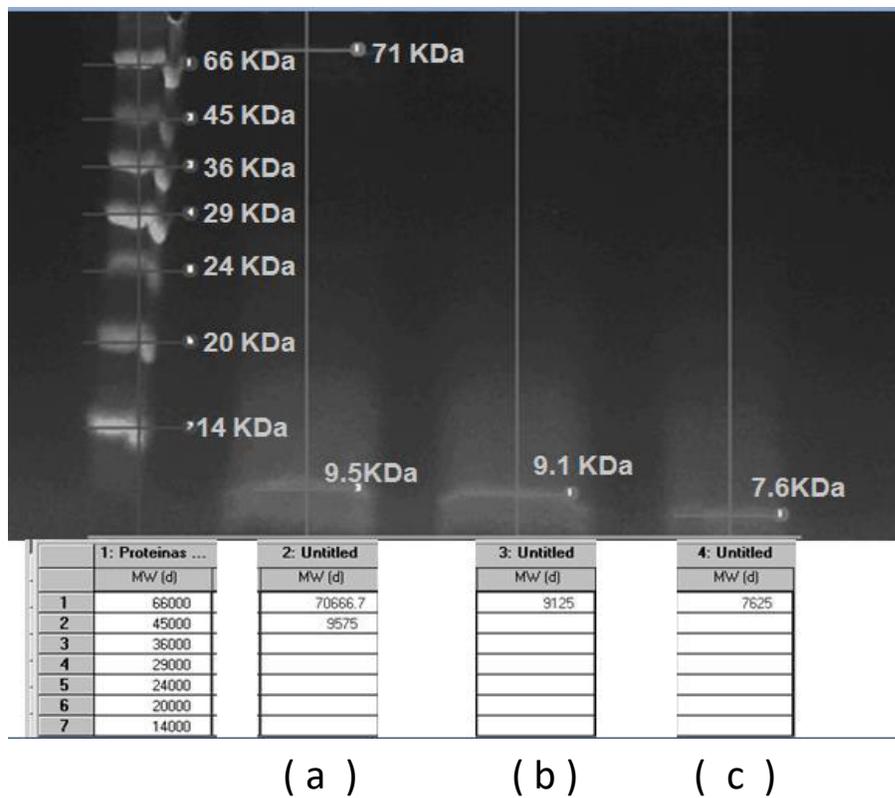


Fig. 35 Electroforesis de proteínas de *L. acidophilus* en gel de poliacrilamida [12%].

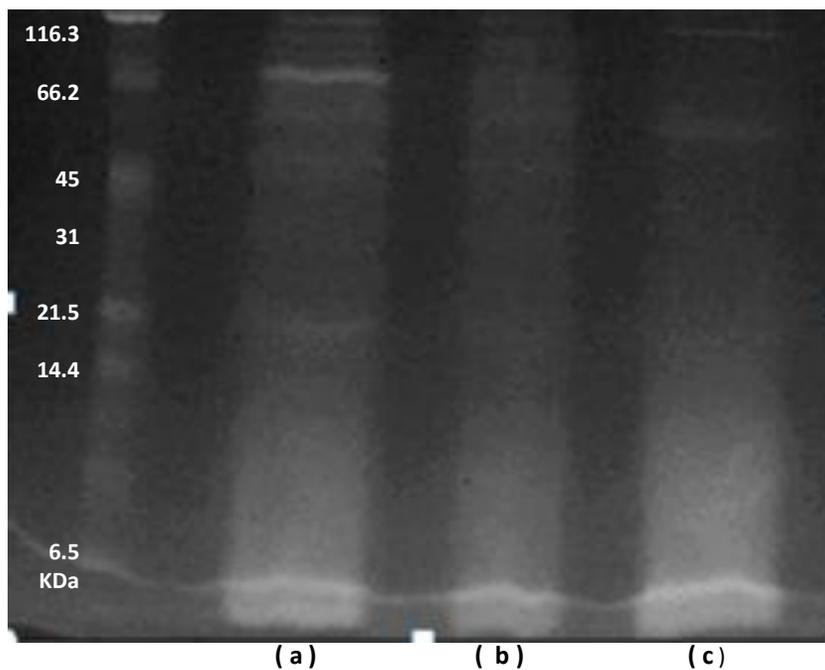


Fig. 36. Electroforesis de proteínas de *L. acidophilus* en gel de poliacrilamida [8%].

8.7 Análisis bromatológicos de los Medios condicionados

A los medios condicionados se les determinó el contenido de proteínas totales y ácidos grasos totales. *L. acidophilus* presentó 2.85% de proteínas en el medio condicionado con sacarosa al 0.5%, mostrando mayor contenido proteico que glucosa 2.0%, que presenta 2.26% y el control MPT, con 2.30%. *L. plantarum* presenta el menor contenido de proteínas en el MC con lactosa al 0.1%, registrando 2.37% y a la vez menor cantidad en glucosa al 2%, con 2.26% de proteínas. *L. casei rhamnosus* mostró el mayor contenido de grasas reportando 1.30%, mientras que la glucosa al 2.0%, se reportó 0.73% y para el control 0.56%. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12
Análisis Físicoquímicos de los Medios Condicionados

Bacteria Ácido Láctica	Fuente de Carbono	Contenido de proteínas %	Contenido de Grasa %
<i>L. casei</i>	Sacarosa (2%)	2.41	1.04
	Glucosa	2.31	0.72
<i>L. plantarum</i>	Lactosa (0.1)	2.37	1.03
	Glucosa	2.26	0.76
<i>L. acidophilus</i>	Sacarosa (0.5)	2.85	0.85
	Glucosa	2.26	0.63
<i>L. casei rhamnosus</i>	Sacarosa (1%)	2.38	1.30
	Glucosa	2.27	0.73
Control (MPT)	Glucosa (2%)	2.30	0.56

El medio condicionado de *L. acidophilus* mostró mejor respuesta ante el crecimiento de *E. hitolytica*, por lo cual al MC se le cuantificó el contenido de acidez total en base húmeda, exhibiendo 0.5451% en MC sacarosa y 0.5095% en glucosa (Tabla 13). La acidez en el MC con sacarosa y el MC con glucosa, no mostró diferencia significativa con $p < 0.5\%$ (Fig. 37)

Tabla 13
Análisis fisicoquímico de acidez del MC de *L. acidophilus*.

Bacteria Ácido Láctica	Control (MPT)	Sacarosa	Glucosa
<i>L. acidophilus</i>	0.3151%	0.5451%	0.5095%

Además, el contenido de proteínas de los medios condicionados se midió por el método de Bradford, estos resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14
Contenido de proteínas por el Método de Bradford

Bacteria Ácido Láctica	Fuente de Carbono	Contenido de proteínas mg/mL
<i>L. casei</i>	Sacarosa (2%)	0.0539
	Glucosa (2%)	0.0446
<i>L. plantarum</i>	Lactosa	0.0525
	Glucosa	0.0464
<i>L. acidophilus</i>	Sacarosa	0.0842
	Glucosa	0.063
<i>L. casei rhamnosus</i>	Sacarosa	0.181
	Glucosa	0.0848

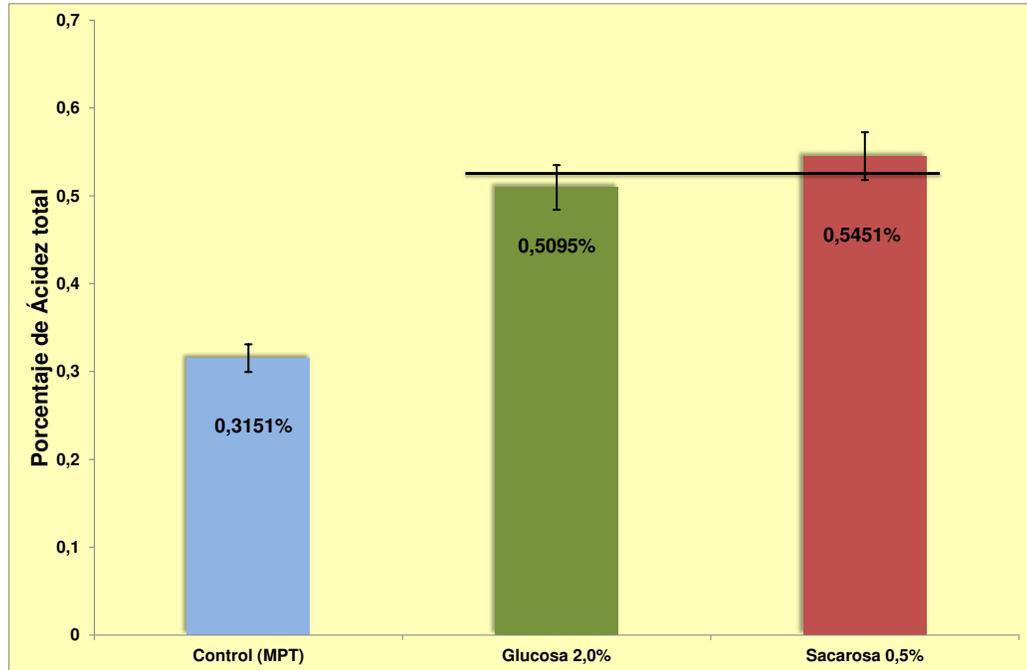


Fig. 37. Porcentaje de acidez de acuerdo a la AOAC, mostrando diferencia significativa con $p=0.5\%$

Tabla 15
Compendio de resultados del análisis a los MCL con actividad de interferencia amibiana

		<i>Lactobacillus casei</i>					
		Control (Glucosa 2%)			Sacarosa 2% (FC)		
		0.1%	1.0%	10.0%	0.1%	1.0%	10.0%
IA	MC sobre <i>E. histolytica</i>	16.52	97.32	72.77	95.98	68.53	97.77
Proteínas	Resultados de las pruebas cualitativas y cuantitativas MC						
	Prueba	Control (Glucosa 2%)			Sacarosa 2% (FC)		
	Biuret	+			+		
	Bradford (mg/mL)	0.0446			0.0656		
	NMX-F-608-NORMEX-2002 (%)	2.31			2.41		
	Nanodrop (mg/mL)	1.022			1.201		
	precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ al 80% de saturación	0.3963 g/200 mL			0.3053 g/200 mL		
		7.0%			7.0%		
	IA del MC sobre <i>E. histolytica</i> (%)	100			98.24		
Ácidos grasos	Pruebas coloridas	-			-		
	NOM-086-SSA1-1994 (%)	0.72			1.04		
Carbohidratos residuales	Prueba de Molish	+			+		

IA: Interferencia amibiana
FC: Fuente de Carbono

Tabla 16
Compendio de resultados del análisis a los MCL con actividad de interferencia amibiana

		<i>Lactobacillus plantarum</i>					
		Control (Glucosa 2%)			Lactosa 0.1% (Fuente de carbono)		
		0.1%	1.0%	10%	0.1%	1.0%	10%
IA	MC sobre <i>E. histolytica</i>	96.88%	98.66%	84.82%	96.88%	36.61%	79.46%
Resultados de las pruebas cualitativas y cuantitativas MC							
Proteínas	Prueba	Control (Glucosa 2%)			Lactosa 0.1% (FC)		
	Biuret	+			+		
	Bradford (mg/mL)	0.0464			0.0785		
	NMX-F-608-NORMEX-2002 (%)	2.26			2.37		
	Nanodrop (mg/mL)	0.94			1.095		
	precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ al 80% de saturación	0.3403g/200mL			0.3268g/200mL		
		7.0%			7.0%		
	IA del MC sobre <i>E. histolytica</i> (%)	75.44			97.27		
Ácidos grasos	Pruebas coloridas	-			-		
	NOM-086-SSA1-1994 (%)	0.76			1.03		
Carbohidratos residuales	Prueba de Molish	+			+		

IA: Interferencia amibiana

FC: Fuente de Carbono

Tabla 17

Compendio de resultados del análisis a los MCL con actividad de interferencia ambiental

		<i>Lactobacillus acidophilus</i>					
		Control (Glucosa 2%)			Sacarosa 0.5% (FC)		
		0.1%	1.0%	10%	0.1%	1.0%	10%
IA	MC sobre <i>E. histolytica</i>	96.88%	98.66%	84.82%	98.66%	97.77%	73.21%
Resultados de las pruebas cualitativas y cuantitativas MC							
Proteínas	Prueba	Control (Glucosa 2%)			Sacarosa 0.5% (FC)		
	Biuret	+			+		
	Bradford (mg/mL)	0.063			0.095		
	NMX-F-608-NORMEX-2002 (%)	2.26			2.85		
	Nanodrop (mg/mL)	2.136			1.838		
	precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ al 80% de saturación	0.5367 g/200mL			0.4506 g/200mL		
	IA del MC sobre <i>E. histolytica</i> (%)	7.0%			7.0%		
		92.98			96.49		
Ácidos grasos	Pruebas coloridas	-			+		
	NOM-086-SSA1-1994 (%)	0.63			0.85		
Carbohidratos residuales	Prueba de Molish	+			+		
Acidez	El Índice de acidez total por la técnica de la AOAC (%)	0.5095			0.5451		
	pH	Sin precipitar	Sobrenadante		Sin precipitar	Sobrenadante	
		4.67	4.74		4.57	4.67	

IA: Interferencia ambiental

FC: Fuente de Carbono

Tabla 18

Compendio de resultados del análisis a los MCL con actividad de interferencia ambiental

		<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>					
		Control (Glucosa 2%)			Sacarosa 1.0%(FC)		
		0.1%	1.0%	10%	0.1%	1.0%	10%
IA	MC sobre <i>E. histolytica</i>	43.31	98.66%	97.14%	94.20%	93.75%	95.09%
Proteínas	Resultados de las pruebas cualitativas y cuantitativas MC						
	Prueba	Control (Glucosa 2%)			Sacarosa 1.0%(FC)		
	Biuret	+			+		
	Bradford (mg/mL)	0.0848			0.191		
	NMX-F-608-NORMEX-2002 (%)	2.27			2.38		
	Nanodrop (mg/mL)	2.525			5.134		
	precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ al 80% de saturación	0.6347g/200mL			0.6525g/200mL		
		7.0%			7.0%		
	IA del MC sobre <i>E. histolytica</i> (%)	100			95.44		
Ácidos grasos	Pruebas coloridas	-			-		
	NOM-086-SSA1-1994 (%)	0.73			1.30		
Carbohidratos residuales	Prueba de Molish	+			+		

IA: Interferencia ambiental

FC: Fuente de Carbono

9 DISCUSIÓN

Los carbohidratos constituyen la mayor parte de la materia orgánica de la tierra, debido a sus funciones importantes en todas las formas de vida, destacando la formación de paredes celulares de bacterias y plantas, armazón estructural del ADN y del ARN, se unen a proteínas y lípidos para ejercer las interacciones entre las células y su entorno, pero su principal actividad es la de almacenar y producir energía, así como, la obtención de metabolitos intermediarios (Berg *et al.* 2008). La glucosa, monosacárido y aldohexosa se emplea como la principal fuente de energía para los microorganismos y por el cual inicia el catabolismo, para generar las rutas metabólicas. Waldir *et al.* 2007 y González *et al.* 2008, realizaron curvas de crecimiento de *L. casei* y *L. delbrueckii* usando como fuente de carbono glucosa entre el 2.0- 2.5%, la mayoría de los medios empleados para el crecimiento bacteriano utilizan estas concentraciones, obteniendo grandes cantidades de UFC/mL. En nuestra investigación modificamos la fuente de carbono sobre el crecimiento de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *L. casei rhamnosus*, empleando sacarosa, disacárido formado por fructosa y glucosa, con un enlace glicosídico α 1-2; lactosa, disacárido formado por glucosa y galactosa, enlace glicosídico β 1-4 y fructosa, monosacárido y cetohexosa; como control se utilizó glucosa al 2%. Por otro lado, se modificó la concentración de estos azúcares, evaluando dosis de 0.1 %, 0.5 %, 1.0 % y 2.0 %. Las figuras 13, 16, 19 y 22 muestran el crecimiento de las BAL, en función de la absorbancia dependiente del tiempo. Los resultados de las cinéticas de crecimiento demuestran que los probióticos tienen la capacidad para crecer en las diferentes fuentes de carbono y en las diferentes concentraciones de azúcar, observando que existe una variación en el crecimiento bacteriano, debido a la variación de absorbancia durante el tiempo de incubación, por lo cual los probióticos no requieren exclusivamente de glucosa al 2.0%.

El crecimiento de *L. casei* (Fig. 13), *L. plantarum* (Fig. 16), *L. acidophilus* (Fig. 19) y *L. casei rhamnosus* (Fig. 22) se evaluaron entre 11 a 17 horas. En la cinética de

crecimiento de las BAL se observan la fase de adaptación, exponencial, estacionaria y de muerte, permitiendo el desarrollo y viabilidad de las bacterias (Madigan 2004.)

Las concentraciones y fuentes de azúcares evaluados permitieron el desarrollo de *L. casei*. En la fig. 14 se presenta el análisis de las concentraciones y fuentes de azúcares a las 9 horas de incubación, observando mayor crecimiento en la fuente de carbono de sacarosa al 2%, el cual presentó una absorbancia de 1.7037. En la fuente de carbono de lactosa, *L. casei* exhibió bajos rendimientos en las 4 concentraciones evaluadas, obteniendo una absorbancia promedio de 0.9345, el análisis estadístico demuestra que no existe diferencia significativa entre estos tratamientos. La fase de muerte (Fig. 13) en esta fuente de carbono se presentó a las seis horas de incubación, por lo cual *L. casei* requiere mayor concentración de lactosa y prolongar el tiempo de incubación para obtener un excelente rendimiento, esto lo demuestra Escobar *et al.* 2010, evaluaron el lacto suero clarificado, rico en lactosa, sobre el crecimiento de *L. casei*. El crecimiento de la cepa por absorbancia a $\lambda=550$ nm fue mayor a 8.0, el cual se determinó a las 96 horas, a partir de este tiempo, la absorbancia disminuye. Además, González *et al.* 2008, demostraron que *Lactobacillus casei* y *L. plantarum*, presentaron tasas de crecimiento del orden de 10^9 y 10^{11} en el jugo de *Aloe vera* variedad *barbariensis* que es rico en manosa. Ellos mencionan que el número de organismos producidos en los cultivos de ambas cepas lácticas, está directamente relacionado con la concentración de sustrato utilizado en el medio, encontrando que en los medios con 25 % y 50 % de manosa, se registraron crecimientos menores de dos órdenes de magnitud que en aquellos que contenían cantidades de 75 % y 100%, demostrando que las cuentas viables más elevadas fueron la de los cultivos al 100 % de jugo de *Aloe vera*, esto indica una limitante para la proliferación de los cultivos.

L. casei presentó una absorbancia de 1.4218 en la fuente de carbono control (glucosa), al comparar con la fuente de elección (sacarosa 2%) presentando diferencia significativa (Fig. 15). La sacarosa está formada por glucosa y fructosa, esto permite que el medio MPT presente mayor concentración de azúcares. Además, la glucosa y fructosa son

intermediarios de la ruta glicolítica, los cuales son fáciles de degradar y la fructosa es un intermediario de la ruta de Embden-Meyerhoff, lo que permite el incremento del número de bacterias de *L. casei*. Por otro lado, la lactosa en su estructura presenta galactosa, ésta hexosa no es reconocida por la hexocinasa, lo que involucra un proceso más largo y complejo, que afecta en el crecimiento de *L. casei*, esto implica que en el medio se presente mayor concentración de lactosa y a la vez, el incremento de la concentración de glucosa en el medio MPT, lo que conlleva que el tiempo se incremente (Voet 2007).

Una de las principales características de *L. plantarum* es su capacidad para fermentar diferentes fuentes de carbono, en la Fig. 16 se muestra el crecimiento de la bacteria, al ser evaluado en sacarosa, lactosa, fructosa y glucosa, demostrando las fases de adaptación, logarítmica, estacionaria y de muerte. Los azúcares evaluados son considerados químicamente como hexosas, por lo cual *L. plantarum* es una bacteria homofermentativa, permitiendo que las hexosas sean degradadas por la vía de Embden-Meyerhoff, permitiendo que el microorganismo libere ácido láctico y descienda el pH y acidifica el medio (Fordyce *et al.* 1984).

Cermeño en el 2012 evaluó las cepas 299v y 748 de *L. plantarum*, demostrando que ambas cepas tienen la capacidad de metabolizar rápidamente maltosa, glucosa, sacarosa y fructosa en concentraciones del 2%, pero no presentan viabilidad en carbohidratos complejos. Los azúcares evaluados en esta investigación son monosacáridos, como: glucosa y fructosa; disacáridos, como: sacarosa y lactosa, los cuales son considerados como hidratos de carbono de estructura sencilla. Además, los resultados obtenidos en nuestra investigación, demuestran que *L. plantarum* no solo crece a concentraciones del 2%, como lo sugiere Cermeño 2012, sino que crecen a concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0 y 2.0%, observando un rendimiento celular mayor a 1.100, el cual se obtiene después de incubar por 5 horas, mientras que Cermeño 2012, obtuvo el mismo rendimiento al incubar por 25 horas. El tiempo de incubación de nuestra cepa fue mucho menor al obtenido por dicho autor, la diferencia de este resultado se debe al medio de cultivo

empleado para realizar la cinética de crecimiento del microorganismo, Cermeño 2012 usó el medio MRS, mientras que nosotros usamos el medio MPT (Barrón y Quiñones 2018), por lo cual el microorganismos crece con mayor facilidad y eficiencia en nuestro caldo de cultivo, obteniendo mayor rendimiento celular en menor tiempo de incubación.

Cermeño 2012, realizó estudios de curvas de crecimiento con *L. plantarum* con la cepa 748 y 299v, ambas cepas fueron cultivadas en el medio MRS enriquecido con lactosa al 2% y determinó que la cepa 748 no metabolizó la azúcar evaluada, pero la cepa 299v sí lo hizo. La BAL utilizada en nuestro experimento tiene la capacidad de metabolizar la lactosa, determinando una absorbancia del 1.73640 en concentración del 0.1% (Fig. 18). El resultado permite dar indicios de que *L. plantarum* crece a concentraciones menores del 2%, obteniendo un buen rendimiento celular, debido a que el carbohidrato está formado por β -D-Galactosa y α -D-Glucosa, lo que potencializa el crecimiento del microorganismo, al presentar dos hexosas que son metabolizadas por glicólisis, permitiendo tener mayor cantidad de energía para su división celular. *L. plantarum* presenta la enzima β -galactosidasa, la cual representa un papel importante en el rompimiento del enlace glicosídico β 1-4, que se localiza en la lactosa, por lo cual, el microorganismo puede ser como un tratamiento para disminuir los efectos adversos de la intolerancia a la lactosa.

Bhowmik *et al.* 1987; realizaron un estudio sobre los factores que influyen en la actividad de la β -galactosidasa, enzima producida por las bacterias para hidrolizar el enlace β 1-4 formado entre la β -D-Galactosa y α -D-Glucosa. Uno de los parámetros evaluados fue usar diferentes fuentes de carbono, entre ellos, lactosa, galactosa y melibiosa a concentraciones del 2.0%, observando una actividad enzimática del 4.2, 3.8 y 2.7 $\mu\text{mol ONP}/\mu\text{g proteína}/\text{min}$. La cepa de *L. acidophilus* usada en la investigación tienen la capacidad para catabolizar lactosa al 2.0% (Fig. 20), lo que permite el crecimiento de la BAL, obteniendo una absorbancia a las 9 horas de incubación del 0.91671. Además, Bhowmik *et al.* 1987; evaluaron diferentes concentraciones de lactosa sobre la actividad de la β -galactosidasa, en un rango de 0.1 – 2.0%, observando

que a concentraciones mayores y menores del 0.4%, la actividad enzimática disminuye, determinando que hay dependencia entre la concentración del azúcar y la actividad enzimática. El estudio realizado en el laboratorio, se evaluaron diferentes concentraciones de lactosa, observando que *L acidophilus* presenta bajos rendimientos celulares, al obtener bajas absorbancias (Fig. 20), esto concuerda con lo propuesto por Bhowmik *et al.* 1987; debido a que al decrecer la actividad enzimática de la β -galactosidasa, en el medio de cultivo se presentará mayor concentración del disacárido y menor concentración de los monosacáridos, generando una disminución en el metabolismo de *L. acidophilus* generando bajos rendimientos celulares. Por otro lado, Bhowmik *et al.* 1987; adicionaron CaCl_2 5mM al medio de lactosa al 0.4%, potencializando la actividad de la β -galactosidasa en un 170%. El crecimiento de *L. acidophilus* en lactosa al 0.5% presentó una absorbancia del 0.82929, por lo cual la bacteria no presenta altos rendimientos celulares comparados con sacarosa (Fig. 20), por lo cual la adición de CaCl_2 , una sal que genera cationes divalentes, sería recomendable para incrementar el consumo de lactosa en el medio, lo que permitiría tener una mayor absorbancia y beneficiará el uso de lactosa al 0.5%.

Laakso *et al.* 2011; realizaron un estudio sobre el proteoma y el transcriptoma de *Lactobacillus rhamnosus GG*, que se asocian a los cambios en las fases de la curva de crecimiento. El grupo de investigadores evaluó dos fuentes de carbono, glucosa y galactosa; las cuales fueron obtenidas del hidrolizado de lactosa. La curva de crecimiento elaborada por Laakso *et al.* 2011; presenta la fase exponencial y estacionaria, la cual se llevó a cabo por un tiempo de 30 horas midiendo la absorbancia a 600 nm.

La Fig. 22 de nuestros resultados, muestra el crecimiento de *L. casei rhamnosus* en glucosa, sacarosa, fructosa y lactosa, realizado en un periodo de 17 horas, observando la fase de adaptación, exponencial y estacionaria, así como lo determinó Laakso *et al.* 2011; por lo cual no se requiere de una incubación de 30 horas como lo sugiere el grupo de investigadores finlandeses.

Los resultados de la curva crecimiento de *Lcr* fueron comparados con la curva de crecimiento de *L. rhamnosus GG* obtenida por Laakso *et al.* 2011; observando que la BAL evaluada con glucosa presentó a las 16 horas de incubación la transición de la fase logarítmica a la fase estacionaria. La cepa de *Lc* Penders *et al.* 2006 estudiada en esta investigación desarrolló el mismo patrón en glucosa al 2% (Fig. 22), observando que después de las 14 horas de incubación el crecimiento de la bacteria no presentó cambios significativos, por lo cual *Lcr* a partir de ésta hora de incubación presentó la fase estacionaria. Además, el tratamiento con sacarosa al 1 y 2% presentó la misma tendencia, por lo cual, este indicio permite elegir a sacarosa al 1% como la mejor fuente de energía para *Lcr*, pues en la Fig. 22 y 24 de esta investigación, se observa que la bacteria sigue presentando fase exponencial a las 15 horas.

En este estudio se evaluó: glucosa, como control; sacarosa, fructosa y lactosa, sobre el crecimiento de *Lc*, *La*, *Lp* y *Lcr*. En la tabla 6 se enlistan las fuentes de carbono y la concentración seleccionada para cada cepa. Los resultados permiten inferir que las bacterias ácido lácticas tienen la capacidad para crecer y sobrevivir en diferentes fuentes de carbono, observando que algunos carbohidratos son más eficientes para cada especie estudiada en esta investigación. Por lo cual, los probióticos poseen la capacidad de colonizar el intestino delgado, debido a que es el órgano del sistema digestivo responsable de absorber los nutrientes, siendo una región rica en fuentes de carbono diversos. O'Donnell *et al.* 2013; realizaron una revisión sobre la flexibilidad metabólica del género *Lactobacillus*, en el cual exponen que estas bacterias utilizan una gran variedad de fuentes de carbono que les permiten crecer, sobrevivir y adaptarse en nuevos ambientes ó mantenerse en el mismo nicho. Además, el género *Lactobacillus* no solo coloniza el tracto gastrointestinal, si no también raíz y follaje de plantas, alimentos fermentados, vagina, ensilado, entre otros. O'Donnell *et al.* 2013; proponen que la flexibilidad catabólica se debe al genoma codificado para metabolizar las fuentes de carbono, la capacidad que desarrollan para la adaptación al ambiente, los diferentes tipos de transportadores de carbohidratos que presenta a nivel de membrana, así como, la capacidad de la regulación del metabolismo, la transferencia de genes de manera

horizontal, que les permite a las bacterias recibir genes y otros elementos genéticos que confieren nuevas habilidades, para desarrollar la máxima capacidad para sobrevivir.

Cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica es el agente causal de la amibiasis, de los abscesos amibianos en el hígado y un problema de salud mundial, pues causa 100, 000 muertes al año, de acuerdo a un reporte emitido en 2001 por la OMS, UNESCO y PAHO. Un grupo de investigadores encabezados por Ali *et al.* 2007; realizaron una investigación de *E. histolytica* sobre la cinética de crecimiento en presencia y ausencia del compuesto 5-azacitidina (5-AzaC), así como, los efectos que se presentan en la expresión de los genes. Ali *et al.* 2007; usaron el medio TYI-S-33 para la cinética de *E. histolytica* HM1-IMSS y la cepa 200:NIH, las cuales fueron incubadas por 7 días observando que la cepa HM1-IMSS en el segundo día de incubación presentó un crecimiento de 40,000 cel/mL. La cepa HM1-IMSS usada en nuestra investigación, presentó en el segundo día de incubación un crecimiento de 7083 cel/mL, dando fin a la etapa de adaptación. Después de las 48 horas de incubación se presentó la fase logarítmica, terminando a las 204 horas de incubación. Entre el tercero y cuarto día de incubación la cepa que nosotros estudiamos (HM1-IMSS) mostró el crecimiento de 40,000 cel/mL, observando que entre nuestros resultados obtenidos y los de Ali *et al.* 2007; hay similitud en el incremento de células.

La cepa *E. histolytica* usada en este trabajo presentó un crecimiento lento en el Medio MPT, comparado con la cepa HM1-IMSS del grupo de Ali *et al.* 2007; pero en ambos trabajos, los experimentos posteriores fueron usando a las amibas en la fase logarítmica, por lo cual, se utilizó a los microorganismos en el estadio de trofozoíto, el cual es el causante de la amibiasis.

Actividad biológica del Medio Condicionado de *Lactobacillus* (MCL) sobre *E. histolytica*

Leveau y Bouix, 2000, proponen que las bacterias ácido lácticas se caracterizan por producir y excretar sustancias al medio donde se cultivan. Las moléculas que liberan las

BAL tienen aplicaciones en la industria alimenticia, para evitar el crecimiento de microorganismos sobre los alimentos, funcionan como inhibidores del crecimiento de bacterias, de parásitos, hongos, entre otros, permitiendo ser compuestos con un gran interés para las industrias. En esta investigación se trabajó con *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *L. casei rhamnosus*, los cuales crecieron en el medio MPT y posteriormente se obtuvo los Medios Condicionados (MC) para cada especie. Los medios condicionados se evaluaron sobre el crecimiento de *E. histolytica* a dosis de 0.1, 1.0, 10.0, 50.0 y 70.0%, en la Fig.26 se muestran los porcentajes de inhibición de la amiba, alcanzando porcentajes de interferencia microbiana del 100% sobre los trofozoítos de *E. histolytica* en las dosis de 50 y 70%. En la Tabla 7 se presentan los porcentajes de inhibición para las dosis de 0.1, 1.0 y 10.0 %, los resultados muestran porcentajes superiores al 95% de interferencia microbiana para: *L. casei* cultivado en sacarosa al 2%, *L. plantarum* cultivado en lactosa al 0.1%, *L. acidophilus* en sacarosa al 0.5% y *L. c. rhamnosus* en sacarosa al 1%. El porcentaje de inhibición más bajo se presentó en *L. casei* cultivado en glucosa al 2% (control) en la dosis de 0.1%, obteniendo una interferencia amibiana del 16.52%. En la Fig. 31 se presenta el porcentaje de interferencia microbiana de los MCL de las 4 cepas a las dosis de 0.1 y 1.0% observando que de los 16 tratamientos, 12 de ellos presentan inhibición mayor al 90%, los 4 restantes son de 16.32%, 72.77%, 36.61%, 43.31%. Rishi *et al.* 2011; investigaron los efectos de un extracto libre de células obtenido de *L. plantarum* y del cotrimazol, sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* NCTC 74, el grupo investigadores concluyeron que el sinergismo del extracto libre de células (80 AU/mL)-cotrimazol (2µg/mL) genera una interferencia microbiana, reduciendo el crecimiento de *Salmonella typhimurium* NCTC 74 en un 50%, y que los tratamientos evaluados de manera independiente presentan porcentajes menores al 25%, con lo anterior, ellos proponen una alternativa medica para el tratamiento de la salmonelosis.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este proyecto de investigación se observó que el medio condicionado de las 4 cepas, presentó efectos inhibitoris para el crecimiento de

E. histolytica, el empleo del medio condicionado o extracto libre de células concuerda en la base metodológica empleada en el trabajo de Rishi *et al.* 2011.

Por otro lado, los medios condicionados de las BAL no solo presentan efectos de inhibición, también presentan el beneficio de potencializar el sistema inmunológico, ya que algunos estudios han demostrado que se incrementan los niveles de lisozima y la producción de especies del agente oxidante. Vicenti 2010, demostró que al agregar medio condicionado de *Lactobacillus rhamnosus GG* a un cultivo de macrófagos, éstos incrementan su actividad fagocítica contra *Escherichia coli*, observando que después de 60 minutos de incubación, el número de células de *E. coli* se redujo.

Lo anterior, demuestra que en los medios condicionados de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *L. c. rhamnosus* se presentan moléculas que son liberadas por éstas bacterias durante el crecimiento, para permitir la interferencia microbiana contra *E. histolytica*. Por lo cual, en nuestra investigación se realizó la caracterización del MC de las cepas evaluadas. Lo anterior concuerda con Grossowicks y Schneerson 1947, quienes demostraron que las BAL reducen el crecimiento de microorganismos indeseables en el tracto intestinal. Este efecto sería consecuencia de la producción de compuestos antibacterianos, de la acidez intestinal originada o del antagonismo competitivo, por lo cual se podría pensar en la inhibición de *E. histolytica* por la acción de la interferencia microbiana generada por los metabolitos producidos por los probióticos evaluados.

Pruebas bioquímicas de los Medios condicionados (MC)

Zapata *et al.* 2009; proponen que una de las características de las BAL es la capacidad de fermentar los carbohidratos, a partir de los cuales, los probióticos tienen la capacidad para producir ácido láctico y otros compuestos como acetato, etanol, CO₂, formato y succinato. Lo anterior se realizó con las cuatro cepas de bacterias trabajadas en el laboratorio, se cultivaron en diferentes fuentes de carbono y a diferentes concentraciones, observando la capacidad de los probióticos para metabolizar los

carbohidratos, como se muestran en las figuras 13, 16, 19 y 22, donde se presentan las curvas de crecimiento de cada una de los microorganismos. Por otro lado, se obtuvo el medio condicionado de cada una de las cepas, determinando que presenta propiedades físicas como: acidez, presentando un rango de pH de 4.67 – 6.00; como lo refiere Zapata *et al.* 2009, el valor del potencial de iones hidrogeno se debe a la presencia de ácido láctico.

Además, Mora *et al.* 2007 reporta en su investigación que el descenso del pH generado por la presencia de ácido láctico, tiene efectos benéficos, al inhibir el crecimiento de bacterias. En esta investigación se evaluó el medio condicionado de las cuatro cepas de probióticos sobre el crecimiento *axénico* de *E. histolytica* determinando inhibiciones superiores al 90% (Fig. 31), por lo cual, la presencia de ácido láctico y por consiguiente la disminución del pH, puede provocar un efecto antagónico, no solo en bacterias como lo Mora *et al.* 2007; sino también en amibas, como se reporta en esta investigación.

Otra propiedad detectada en el medio condicionado fue el olor característico del alcohol, el cual se obtuvo de la fermentación de carbohidratos, Zapata *et al.* 2008; Mora *et al.* 2007; reportan que las BAL tienen la capacidad de producir etanol, el cual funciona como una sustancia antimicrobiana. El alcohol y el ácido láctico presentes en los medios condicionados de *L. plantarum*, *L. casei rhamnosus*, *L. acidophilus* y *L. casei* pueden trabajar de manera sinérgica para potencializar la inhibición de *E. histolytica*.

Además, los medios condicionados obtenidos de las BAL estudiadas fueron sometidos a diferentes pruebas bioquímicas para la detección de carbohidratos, proteínas, cadenas hidrocarbonadas con dobles enlaces, aromaticidad y grupos carbonilos. En la Tabla 8 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas de los medios condicionados de las cuatro cepas estudiadas en esta investigación y el medio MPT que se usó como control. Se demostró la ausencia de compuestos aromáticos, cetónicos y libre de aldehídos, en las muestras analizadas.

El medio condicionado de *L. acidophilus* cultivado en sacarosa 0.5% presentó prueba positiva para insaturaciones (Tabla 8), la prueba indica que en el medio existen moléculas hidrocarbonadas con dobles enlaces.

En la Tabla 11 se presenta el análisis fisicoquímico realizado al medio condicionado de *L. acidophilus*, el cual presentó un contenido de grasas de 0.85%, en base a la NOM-086-SSA1-1994. Los resultados obtenidos muestran que el medio condicionado de *L. acidophilus* presenta moléculas orgánicas, las cuales pueden ser ácidos grasos. Lo anterior permite tener una concordancia con Kandler 1983, él menciona que las bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de metabolizar los carbohidratos, la cual se puede llevar a cabo por una ruta homfermentativa o heterofermentativa, teniendo como resultado la producción de ácidos orgánicos, entre ellos, ácido láctico y ácido acético, ambos ácidos son eliminados por las bacterias hacia el medio de cultivo. Los ácidos orgánicos propuestos por Kandler 1983, se caracterizan por ser compuestos de cadena corta. Los resultados obtenidos del análisis del medio condicionado de *L. acidophilus* no revela la longitud de la cadena, por lo cual, no permite distinguir si son de cadena larga o corta. Raftari *et al.* 2009; realizaron una investigación del efecto de los ácidos orgánicos (ácido acético, láctico, propiónico y fórmico) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus*, observando que el ácido fórmico mostró el mejor efecto antimicrobiano sobre ambas cepas. Lo propuesto por Raftari *et al.* 2009; permite intuir que la presencia de los ácidos orgánicos en el medio condicionado genera una interferencia amibiana sobre *E. histolytica* (Fig. 26, 29 y31).

La Tabla 8 muestra los resultados de la prueba de Molish, la cual permite detectar la presencia de carbohidratos. Los medios condicionados y el control (MPT) presentaron pruebas positivas, indicando la presencia de azúcares en las muestras, pero se observó que la tonalidad del anillo color violeta, fue más fuerte para: MC de *L. casei* en sacarosa 2.0% y glucosa al 2.0%; MC de *L. casei rhamnosus* en glucosa al 2.0% y en el control MPT. El resto de los medios condicionados presentaron una intensidad baja en el color del anillo violeta. La intensidad del color desarrollado en la prueba es directamente

proporcional a la concentración del analito a prueba, por lo tanto, al tener una mayor intensidad en el color del anillo indica una mayor concentración de carbohidratos. Por otra parte, no se reporta que las BAL producen carbohidratos y sean liberadas al medio. La presencia de carbohidratos en los MC se puede relacionar con los remanentes de moléculas de azúcar que quedaron y que no fueron metabolizadas por las bacterias.

Jack *et al.* 1995 y Savadogo *et al.* 2006; mencionan que las bacterias ácido-lácticas tienen capacidad de producir compuestos proteicos denominados bacteriocinas, las cuales se caracterizan por ser compuestos de naturaleza peptídica o proteínas, sintetizados a partir de los ribosomas y que, generalmente, tienen como blanco la membrana celular. En fundamento con Jack *et al.* 1995; Savadogo *et al.* 2006; se realizó la prueba de Biuret para detectar la presencia de compuestos proteicos en los medios condicionados de las BAL y en el control, observando que las todas las muestras analizadas dieron positivas, al desarrollar una coloración violeta (Tabla 8).

El medio condicionado que presentó mayor intensidad en el color violeta fue el de *L. casei sacarosa* 2.0%, después el de *L. plantarum* en lactosa 0.1% y *L. acidophilus* 0.5%, el resto de los medios condicionados presentaron una intensidad baja. Por otro lado, en los medios condicionados se cuantificó el contenido de proteínas por cada 200 mL de medio condicionado, determinando que *L. casei rhamnosus* produjo mayor cantidad de proteínas, 0.6525 g, mientras que, *L. casei* y *L. plantarum* presentaron menor cantidad proteica, 0.3053 y 0.3268 g (Tabla 9). La diferencia entre los resultados de la Tabla 8 y 9 se deben a la cantidad de muestra analizada, además, los resultados de la Tabla 8 fueron obtenidos por pruebas cualitativas, mientras que, la cantidad de proteínas que muestra en la Tabla 9 es cuantitativo. En la Fig. 33 se presenta el contenido de proteínas de los MC de las bacterias ácido lácticas, observando que entre los MC de *L. casei* y *L. acidophilus* de glucosa y sacarosa no presentan diferencia significativa ($p=0.5\%$).

Los medios condicionados y el medio MPT (control) fueron sometidos a un análisis bromatológico bajo la norma oficial NMX-F-608-NORMEX-2002, la cual permite

cuantificar el contenido de proteínas (Tabla 11). El medio condicionado de *L. acidophilus* en sacarosa 0.5% presentó un 2.85% de proteínas, mostrando el mayor contenido de esta biomolécula, mientras que, el menor contenido de proteína fue para el MC de *L. plantarum* en lactosa al 0.1%. Un método cuantitativo realizado en esta investigación fue el Método de Bradford, el cual permite conocer el contenido de proteínas, determinando que el MC de mayor contenido proteico fue el de *L. casei rhamnosus* con una concentración de 0.181 mg/mL, mientras que, el MC de *L. plantarum* presentó una concentración de 0.0525 mg/mL. La concentración de proteínas cuantificada por este método presenta una discrepancia con los anteriores, la diferencia que se observa se puede deber al metabolismo para degradar los azúcares, el tiempo de generación y/o al crecimiento lento de la bacteria, por estos motivos, es recomendable cuidar las concentraciones de los glúcidos y el tiempo de incubación de las bacterias. Los resultados de los análisis bromatológicos, cualitativos y fisicoquímicos de los medios condicionados de las BAL, permiten dar evidencias que contienen proteínas, a las cuales los autores les denominan bacteriocinas.

Fernandez 2000, propone las propiedades fisicoquímicas de las bacteriocinas, como: resistencia a proteasas, solubles en agua, activas a pH ácidos, bactericidas, termoresistente, no imparten sabor o aromas. Dodd y Gasson 1994; mencionan que las bacteriocinas son termoestables. En la Fig. 31 se muestra la interferencia ambiental de los medios condicionados sobre *E. histolytica*, determinando que el MC de *L. acidophilus* en sacarosa 0.5% presentó una inhibición del 98.66%, siendo el mayor porcentaje de interferencia respecto a los otros medios. Por lo anterior, el MC fue sometido a un tratamiento térmico, 80°C/hora, posteriormente, se evaluó a dosis de 0.1, 0.5 1.0% sobre *E. histolytica*, determinando una interferencia de 56.25% a dosis de 0.5% y 71.35% a la dosis de 1.0% (Fig. 32). Los resultados determinan que las proteínas presentes en el medio condicionado son termoresistentes, como lo expone Dodd y Gasson 1994; Fernandez 2000.

En la actualidad se han reportado compuestos proteicos obtenidos a partir de probióticos, a los cuales, los investigadores han denominado a estas moléculas bacteriocinas y han atribuido una gama de efectos benéficos para la salud de los humanos, aplicación en la industria alimenticia, efectos de inhibición en el metabolismo, entre otros. Por lo anterior, un grupo de investigadores nigerianos encabezados por Ogunbanwo *et al.* 2003; caracterizaron dos bacteriocinas, una de *L. plantarum* F1 y otra de *L. brevis* OG1. Las bacteriocinas de estos probióticos se precipitaron con sulfato de amonio se evaluaron a 121°C demostrando ser termoestables, ser activas en un rango de pH de 2-6, presentaron estabilidad por 60 días a -20°C, pero la actividad decrece entre los 80-120 días a 37°C. Los medios condicionados de las cuatro BAL se les adicionó sulfato de amonio y se obtuvo un precipitado, al cual se le realizó la prueba de Biuret, generando un color violeta, indicando la presencia de proteínas, también se llevó a cabo la prueba de insaturaciones, detectando en el precipitado cadenas hidrocarbonadas con insaturaciones. El resultado positivo de Biuret e insaturaciones se puede deber a la presencia de lipoproteínas en el precipitado, el cual es una molécula formada por proteínas y un grupo prostético que es el lípido. El sobrenadante fue evaluado con el reactivo de Biuret y los resultados fueron negativos, indicando la ausencia de proteínas. Además, la prueba de insaturaciones en el sobrenadante dio positivo, indicando la presencia de moléculas orgánicas con insaturaciones, los resultados se muestran en la Tabla 10.

Ogunbanwo *et al.*, 2003; reportaron que las bacteriocinas son termoestables a 121 °C/60 minutos. Nuestro equipo de investigación reportó que las proteínas del MC de *L. acidophilus* presentó ser termoestable a 80°C/h y conservar su actividad biológica, pues en general generó interferencia ambiental después del tratamiento térmico (Fig. 32).

Galinda Yu *et al.* 2012; obtuvieron un liofilizado de bacteriocinas del género *Lactobacillus* y fue evaluado sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, los cuales son un gran problema para la industria alimenticia. La mayoría de las investigaciones consultadas, como la anterior, se enfocan a inhibir el

crecimiento bacteriano usando bacteriocinas, nuestra investigación usó las bacteriocinas para inhibir *E. histolytica*, agente causal de la amibiasis. Las proteínas obtenidas de los MC de las cuatro cepas de BAL, fueron evaluadas a una dosis del 7% m/v sobre el crecimiento axénico de *E. histolytica*, observando porcentajes de interferencia amibiana por arriba del 90% (Fig. 34). Galinda Yu *et al.* 2012; Disha *et al.* 2003; reportaron efectos positivos de las bacteriocinas, nosotros obtuvimos una interferencia microbiana, pero contra *E. histolytica*, lo que indica que las proteínas no solo afectan el crecimiento de bacterias, sino que actúan sobre otros microorganismos, por lo cual, las bacteriocinas poder ser evaluadas en hongos, levaduras, protozoarios, parásitos o algún microorganismo que se considerado como agente causal de enfermedades o nuevas enfermedades emergentes. Además, el uso de bacteriocinas contra agentes infecciosos se puede usar como un tratamiento alternativo y evitar la resistencia de los microorganismos a los medicamentos de elección. Los resultados sugieren que las proteínas de los medios condicionados de las BAL pueden ser usados como un tratamiento alternativo para la amibiasis y disminuir el consumo del metronidazol, el cual, genera efectos secundarios sobre los humanos.

De acuerdo a los resultados de inhibición amibiana, pruebas bioquímicas, contenido de proteínas, análisis fisicoquímicos, el medio condicionado de *Lactobacillus acidophilus* en sacarosa al 0.5%, presentó los resultados más eficientes, por lo cual, a este medio condicionado se le realizó una electroforesis al 8 y 12%, demostrando una mejor separación a la electroforesis del 12% (Fig. 35 y 36) y logrando obtener dos bandas, una presentó un peso molecular próximo a 71KDa y la otra a 9.5 KDa. Ogunbanwo *et al.* 2003; realizaron la caracterización de bacteriocinas de *L. plantarum* F1 y *L. brevis* OGI y concluyen que las proteínas presentan pesos moleculares entre 1,000-100,000, este resultado concuerda con los obtenidos en nuestro trabajo, al revelar la presencia de una proteína de 71 KDa y otra de 9.5KDa, pero no solo se observó la presencia de proteínas en el MC con sacarosa, también, se presentó una banda con peso molecular aproximado a 9.1 KDa en el MC con glucosa al 2% y el control MPT, presentó una banda con un peso molecular próximo a 7.6 KDa, esta banda que se aprecia en el revelador se debe a la presencia de peptona en el medio. Trivedi *et al.*, 2013; caracterizaron la bacteriocina

DT24 de *L. brevis* DT24, obteniendo una banda proteica con un peso molecular aproximado de 7 KDa. Es probable que las dos bandas presentes en el MC de *L. acidophilus* potencializan su efecto de actividad amibiana, pues el modo de acción de las bacteriocinas es atacando la membrana celular, al realizar poros y afectando la homeostasis de la amiba, provocando la lisis amibiana, por lo cual, en el medio se observan detritos y restos celulares. Klaenhammer 1993, reportó que la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células sensibles, debido a que es un mecanismo de acción común presentado por las bacteriocinas generadas por las BAL en su forma bactericida o bacteriostática. La nisina y algunos péptidos pequeños, como lactacina, actúan mediante este mecanismo (Bruno y Montville 1993).

Al medio condicionado de *L. acidophilus* se le realizó la cuantificación de acidez de acuerdo a la AOAC (Tabla 12 y Fig. 36) determinando un 0.5451% en sacarosa y 0.5095% en glucosa, indicando que las proteínas son activas a pH ácido, como lo refiere Trivedi 2013; Ogunbanwo *et al.* 2003; los cuales determinaron que las bacteriocinas ejercen su efecto de inhibición bacteriana en pH de 2-10 (Trivedi 2013) o 2-6 (Ogunbanwo *et al.* 2003).

Las Tablas 14, 15, 16 y 17 presentan una síntesis de la caracterización de los medios condicionados de las cuatro BAL, en su fuente de carbono seleccionada y el control, glucosa 2%.

El medio condicionado con mejor efecto de interferencia amibiana fue el de *L. acidophilus* en sacarosa al 0.5%. A partir de este medio condicionado, propongo que se lleven a cabo pruebas de las bandas mostradas en la electroforesis (Fig. 35), pues estas proteínas pueden ser usadas no solo con efectos amebicidas, si no, en la industria alimenticia, como conservadores, cosmética, bactericida y/o algún otro microorganismo que sea agente causal de enfermedades de difícil tratamiento.

Las fuentes de carbono evaluadas en esta investigación fueron lactosa, sacarosa, fructosa y glucosa, usando las concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0 y 2.0%. Estos datos se deben tomar en cuenta para la producción de las biomoléculas que se localizan en el medio condicionado, principalmente, las proteínas (bacteriocinas), pues los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que el contenido proteico se ve afectado. La cuantificación de proteínas por el método de Bradford, Nanodrop, Norma oficial Mexicana y la precipitación con sulfato de amonio, demuestran que el mayor contenido de proteína se presenta usando como fuente de carbono sacarosa al 0.5 y 1.0%, este azúcar, es un disacárido, el cual, incrementa el contenido de metabolitos en el medio condicionado de *Lactobacillus casei rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus*.

10. CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que:

- *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus* y *L. casei rhamnosus* presentaron mayor crecimiento en sacarosa al 2.0%, 0.5% y 1.0% mostrando absorbancias de 1.7037, 1.3100 y 1.7841 a las nueve horas de incubación y *L. plantarum* creció mejor en lactosa al 0.1% con una absorbancia de 1.7364.
- *E. histolytica* al sexto día de incubación presenta el mayor número de células, 95,416 cel/mL.
- Los MC de las bacterias ácido-lácticas (*Lc*, *La*, *Lcr* y *Lp*) demostraron tener una interferencia microbiana contra *E. histolytica* con dosis de 0.1%, generando inhibiciones mayores del 90% a partir de la fuente de carbono y la concentración elegida. Los medios condicionados de *Lc* y *Lcr* con glucosa al 2.0%, presentaron inhibiciones de 16.52 y 43.31%.
- El contenido de proteínas por el método de Bradford en los medios condicionados presenta un rango de 0.0446 – 0.191mg/mL.
- El contenido de proteínas de los MC de las BAL cuantificado por el Nanodrop presentó un rango de 0.94 – 5.134 mg/mL.
- El contenido de proteína fue de 2.26 – 2.85%.
- Las proteínas obtenidas del medio condicionado de *L. acidophilus* en sacarosa al 0.5%, presentaron termoresistencia, ya que su actividad amebicida sigue teniendo efecto sobre *E. histolytica* con interferencia microbiana arriba del 90% de inhibición, a dosis del 7.0%.
- En la electroforesis del 12% MC de *L. acidophilus* en sacarosa 0.5%, se observó dos bandas, una con un peso molecular próximo a 71 KDa y otra con 9.5 KDa.
- El MC de *L. acidophilus* en sacarosa 0.5% presentó ácidos grasos con insaturaciones,
- Los medios condicionados de las BAL contienen grasa en un rango de 0.63 – 1.3 %.
- Al medio condicionado de *L. acidophilus* sacarosa 0.5% y glucosa 2.0% se les cuantificó el contenido de acidez a partir de la técnica de la AOAC, obteniendo 0.5451 y 0.5095%, mientras que el medio MPT presentó una acidez de 0.3151%.

11. PERSPECTIVAS

En los últimos años los probióticos han adquirido una importancia en la salud a nivel mundial, nacional y estatal, debido al incremento de enfermedades gastrointestinales, como: el síndrome de inflamación intestinal, infecciones intestinales bacterianas, virales y amebianas, esta última por *E. histolytica*.

Esta investigación demostró que las BAL tienen el potencial para inhibir el crecimiento de *E. histolytica*, pero el trabajo permite generar nuevos estudios, considerando las siguientes perspectivas:

- Generar un fármaco a partir de los metabolitos secundarios producidos por *L. acidophilus*.
- Elaborar un perfil proteico de las bacteriocinas para demostrar si el efecto de interferencia microbiana se debe a una o al conjunto de proteínas.
- Determinar la estructura de las bacteriocinas producidas por *L. acidophilus*.
- Determinar el tipo de ácido de láctico que libera *L. acidophilus*, si pertenece al tipo D o L.
- Identificar los tipos de ácidos grasos de cadena corta que son liberados por *L. acidophilus*.
- Determinar el efecto de los ácidos grasos de cadena corta liberados por *L. acidophilus* sobre el crecimiento de microorganismos patógenos

12. BIBLIOGRAFÍA

- Ali IKM, Ehrenkaufer GM, Hackney JA, Singh U. 2007. Growth of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* in 5-azacytidine has limited effects on parasite gene expression. *BioMed Central Genomics* 5: 8-7.
- Allgaier HJ, Werner G, Scheneider U, Zahner H. 1985. Elucidation of the structure of epidermin, a ribosomally synthesized tetracyclic heterodetic polypeptide antibiotic. *Angewandte Chemie* 24: 1051-1053.
- Allison GE, Fremaux C, Klaenhammer TR. 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *Journal of Bacteriology* 176(8):2235-2241.
- Álvarez SH, Brue C, Perdigon G. 2001. Effect of *Lactobacillus casei* and yogurth administration in prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in Young mice. *Journal Food Protection* 64(11): 1768-1774.
- Anderssen EL, Diep DB, Nes IF, Eijsink VGH, Nissen J. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: Two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology* 64(6):2269-2272.
- Axelsson LT, Chung TC, Dobrogosz WJ, Lindgren S. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology Health* 2:131-136.
- Babel FJ. 1977. Antibiosis by lactic cultures bacteria. *Journal of Dairy Science* 60: 815-821.
- Barefoot SF, Klaenhammer TR. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 45(6):1808–1815

- Barrón MP, Quiñones Y. 2018. Antibiosis of cefotaxime/clindamycin and *Lactobacillus acidophilus* on related bacteria to diabetic foot ulcer. Food and Nutrition Sciences, 9:277-28
- Barrón MP, Serrano GC, Villarreal L, Morales MR. 2008. Efecto de probióticos sobre cultivos de *Entamoeba histolytica*. Ciencia, UANL XI (003): 285-290.
- Barrón MP, Villarreal L, Verduzco JA, Mata BD, Morales MR. 2005. *Entamoeba histolytica*: *in vitro* axenic encystation with a serum substitute. Experimental Parasitology 110: 318-321.
- Benyacoub J, Pérez PF, Rochat F, Saudan KY, Reuteler G, Antille N, Humen M, De Antoni GL, Cavadini C, Blum S, Schiffrin EJ. 2005. *Enterococcus faecium* SF68 Enhances the immune response to *Giardia intestinalis* in mice The Journal of Nutrition 135: 5 1171-1176.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2008. Bioquímica Sexta edición. Editorial Reverte: España pp: 97-106
- Bhowmik T, Johnson MC, Ray B. 1987. Factor influencing synthesis and activity of beta galactosidase in *Lactobacillus acidophilus*. Journal of Industrial microbiology and biotechnology 2(1): 1-7.
- Bhunja AK, Johnson MC, Ray B, Klchayanand N. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. Journal Applied Bacteriology 70:(1) 25-33.
- Bierbaum G. Sahl HG. 1991. Induction of autolysis of *Staphylococcus simulans* 22 by Pep5 and nisin and influence of the cationic peptides on the activity of the autolytic enzymes. En nisin and novel lantibiotics. Jung G. y Sahl HG (eds). ESCOM Science Publishers B.V. Leiden, The Netherlands, ESCOM Science Publishers BV. Leiden, The Netherlands pp. 386-396.

- Boulnois GJ, Paton JC, Mitchell TJ, Andrew PW. 1991. Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxins of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* 5(11): 2611-2616.
- Brewer D, Hunter H, Lajoie G. 1998. NMR studies of the antimicrobial salivary peptides histatin 3 and histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions. *Biochemistry and Cell Biology* 76(2-3): 247-256.
- Brogden KA. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3(3): 238-250.
- Bruno MEC, Montville TJ. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 59(9): 3003–3010.
- Bujalance C, Moreno E, Jimenez M, Ruiz A. 2007. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. *International Journal of Food Microbiology* 113(1):28-34.
- Bulet P, Stöcklin R, Menin L. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews* 198: 169-184.
- Casas E, Barrón MP, Villarreal L, Verduzco JA, Mata B, Morales M. 2006. Inhibición del crecimiento axénico in vitro de *Entamoeba histolytica* por acción de *Lactobacillus casei rhanosus* y *Lactobacillus plantarum*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Cermeño AM. 2012. Estudio de propiedades de interés probiótico y tecnológico de dos cepas de *Lactobacillus plantarum*. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. España, Universidad de Zaragoza: 46.
- Chandra RK, Kumari S. 1994. Nutrition and immunity: overview. *Journal of Nutrition* 124: 1433S-1435S.

- Chmiel D. 2001. Mode of action of antimicrobial peptides. *Advances in Molecular and Cell Biology* 16: 260-273.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe natural antimicrobial for food preservation. *International Food Microbiology* 71(1):1-20.
- Coconnier MH, Lievin V, Hemery E, Servin AL. 1998. Antagonistic activity against *Helicobacter* Infection *in vitro* and *in vivo* by the Human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11): 4573–4580.
- Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3: 777-788.
- Councilman WT, Lafleur HA. 1891. Amoebic dysentery. *Johns Hopkins Hosp. Reptorts* 2: 393-548.
- Dahly TA, Midden WR, Hartman PE. 1989. Comparison of killing of Gram negative and Gram positive bacteria by pure single oxygen. *Journal of Applied Bacteriology* 171: 2188-2194.
- Diamond LS, Clark CG. 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Shaudinn, 1903 (Emmended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *Journal of Eukariotic Microbiology* 40: 340-344.
- Diep DB, Nes IF. 2002. Ribosomally syntesized antibacterial peptides in Gram-positive bacteria. *Curr Drug Targets* 3: 107-122.
- Dodd HM, Gasson MJ. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. En: Gasson,M.J., De Vos, W.M. (Eds.). *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*. Ed. Blackie Academic and Professional, Glassgow, United Kingdom, pp.211-251
- Draksler UP, Monferrán C, González S. N. 2007. Inhibición de nematodes gastrointestinales por bacterias probióticas de origen caprino. *Portal Veterinaria Caprinos y Ovinos* 5:1.

- Dunne C. 2001. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. *Inflamm Bowel Diseases* 7:136-145.
- Ehrenstein G, Lecar H. 1977. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quarterly Reviews of Biophysics* 10: 1-34.
- Epanand RH, Vogel HJ. 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta* 462: 11-28.
- Escobar FR, Giraldo GA, Sanabria LP. 2010. Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno. *Revista de Investigación de la Universidad Quindío de Armenia, Colombia* 20: 42-49.
- Falla TJ, Karunaratne DN, Hancock RE. 1996. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *Journal of Biological Chemistry* 271(32): 19298-19303.
- FAO/OMS Consulta Experta en Evaluación de las Propiedades de la Salud y Nutrición de los Probióticos en Alimentos Incluyendo Leche en polvo con bacterias ácido lácticas vivas, Octubre 2001.
- Fath MJ, Kolter R. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiological Reviews* 57: 995-1017.
- Fernandez EE. 2000. *Microbiología de los alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México, pp 43-60.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. 2006. *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: World Health Organization.
- Fordyce AM, Crow VL, Thomas TD. 1984. Regulation of product formation during glucose or lactose limitation in nongrowing cells of *Streptococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 332-337.

- Franz CM, Holzapfel WH, Stiles ME. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety?. *International Journal of Food Microbiology* 47: 1-24.
- Fremaux CA, Klaenhammer TR. 1993. Molecular analyses of the lactacin F operon. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3906-3915.
- Galina YD, Gülhan MÜ. 2012. Development of freeze-dried bacteriocin-containing preparations from lactic acid bacteria to inhibit *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 4: 27-38.
- Ganz T, Lehrer RI. 1998. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Current Opinion in Immunology* 10(1): 41-44.
- Ganz T, Lehrer RI. 1999. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Molecular Medicine Today* 5(7): 292-297.
- González B, Gómez M, Jiménez Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. *Revista de Salud Publica y Nutrición* 4(2).
- González BA, Dominguez ER, Alcocer BR. 2008. *Aloe vera* como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y *L. casei*. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* 6(2): 152-157.
- González BG, Kunji ERS, Driessen AJM, Suárez JE, Konings WN. 1996. Bactericidal mode of action of plantaricin C. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2701-2709.
- González P, Mayo B, Suárez JE. 1994. Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2158-2163.
- Gratia A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales* 93:1040-1041.

- Gross E, Kilyz HH, Nebelin E. 1973. Subtilin. VI. Die structur des subtilins. H.-Z. Z. Physiological Chemistry and Physics 354: 810-812.
- Gross E, Morell J. 1971. The structure of nisin. Journal of the American Chemical Society 93: 4634-4635.
- Hancock RE, Diamond G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends in Microbiology 8(9): 402-410.
- Hancock RE, Lehrer R. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. Trends in Biotechnology 16(2): 82-88.
- Hansen JN, Yong JC, Liu W, Steen MT. 1991. Biosynthesis and mechanism of action of nisin and subtilin. En Nisin and novel lantibiotics. Jung, G. y Shal, H.G. (eds.). pp: 78-93.
- Harwig SS, Kokryakov VN, Swiderek KM, Aleshina GM, Zhao C, Lehrer RI. 1995. Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters 362(1): 65-69.
- Hastings JWS, Johnson K, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. Journal of Bacteriology 173: 7491-7500.
- Håvarstein LS, Diep DB, Nes IF. 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. Molecular Microbiology 16: 229-240.
- Helmerhorst EJ, Breeuwer P, Hof W, Walgreen E, Oomen L, Veerman E, Nieuw A. 1999. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. The Journal of Biological Chemistry 274(11): 7286-7291.

- Holck A, Birkeland SE, Aukrust T, Bloom H. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* LB706. *Journal of General Microbiology* 138: 2715-2720.
- Holck AL, Axelsson L, Schillinger U. 1994. Purification and cloning of piscicolin 61, a bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* LV61. *Current Microbiology* 29: 63-68.
- Holo H, Nilssen O, Nes IF. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *Journal of Bacteriology*. 173(12): 3879–3887.
- Hughenoltz J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Microbiology Reviews* 12: 165-178.
- Hugo AK, De Antoni GL, Pérez PF. 2008. Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* *in vitro*. *Letters in Applied Microbiology* 46: 613–619.
- Isolauri EJ, Rautanen T. 1995. A human lactobacillus strain (*Lactobacillus* GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 88: 90-97.
- Jack RW, Tagg JR. 1991. Isolation and partial structure of streptococcin A-FF22. En *Nisin and novel lantibiotics*. Jung, G. y Shal, H.G. (eds.). ESCOM Science Publishers B.V. Leiden, The Netherlands pp: 171-179.
- Jack, RW, Tagg JR, Ray B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*. 59(2): 171–200.
- Jay JM. 1982. Antimicrobial activity of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 525-527.
- Jiménez DR, Ruiz JL, Cathcart DP, Holo H, Nes IF, Sletten KH, Warner PJ. 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the

- complementary action of two peptides. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 4459-4463.
- Joerger MC, Klaenhammer TR. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology* 167: 439-446.
- Johansson M, Nobaek S, Berggren A, Nyman M, Bjorck I, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G. 1998. Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *International Journal Food Microbiology*. 42(1-2):29-38.
- Jung G. 1991. Antibiotics: a survey. En Nisin and novel antibiotics. Jung, G. y Sahl, H.G. (eds.). ESCOM Science Publishers B.V. Leiden, The Netherlands, pp:1-34.
- Kaila M, Isolauri E, Saxelin M, Arvilommi H, Vesikari T. 1995. Viable versus inactivated lactobacillus strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Archives of Disease in Childhood*. 72(1): 51-53.
- Kailasapathy K, Chin J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology and Cellular Biology*. 78: 80-88.
- Kamysz W, Okrój M, Tukasiak J. 2003. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochimica Polonica* 50(2): 461-469.
- Kandler D. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 49: 209-224.
- Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 337-349.
- Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Microbiology Reviews* 12: 39-86.

- Kokryakov VN, Harwig SS, Panyutich EA, Shevchenko AA, Aleshina GM, Shamova OV, Korneva HA, Lehrer RI. 1993. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters 327(2): 231-236.
- Konisky J. 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. Annual Review of Microbiology 36: 125-144.
- Kordel M, Schüller F, Sahl HG. 1989. Interaction of the pore forming-peptide antibiotics Pep 5, nisin and subtilin with non-energized liposomes. Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters 244(1): 99-102.
- Kozak W, Bardowski J, Dobrzański WT. 1978. Lactostrepcins-acid bacteriocins produced by lactic streptococci. Journal of Dairy Research 45: 247-257.
- Kupke T, Götz F. 1996. Post-translational modification of lantibiotics. Antonie van Leeuwenhoek 69: 139-150.
- Laakso K, Koskenniemi K, Koponen J, Kankainen M, Surakka A, Salusjärvi T, Auvinen P, Savijoki K, Nyman TA, Kalkkinen N, Tynkkynen S, Varmanen P. 2011. Growth phase-associated changes in the proteome and transcriptome of *Lactobacillus rhamnosus* GG in industrial-type whey medium. Microbial Biotechnology 4(6): 746-766.
- Ladokhin AS, Selsted ME, White SH. 1997. Bilayer interactions of indolicidin, a small antimicrobial peptide rich in tryptophan, proline, and basic amino acids. Biophysical Journal 72(2):794–805.
- Ladokhin AS, White SH. 2001. Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. Biochimica et Biophysica Acta 1514(2): 253-260.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

- Lee YK, Seppo S. 1995. The coming of age of probiotics. *Food Science and Technology* 6:241-245.
- Leer RJ, van der Vossen JM, van Giezen M, van Noort JM, Pouwels PH. 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* 141:1629-1635.
- Legator MS, Connor TH, Stoeckel M. 1975. Detection of mutagenic activity of metronidazole and niridazole in body fluids of human and mice. *Science* 188: 1118-1119.
- Lehrer RI, Ganz T. 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunology* 11(1): 23-27.
- Leippe M, Andrä J, Müller HJ. 1994. Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(7):2602–2606.
- Leveau J. 2000. Los microorganismos de interés industrial. Ed. Acribia. Zaragoza, España, Ed. Acribia. Zaragoza, España, pp.167-187, 206, 227-242.
- Lewus CB, Sun S, Montville TJ. 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 58:143-149.
- Lindgren SE, Dobrogosz WJ. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *Federation of European Microbiology Societies FEMS Microbiology Reviews* 87:149-164.
- Lösch FA. 1875. Massive development of amoebae in the large intestine. *Virchow's Archives from Pathology and Anatomy* LXV: 196.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2004. *Brock Biología de los Microorganismos*, 10ª edición, Pearson – Prentice Hall, Madrid (España), pp.164, 910.

- Mangiante G, Colucci G, Canepari P, Bassi C, Nicoli N, Casaril A, Marinello P, Signoretto C, Bengmark S. 2001. *Lactobacillus plantarum* reduces infection of pancreatic necrosis in experimental acute pancreatitis. *Digestive Surgery* 18(1): 47-50.
- Martín B. 2000. Interés de las leches fermentadas en la prevención de las diarreas agudas del lactante y del niño pequeño. *Revista Yogurt vivo*. 7 : 13-15
- Marugg JD, Gonzalez CF, Kunka BS, Ledebøer AM, Pucci MJ, Toonen MY, Vandenberg PA. 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, and bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Applied and Environmental Microbiology* 58(8): 2360–2367.
- McKay AM. 1990. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* against *Listeria* spp. *Letters in Applied Microbiology* 62: 4095-4099.
- Moll G, Ubbink T, Hildeng H, Nissen J, Nes IF, Konings WN, Driessen AJ. 1996. Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two-component bacteriocin. *Journal of Bacteriology* 178: 600-605.
- Moll GN, Konings WN, Driessen AJ. 1999a. Bacteriocins: Mechanisms of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 185-198.
- Monaco V, Locardi E, Formaggio F, Crisma M, Mammi S, Peggion E, Toniolo C, Rebuffat S, Bodo B. 1998. Solution conformational analysis of amphiphilic helical, synthetic analogs of the lipopeptaibol trichogin GA IV. *The Journal of Peptide Research* 52(4): 261-272.
- Monteville TJ, Winkowski K, Ludescher RD. 1995. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *International Dairy Journal* 5: 797-814.
- Mora PN, García GA. 2007. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Pachuca de Soto, Hidalgo, Universidad Autónoma de Hidalgo p.113.

- Morgan S, Ross RP, Hill C. 1995. Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcins A, B, and M. *Applied and Environmental Microbiology* 61(8): 2995-3001.
- Morris SL, Walsh RC, Hansen JN. 1984. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *The Journal of Biological Chemistry* 259: 13590-13594.
- Mørtvedt CI, Sletten K, Nes IF. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1829-1834.
- Motlagh A, Bukhtiyarova M, Ray B. 1994. Complete nucleotide sequences of pSMB74, a plasmid encoding production of pediocin AcH in *Pediococcus acidilactici*. *Letters in Applied Microbiology* 18: 305-312.
- Motlagh A, Johnson MC, Ray B. 1991. Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites. *Journal of Food Protection* 54: 873-878.
- Mulders JW, Boerrigter IJ, Rollema HS, Siezen RJ, de Vos WM. 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *European Journal of Biochemistry* 201: 581-584.
- Nieto JC, Sletten K, Peláez C, Nes IF. 1992. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of General Microbiology* 138: 1985-1990.
- Nissen JH, Håvarstein LS, Sletten K, Nes IF. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology* 174: 5686-5692.
- O'Donnell MM, O'Toole PW, Ross RP. 2013. Catabolic flexibility of mammalian-associated lactobacilli. *Microbial Cell Factories* 12: 48-59.

- Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude, AA. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 y *Lactobacillus brevis* OG1. African Journal of Biotechnology 2(8): 219-227.
- Ojcius DM, Young JD. 1991. Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif?. Trends in Biochemical Sciences 16(6): 225-229.
- OMS. 1997. Amoebiasis-an expert consultation. Weekly Epidemiological Record Apr.4; 72(14):97-99.
- Oxford AE. 1944. Diplococcin, an anti-bacterial protein elaborated by certain milk streptococci. Biochemical Journal 38: 178-183.
- Pasteur L, Joubert JF. 1877. Charbon et septicémie. Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales-Paris 85: 101-115.
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma F, Snijders B, Kqummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. Pediatrics 118(2) 511-521.
- Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Agüero G, Gobbato N. 1995. Immune system stimulation by probiotics. Journal of Dairy Science 78(7): 1597-1606.
- Persson S, Killian JA, Lindblom G. 1998. Molecular ordering of interfacially localized tryptophan analogs in ester- and ether-lipid bilayers studied by 2H-NMR. Biophysical Journal 75(3): 1365-1371.
- Petri W, Gathiram V, Kress K, Saffer LD, Snodgrass TL, Champman MD, Keren Z, Mirelman D. 1993. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose specific adherence lectin. Infection and Immunity 58: 1802-1806.
- Piard JC, Muriana PM, Desmazeaud MJ, Klaenhammer TR. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine containing bacteriocin produced by

- Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. Applied and Environmental Microbiology 58: 279-284.
- Proctor EM, Gregory MA. 1973. Ultrastructure of cyst of *E. histolytica*. International Journal for Parasitology. 3: 455-456.
- Pucci MJ, Vedamuthu ER, Kunka BS, Vandenberg PA. 1988. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1. Applied and Environmental Microbiology 54: 2349-2353.
- Puertollano E, Puertollano M, Chericaorro L, Alvarez G, de Pablo MA. 2005. Acción de los concentrados proteicos de *Lactobacillus plantarum* sobre una línea leucémica humana. Universidad de Jaén, Área de microbiología pp.30-71.
- Pugsley AP. 1984. The ins and outs of colicins. Part II. Lethal action, immunity and ecological implications. Microbiological sciences 1(8): 203-205.
- Pumarola A, Rodríguez A, García J, Piedrola A. 1991. Microbiología y Parasitología Médica. 2ª ed. Editorial Científica y Técnica, S.A. Barcelona, España. p. 915.
- Quadri LE, Sailer M, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME. 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. Journal of Biological Chemistry 269: 12204-12211.
- Quincke E. 1893. Ueber Amöben-Enteritis. Berl. Klin. Wochenscher 30: 1089-1094.
- Raftari M, Abdulmir AS, Son R, Sekawi Z, Fatimah AB. 2009. Effect of organic acids on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* Contaminated Meat. The Open Microbiology Journal 3: 121-127.
- Rammelsberg M, Müller E, Radler F. 1990. Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. Archives of Microbiology 154: 249-252.

- Rayes N, Hansen S, Seehofer D, Müller AR, Serke S, Bengmark S, Neuhaus P. 2002. Early enteral supply of fiber and Lactobacilli versus conventional nutrition: a controlled trial in patients with major abdominal surgery. *Nutrition* 18(7-8):609-615.
- Rayes N, Seehofer D, Hansen S, Boucsein K, Müller AR, Serke S, Bengmark S, Neuhaus P. 2002. Early enteral supply of lactobacillus and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients. *Transplantation* 74(1): 123-127.
- Rishi P, Preet S, Kaur P. 2011. Effect of *L. plantarum* cell-free extract and co-trimoxazole against *Salmonella typhimurium*: a possible adjunct therapy. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 10:9.
- Rodríguez FG, Prieto GE, Espinosa AJ. 2001. Tinidazol: Una droga antimicrobiana con actividad genotóxica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 20(1):54-58.
- Romero CR. 1994. Introducción a la amibiasis, Segunda reunión de expertos. SEARLE, México D.F.
- Romero R. 1993. Microbiología y Parasitología Humana. México, D.F., Editorial Médica Panamericana, pp. 19-32.
- Ross KF, Ronson CW, Tagg JR. 1993. Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene salA from *Streptococcus salivarius* ZOP3. *Applied Environmental Microbiology* 59: 2014-2021.
- Ross RP, Morgan S, Hill C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* 79: 3-16.
- Sahl HG. 1991. Pore formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics. En Nisin and novel lantibiotics. Jung, G. y Sahl, H.G. (eds.). ESCOM Science Publishers B.V. Leiden, The Netherlands, ESCOM Science Publishers B.V. Leiden, The Netherlands. pp. 347-358

- Salminen SW, Morelli L, Marteau P, Brassart D, De vos W, Fondén R, Saxelin M, Collins K, Mongensen G, Birkeland S, Sandholm T. 1993. Demonstration of safety of probiotics -a review-. *International Journal of Food Microbiology* 44: 93-106.
- Samarawickream NA, Brown DM, Upcroft JA, Thammapalard N, Upcroft P. 1997. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40: 833-840.
- Sampson H. 1993. Food allergies in children. *Current Problems In Pediatrics* 23: 230-252.
- Sato KS, Tomioka H, Yokokura T. 1998. Enhancement of host resistance against *Listeria* infection by *Lactobacillus casei*: efficacy of cell wall preparation of *Lactobacillus casei*. *Microbiology and Immunology* 32(12): 1189-2000.
- Savadogo A, Cheik AT, Bassole IH, Traore SA. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. *African Journal of Biotechnology* 5(9): 678-683.
- Schaudinn F. 1903. On the development of some Rhizopoda (Preliminary Report) En: Kean B, Mott K, Rusell A, eds. *Tropical Medicine and Parasitology Classic Investigation: Cornell University Press*. 1:110-118.
- Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB Jr, Tack BF, Vogel HJ. 2002. The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* 277(10): 8279-8289.
- Schleifer KH. 1993. Section 12, Gram-positive cocci. En: *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, P.H.A. Sneath, N.S., Mair, M.E. Sharpe y J.G. Holt (Eds), Williams and Wilkins, Los Angeles, EUA. pp. 75-82
- Selsted ME, Novotny MJ, Morris WL, Tang YQ, Smith W, Cullor JS. 1992. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* 267(7): 4292-4295.

- Shai Y. 1999. Mechanism of the binding insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1462: 55-70.
- Sharpe ME, Pettipher GL. 1983. Food spoilage by lactic acid bacteria. In: *Economic Microbiology*. A. H. Rose (Editor), Academic Press, Nueva York, EUA 8:199-223.
- Skaugen MN, Jung G, Stevanovic S, Sletten K, Abildgaard M, Nes IF. 1994. *In vivo* conversion of L-serine to D-alanine in a ribosomally synthesized polypeptide. *Journal of Biological Chemistry* 269: 27183-27185.
- Steiner H. 1982. Secondary structure of the cecropins: antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia*. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters* 137(2): 283-287.
- Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA, Klaenhammer TR. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram negative bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 57(12): 3613-3615.
- Stoddard GW, Petzel JP, van Belkum MJ, Kok J, McKay LL. 1992. Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* WM4. *Applied Environmental Microbiology* 58: 1952-1961.
- Stoffels G, Nissen-Meyer J, Gudmundsdottir A, Sletten K, Holo H, Nes IF. 1992. Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Applied Environmental Microbiology* 58: 1417-1422.
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews* 40(3): 722-756.
- Tichaczek PS, Nissen J, Nes IF, Vogel RF, Hammes WP. 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. *Systematic and Applied Microbiology* 15:460-468.

- Toba T, Yoshioka E, Itoh T. 1991a. Acidophilucin A, a new heat labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. Letters in Applied Microbiology 12: 106-108.
- Toba T, Yoshioka E, Itoh T. 1991b. Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*. Letters in Applied Microbiology 12: 43-45.
- Toke O. 2005. Antimicrobial peptides. New candidates in the fight against bacterial infections. Biopolymers (Peptide Science) 80: 717-735.
- Trivedi D, Jena PK, Patel JK, and Cshadri S. 2013. Partial purification and characterization of bacteriocin DT24 produced by probiotic vaginal *Lactobacillus brevis* DT24 and determination of its anti-uropathogenic *Escherichia coli* potential. Probiotics and Antimicrobial Proteins 5:142-151.
- Tsai H, Bobek LA. 1998. Human salivary histatins: promising anti-fungal therapeutic agents. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 9(4): 480-497.
- van Belkum JK, Venema G, Holo H, Nes IF, Konings WN, Abee T. 1991b. The bacteriocin lactococcin A specifically increases the permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. Journal of Bacteriology 173:7934-7941.
- van Belkum MJ, Hayema BJ, Jeeninga RE, Kok J, Venema G. 1991a. Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. Applied Environmental Microbiology 57: 492-468.
- van Belkum MJ, Stiles ME. 2000. Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. Natural Product Research 4: 323-335.
- van der Meer JR, Rollema HS, Siezen RJ, Beerthuyzen MM, Kuipers OP, de Vos WM. 1994. Influence of the aminoacid substitutions in the nisin leader peptide on biosynthesis and secretion of nisin by *Lactococcus lactis*. The Journal of Biological Chemistry 269: 3555-3562.

- Venema KA, Haandrikman AJ, Leenhouts KJ, Kok J, Konings WN, Venema G. 1993. Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology* 59: 1041-1048.
- Vicenti J. 2010. The influence of cell-free *Lactobacillus rhamnosus* GG supernatant on the phagocytic activity of macrophages. *Bioscience Horizons* 3(2): 105-112
- Villanueva D, Herbas J, Rocha I. 2009. Perfil Epidemiológico de la amebiasis intestinal de niños y adolescentes en México 2005-2009. *Revista de Enfermedades Infecciosas Pediátricas XXII(89): 5.*
- Voet DV. 2007. *Fundamentos de Bioquímica: La vida a nivel molecular. 2° Edición.* Buenos Aires: Editorial Médica-Panamericana, 2° Edición. Buenos Aires: Editorial Médica-Panamericana.
- von Heijne G. 1983. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *European Journal of Biochemistry* 133: 17-21.
- Vuyst L, Dandamme EJ. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria in bacteriocins of lactic acid bacteria. Edited De Vuyst, L. and Vandamme, Blackie Academic and Professional. Great Britain. pp.91-142.
- Waldir E, Mojmir R, Karel M, Quillama E, Egoavil E. 2007. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista Peruana de Biología* 14(2):271-275.
- Worobo RW, Henkel T, Sailer M, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME. 1994. Characteristics and genetic determinant of a hidrofobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology* 140: 517-526.
- Worobo RW, Van Belkum MJ, Sailer M, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME. 1995. Signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *Journal of Bacteriology* 177: 3143-3149.

- Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical Journal* 81(3):1475-1485.
- Yau WM, Wimley WC, Gawrisch K, White SH. 1998. The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* 37(42): 14713-14718.
- Young RJ, Huffman S. 2003. Probiotic of in children. *Journal of Pediatric Health Care* 17: 277-283.
- Zapata S, Muñoz J, Ruiz OS, Montoya OI, Gutiérrez PA. 2009. Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 16(1): 75-82.
- Zasloff M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Archive of "Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84(15): 5449-5453.
- Ziauddin KS, Rao DN, Amla BL. 1993. *In vitro* study on the effect of lactic acid and sodium chloride on spoilage and pathogenic bacteria of meat. *Journal of Food Science and Technology* 30: 204-207

Páginas electrónicas

- http://www.medizzine.com/pacientes/medicamentos/M/metronidazol_oral.php
(Accesado 19 febrero de 2018)
- <http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/biology.html>. Prevention, C. D. C. a. (2010, 2 de Noviembre de 2010). Life cycle of *Entamoeba histolytica*. Retrieved 20 de febrero de 2018.

NORMAS

- NMX-F-608-NORMEX-2002
- NOM-086-SSA1-1994

13. RESUMEN BIOGRÁFICO

Carlos Alberto Mireles Rangel

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: Caracterización Bioquímica del Medio Condicionado con *Lactobacillus sp.* que Presenta Actividad de Interferencia Microbiana sobre *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.

Campo de Estudio: Ciencia de la Salud

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 01 de Enero de 1984, hijo de Juan Manuel Mireles Herrera y Ventura Rangel Rivera.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2009.

Experiencia Profesional: Docente en la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL) de 2009-2014, Profesor en la Preparatoria 7 Puentes de 2012-2013 y Preparatoria y Escuela Industrial Álvaro Obregón de 2013 a la actualidad(UANL), Maestro en la Preparatoria

José Vascelos Calderón de 2006-2008 y asistente de Laboratorio de tratamientos de Aguas Residuales de 2007-2008.

Participación en el XVI Congreso Internacional de Inocuidad Alimentos, con el trabajo “Efecto del Medio Condicionado de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei rhamnosus* sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*”, organizado por la UDG-CUCEI, logrando el 3er lugar en la exposición de carteles.