



**Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A.C.**

**ESTIMULACIÓN CON OLIGOSACARIDOS DE LA
CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE BACTERIAS
ÁCIDO LÁCTICAS EPÍFITAS DE MELÓN CANTALOUPE
CONTRA *Salmonella* Typhimurium**

Por:

Cynthia Laura Aguilar Gil

TESIS APROBADA POR LA

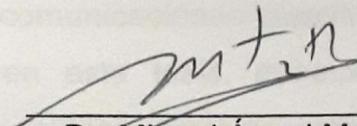
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

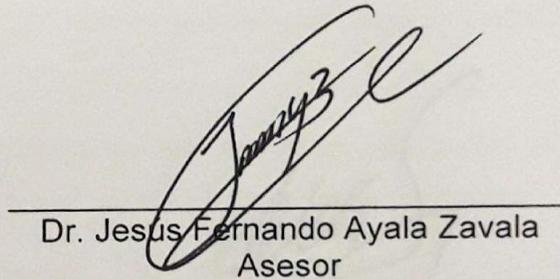
MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

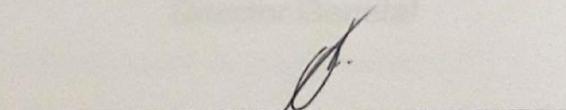
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Q.A. Cynthia Laura Aguilar Gil, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



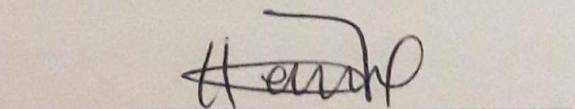
Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Director de Tesis



Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Asesor



Dr. Adrián Hernández Mendoza
Asesor

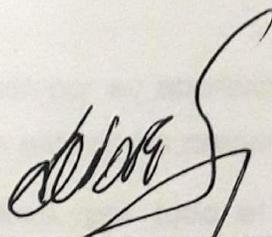


M.C. Emmanuel Aispuro Hernández
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca otorgada para poder realizar este posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por permitirme ser parte de su alumnado, por permitirme utilizar sus instalaciones para poder llevar a cabo mi tesis de maestría y así poder alcanzar una meta más en mi preparación profesional.

Pero sobre todo agradezco primeramente a Dios por las metas alcanzadas y los sueños cumplidos.

Le agradezco enormemente al Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez por aceptar ser mi director de tesis, por todo el aprendizaje, asesorías, por su disponibilidad en horas no laborables, por sus consejos, por siempre sacarme de mi ser negativo, muchas gracias!

Al Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala por su aportación, formación académica y las palabras de ánimo que siempre estuvieron presentes.

Al Dr. Adrián Hernández Mendoza, por todo el conocimiento y asesorías brindadas, por indicarme y asesorarme de cuál era el siguiente paso a seguir en mi experimental, muchas gracias.

Le agradezco al M.C. Emmanuel Aispuro Hernández por siempre tener tiempo para asesorarme en mi trabajo experimental, por el tiempo invertido en mí trabajo, por las palabras de ánimo, gracias por los consejos, por el apoyo técnico en el laboratorio, por todo gracias!

Al técnico del laboratorio Q.B. Francisco Soto, por su ayuda en la realización de este trabajo de maestría y también gracias por las palabras de aliento.

Al Laboratorio de Ecología Química, por su ayuda y préstamos de equipos, en especial a M.C. Consuelo Corrales y a Q.B. Socorro Vallejo, gracias por los momentos compartidos y las palabras de ánimo en momentos difíciles.

Al laboratorio de Microbiología Industrial por la ayuda brindada y el préstamo de equipos para llevar a cabo este trabajo, en especial a la Dra. Itzamná Baqueiro, por su asesoría como investigadora, pero se agradece más sus asesorías de la vida, por los consejos recibidos y por las pláticas fugaces.

A mis compañeros y ex compañeros de laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular Emmanuel, Vanessa, Gabriela, Yuri, Demetrio, Araceli, gracias por todos esos momentos de diversión, momentos de mucho trabajo y por la ayuda brindada durante el trabajo, gracias por su amistad chicos!

A mis amigos que reencontré y a los nuevos que hice durante el tiempo que duro esta etapa Roció, Deyanira, Cristóbal, Julián, Carmen, Karen, Alejandra, muchas gracias por compartir conmigo esos momentos de estrés, momentos de mucha felicidad y diversión, gracias por compartirme su amistad y por el apoyo brindado también en clases, sin duda alguna, sin ustedes esta etapa del estudio no hubiera sido la misma, que sigan los buenos momentos, los quiero mucho!

Le agradezco en especialmente a amiga **Yuri Edith**, porque si no su existiera su terquedad yo no hubiera iniciado con este proyecto, gracias por que fuiste de las principales personas que creyó en que podía llevar a cabo esta Maestría, gracias por tu gran amistad brindada desde hace muchos años, por siempre estar en los momentos difíciles, por compartir los momentos de alegría, gracias por todo, Te quiero mucho!

Durante el paso del tiempo nos encontramos personas las cuales llegan en un momentos de nuestras vidas y no sabemos el gran cambio que causará su presencia, es por eso que agradezco enormemente a **Víctor Eduardo** el que haya aparecido en esta etapa, te agradezco porque me enseñaste a crecer como persona, llegaste a brindarme tu amistad y creo que superamos el nivel máximo, gracias por la ayuda brindada en clases, en el laboratorio, fuera de la escuela, gracias por todos y cada uno de los momentos compartidos, porque gracias a ti pude crecer personalmente, gracias por acompañarme esas noches de desvelos, gracias por estar siempre ahí para mí, Te quiero mucho!!!

Y por último y no menos importante le agradezco a mi familia, en especial a mis papás **Antonio** y **Carmen** por siempre brindarme su apoyo en todo proyecto que inicio, por ser los pilares más importantes en mi vida, por su paciencia ya que durante esta etapa muchas veces no pude estar para ustedes como lo hubiera querido, gracias por siempre apoyarme, los amo infinitamente a los dos, gracias por esas llamadas de atención oportunas y por los sabios consejos que a veces desaprovecho, muchas gracias por todo, a mis hermanas **Martha** y **Carolina** por apoyarme siempre que lo necesito, por siempre cuidarme aunque sea a la distancia, gracias por darme lo más hermoso de esta vida, a mis sobrinos **pepetoño**, **vanne** y **ale**, los amo muchos a TODOS, y les agradezco de todos corazón su existencia, y gracias a Dios por haberme hecho parte de esta hermosa familia, LOS AMO!

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo con todo mi amor y dedicación a Dios por darme las fuerzas para salir adelante, se la dedico mis padres **Antonio Aguilar** y **Carmen Gil**, a mis hermanas Carolina y Martha, a mis hermosos sobrinos, José Antonio y Vanessa Arely Aguilar Aguilar y a Martha Alejandra Salinas Aguilar.

Una dedicatoria muy especial a dos hermosos ángeles que se encuentran en el cielo, que ellas vieron como inicié con esta meta, pero se adelantaron al descanso eterno y no pudieron ver mi meta finalizada, a mi nana Teodora Uzarraga y a mi prima Sandra Luz Aguilar que fue una de las personas que me animo a iniciar con esta etapa y no pudo ver finalizado mi sueño y aun que ya no estaba físicamente conmigo siempre sentí su apoyo y sus porras como ella lo hacía, siempre vivirán en mi corazón, hasta siempre!

CONTENIDO

| | Página |
|--|-----------|
| LISTADO DE FIGURAS..... | x |
| LISTADO DE TABLAS..... | xi |
| RESÚMEN..... | xii |
| ABSTRACT..... | xiv |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 4 |
| II.1 Inocuidad Alimentaria: Reto a Vencer a Nivel Mundial | 4 |
| II.2 Melón Cantaloupe (<i>cucumis melo</i> L.)..... | 5 |
| II.3 Microorganismos Presentes en la Superficie de Frutos y Hortalizas, y su Actividad Antagonista | 8 |
| II.4 Estimulación del Poder Antagonista con Oligosacáridos | 10 |
| II.5 Uso de la Inulina Como Oligosacárido No Digerible | 11 |
| II.6 Fructooligosacáridos Utilizado Como Fuente de Carbono | 13 |
| II.7 Oligosacáridos de Pectina: Como Inductor Potencial de Actividad Antagonista de BAL | 14 |
| II.8 Oligosacáridos de ácido poligalacturónico Como Estimulador de la Potencial Actividad Antagónica de BAL | 17 |
| III. HIPÓTESIS | 19 |
| IV. OBJETIVOS..... | 20 |
| IV.1. Objetivo General..... | 20 |
| IV.2. Objetivos Específicos | 20 |
| V. MATERIALES Y METODOS..... | 21 |
| V.1 Material Vegetal..... | 21 |
| V.2 Cepas y Oligosacáridos Utilizados | 21 |
| V.2.1. Aislamiento de BAL Presentes en el Epicarpio de Melón Cantaloupe.... | 21 |
| V.2.2 Oligosacáridos..... | 22 |
| V.2.2 Medios de Cultivo | 22 |
| V.2.3 Bacteria Patógena y Bacteria Ácido Láctica Testigo | 23 |
| V.3 Determinación de Antagonismo de aislados de Bacterias Ácido Lácticas Frente a <i>Salmonella</i> Typhimurium | 23 |
| V.3.1 Selección de Aislados por Pruebas Bioquímicas y Morfológicas..... | 24 |
| V.4 Determinación de la Tasa de Crecimiento de los Aislados de BAL y <i>Salmonella</i> Typhimurium en Medio de Cultivo Modificado..... | 25 |
| V.4.1 Obtención de Parámetros Cinéticos | 26 |
| V.7 Determinación del Potencial Antagonista <i>in vitro</i> de los Aislados de Bacterias Ácido lácticas en Medios Modificados con los Oligosacáridos seleccionados | 26 |

CONTENIDO (continuación)

| | Páginas |
|--|----------------|
| V.6 Evaluación de la Actividad Antagónica <i>in vivo</i> de Bacterias Ácido Lácticas en Superficies de Melón Cantaloupe | 26 |
| V.7 Identificación de los Aislados de Bacteria Ácido Láctica Seleccionados ... | 28 |
| V.7.1 Identificación por Secuenciación del Gen 16S Ribosomal | 28 |
| V.7.2 Identificación Microbiológica por Fermentación de Carbohidratos Específicos..... | 30 |
| V.8 Análisis Estadístico..... | 31 |
| V.8.1 Determinación de Antagonismo de Aislados de Bacterias Ácido Lácticas Frente a <i>Salmonella</i> Typhimurium | 31 |
| V.8.2 Determinación de la Tasa de Crecimiento de los Aislados de Bacterias Ácido Lácticas y <i>Salmonella</i> Typhimurium..... | 31 |
| V.8.3 Determinación del Potencial Antagonista <i>in vitro</i> de los Aislados de Bacterias Ácido Lácticas en Medios Modificados con los Oligosacáridos seleccionados | 31 |
| V.8.4 Evaluación de la Actividad Antagónica <i>in vivo</i> de Aislados de Bacterias Ácido Lácticas en Superficies de Melón Cantaloupe | 32 |
| VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 33 |
| VI.1 Capacidad Antagónica y Caracterización Bioquímica de Aislados Bacterianos del Epicarpio de Melón..... | 33 |
| VI.2 Efecto de Oligosacáridos en el Crecimiento y Potencial Antagonista <i>in vitro</i> de Bacterias Ácido Lácticas Aisladas del Epicarpio de Melón Contra <i>Salmonella</i> Typhimurium | 38 |
| VI.3 Identificación de los Aislados de BAL por Técnicas Moleculares | 49 |
| VI.4 Estimulación de la Actividad Antagónica de <i>Pediococcus pentosaceus</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> por OP y OAPG en la Superficie de Melón Cantaloupe | 52 |
| VII. CONCLUSIONES | 59 |
| ANEXO I | 60 |
| ANEXO II | 65 |
| REFERENCIAS | 68 |

LISTADO DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Epicarpio de melón infectado con <i>Salmonella</i> Poona | 8 |
| 2 | Estructura de la inulina | 12 |
| 3 | Estructura de los fructooligosacáridos | 14 |
| 4 | Estructura de la pectina | 15 |
| 5 | Estructura de los oligosacáridos de ácido poligalacturónico | 17 |
| 6 | Colonias aisladas del epicarpio del melón cantaloupe | 34 |
| 7 | Antagonismo bacteriano de BAL | 35 |
| 8 | Morfología y tinción Gram de los aislados del epicarpio de melón con actividad antagonista | 37 |
| 9 | Curvas de crecimiento | 41 |
| 10 | Tasa de crecimiento promedio de BAL aisladas del epicarpio de melón por efecto de tratamientos con oligosacáridos o inulina | 44 |
| 11 | Halo de inhibición del aislado de BAL 175 | 46 |
| 12 | Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR-ADN de los aislados bacterianos | 49 |
| 13 | Efecto de oligosacáridos de ácido poligalacturónico (OAPG) sobre la viabilidad de <i>Salmonella</i> Typhimurium en presencia de <i>Enterococcus faecalis</i> | 53 |
| 14 | Efecto de oligosacáridos de ácido poligalacturónico (OAPG) sobre la viabilidad de <i>Salmonella</i> Typhimurium en presencia de <i>Pediococcus pentosaceus</i> | 55 |
| 15 | Efecto de oligosacáridos de pectina (OP) sobre la viabilidad de <i>Salmonella</i> Typhimurium | 56 |

LISTADO DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|--------------|--|---------------|
| 1 | Casos de brotes de ETA's relacionados al consumo de melón cantaloupe en EUA y Canadá en el periodo 2000 al 2013 | 7 |
| 2 | Composición de los oligosacáridos de pectina de cascara de naranja | 16 |
| 3 | Formulación del medio MRS en caldo y/o agar modificado sin glucosa | 23 |
| 4 | Composición de la mezcla de reacción para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar ADN | 29 |
| 5 | Etapas de la PCR | 29 |
| 6 | Morfología de aislados del epicarpio de melón cantaloupe con actividad antagónica contra <i>S. Typhimurium</i> | 36 |
| 7 | Aislados de BAL seleccionados | 38 |
| 8 | Tasa de crecimiento de cada aislado bacteriano con los diferentes tratamientos | 42 |
| 9 | Densidad óptica máxima (DO_{max}) de cada microorganismo con los diferentes tratamientos | 42 |
| 10 | Efecto de oligosacáridos de ácido poligalacturónico en la inhibición de <i>S. Typhimurium</i> por los aislados | 47 |
| 11 | Efecto de oligosacáridos pécticos en la inhibición de <i>S. Typhimurium</i> por el aislado de BAL 175 | 47 |
| 12 | Identificación molecular de BAL epífitas del epicarpio de melón cantaloupe con actividad antagónica contra <i>S. Typhimurium</i> mediante secuenciación del gen ARNr 16S | 50 |
| 13 | Fermentación diferencial de azúcares entre cepas de <i>Pediococcus</i> epífitas del epicarpio de melón | 51 |

RESÚMEN

El melón cantaloupe posee un epicarpio rugoso, que reduce la eficacia de los procesos de desinfección para eliminar patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). La superficie de frutos y hortalizas hospeda microorganismos inocuos, como las bacterias ácido lácticas (BAL), capaces de inhibir el crecimiento de patógenos. Esta capacidad antagónica es estimulada por la fermentación de carbohidratos complejos. Por lo que el objetivo de este estudio fue aislar BAL del epicarpio de melón cantaloupe y evaluar su actividad antagónica, *in vitro* e *in vivo*, contra *Salmonella* Typhimurium, así como determinar el efecto estimulante de dicha actividad mediante la adición de oligosacáridos específicos. Para ello, primero se aislaron 43 cepas de BAL antagonistas del epicarpio de melón cosechados en las temporadas otoño-invierno (2014) y primavera-verano (2016), de los cuales se seleccionaron nueve cepas con la mayor actividad inhibitoria contra *S. Typhimurium* (halo de inhibición >1cm). Posteriormente, se determinó la capacidad de las cepas seleccionadas para metabolizar oligosacáridos de pectina (OP) y de ácido poligalacturónico (OAPG) mediante los parámetros cinéticos DO_{max} y tasa específica de crecimiento (h^{-1}). Las cepas 45, 70, 77, 102, 170 y 210, y la cepa 175 fueron seleccionadas con el tratamiento de OAPG y con OP, respectivamente, (por presentar parámetros cinéticos superiores al del patógeno). El efecto estimulante del antagonismo se evaluó *in vitro* en agar MRS enriquecido con 1 % de oligosacáridos. Se observó que los OP estimularon la actividad inhibitoria *in vitro* de la cepa 175, mientras que los OAPG estimularon a las cepas 45 y 170, mostrando un incremento significativo ($P \leq 0.05$) de 3.3, 2.1 y 1.35 veces, respectivamente. La identificación molecular de las cepas, indicó que el aislado 45 corresponde a *Enterococcus faecalis* y los aislados 170 y 175 a *Pediococcus pentosaceus*. En ensayos *in vivo*, se observó que la cepa de *P. pentosaceus* redujo el número de UFC/cm² de *S. Typhimurium* en presencia de OP al 1 % ($P \leq 0.05$). Estos resultados sugieren que la composición de carbohidratos de los OP al 1 % tiene efecto estimulante

in vitro e *in vivo*, de la capacidad antagónica de *P. pentosaceus* en contra de *S. Typhimurium* en frutos de melón cantaloupe.

Palabras clave: *Cucumis melo* L; antagonismo; microbiota natural; patógenos transmitidos por alimentos, inhibición.

ABSTRACT

Cantaloupe melon has a rough epicarp, which reduces the effectiveness of disinfection processes to eliminate pathogens that cause foodborne diseases. The surface of fruits and vegetables hosts innocuous microorganisms like lactic acid bacteria (LAB), capable of inhibiting the growth of pathogens. This antagonistic capacity is stimulated in LAB by the fermentation of complex carbohydrates. Therefore, the aim of this study was to isolate LAB from cantaloupe epicarp and to evaluate their *in vitro* and *in vivo* antagonistic activity against *Salmonella* Typhimurium, as well as to determine the stimulatory effect of specific oligosaccharides on such antagonism. Forty three LAB isolates were first obtained from cantaloupe epicarp harvested during the autumn-winter and spring-summer seasons, where nine with the higher inhibitory activity over *S. Typhimurium* (inhibition halo >1cm) were selected for further studies. BAL isolates' ability to metabolize pectic oligosaccharides (PO) and poligacturonic acid oligosaccharides (OAPG) was determined based on the kinetic parameters DO_{max} and specific growth rate (h^{-1}). The strains 45, 70, 77, 102, 170 and 210 with OAPG treatment and the strain 175 with PO treatment were respectively selected by their higher DO_{max} or h^{-1} than the pathogen. The stimulatory effect on the antagonism of LAB isolates was evaluated *in vitro* using MRS agar enriched with 1 % oligosaccharides. PO significantly enhanced the *in vitro* inhibitory activity of strain 175, while strains 45 and 170 were stimulated by PGOA, increasing 3.3, 2.1 and 1.35 times respectively, compared to control ($P \leq 0.05$). The molecular identification of strains indicates that isolate 45 corresponds to *Enterococcus faecalis*, and isolates 170 and 175 to *Pediococcus pentosaceus*. For the *in vivo* assays, *P. pentosaceus* reduced the CFU/cm² number of *S. Typhimurium* in the presence of 1 % PO ($P < 0.05$). These results suggest that carbohydrates from PO have an *in vitro* e *in vivo* stimulant effect on *P. pentosaceus* antagonistic activity against *S. Typhimurium* on cantaloupe fruit.

Key words: *Cucumis melo* L, antagonism, natural microbiota, foodborne pathogens, inhibition.

I. INTRODUCCIÓN

El número de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) atribuibles al consumo de vegetales frescos se ha incrementado en los últimos años (Harapas y col., 2010). Los brotes de ETA's causan un considerable número de pérdidas de vidas y económicas. En los Estados Unidos, en el año 2008 se registró un brote de *Salmonella spp.* involucrando al consumo de tomates y pimientos, infectando a 1,442 personas, de las cuales 273 fueron hospitalizadas y dos fallecieron (CDC, 2008). En lo económico, se han estimado pérdidas de más de 100 millones de dólares sólo en el cultivo del tomate, sin tomar en cuenta las pérdidas económicas por el pimiento infectado (Thompson, 2008). Por lo tanto, se tienen que tomar medidas necesarias para reducir el número de brotes de ETA's relacionadas al consumo de productos agrícolas frescos.

Las frutas y hortalizas frescas pueden albergar una gran cantidad de poblaciones bacterianas en su superficie como patógenos contaminantes y bacterias comensales (obscuas) (Badosa y col., 2008). Entre los microorganismos comensales presentes se encuentran las bacterias ácido lácticas (BAL), se han identificado entre *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella cibaria* (Leff y Fierer, 2013). Existen además, algunos microorganismos contaminantes que no son parte de la microbiota natural, pero que pueden contaminar a las frutas y hortalizas, como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* (Badosa y col., 2008). Cuyo crecimiento puede ser inhibido por algunas BAL, que actúan de forma antagónica contra los patógenos humanos (Varo y col., 2009).

El antagonismo que ejercen las BAL sobre los patógenos podría no ser suficiente para eliminarlos totalmente, por lo que es necesaria la búsqueda de alternativas para estimular e incrementar su efecto antagonista (Sharma y col., 2009).

Los oligosacáridos son carbohidratos complejos que se caracterizan por su estructura química, ya que no pueden ser absorbidos en el tracto gastrointestinal (TGI), o que no son hidrolizados por las enzimas digestivas (Conesa y col., 2004). Además de estimular efectos fisiológicos benéficos para la salud, pueden estimular el antagonismo de las BAL en contra de los patógenos humanos (Roberfroid y col., 2010). Los oligosacáridos no digeribles pueden obtenerse por parte de algunos alimentos o ser adicionadas intencionalmente. Una vez consumidos y al llegar al intestino, sirven como fuente de carbono para las BAL presentes en la microbiota natural del tracto gastrointestinal. Los oligosacáridos deben cumplir con ciertas características para poder ser utilizados como prebióticos (Mussatto y Mancilha, 2007). La primer característica es que no debe de ser absorbido ni hidrolizado en el TGI, por lo que debe resistir la acción de los ácidos gástricos y enzimas digestivas (Roberfroid y col., 2010). Adicionalmente, el oligosacárido debe ser fermentado por bacterias benéficas que se encuentran en el TGI del hospedero. Además, debe de estimular los efectos fisiológicos necesarios para la salud. Es por esto, que aunque existen muchos tipos de oligosacáridos, no todos pueden ser usados como prebióticos, pues no cumplen con estas tres características.

Los sistemas de reducción de riesgos de contaminación de los productos agrícolas frescos contemplan varias medidas de control para reducir o eliminar la contaminación biológica de los diferentes cultivos. La aplicación de las buenas prácticas agrícolas en la cadena completa de producción, es reconocida como la mejor forma de prevenir la contaminación de los productos agrícolas frescos (Garmendia y Méndez, 2006). En la actualidad existen diversos métodos para reducir o eliminar la contaminación de las frutas y hortalizas frescas, como el uso de agua potable en el manejo poscosecha, la desinfección

de producto con el propósito de reducir los brotes de ETA's en este tipo de alimentos, cuidado en la higiene del trabajador agrícola (Martínez-Téllez y col., 2007), y dada las diferentes medidas de control, no se ha encontrado una que sea eficaz para erradicar el problema. Por lo tanto, estos métodos actualmente utilizados sólo son de ayuda para tener una mayor eficacia en la erradicación de los microorganismos. Es por esto, que los agricultores buscan que sean más eficaces, prácticos, seguros para los consumidores y de bajo costo (Garmendia y Méndez, 2006).

La importancia de encontrar nuevas alternativas, que cumplan con los parámetros descritos, invita a evaluar nuevos métodos para reducir la incidencia de ETA's por el consumo de vegetales frescos. Por lo que este trabajo propone aislar BAL del epicarpio del melón cantaloupe y evaluar su actividad antagónica contra *Salmonella* Typhimurium, así como determinar el efecto estimulante de dicha actividad mediante la adición de oligosacáridos específicos para potenciar el efecto antagónico en contra de patógenos que generan brotes de ETA's, esto con fines de inocuidad agroalimentaria.

II. ANTECEDENTES

II.1 Inocuidad Alimentaria: Reto a Vencer a Nivel Mundial

La inocuidad alimentaria comúnmente se describe como las acciones y condiciones necesarias para que se preserve la calidad en los alimentos y así poder evitar contaminaciones del tipo físicas, químicas o microbiológicas, esto tendrá como resultado una disminución de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's), con lo cual se podrán prevenir millones de casos de enfermedades a nivel mundial (OMS, 2016). Además, existen organizaciones no gubernamentales a nivel mundial que trabajan para fortalecer las reglamentaciones para mejorar el control en los alimentos y así evitar casos de contaminaciones que tengan como consecuencias enfermedades y retiros de alimentos del comercio (FAO, 2016). Aunque existe reglamentación al respecto a nivel mundial, aún se han reportado miles de casos en donde se ve comprometida la inocuidad de los alimentos, con lo que se evidencian las deficiencias de las reglamentaciones impuestas (OMS, 2016).

Por lo anterior, el 4 de enero del 2011 el gobierno de los Estados Unidos de América aprobó la Ley de Modernización de la Inocuidad de los Alimentos (FSMA, por sus siglas en inglés), mediante la cual se desarrollan y se implementan mayores regulaciones en la inocuidad alimentaria, que tiene como objetivo el tener un enfoque preventivo a diferencia de un enfoque correctivo en los problemas de inocuidad de alimentos (FDA, 2015). Esta Ley amplía la autoridad de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) para vigilar la inocuidad alimentaria de todos los alimentos, incluidos los importados, que abastecen el mercado estadounidense.

Al mismo tiempo, establece nuevas obligaciones y disposiciones a todos los establecimientos estadounidenses y extranjeros, así como a los importadores estadounidenses. (FDA, 2016; SENASICA, 2011).

Además en México en 2007, se modificó la Ley de Sanidad Vegetal, que confiere autoridad a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) para la vigilancia de los sistemas de reducción de riesgos de contaminación, los cuales buscan, de igual manera, prevenir, controlar o erradicar peligros de contaminación en los productos agrícolas frescos y así lograr que los productores que exportan frutas y hortalizas a EUA implementaron las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y las Buenas Prácticas de Manejo (BPM) (SENASICA, 2015).

Estas legislaciones y regulaciones tienen gran relevancia ya que México es uno de los principales exportadores de frutas y hortalizas hacia los Estados Unidos de América, por lo que estas medidas son aplicadas para cualquier hortaliza cosechada en México. Entre los principales productos cosechados en campo mexicanos se encuentran: Tomate, chile verde, cebolla blanca, espárrago y pepino. En Sonora uno de los principales frutos de hortalizas cosechados son calabazas, pepinos, sandías y melones, por lo tanto es aquí donde radica su importancia (SAGARPA, 2011).

II.2 Melón Cantaloupe (*cucumis melo* L.)

El melón cantaloupe es uno de los principales frutos de hortaliza en México que se exporta hacia los EUA, siendo Coahuila el estado con mayor producción, seguido por Guerrero y el estado de Sonora (SENASICA, 2010). En el 2013, en Sonora se sembraron cerca de 2,948.50 Ha, en las cuales se obtuvo una producción de cercana a las 102, 234.23 ton (SIAP, 2014). Es por esto que el

Estado de Sonora es posicionado en el tercer lugar dentro de los estados productores de Melón Cantaloupe.

Los melones se han caracterizado por ser frutos que se han visto involucrados en casos de brotes de Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) registrados en EUA (Castillo y col., 2009). La contaminación de estos frutos puede ser por diversos factores como el suelo, el agua, los equipos utilizados durante su producción y por las personas que los manipulan (Beuchat, 1996; Castillo y col., 2009). La contaminación puede llevarse a cabo durante las diferentes etapas de producción, por ejemplo, durante el desarrollo del fruto, la poscosecha, el empaque, el transporte, o por contaminación cruzada en contacto con carne cruda o utensilios de cocina que no estén lavados y desinfectados (Parnell y col. 2005).

Sin embargo, aun siguiendo las normas y regulaciones, así como las BPA, BPM y los sistemas de reducción de riesgos, se han registrado un considerable número de brotes de enfermedades provocadas por *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter*, norovirus y diferentes serotipos de *Salmonella*, relacionados al consumo de vegetales y frutos frescos (Chapman, 2005). Otro ejemplo se presenta en la Tabla 1 donde se muestran casos de brotes de ETA's provocados por *Salmonella*, en el consumo de melón cantaloupe.

Tabla 1. Casos de brotes de ETA's relacionados al consumo de melón cantaloupe en EUA y Canadá en el periodo 2000 al 2013.

| Año | Patógeno | No. casos | Localidad |
|------|-------------------------------|-----------|------------------------|
| 2000 | <i>Salmonella</i> Poona | 43 | U.S.A y Canadá |
| 2001 | <i>Salmonella</i> Poona | 51 | U.S.A y Canadá |
| 2001 | <i>Salmonella</i> Anatum | 15 | U.S.A (varios estados) |
| 2002 | <i>Salmonella</i> Poona | 43 | U.S.A (varios estados) |
| 2008 | <i>Salmonella</i> Litchfield | 51 | U.S.A (varios estados) |
| 2011 | <i>Salmonella</i> Panama | 20 | U.S.A (varios estados) |
| 2012 | <i>Salmonella</i> Typhimurium | 228 | U.S.A (varios estados) |
| 2012 | <i>Salmonella</i> Newport | 33 | U.S.A (varios estados) |

Fuente: CDC, 2013.

El melón es especialmente aprovechado por los patógenos como vehículo, ya que en su epicarpio o cáscara tiene características que le confieren protección a estos microorganismos. El epicarpio del melón cantaloupe es rugoso, tiene un tipo de malla que puede favorecer la adhesión bacteriana y puede obstaculizar su desprendimiento (Castillo y col., 2009). Además, estas estructuras pueden proporcionar un gran número de espacios cóncavos (Figura 1), que pueden servir como sitios de unión para las bacterias, en los cuales se dificulta el contacto entre las bacterias y los desinfectantes líquidos que son utilizados para erradicar este tipo de microorganismos (Annous y col., 2005).

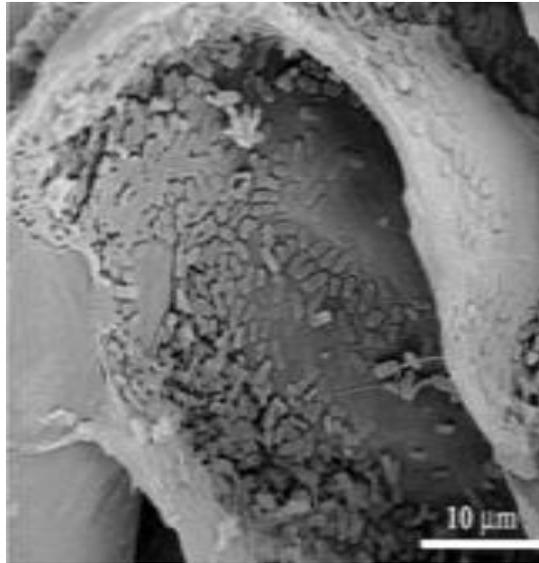


Figura 1. **Epicarpio de melón infectado con *Salmonella Poona***. Tomado de Annous y col. (2009)

II.3 Microorganismos Presentes en la Superficie de Frutos y Hortalizas, y Su Actividad Antagónica

Estudios realizados han demostrado que existe una gran variedad de microorganismos en frutas y hortalizas que son parte de la microbiota natural, se demostró que los tipos de microorganismo en cada producto fueron significativamente distintos entre ellos, aunque en algunos como las espinacas, coliflor, lechugas, tomates y pimientos, existe similitud, ya que presentan bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, en comparación con otros productos como la manzana y uvas, que la mayoría de los microorganismos pertenecían a *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* (Leff y Fierer, 2013).

En melón cantaloupe se encontró que existe una gran cantidad de microorganismos, entre ellos mesófilos, psicrótrofos, coliformes y BAL, demostrando que algunas de estas bacterias ejercen un efecto antagónico contra *Salmonella Saintpaul* y *Escherichia coli*, siendo el grupo de BAL las que presentaron mayor poder antagónico y un mayor número de aislados

bacterianos con esta característica (datos no publicados) (Martínez-Téllez y col., 2014). Tras la fermentación de carbohidratos las bacterias ácido lácticas producen sustancias antimicrobianas como el ácido láctico, ácido acético, peróxido de Hidrógeno y péptidos de bajo peso molecular, llamados bacteriocinas (Casas y Dobrogosz, 2000). Estas sustancias pueden generar un cambio en la microbiota intestinal por la inhibición de patógenos.

Las BAL son un grupo de microorganismos de diferentes especies, pero con características similares. Se caracterizan por ser Gram Positivos, no formadores de esporas, pueden ser cocos o bacilos de tamaño variable (0.5-0.8 μm), no tienen movilidad y carecen de catalasa (Ekinci y Gurel, 2008; Savadogo y col., 2006). Las BAL son un grupo de alrededor de 20 géneros distintos, entre los cuales se encuentran: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus* y *Carnobacterium* que son los principales géneros dentro del grupo (Parra, 2010). *Lactobacillus* es el más grande de estos géneros, que además es reconocido por su habilidad fermentativa por lo que es considerada benéfica por tener un papel protector (Maldonado y col., 2005).

Weissella confusa es una BAL que ha sido aislada de vegetales frescos, productos cárnicos y lácteos fermentados (Cock y col., 2012). Al igual que otras BAL, este género posee actividad antimicrobiana por la producción de diferentes ácidos y bacteriocinas. Las cuales, son compuestos naturales con capacidad de influir en la inocuidad por el poder antimicrobiano que poseen. Aun así, las bacterias Gram negativas en su mayoría no son sensibles a las bacteriocinas, en contraste, las Gram + son más susceptibles a algún daño provocado por las bacteriocinas (Riaz y col., 2010). En general, el modo de acción de las bacteriocinas es a nivel de la membrana citoplasmática, donde actúan formando poros en la membrana, causando con esto el desequilibrio de iones, afectando la síntesis de ATP y el transporte de proteínas, entre otras funciones (Cotter y col., 2005). El daño dependerá del tipo y cantidad de bacteriocinas producidas por las BAL, pero en su gran mayoría se tendrá como consecuencia la muerte del microorganismo (Rosa y Franco, 2009).

Los ácidos orgánicos producidos por las BAL poseen actividad inhibidora del crecimiento bacteriano, donde los ácidos no disociados tienen mayor efectividad. Esto se debe a que al pasar al citoplasma se disocian y provocan un daño mayor por el incremento en la concentración intracelular de protones. El exceso de protones tiene que ser nivelado mediante su transporte activo hacia el exterior por la bomba de protones, lo que agota sus reservas energéticas (Requena y Peláez, 1995). Sin la energía necesaria la bomba de protones se detiene provocando un descenso del pH interno y causa la desnaturalización de proteínas y de otros componentes estructurales, que a su vez interfiere con funciones celulares como la translocación de sustrato y fosforilación oxidativa y afecta la viabilidad (Vásquez y col., 2009).

Las BAL presentes en medio aerobios forman varios metabolitos del oxígeno como peróxido de hidrogeno y radicales libres que provocan un efecto bactericida (Vásquez y col., 2009). El peróxido de hidrógeno actúa como oxidante al estimular la producción de radicales libres que atacan a lípidos, proteínas y ADN. La acumulación del peróxido de hidrógeno se debe a que las BAL no poseen catalasa.

II.4 Estimulación del Poder Antagonista con Oligosacáridos

Los carbohidratos no digeribles (oligosacáridos y polisacáridos), algunos péptidos y proteínas, y ciertos lípidos (ésteres y éteres) son considerados como fuente de carbono para algunas bacterias. Debido a su estructura química, estos compuestos pueden ser utilizados como fuente de energía por distintos microorganismos para llevar a cabo sus funciones principales. Sin embargo, no se ha estudiado esta característica en BAL en la superficie de vegetales. A estos tipos de microorganismos (BAL) se les conoce por su actividad antagónica frente a bacterias patógenas, por ejemplo, en ciertas especies de *Clostridium* y de *Enterobacteriaceae*, las BAL presentan antagonismo gracias a que producen ácidos grasos de cadena corta (AGCC), disminuyen el pH,

producen compuestos antimicrobianos, además de competir por el espacio y nutrientes, así como en el espacio de adhesión (Hudault y col., 1997; Lievin y col., 2000).

Los compuestos hidrocarbonados pueden ser clasificados en dos grupos según el grado de polimerización (GP). Un grupo está conformado por los oligosacáridos que se caracteriza por tener un GP entre dos y 10 unidades de monosacáridos. Mientras que el otro grupo está compuesto por los polisacáridos con un GP de más de 10 monosacáridos (Conesa y col., 2004). Aunque, según Cummings y col. (1997), no existe ninguna relación química o fisiológica que respalde esta división.

Los oligosacáridos que pueden ser usados como fuentes de carbono se clasifican según sus componentes químicos. Se pueden clasificar en Galactooligosacáridos (GOS), Fructooligosacáridos (FOS), transgalactooligosacáridos (TOS) e Inulina (Morales-Koelliker y Vélez-Ruíz, 2013). Estos oligosacáridos están de forma natural en muchos alimentos, por ejemplo, frutas, verduras, hortalizas, legumbres y leche. Estos pueden obtenerse de los alimentos ya mencionados a través de métodos químicos y enzimáticos (Mussatto y Mancilha, 2007).

II.5 Uso de la Inulina Como Oligosacárido No Digerible

La inulina es un polisacárido compuesto por unidades de D-fructosa unidos por enlaces β (1 \rightarrow 2) que al final tiene un residuo de glucosa (Figura 2) (Causey y col., 2000). El grado de polimerización varía de 2 a 65 unidades (Mussatto y Mancilha, 2007). Lo cual hace que este compuesto hidrocarbonado pueda ser utilizado como única fuente de carbono, además, de que está comprobado mediante numerosos estudios en animales y de nutrición humana que la inulina es un prebiótico (Li y col., 2015).

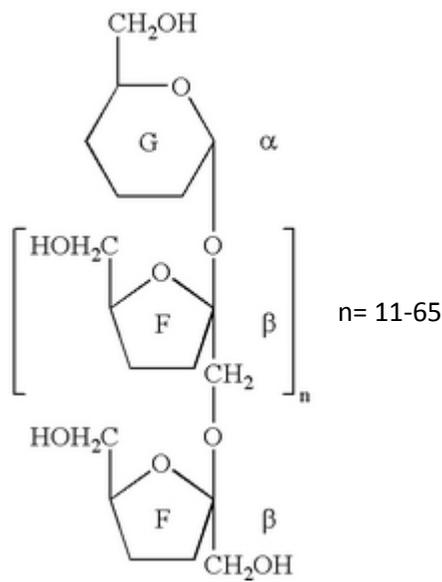


Figura 2. **Estructura de la Inulina.** Modificado de Madrigal y Sangronis (2007).

Según la longitud de la cadena o el grado de polimerización se les denomina fructooligosacáridos (2 a 10 unidades) e inulina (11 a 65 unidades) (Delzenne y Roberfroid, 1994). Por lo tanto, en diferentes trabajos se separa a los fructooligosacáridos de la inulina, teniendo 2 términos diferentes, aunque en su estructura sean muy parecidos, y sólo cambie el grado de polimerización y el número de unidades de fructosa.

La vía metabólica de fermentación de la inulina, tiene como principal producto al butirato, además de acetato y propionato (Rossi y col., 2005). Este ácido es producido por la acción conjunta de la inulina y las BAL. La producción de este ácido es una ventaja, ya que actúa de forma positiva en la microbiota natural, ejerciendo un efecto estimulante en especial en el metabolismo de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Desai y col., 2004).

II.6 Fructooligosacáridos Utilizado Como Fuente de Carbono

Durante la década de los 80, fue cuando el estudio de los oligosacáridos comenzó a llamar la atención de los investigadores, siendo los Fructooligosacáridos (FOS) de los primeros en ser estudiados (Mussatto y Mancilha, 2007). Investigadores japoneses demostraron que los FOS eran fermentados por *Bifidobacterium* y además tenían la capacidad de estimular su crecimiento, este trabajo fue hecho *in vitro* donde se utilizó heces humanas como inóculo (Onompai y col., 2011). Gibson y Wang (1994), confirmaron que los FOS cumplen con las características para ser considerados como buena fuente de carbono para algunos microorganismos, incubando suspensiones fecales con inulina, FOS y fructosa, donde se demostró un mayor aumento de *Bifidobacterium* con FOS. Confirmando la capacidad que tiene este oligosacárido de ser utilizado como fuente carbono.

Los FOS, son el prebiótico más utilizado en el mercado y el más estudiado (Manderson y col., 2005). Tienen un grado de polimerización de 2 a 10 unidades (Figura 3), y regularmente son obtenidos mediante dos métodos. Uno de ellos es la hidrólisis parcial del fructano o la inulina que se obtiene de fuentes naturales, por ejemplo, frutas y vegetales (Pedreschi y col., 2003). El otro método utiliza disacáridos de sacarosa empleando la actividad transfructosilación de la enzima fructofuranosidasa, en este método se necesita una elevada cantidad de materia prima para obtener una buena transglucosilación (Park y Almeida, 1991). Los FOS obtenidos por este método enzimático se caracterizan por tener entre 2 y 4 unidades de fructosa, con una glucosa como residuo terminal, y dependiendo del productor se les ha llamado como "Actilight" o "nutraflora" (Conesa y col., 2004). Es así como este compuesto es conocido por ser uno de los principales oligosacáridos no digeribles en cuanto a volumen de producción se trata.

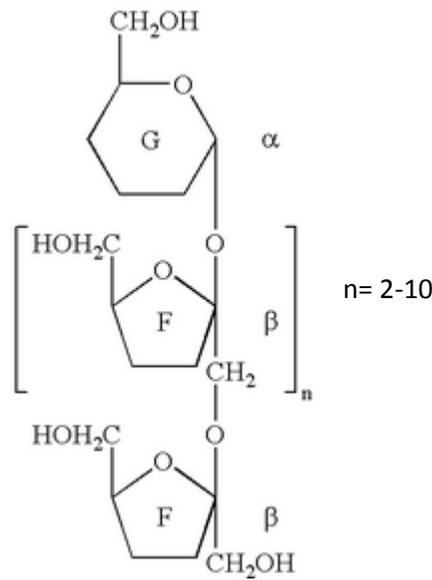


Figura 3. **Estructura de los Fructooligosacáridos.** Modificado de Madrigal y Sangronis (2007).

Aunque este prebiótico es muy utilizado y analizado, no existen estudios sobre su comportamiento en el área de inocuidad en productos agrícolas. Existen trabajos donde se reporta su actividad estimulante en el crecimiento de bacterias ácido lácticas, procedentes de productos agrícolas, pero no se tienen registros del como beneficia este aumento de bacterias en contra de patógenos que contaminan a las frutas y hortalizas durante el proceso de producción.

II.7 Oligosacáridos de Pectina: Como Inductor Potencial de Actividad Antagonista de BAL

Uno de los principales problemas de las industrias alimenticias son los desechos que estas producen. En los últimos años,, diversos estudios se han enfocado en plantear y estandarizar métodos en los cuales se pueda hacer uso de los desechos de las industrias de alimentos de origen vegetal, para obtener productos de interés comercial, tal es el caso de la industria de los cítricos, en donde se obtienen grandes cantidades de desechos como cascara y pulpa de

naranja, limón y bergamota (Mandalari y col., 2007; Gomez y col., 2013; Gomez y col., 2014) De estos desechos se obtienen productos de valor agregado como los aceites esenciales, antioxidantes naturales, etanol, ácidos orgánicos y pectina (Li y col., 2016).

Los oligosacáridos de pectina (OP) son oligosacáridos derivados de la hidrólisis de la pectina que se encuentra en la pared celular de los tejidos vegetales. La pectina al ser hidrolizada por enzimas hidrolíticas como pectinasas y pectolíticas (Jayani y col, 2005) se fracciona en principales estructuras poliméricas (Figura 4): Ramnogalacturonano I (RGI), Ramnogalacturonano II (RGII) y Homogalacturonano, este último, está compuesto por cadenas lineales de α -(1,4)- D-ácido galacturónico, mientras que en las otras estructuras se pueden encontrar otros azúcares como la arabinosa, ramnosa, etc. Manderson y col. (2005) determinaron la composición de azúcares presentes en los oligosacáridos pecticos extraídos de la cascara de naranja (Tabla 2).

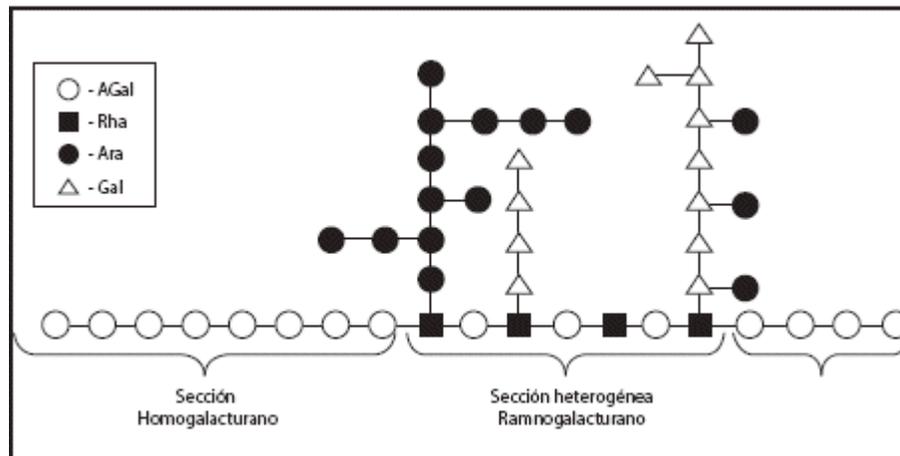


Figura 4. **Estructura de la pectina.** Se especifican las fracciones de Homogalacturonano y Ramnogalacturonano. (Guidi y Arandia, 2010).

Tabla 2. Composición de los Oligosacáridos de Pectina de cascara de Naranja

| Azúcar | % presente en OP |
|----------------------------|-------------------------|
| Glucosa | 48.12 |
| Arabinosa | 31.19 |
| Galactosa | 9.59 |
| Xilosa | 2.44 |
| Ramnosa | 2.13 |
| Fucosa | 0.24 |
| Ácido Galacturónico | 6.29 |

Tomado de: Manderson y col., 2005.

Evidencias del potencial de los OP para ser utilizados como fuentes de carbono, son los trabajos realizados por Olano-Martin, Gibson y Rastall (2002), donde se confirma que los OP son un mejor candidato a prebiótico que las pectinas, por su mayor capacidad fermentativa en presencia *Bifidobacterium angulatum*, *B. infantis* y *B. adolescentis* aunque su efecto bifidogénico es más bajo en comparación con los FOS.

Por su parte Li y col. (2016) estudiaron 3 tipos de OP, que diferían entre sí por la concentración de los diferentes azúcares, en presencia de *Bifidobacterium infantis* y *Lactobacillus acidophilus*. Se realizaron ensayos individuales entre los OP's y cada microorganismo, demostrando que los OP2 presentaron mayor efecto prebiótico en comparación a OP1 y OP3, así como también fue comparable con respecto a los FOS. Además, se hicieron ensayos con bacterias patógenas para conocer su comportamiento y resultó que los OP1 y OP2 mostraron mayor actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*.

De modo similar, Mandalari y col. en el 2007 estudiaron el efecto prebiótico de los OP extraídos de la cascara de bergamota, estos oligosacáridos fueron analizados en presencia de cultivos puros y mixtos de bacterias presentes en

las heces humanas. Eligieron a los FOS para hacer comparativo del efecto prebiótico. La adición de los oligosacáridos de pectina dio como resultado el aumento de células de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, mientras que la población de *Clostridium Perfringens* disminuyó. Además, se calculó el Índice prebiótico (IP), el cual nos indica que tan afín es la BAL al prebiótico utilizado, para los FOS y los OP, para poder hacer una comparación, y observaron que en general se obtuvieron IP más altos con OP (6.9) que con FOS (6.12), lo cual indica que las *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son más afines a los OP extraídos de bergamota en comparación a los FOS.

II.8 Oligosacáridos de Ácido Poligalacturónico Como Estimulador de la Potencial Actividad Antagónica de BAL

Los Oligosacáridos de ácido poligalacturónico (OAPG), son oligosacáridos derivados de la fracción de pectina de la pared celular de vegetales (Figura 5). Estos, son los encargados de la transducción de señales y de vías involucradas en el crecimiento, desarrollo y defensa de plantas (Simpson y col., 1998). Además, en los últimos años ha sido reportado que los oligogalacturónidos con un grado de polimerización de entre 10 y 15 presentan una actividad biológica en plantas (Serrat-Díaz y col., 2013).

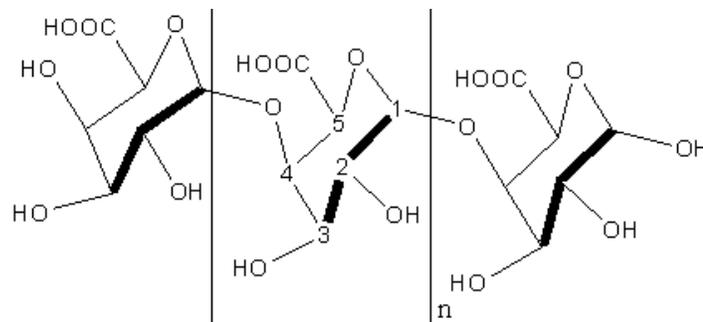


Figura 5. Estructura de los oligosacáridos de ácido poligalacturónico.

Los oligosacáridos son producto de la hidrólisis del ácido poligalacturónico, el cual puede ser extraído de la pectina de la cascara de frutos cítricos. Sin embargo, no existe mucha información sobre su efecto inductor del crecimiento de bacterias (Lang y Dörnenburg, 2000). Solo se conoce que son oligosacáridos lineales de unidades de ácido D-galacturónico que están unidos por enlaces α (1-4), su grado de polimerización (GP) está dado por el número de D-galacturonatos que formen la estructura (Mederos y Hormaza, 2008), además, son oligosacáridos no digeribles, y pueden ser utilizados como compuestos que promueven la salud en la nutrición humana y animal, así como lo hacen los prebióticos ya estudiados como la inulina.

Estos oligosacáridos no han sido muy estudiados por su acción inductora en el crecimiento de los microorganismos, ahí es donde radica la importancia de investigación, ya que solamente han sido estudiados por su efecto elicitor de mecanismos de defensa en plantas (Darvill y col., 1992). Por lo que se busca obtener nueva información por su potencial para inducir el crecimiento de BAL en la superficie de productos agrícolas frescos.

Después de analizar los reportes realizados por los diferentes autores, no se encontró evidencia de trabajos de antagonismo de BAL en las superficies de frutas y hortalizas. En los últimos años este tipo de alimentos ha estado involucrado en brotes de ETA's debido a contaminaciones por bacterias patógenas. Este tipo de frutos tienen algunas bacterias epifitas como las BAL y además pueden tener contaminaciones de bacterias patógenas, por lo tanto es donde surge el interés de conocer el efecto de los oligosacáridos de pectina y de ácido poligalacturónico en este tipo de matrices, esto con el fin de encontrar nuevas alternativas de prevención de contaminaciones del fruto en el campo que sean sustancias con valor agregado y seguros para el consumidor.

III.HIPÓTESIS

Los oligosacáridos derivados de ácido poligalacturónico y de pectina, estimulan la actividad antagonista de bacterias ácido lácticas presentes en la microbiota epífita de melón cantaloupe, contra *Salmonella* Typhimurium.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo General

Evaluar el efecto estimulante *in vitro* de los oligosacáridos derivados de ácido poligalacturónico, oligosacáridos de pectina, fructooligosacáridos e inulina, en la actividad antagonista de BAL, aisladas de la microbiota epífita del melón cantaloupe, vs *Salmonella* Typhimurium y el efecto de su aplicación *in vivo* en el epicarpio del fruto.

IV.2. Objetivos Específicos

1. Determinar las características bioquímicas y la capacidad antagónica y de bacterias ácido lácticas aisladas de epicarpio de melón cantaloupe.
2. Evaluar *in vitro* el efecto de oligosacáridos de pectina, oligosacáridos de ácido poligalacturónico, fructooligosacáridos e inulina sobre el crecimiento y potencial antagonista de bacterias ácido lácticas aisladas del epicarpio de melón contra *Salmonella* Typhimurium y se seleccionaron aquellas con mayor capacidad antagónica.
3. Identificar las cepas seleccionadas mediante la secuenciación del gen 16S ARN ribosomal.
4. Evaluar la actividad antagónica *in vivo* de las BAL seleccionadas con la aplicación del oligosacárido, en superficies de melón cantaloupe.

V. MATERIALES Y METODOS

V.1 Material Vegetal

Para el aislamiento de BAL se recolectaron 25 frutos de melón cantaloupe listos para cosecha comercial durante la temporada otoño-invierno (Octubre) 2014 y primavera-verano (Mayo) 2015. Se muestrearon directamente del campo de cultivo localizado en el valle de Guaymas, Sonora (coordenadas 28.245633-110.650780) empleando guantes de látex estériles y se depositaron en bolsas estériles de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-109-SSA1-1994. Las muestras se depositaron en contenedores para ser transportadas al laboratorio de Fisiología Vegetal-Molecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. en Hermosillo, Sonora, para su procesamiento antes de 24 h.

V.2 Cepas y Oligosacáridos Utilizados

V.2.1. Aislamiento de BAL Presentes en el Epicarpio de Melón Cantaloupe

A partir de cada fruto recolectado, como se describió anteriormente, se tomó una muestra de 5x6 cm del epicarpio el cual se puso en 99 mililitros de agua peptonada al 0.1 %, para homogenizarlo en un stomacher (400 Circulator, Seward Stomacher®) a 260 rpm por un min, y se realizaron diluciones en serie hasta la dilución 1×10^{-4} . Después se procedió a una siembra en superficie en placas Petri con agar MRS (Franklin, NJ) y se incubaron en anaerobiosis a 37 °C por 48 h en una incubadora (Yamato IC 600, Tokio Japón). Posteriormente, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). Las colonias obtenidas se pasaron a MRS en caldo para incubarlas por 24 h a 37 °C.

Una alícuota de 800 µL del cultivo con 24 h de crecimiento se transfirió a viales con glicerol al 20% para su conservación en congelación a -80 °C hasta su utilización (Andrade-Bustamante, 2014).

V.2.2 Oligosacáridos

Se utilizó inulina y fructooligosacáridos comerciales marca Sigma-Aldrich (San Louis, MO). Los oligosacáridos de ácido poligalacturónico (OAPG) y oligosacáridos de pectina (OP) con un grado de polimerización (GP) de 3-20, se obtuvieron en el laboratorio de Fisiología Vegetal-Molecular del CIAD, mediante hidrólisis enzimática del ácido poligalacturónico (Sigma-Aldrich), por la metodología de Ochoa-Villareal y col., 2012. Los oligosacáridos se agregaron a los medios de cultivo al 1 % p/v, se estabilizó a pH final a 6.2 y se esterilizó a 121 °C durante 15 min según lo descrito por Saarela y col. (2003).

V.2.2 Medios de Cultivo

Se utilizaron los medios de cultivo comerciales TSB, TSB sin dextrosa, MRS caldo, MRS agar y agar-agar (DIFCO, Detroit, MI). Se utilizaron caldo de cultivo MRS y agar MRS modificados sin glucosa, para lo cual se reformuló el contenido de acuerdo a lo descrito por Saarella y col. (2003). La formulación se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Formulación del medio MRS modificado sin glucosa. Formulación para 1000 mL.

| Reactivo/Medio | Cantidad | Marca |
|------------------------|----------|----------------|
| Peptona | 10 g | Oxoid Ltd |
| Extracto de levadura | 5 g | Oxoid Ltd |
| Acetato de sodio | 5 g | Oxoid Ltd |
| $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ | 2 g | Sigma Aldrich |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.2 g | Sigma Aldrich |
| $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ | 0.05 g | Sigma Aldrich |
| Tween 80 | 1 mL | Merk Darmstadt |
| *Agar granulado | 15 g | Difco |

* Se agrega agar granulado cuando se requiere hacer medio MRS Agar en placas Petri.

V.2.3 Bacteria Patógena y Bacteria Ácido Láctica Testigo

Se utilizó *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, del cepario del Laboratorio de Fisiología Vegetal-Molecular del CIAD. Además, se utilizó *Lactobacillus animalis* como bacteria testigo, ya que se observó en la Universidad de Texas A&M que presentaba actividad antagonista en la en contra de patógenos contaminantes (Castillo, comunicación personal).

V.3 Determinación de Antagonismo de Aislados de Bacterias Ácido Lácticas Frente a *Salmonella* Typhimurium

Las cepas de BAL obtenidas y posteriormente congeladas, se pasaron a tubos con caldo MRS y se incubaron durante 24 h a 37 °C, se tomó una alícuota (1 µL) del caldo y se realizó siembra el gota sobre cada una de las placas Petri con agar MRS. Se incubaron a 37 °C durante 24 h.

La bacteria patógena *S. Typhimurium* almacenada en congelación se sembró en tubos con caldo TSB y se incubó por 24 h a 37 °C. Posteriormente el paquete celular se recuperó por centrifugación durante 15 min a 3500 x g y se lavó en tres ocasiones con buffer de fosfatos salino esteril (PBS pH 7.4) (NaCl 124 mmol/L, Na_2HPO_4 10 mmol/L, y KH_2PO_4 3 mmol/L). El paquete celular se

suspendió en 9 mL del mismo buffer, se homogenizó y se realizó un inóculo de 1 mL con absorbancia de 0.1 (aproximadamente 1×10^6 UFC/mL) unidades a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro Bio.spec 1601 (Shimadzu, Japón) que se depositó en 9 mL de agar semisólido preparado con caldo TSB y agar al 4%. Este a su vez, se homogenizó y se virió sobre las placas de MRS con las colonias de BAL con 24 h de incubación. Las placas fueron nuevamente incubadas por 24 h a 37 °C con el agar suave superpuesto mediante la técnica modificada de agar semisuave superpuesto (overlay). Pasado el tiempo requerido se midió el halo de inhibición en cm, utilizando un vernier (Kropinski y col., 2009).

V.3.1 Selección de Aislados por Pruebas Bioquímicas y Morfológicas

Los aislados bacterianos que lograron inhibir el crecimiento de *Salmonella* fueron sometidos a las pruebas bioquímicas de Catalasa, Oxidasa y tinción Gram, para seleccionar aquellos que cumplieron con características de bacterias ácido lácticas. El procedimiento de las pruebas se describe a continuación:

Prueba de catalasa. Se tomó una colonia aislada con el asa y se colocó en un portaobjetos (Bailón y Cervantes, 2003). Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ), esto con el fin de seleccionar aquellos aislados bacterianos que dieran la prueba negativa (no hubo formación de burbujas), ya que la catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias y descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Las bacterias anaerobias carecen de catalasa; característica de las BAL (Ramírez y col., 2011).

Prueba de oxidasa. Se tomó una colonia aislada con el asa y se colocó en un portaobjetos, donde se le agregó una gota de reactivo de Kovacs (5 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 75 mL de alcohol amílico además de 25 mL de

HCl concentrado) (Bailón y Cervantes, 2003). Esta prueba se utilizó para conocer si el microorganismo es productor de la enzima citocromo-c-oxidasa. Un resultado negativo (no presenta cambio a color azul, la masa bacteriana) es esperado para las BAL ya que carecen de citocromos (Ramírez y col., 2011).

Tinción de Gram. Se tomó una colonia y se expuso a las distintas fases de la tinción (Forbes y Weissfeld, 2009), donde se seleccionaron aquellos aislados bacterianos que presentaron tinción Gram positiva (cocos o bacilos color azul), ya que esta es una de las características principales de las BAL (Carr y col., 2002).

V.4 Determinación de la Tasa de Crecimiento de los Aislados de BAL y *Salmonella* Typhimurium en Medio de Cultivo Modificado

Se realizaron curvas de crecimiento a los aislados con características bioquímicas y morfológicas semejantes a las bacterias ácido lácticas y para *Salmonella* Typhimurium, en presencia de oligosacáridos OP y OAPG a una concentración de 1 % p/v para determinar los parámetros cinéticos de densidad óptica máxima (DO_{max}) y tasa de crecimiento (h^{-1}) de estos microorganismos. De los aislados de BAL se tomó muestra con una asa y se inoculó en caldo MRS para su crecimiento, se incubó a 37 °C por 24 h, pasado el tiempo se tomó muestra del caldo MRS y se inoculó por estriado en placas de agar MRS y fueron incubadas a 37° C por 24 h, pasado el tiempo, se tomaron colonias aisladas para realizar el inóculo en una solución salina al 0.85 %, el inóculo inicial se ajustó a una concentración de 1×10^6 UFC/mL (0.1 absorbancia a 600nm), del cual se tomó 1 mL y se le agregó al matraz que contenía caldo MRS modificado sin glucosa (siguiendo la formulación descrita en la sección V.2.2), suplementado con los oligosacáridos de pectina y los oligosacáridos derivados de ácido poligalacturónico de forma individual a una concentración de 1 % p/v, el ensayo se hizo por triplicado. Se tomaron lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm en intervalos de tiempo de 2 h, hasta llegar a la

fase estacionaria. Se llevó a cabo el mismo procedimiento para *S. Typhimurium*, utilizando caldo TSB sin glucosa y agar TSA suplementado con 1 % p/v de OP y OAPG para el crecimiento de las colonias aisladas.

V.4.1 Obtención de Parámetros Cinéticos

Se calcularon las tasas de crecimiento (h^{-1}) y densidad óptica máxima (DO_{max}) de los aislados bacterianos, empleando el programa Growth Rates 2.0, a partir de las densidades ópticas registradas en las curvas de crecimiento (Hall y col., 2013).

V.7 Determinación del Potencial Antagonista *in vitro* de los Aislados de Bacterias Ácido Lácticas en Medios Modificados con los Oligosacáridos Seleccionados

Los aislados de BAL que presentaron la mayor DO_{max} o tasa de crecimiento se incubaron durante 24 h a 37 °C en caldo MRS, se tomó 1 μ L del caldo y se sembró en gota sobre cada una de las placas Petri con agar MRS modificado, descrito en la Tabla 2, con los oligosacáridos seleccionados en una concentración al 1 % de oligosacáridos. Se incubaron a 37 °C durante 24 h. El ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano de *Salmonella* se realizó de acuerdo a lo descrito en el punto V.3 de este trabajo.

V.6 Evaluación de la Actividad Antagónica *in vivo* de Bacterias Ácido Lácticas en Superficies de Melón Cantaloupe

Se seleccionaron frutos de melón cantaloupe libres de daños físicos aparentes de un supermercado local y se transportaron al laboratorio de Fisiología Vegetal-Molecular en CIAD. Los frutos fueron desinfectados con una solución

de hipoclorito de sodio 1000 ppm, utilizando el cloro comercial Cloralex®, se llevaron a cabo 3 lavados cada 10 min, eliminando el exceso de la solución de hipoclorito de sodio con agua destilada estéril, después se dejaron escurrir en una zona estéril para que se secaran y poder realizar los cortes (Rodríguez-Leyva, 2004).

Se tomaron muestras de epicarpio de 7 melones, de los cuales se obtuvieron 4 cortes por melón de 7 x 7 cm aproximadamente, para realizar los cortes se utilizó una regla metálica y un bisturí estéril. Los cortes obtenidos se colocaron en placas Petri de vidrio de 150X20 mm de diámetro, previamente esterilizadas, las cuales se etiquetaron con los diferentes tratamientos utilizados.

Los inóculos de las BAL y de *Salmonella* Typhimurium se realizaron de acuerdo a la siguiente metodología: Se tomaron asadas de los aislados de BAL congelados y se reactivaron en tubos con caldo MRS, después, se tomaron inóculos de 20µL y se pasaron a tubos con caldo MRS modificado y suplementado con oligosacáridos de OGAS y de OP al 1 % p/v. En el caso de la *S. Typhimurium* se tomó asada del congelado y se reactivó en caldo TSB, incubando los diferentes microorganismos a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se tomaron muestras de los tubos con crecimiento y se sembraron por estría en placas Petri con agar MRS para las BAL y con agar TSA para *S. Typhimurium*, y se incubaron a 37 °C por 24 h. Colonias aisladas se utilizaron para inocular con una solución de (1×10^6 UFC/mL) 30 mL del caldo de cultivo correspondiente para BAL o *S. Typhimurium* modificado y suplementado con oligosacáridos de OGAS y de OP al 1 % p/v. Esta solución con el inóculo se colocó en una caja Petri de vidrio donde se sumergieron los cortes del epicarpio de melón por 10 s hasta que estuvieran completamente empapados. Los cortes empapados se dejaron escurrir por unos segundos y se volvieron a colocar en la caja Petri correspondiente, todo esto se realizó en una zona estéril y con mecheros, para evitar contaminaciones en los cortes, así como también evitar la dispersión del patógeno.

Ya inoculados, los cortes se colocaron en una campana de flujo laminar a una temperatura de 25 °C aproximadamente y se procedió a tomar muestra a las 0, 24, 48 y 72 h, para realizar una cuantificación de *S. Typhimurium* y de BAL mediante la técnica de conteo en placa por diluciones seriadas. Se tomaron las muestras correspondientes a cada uno de los tratamientos en los tiempos establecidos, y se homogenizaron con 99 mL de agua peptonada al 0.1 % cada muestra, en un homogeneizador stomacher-400 circulator seaward, programado a 300 rpm durante 2 minutos. Se realizaron las diluciones seriadas hasta una dilución de 10^{-6} UFC/mL. Se sembraron dos placas de cada una de las diluciones 10^{-4} UFC/mL, 10^{-5} UFC/mL y 10^{-6} UFC/mL, en agar XLD (DIFCO, Detroit, MI) para *S. Typhimurium* y agar MRS para BAL, para determinar el número de UFC/mL de *S. Typhimurium* y de BAL recuperadas según Mislivec y col., 1992.

V.7 Identificación de los Aislados de Bacteria Ácido Láctica Seleccionados

V.7.1 Identificación por Secuenciación del Gen 16S Ribosomal

Se realizó la extracción de ADN de aquellos aislados bacterianos que cumplieron con las características de antagonismo en medios modificados, utilizando los reactivos comerciales QIA amp DNA mini kit, donde se siguieron las instrucciones del fabricante. El ADN genómico extraído fue utilizado como templado en una reacción en cadena de la polimerasa con los iniciadores universales sentido 27FW (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y antisentido 1492 RV (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'), además de los componentes mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición de la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el ADN.

| Componente | Cantidad en μL |
|-------------------------------|---|
| MgCl₂ 25 mM | 4 |
| dNTP's | 1 |
| Buffer 5X | 10 |
| Got Taq DNA polimerasa | 0.25 |
| Templado | * |
| FW (iniciador) | 1.5 |
| RV(antisentido) | 1.5 |
| Agua esteril | ** |
| Volumen final | 50 |

*Dependerá de los μL 's de templado necesarios para tener la concentración de 200 ng de ADN.

** Dependerá de la cantidad final del templado calculado.

Las mezclas realizadas se colocaron en un termociclador Perkin-Elmer P15389 (Waltham, MA), en el cual se programó con las condiciones necesarias para la amplificación de un fragmento aproximado de 1460 pb del gen 16S ARN ribosomal. Las condiciones del programa están descritas en la Tabla 5.

Tabla 5. Etapas de la PCR. Ciclos, temperaturas y tiempos para la amplificación del gen 16S ARN ribosomal.

| Etapas | Ciclo de la PCR | Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | Tiempo (min) |
|---------------|---------------------------|--|---------------------|
| 1 | Desnaturalización inicial | 95 | 5 |
| 2 | Desnaturalización* | 95 | 1 |
| 3 | Alineación* | 55 | 1 |
| 4 | Extensión* | 72 | 2 |
| 5 | Extensión final | 72 | 10 |
| 6 | conservación | 4 | - |

* Repetir las etapas 2, 3 y 4 por 30 ciclos de reacción.

Los productos de PCR obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Sigma Aldrich) durante 60 min a 60 volt constantes en una cámara de electroforesis (BIO-RAD Power Pac 300) utilizando un buffer TBE 0.5X. Pasado el tiempo fueron teñidos con Gel Red (BIOTIUM) y se observaron en un transluminador de luz ultravioleta UV (UVP).

Para la purificación de los productos de PCR se utilizó ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante, después, se cuantifico la concentración de los productos en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 y la pureza se determinó mediante la relación 260/280. Los productos de PCR purificados se secuenciaron en Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

V.7.2 Identificación Microbiológica por Fermentación de Carbohidratos Específicos

La diferenciación entre dos cepas de bacterias ácido lácticas del mismo género y especie se llevó a cabo mediante la fermentación diferencial de azúcares. Se utilizaron 10 mL de caldo MRS basal sin glucosa, preparado como se menciona en la Tabla 2, suplementado al 1 % por los azúcares sacarosa, trehalosa, maltosa y ramnosa. Se utilizó el indicador purpura de bromocresol para comprobar la producción de ácido, ya que este vira de color azul a amarillo cuando se detecta la presencia de ácidos. El tubo con el caldo preparado adicionado con el azúcar al 1 % y el indicador se inoculó con la bacteria correspondiente y se incubó a 37 °C por 24 h. Se tomó como positivo aquel tubo que virara del color azul a amarillo y que además presentara turbidez por el crecimiento bacteriano. Los tubos que presentaron turbidez por el crecimiento bacteriano pero que no fueron amarillos se tomaron como negativos.

V.8 Análisis Estadístico

V.8.1 Determinación de Antagonismo de Aislados de Bacterias Ácido Lácticas Frente a *Salmonella Typhimurium*

Se utilizó estadística descriptiva para determinar la media de las réplicas en donde la variable respuesta fue el halo de inhibición medido en cm.

V.8.2 Determinación de la Tasa de Crecimiento de los Aislados de Bacterias Ácido Lácticas y *Salmonella Typhimurium*

Se realizó un diseño completamente al azar con mediciones repetidas, utilizando una comparación de medias por el método de Tukey-Kramer, en donde los factores fueron los diferentes oligosacáridos, y las variables respuesta fueron la constante de la tasa de crecimiento (h^{-1}) y densidad óptica máxima (DO_{max}).

V.8.3 Determinación del Potencial Antagonista *in vitro* de los Aislados de Bacterias Ácido Lácticas en Medios Modificados con los Oligosacáridos Seleccionados

Se realizó un ANOVA de una vía con un diseño completamente al azar con comparación de medias por Tukey-Kramer. El factor fue el tipo de oligosacárido y la variable respuesta fue el diámetro del halo de inhibición, medido en cm.

V.8.4 Evaluación de la Actividad Antagónica *in vivo* de Aislados de Bacterias Ácido Lácticas en Superficies de Melón Cantaloupe

Se empleó un diseño completamente al azar con un ANOVA de una vía y para la comparación de medias, el método de Tukey-Kramer, donde los factores fueron los diferentes tratamientos utilizados, y como variable de respuesta las UFC/cm² de *S. Typhimurium*.

Todos los resultados que se obtuvieron, fueron analizados con el paquete estadístico NCSS 2007(J.L. Hintze, Kaysville, UT).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Capacidad Antagónica y Caracterización Bioquímica de Aislados Bacterianos del Epicarpio de Melón

Doscientos ochenta y cuatro aislados bacterianos se obtuvieron de la superficie del melón cantaloupe (Figura 6) utilizando el medio MRS; con el objetivo de favorecer el crecimiento de BAL, las cuales su presencia se ha encontrado en la superficie de frutas y hortalizas frescas como tomate, chile jalapeño, espinaca baby, lechuga y cilantro (Varo y col., 2009; Martínez-Téllez y col., 2014; Leff y Fierer, 2013). Los frutos generalmente poseen un pH más bajo que los vegetales, por lo que suelen tener una microflora epífita diferente; en frutos predomina la presencia de hongos y bacterias ácido lácticas (Fernandez Escartin, 2000). Lo anterior, aunado al número de aislados bacterianos obtenidos en el presente trabajo indica que entre la microbiota epífita del epicarpio del melón podrían existir diferentes tipos BAL, aunque muchos de estos podrían corresponder a la misma cepa.

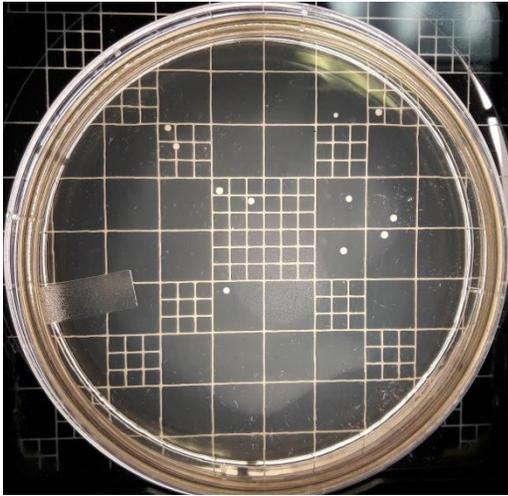


Figura 6. **Colonias aisladas del epicarpio del melón cantaloupe.**

De los 284 aislados bacterianos encontrados en la superficie del melón, 78 mostraron actividad antagonista contra *S. Typhimurium*, considerando como positivos los que produjeron halos mayores de 0.4 cm de diámetro (Figura 7). Los diámetros de los halos variaron de 0.4 a 2 cm entre los diferentes aislados bacterianos. Martínez-Téllez y col. (2014) también usaron la técnica de agar semisuave superpuesto para determinar antagonismo de diferentes microorganismos, como mesófilos, coliformes, psicrotrofos y bacterias ácido lácticas, en contra de *Salmonella Saintpaul* y *Escherichia coli* O157:H7, donde las bacterias ácido lácticas fueron las que mostraron mayor efecto antagónico contra los patógenos mencionados. El efecto antagonista de los aislados bacterianos podría deberse a la producción de sustancias antimicrobianas. Estas sustancias pueden ser péptidos de bajo peso molecular como las bacteriocinas y peróxido de hidrogeno, además de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), ácido láctico, por lo cual disminuyen el pH del medio provocando la muerte de la bacteria patógena, además también pueden competir por nutrientes (Casas y Dobrogosz, 2000; Hudault y col., 1997; Lievin y col., 2000).

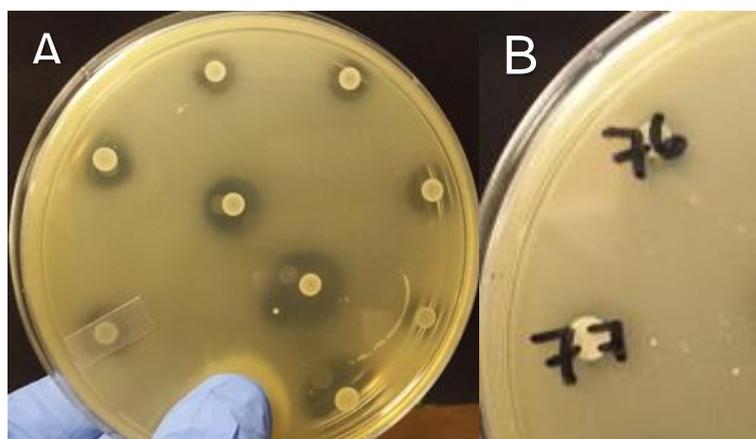


Figura 7. **Antagonismo bacteriano de BAL.** Aislados bacterianos de la superficie de melón cantaloupe con actividad antagónica (A) y sin actividad antagónica (B) representada en base a la presencia de halos de inhibición >0.4 mm contra *S. Typhimurium*. Los círculos negros indican los aislados sin actividad antagónica en medio MRS comercial.

Los 78 aislados con actividad antagonista contra *S. Typhimurium* presentaron resultados negativos para la prueba de catalasa, lo que indica que este grupo de microorganismos carecen de la presencia de esta enzima y no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La producción de peróxido de hidrogeno y otras especies reactivas del oxígeno pueden ser, en parte, responsables de conferir el efecto bactericida (Vásquez y col., 2009), ya que el peróxido de hidrógeno desestabiliza las membranas celulares al oxidar sus fosfolípidos y provoca daño celular irreversible. Con respecto a la prueba oxidasa, estos aislados resultaron negativos, indicando la carencia de enzimas oxidasas como las del sistema citocromooxidasa; el cual produce agua o peróxido de hidrógeno mediante reacciones de oxidoreducción según las características de las bacterias (Ramírez y col., 2011).

Para continuar con la identificación presuntiva de los aislados del epicarpio de melón con actividad antagonista se clasificó mediante tinción Gram (Tabla 6). Estos resultados mostraron la presencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Figura 8). Ha sido ampliamente señalado que las BAL son

microorganismos Gram positivos, que pueden ser cocos y bacilos de longitud variable entre 0.5 a 0.8 μm , anaerobias facultativas, oxidasa y catalasa negativas (Ekinci y Gurel, 2008; Parra,2010; Savadogo y col., 2006). Por lo tanto, los resultados de esta etapa sugieren que entre los 78 aislados antagonistas, los aislados Gram positivos podrían corresponder a BAL. Con la finalidad de trabajar con BAL en las etapas posteriores del presente estudio, se descartaron los aislados Gram negativos.

Tabla 6. Morfología de aislados del epicarpio de melón cantaloupe con actividad antagónica contra *S. Typhimurium*.

| Morfología y tinción de Gram | Numero de cepas |
|-------------------------------------|------------------------|
| Bacilos Gram + | 1 |
| Cocobacilos Gram + | 2 |
| Staphylococcus | 36 |
| Streptococcus | 4 |
| Bacilos Gram - | 2 |
| Cocobacilos Gram - | 33 |

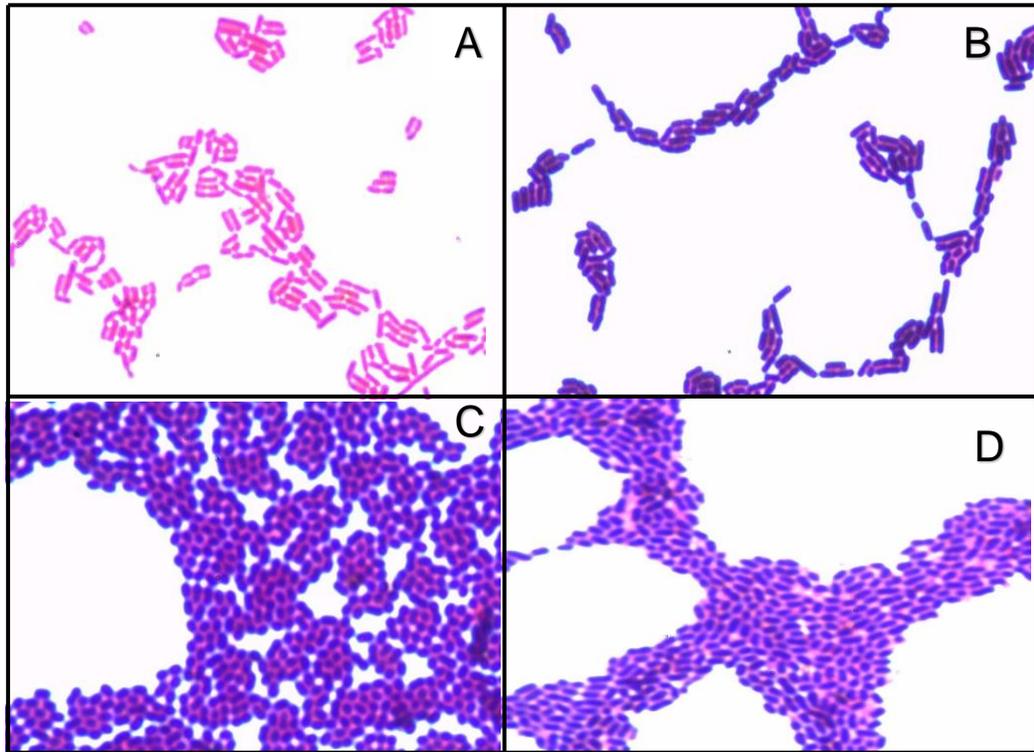


Figura 8. **Morfología y tinción Gram de los aislados del epicarpio de melón con actividad antagonista.** A) bacilos Gram negativo. B) bacilos Gram positivo. C) cocos Gram positivos D) cocobacilos Gram positivos.

Un total de 43 aislados del epicarpio de melón cumplieron con algunas de las características de las bacterias ácido lácticas (Tinción Gram positiva, catalasa y oxidasa negativas), de los cuales se seleccionaron aquellos con mayor halo de inhibición y morfología diferente entre sí (Tabla 7).

Tabla 7. Aislados de BAL seleccionadas.

| Identificación de aislado bacteriano | Halo de inhibición (cm) | Morfología |
|---|--------------------------------|--------------------|
| 45 | 1 | Cocos Gram + |
| 70 | 1 | Bacilos Gram + |
| 77 | 1 | Cocobacilos Gram + |
| 102 | 1 | Cocos Gram + |
| 170 | 1.5 | Cocos Gram + |
| 175 | 2.1 | Cocos Gram + |
| 210 | 1.6 | Cocos Gram + |
| 235 | 1 | Bacilos Gram + |
| 280 | 1 | Cocobacilos Gram + |

VI.2 Efecto de Oligosacáridos en el Crecimiento y Potencial Antagonista *in vitro* de Bacterias Acido Lácticas Aisladas del Epicarpio de Melón Contra *Salmonella Typhimurium*

En la Figura 9 se ejemplifica el patrón de crecimiento de las BAL aisladas del epicarpio de melón incubando el medio de cultivo con diferente fuente de carbono. En las curvas de crecimiento bacteriano se logró distinguir las diferentes etapas del crecimiento, tales como la fase de adaptación, logarítmica y estacionaria, lo que permitió conocer la capacidad del microorganismo para desarrollarse en un medio de crecimiento determinado y también inferir el momento en el que puede llevarse a cabo algún proceso fisiológico específico, por ejemplo, este tipo de curvas mostró el periodo de tiempo en el que se alcanza la fase estacionaria, fases donde las BAL comienzan la producción de algunas sustancias antimicrobianas (Castillo-Martínez y col., 2013).

En la Figura 9A se observa el crecimiento del aislado bacteriano 77 en caldo MRS, cuya fuente principal de carbono es la glucosa, la cual es metabolizada y permite su crecimiento. Cuando el medio MRS carece de alguna fuente de carbono de rápido acceso, su patrón de crecimiento se ve afectado, como lo observado en el comportamiento del aislado 77 cuando fue sembrado en MRS sin glucosa y cuando la fuente de carbono disponible en el medio fueron los

OAPG y FOS. Lo anterior indica que estos oligosacáridos no pudieron ser utilizados por el microorganismo para la obtención de energía para su crecimiento. Este comportamiento es similar al reportado por Jaskari y col., (1998) y Saminathan y col. (2011) donde BAL de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* mostraron una mejor capacidad fermentativa en un medio con glucosa, en comparación con xilooligosacaridos, isomaltooligosacaridos o FOS.

En la Figura 9B, se observa que el aislado 175 mostró una preferencia similar al aislado 77 por la fermentación de glucosa y la incapacidad de fermentar los OAPG y FOS. Sin embargo, es importante señalar que ambos aislados tuvieron la capacidad de crecer utilizando los OP y la inulina como fuente de carbono. Las curvas de crecimiento del resto de las BAL señaladas en la Tabla 8, con los diferentes oligosacáridos como fuente de carbono en medio MRS, se muestran en los Anexo I de este trabajo.

Con el objetivo de seleccionar aquellas BAL aisladas del epicarpio del melón que superaran a *Salmonella* Typhimurium en cuanto a la capacidad fermentativa de los oligosacáridos evaluados en el presente estudio, se calculó la tasa específica de crecimiento (h^{-1}) (Tabla 8) y densidad óptica máxima (DO_{max}) (Tabla 9) de cada aislado bacteriano y se comparó con la del patógeno. La tasa específica de crecimiento es considerada como la velocidad con la que el microorganismo consume los nutrientes presentes en el medio, por lo tanto, es la medida de la capacidad de adaptación que presentan las bacterias al medio de cultivo (Bustamante y col., 2006). Por otra parte, la DO_{max} indica la cantidad máxima de biomasa producida con cierta cantidad limitada de sustrato, por lo tanto, estos parámetros se seleccionan ya que indican la afinidad del microorganismo con el medio en lo que se encuentra.

Las tasas de crecimiento presentadas por los microorganismos en presencia de inulina, FOS y OP no presentaron diferencia significativa ($P \leq 0.05$). En cambio las tasas de crecimiento calculadas para los OAPG fueron las más altas. Esto señala que el microorganismo tiene la facilidad de adaptarse a este medio de cultivo, en caso contrario, las cepas en presencia de los OAPG mostraron las

DO_{max} más bajas, por lo que se especula que aun que existe una buena adaptación no es el oligosacárido de preferencia para metabolizarlo. Las DO_{max} mayores las obtuvieron los microorganismos que fermentaron los OP, seguidos de aquellos que fermentaron la inulina, aunque existan reportes donde se establezca que la inulina es un prebiótico ya reconocido, en el presente estudios no presento el mismo comportamiento, por lo que no puede ser utilizado como fuente de carbono para el fin de este trabajo.

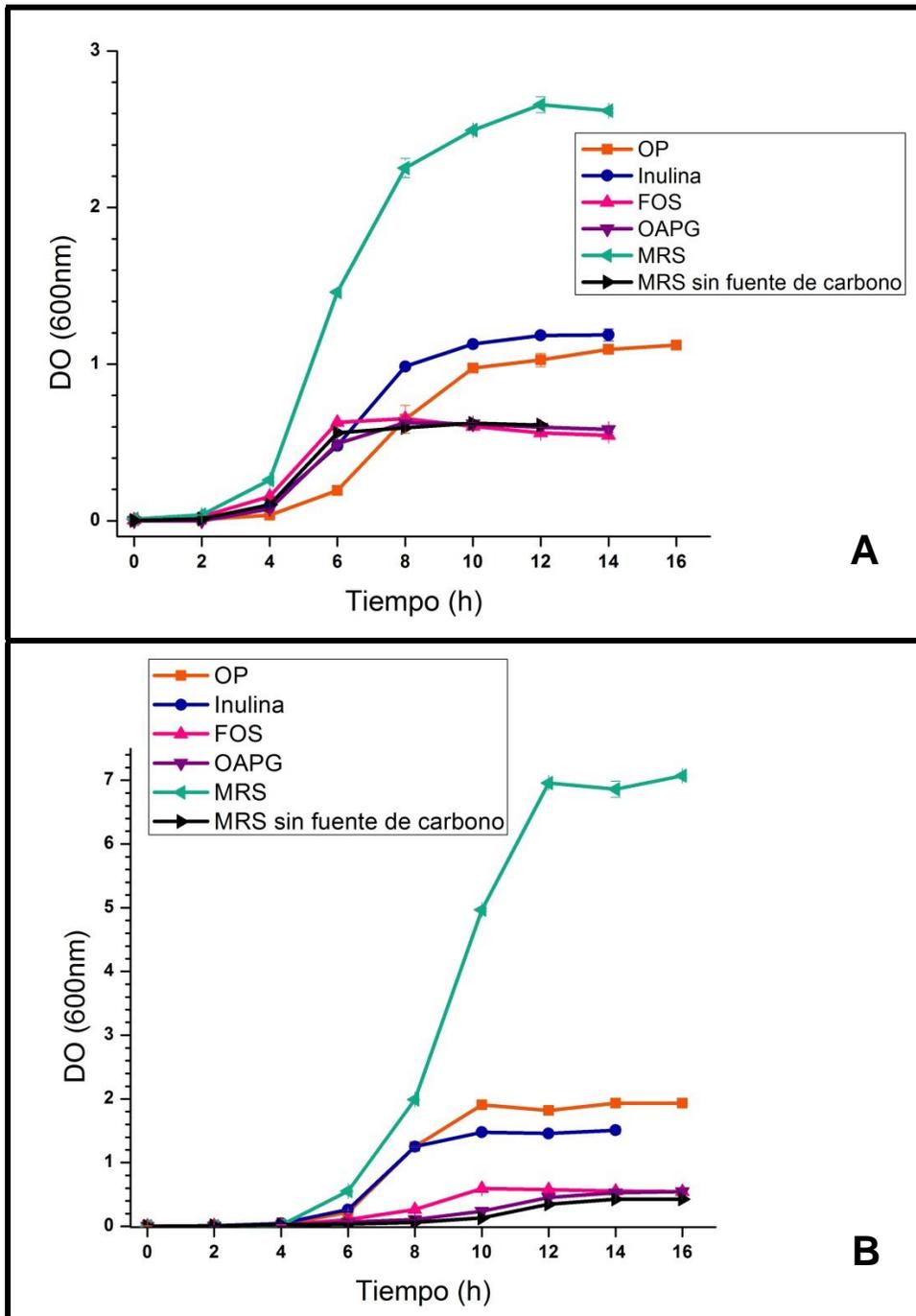


Figura 9. **Curvas de crecimiento.** (A) Aislado bacteriano 77 y (B) Aislado bacteriano 175, en un medio de cultivo MRS sin fuente de carbono (control), suplementado con 1 % (p/v) de los oligosacáridos. Los resultados son la media de 2 experimentos, las líneas verticales representan las desviaciones estándar (DE).

Tabla 8. Tasas de crecimiento de cada aislado bacteriano con los diferentes tratamientos.

| Identificación de aislado bacteriano | OP | Inulina | FOS | OAPG |
|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 45 | 0.84±0.004 ^a | 0.66±9.8x10 ^{-5bc} | 0.72±0.002 ^a | 1.32±9.1x10 ^{-5ab} |
| 70 | 0.6±1.3x10 ^{-4a} | 0.6±1.6x10 ^{-4de} | 0.66±6.3x10 ^{-5ab} | 1.2±7.7x10 ^{-5b} |
| 77 | 0.66±9.6x10 ^{-4a} | 0.66±7.7x10 ^{-5bc} | 0.66±7.07x10 ^{-6ab} | 1.322±4.9x10 ^{-5a} |
| 102 | 0.66±1.4x10 ^{-3a} | 0.66±3.2x10 ^{-4bc} | 0.6±6.3x10 ^{-5ab} | 1.32±2.8x10 ^{-5ab} |
| 170 | 0.6±5.3x10 ^{-4a} | 0.54±2.6x10 ^{-4e} | 0.3±2.5x10 ^{-4c} | 0.9±1.3x10 ^{-4c} |
| 175 | 0.72±2.6x10 ^{-4a} | 0.72±6.3x10 ^{-5ab} | 0.6±1.4x10 ^{-5ab} | 0.84±1.06x10 ^{-4cd} |
| 210 | 0.72±0.001 ^a | 0.72±1.4x10 ^{-5b} | 0.66±2.6x10 ^{-4ab} | 0.78±1.4x10 ^{-5d} |
| 235 | 0.78±1.9x10 ^{-4a} | 0.66±1.4x10 ^{-5bc} | 0.54±4.1x10 ^{-4ab} | 0.54±0.001 ^e |
| 280 | 0.72±.3x10 ^{-4^a} | 0.66±6.3x10 ^{-5cd} | 0.48±9.1x10 ^{-5bc} | 0.36±7.07x10 ^{-5f} |
| Salmonella Typhimurium | 0.54±9.8x10 ^{-5a} | 0.78±6.6x10 ^{-4a} | 0.72±0.002 ^a | 0.54±7.07x10 ^{-5e} |

Literales distintas entre columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$). **OP**: oligosacáridos derivados de pectina; **FOS**: fructooligosacáridos; **OAPG**: oligosacáridos derivados de ácido poligalacturónico.

Tabla 9. Densidad óptica máxima (DO_{max}) de cada microorganismo con los diferentes tratamientos.

| Identificación de aislado bacteriano | OP | Inulina | FOS | OAPG |
|--------------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 45 | 0.977 ^e | 1.224 ^d | 0.65 ^{bcd} | 0.596 ^{cd} |
| 70 | 1.057 ^{cde} | 1.258 ^{bc} | 0.697 ^b | 0.6 ^{cd} |
| 77 | 1.121 ^{cd} | 1.194 ^d | 0.651 ^{bc} | 0.613 ^{bc} |
| 102 | 1.164 ^c | 1.212 ^d | 0.658 ^{bc} | 0.643 ^b |
| 170 | 0.79 ^f | 0.536 ^f | 0.323 ^f | 0.359 ^f |
| 175 | 1.95 ^a | 1.51 ^b | 0.593 ^d | 0.602 ^{bc} |
| 210 | 1.386 ^b | 1.37 ^c | 0.638 ^{cd} | 0.567 ^d |
| 235 | 1.363 ^b | 1.275 ^{cd} | 0.369 ^{ef} | 0.402 ^e |
| 280 | 1.015 ^{de} | 0.754 ^e | 0.41 ^e | 0.109 ^g |
| Salmonella Typhimurium | 1.442 ^b | 1.667 ^a | 1.256 ^a | 1.417 ^a |

Literales distintas entre columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$). **OP**: oligosacáridos derivados de pectina; **FOS**: fructooligosacáridos; **OAPG**: oligosacáridos derivados de ácido poligalacturónico

Además, con el propósito de conocer cuál de los tratamientos favoreció en mayor medida el crecimiento de las BAL aisladas del epicarpio de melón, en la Figura 10 se presenta la tasa de crecimiento promedio de los aislados, en los

medios con oligosacáridos o inulina. La tasa de crecimiento promedio fue significativamente superior en presencia de OAPG ($P \leq 0.05$), que con el resto de los tratamientos de inulina, FOS y OP, lo que concuerda con los datos de la Tabla 8, donde se muestran las tasas de crecimiento como un parámetro de adaptación de las bacterias a los distintos medios de cultivo, lo que indican que el melón cantaloupe posee en su microbiota a BAL con la capacidad de adaptarse mejor que *S. Typhimurium* al uso de OAPG, ya que lograron mayores tasas de crecimiento entre los diferentes tratamientos, y así mismo, entre los aislados en general. Por lo que se puede considerar que estas bacterias prefieren oligosacáridos con un grado de esterificación (GE) bajo como los OAPG, muy distinto a la inulina que es la sustancia prebiótica más utilizada en el mercado. Esto es comparable a lo reportado por Van der Meulen y col. (2003), quienes observaron que algunas BAL como las *Bifidobacterium* pueden metabolizar carbohidratos como las inulinas, pero prefieren azúcares más pequeños y/u oligosacáridos con grado de polimerización bajo, de entre 2 y 3 unidades.

A pesar de que los FOS e inulina son prebióticos reconocidos y fermentados por diversas especies de *Lactobacillus* spp. (Saminathan y col., 2011) y *Bifidobacterium* spp. (Onumpai y col., 2011), no fueron los óptimos para las BAL aisladas de melón cantaloupe, evaluadas en el presente trabajo, lo que sugiere, que los aislados bacterianos carecen de las enzimas necesarias para llevar a cabo la fermentación de estos azúcares. La capacidad para hidrolizar OAPG es conferida por enzimas poligalacturonasas que rompen la cadena lineal de ácido poligalacturónico (enlaces $\beta 1-3$). Estas enzimas pueden ser producidas por una amplia gama de microorganismos, entre los cuales se encuentran hongos, levaduras y bacterias de diferentes géneros y especies (Khan y Latif, 2016). Para efectos del presente trabajo se descartaron aquellas combinaciones de aislado-tratamiento donde *S. Typhimurium* alcanzó una mayor tasa de crecimiento o densidad óptica máxima, con el objetivo de evitar aquellas combinaciones en el que el patógeno se veía favorecido.

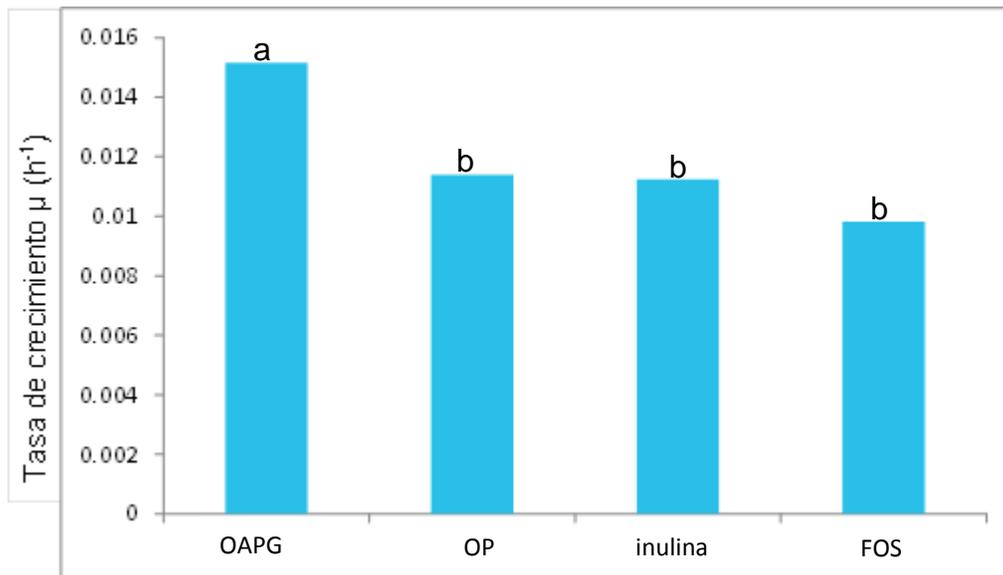


Figura 10. Tasa de crecimiento promedio de BAL aisladas del epicarpio de melón cantaloupe, por efecto de tratamientos con oligosacáridos o inulina. Literales distintas entre columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

En base a lo anterior, y para continuar con la siguiente etapa experimental se descartaron los tratamientos de inulina y FOS, ya que cuando estos son la única fuente de carbono de las BAL no presentan tasas de crecimiento y DO_{max} mayores a *S. Typhimurium*, por lo tanto no cumplen con el parámetro de selección requerido para continuar en el presente trabajo. El aislado bacteriano 175 alcanzó una DO_{max} superior que *S. Typhimurium* y el resto de los aislados ($P \leq 0.05$), en presencia de los OP. Por su parte los aislados 45, 70, 77, 102, 170 y 210 alcanzaron una mayor tasa de crecimiento que el patógeno en presencia de OAPG. Las pectina es una sustancia más compleja que el ácido poligalacturónico y, además de las poligalacturonasas, puede ser hidrolizada por pectinasas o enzimas pectolíticas (Jayani y col. 2005). Estas enzimas actúan de diferente forma entre sí, siendo las pectinasas de las principales, y con actividad importante en diferentes microorganismos (Dávila-Zambrano, 1996). Lo anterior podría indicar que la razón de que el aislado 175 presentara

una mayor DO_{max} en presencia de los OP, se debe a que produce algunas de estas enzimas y es capaz de metabolizar este oligosacárido.

En resumen, para determinar si los oligosacáridos aumentan el antagonismo de BAL epífitas del epicarpio de melón contra *S. Typhimurium*, los aislados número 45, 70, 77, 102, 170, 210 fueron seleccionados por su capacidad para desarrollarse con mayor facilidad en presencia de OAPG, mientras que el aislado 175 fue seleccionado por su capacidad de alcanzar una mayor densidad poblacional en presencia de OP (Tabla 9). El efecto de los OAPG para aumentar la inhibición de *S. Typhimurium* por las BAL epífitas del melón se observa en la Tabla 10. De los siete aislados bacterianos analizados solo dos presentaron una estimulación significativa ($P \leq 0.05$) en su capacidad antagónica en contra del patógeno, con aumentos en el halo de inhibición de 1.3 y 2.1 veces por los aislado 170 y 45, respectivamente.

Los resultados indican que el OAPG además de ser utilizado para el crecimiento y metabolismo basal, podría estar siendo utilizados para la producción de sustancias antimicrobianas. En este caso posiblemente este oligosacárido fue fermentado y utilizado para la producción de sustancias antimicrobianas más que para crecimiento, ya que lo reportado por Van Laene, y col. (2000) indicaron que algunas cepas de *Bifidobacterium spp.* no utilizan el ácido galacturónico como la mejor fuente de carbono para su crecimiento. De igual manera, Onompai y col. (2011) indicaron que este tipo de bacterias no son promovidas en su crecimiento por fracciones que tenían ácido galacturónico en su estructura, y que además algunas cepas disminuían su concentración inicial bacteriana, aunque no se tiene identificado que género y especie son los aislados bacterianos obtenidos en este trabajo, estos pueden compartir muchas características similares entre sí.

En la Tabla 11 se muestra el efecto de los OP en la inhibición de *S. Typhimurium* por la BAL 175, donde se observó un efecto estimulante en el antagonismo mediante el aumento significativo ($P \leq 0.05$) respecto al control, en

el tamaño del halo de inhibición de hasta 3.3 veces (Figura 11). El efecto estimulante en el antagonismo presentado por el aislado 175, en presencia de OP, puede deberse a varios factores. Entre esos se encuentran la producción de sustancias antimicrobianas, bacteriocinas, o el aumento del número de bacterias benéficas las cuales compiten por espacio y/o nutrimento con las bacterias patógenas. Manderson y col. (2005) encontraron que los OP promueven el crecimiento de BAL como las *Bifidobacterium*, además de aumentar la concentración de ácido láctico, en comparación con la fermentación de los FOS.

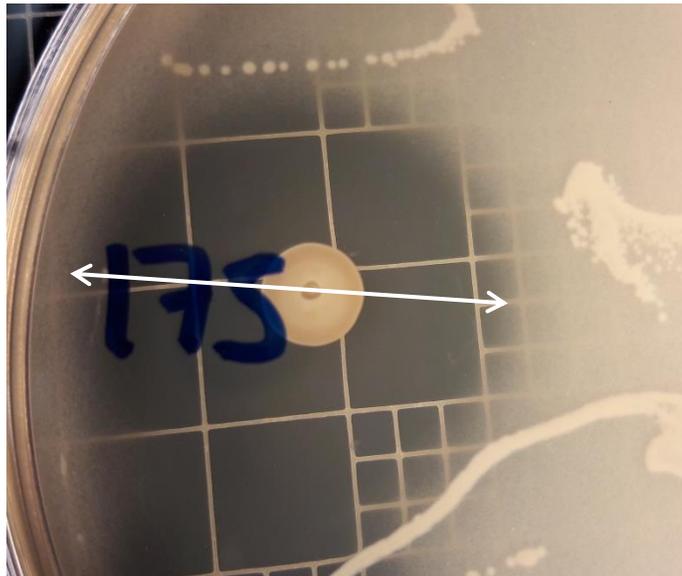


Figura 11. Halo de inhibición, del aislado 175 vs *S. Typhimurium*, en agar MRS modificado sin glucosa, con 1 % de OP.

Tabla 10. Efecto de oligosacáridos de ácido poligalacturónico en la inhibición de *S. Typhimurium* por los aislados.

| Identificación de aislado bacteriano | Control MRS con glucosa (halo cm) | MRS + 1 % OAPG (halo cm) | Aumento (veces) |
|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------------|
| 45 | 0.7±0 | 1.5±0.08* | 2.1 |
| 70 | 1.03±0.04 | 1.06±0.04 | 1.02 |
| 77 | 1±0 | 0.9±0.04 | - |
| 102 | 1.16±0.04 | 1.06±0.04 | - |
| 170 | 0.76±0.04 | 1.03±0.04* | 1.35 |
| 175 | 1.53±0.04 | 1.53±0.09 | - |
| 210 | 0.96±0.04 | 1.03±0.04 | 1.07 |

* indica diferencias significativas respecto al control (P≤ 0.05)

Tabla 11. Efecto de oligosacáridos pécticos en la inhibición de *S. Typhimurium* por el aislado de BAL 175.

| Ensayos | Halo de inhibición (cm) | Incremento en tamaño del halo de inhibición (veces) |
|--------------------------|-------------------------|---|
| Control | | |
| MRS con glucosa | 0.3±0 | 3.3 |
| MRS con glucosa + | | |
| 1 % OP | 1±0.08* | |

*Diferencia significativa respecto al control (P≤ 0.05)

La fuente de carbohidratos va a determinar la regulación de las tasas de fermentación y los perfiles de los productos finales, como la síntesis de los diferentes ácidos (Hove, Nordgaard-Andersen y Mortensen, 1994). La composición de los oligosacáridos analizados va a determinar la síntesis de los productos finales, ya que al momento de hidrolizarlos existirán más variedad de azúcares, y de estos dependerá que tipo de fermentación se lleve a cabo, ya que puede ser fermentación de hexosas como la glucosa, galactosa y fructosa obteniendo como producto final lactato, acetato y etanol. Además de la fermentación de pentosas, por ejemplo, xilosa, ribosa, arabinosa, obteniendo como producto final el ácido láctico (Seppo y col., 2004).

La producción de ácidos depende también del tipo de microorganismo del que se trate, ya que puede ser un microorganismo homofermentativo o heterofermentativo. En las cepas homofermentativas su producto final es el ácido láctico, en cambio las heterofermentativas sus productos finales varían entre el lactato y el acetato (Kandler, 1983). Los OP aumentan la producción de ácidos orgánicos como el propionato, acetato y el butirato en bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Mandalori y col., 2007). Así mismo, las *Bifidobacterium* en presencia de OP, presentan una mayor producción de ácido láctico (Manderson y col., 2005). De la misma manera, Li y col. (2016) reportaron que *Bifidobacterium infantis* y *Lactobacillus acidophilus* en presencia de OP mostraron mayor actividad antimicrobiana en contra de patógenos en comparación con la actividad reportada en presencia de FOS.

Lo anterior podría sugerir que el aumento del antagonismo del aislado 175 inducido por los OP puede deberse a la producción de estas sustancias antimicrobianas en lugar de que el antagonismo se de por la competencia por nutrientes y/o por competencia por sitios de unión. Para llevar a cabo la siguiente etapa experimental, que consistió en la identificación molecular de las bacterias y el ensayo *in vivo*, de antagonismo en frutos enteros, se seleccionaron los aislados de BAL 45 y 170 con los OAPG y el 175 con OP, los cuales presentaron mayor halo de inhibición que los demás aislados analizados.

VI.3 Identificación de los Aislados de BAL por Técnicas Moleculares

A los aislados bacterianos con mejor desempeño en las pruebas de antagonismo en medios modificados *in vitro*, se les realizó una identificación mediante secuenciación del gen 16S ribosomal. De estos aislados se obtuvieron productos de PCR de 1500 pb (Figura 12) aproximadamente, los cuales fueron secuenciados por Macrogen Inc., y las secuencias de los aislados bacterianos (Anexo II) fueron analizadas y comparadas con las secuencias en la base de datos del GenBank para asignar su identidad (Tabla 12).

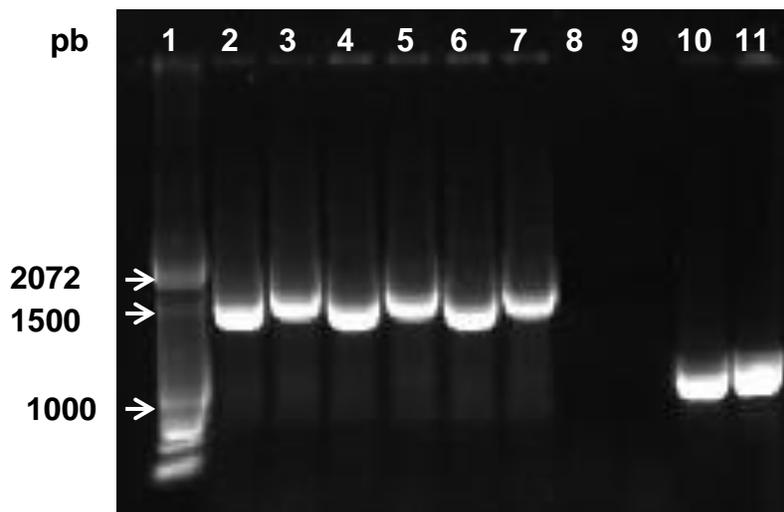


Figura 12. **Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR-ADN de los aislados bacterianos.** 1= Marcador de peso molecular, 2= aislado 45 Rv1301, 3= aislado 45 Rv1492, 4= 170 Rv1301, 5= aislado 170 Rv1492, 6= aislado 175 Rv1301, 7= aislado 175 Rv1492, 8= Control - Rv1301, 9= Control - Rv1492, 10= Control + Rv1301 y 11= Control + Rv1492.

Tabla 12. Identificación molecular de BAL epífitas del epicarpio de melón cantaloupe con actividad antagónica contra *S. Typhimurium* mediante secuenciación del gen ARNr 16S.

| Identificación de aislado | ID de secuencia de referencia | Cepa | Cobertura % | Similitud % |
|----------------------------------|--------------------------------------|-------------|--------------------|--------------------|
| 45 | <i>Enterococcus faecalis</i> | ATCC 19433 | 97 | 98 |
| 170 | <i>Pediococcus acidilactici</i> | DSM 20284 | 90 | 98 |
| | <i>P. pentosaceus</i> | DSM 20336 | 90 | 96 |
| | <i>P. lolli</i> | NGRI 0510 | 89 | 97 |
| 175 | <i>Pediococcus acidilactici</i> | DSM 20284 | 98 | 95 |
| | <i>P. pentosaceus</i> | DSM 20336 | 98 | 94 |
| | <i>P. lolli</i> | NGRI 0510 | 96 | 94 |

Con los datos obtenidos de la base de datos del GenBank se determinó que el aislado bacteriano 45 corresponde a una cepa de *Enterococcus faecalis*. El análisis de las secuencias reveló una alta identidad entre los aislados 170 y 175 con las cepas *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus lolli*. Se ha reportado el aislamiento de cepas de *P. pentosaceus* en superficies de diferentes frutos y vegetales como ejote, tomates, pepinos, alcaparras, cerezas y repollo (Di Cagno y col., 2013). Debido a lo anterior, la identificación exacta de estas cepas ha sido motivo de estudios exhaustivos, donde recomiendan pruebas moleculares más específicas, como la amplificación del gen D-lactato Deshidrogenasa (Mora y col., 1997; Barros y col., 2001) además, del uso de técnicas diferenciales de crecimiento y fermentación específica de azúcares (Doi y col., 2009).

Para concretar la identificación de la especie de los aislados 170 y 175, se utilizó una estrategia basada en lo descrito por Mora y col., (1997), quienes diseñaron un par de cebadores con la capacidad de reconocer una región específica del gen 16S ribosomal que presenta una variación de solamente dos pares de bases. Estas pares de bases se encuentran en su extremo 3', entre

las especies *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*. La secuencia de estos cebadores es 5'-CGAACTTCCGTTAATTGATTAT-3' para *P. pentosaceus* y 5'-CGAACTTCCGTTAATTGAT**CAG**-3' para *P. acidilactici*. El análisis de la secuencia de los aislados 170 y 175 indicó que la identidad de ambos aislados coincide con la de *P. pentosaceus*, sin embargo para discernir entre ésta y *P. lolli* se utilizó una estrategia basada en la fermentación diferencial de azúcares específicos, a pesar de que las diferentes especies de *Pediococcus* tienen características muy conservadas, estas difieren en la capacidad de metabolizar diferentes carbohidratos. Estas particularidades metabólicas se deben a la presencia o ausencia de algunas enzimas del grupo pectolíticas y/o pectinasas (Davila-Zambrano, 1996) (Los aislados 170 y 175 del presente estudio mostraron un comportamiento idéntico en la capacidad fermentativa de sacarosa, trehalosa y ramnosa (Tabla 13), el cual coincide al reportado para *P. pentosaceus* y difiere a los de *P. acidilactici* y *P. lolli* (Doi y col., 2009), por lo que se asume que el aislado 170 y 175 corresponde al microorganismo del género y especie *Pediococcus pentosaceus*.

Tabla 13. Fermentación diferencial de azúcares entre cepas de *Pediococcus* epífitas del epicarpio de melón.

| Azúcar/Bacteria | 170 | 175 | <i>L. animalis</i> (Testigo) | <i>P. pentosaceus</i> | <i>P. lolli</i> |
|------------------|-----|-----|---------------------------------|-----------------------|-----------------|
| Sacarosa | + | + | + | + | - |
| Trehalosa | + | + | - | + | - |
| Ramnosa | - | - | - | - | + |

+: Positivo, -: Negativo, a las fermentaciones de cada azúcar.

Como ya se había mencionado antes, en las etapas previas del presente estudio los aislados 170 y 175, ya identificados como bacterias del género *Pediococcus*, mostraron diferencias en las características cinéticas durante la fermentación de los oligosacáridos. Sin embargo, los resultados indicaron que

ambos aislados pertenecen a la especie *pentosaceus*, sugiriendo que estas son cepas o subespecies diferentes y por lo tanto difieren en algunas capacidades. Algunas de las diferencias que han sido reportadas entre cepas de *P. pentosaceus* han sido reportadas por Lee y col. (2014), cuyos autores reportaron que entre las cepas, A24, D56 y F66 existe diferencia a nivel enzimático ya que la cepa A24 carece de las enzimas fosfatasa alcalina y leucina arilamidasa, caso contrario de las cepas D56 y F66. Otro ejemplo, es que en presencia de 10 % de NaCl, la cepa A24 presentó mayor crecimiento en comparación a las cepas D56 y F66. En cuanto al porcentaje de sobrevivencia en ácido a pH 3 la cepa A24 presento un 7.5 %, D56 un 25.3 % y F66 presento un 32,6 % de sobrevivencia, en cuanto al porcentaje de sobrevivencia de las diferentes cepas en presencia de sales biliares al 0.3 %, A24 mostro un 13.7 %, D56 5.8 % y por ultimo F66 presento un 26.6 % de sobrevivencia (Lee y col.,2014). Estos datos evidencian que existen existir diferencias entre distintas cepas de *Pediococcus pentosaceus*.

VI.4 Estimulación de la Actividad Antagónica de *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecalis* por OP y OAPG en la Superficie de Melón Cantaloupe

La capacidad de los OP para estimular la actividad antagónica de *Pediococcus pentosaceus* y de los OAPG en la estimulación de *Enterococcus faecalis* y *P. pentosaceus* se evaluó en epicarpio de melón cantaloupe y se obtuvieron resultados diferentes al resultado del ensayo en placa. Los resultados correspondientes al desempeño de *Enterococcus faecalis* (aislado 45) se muestran en la Figura 13.

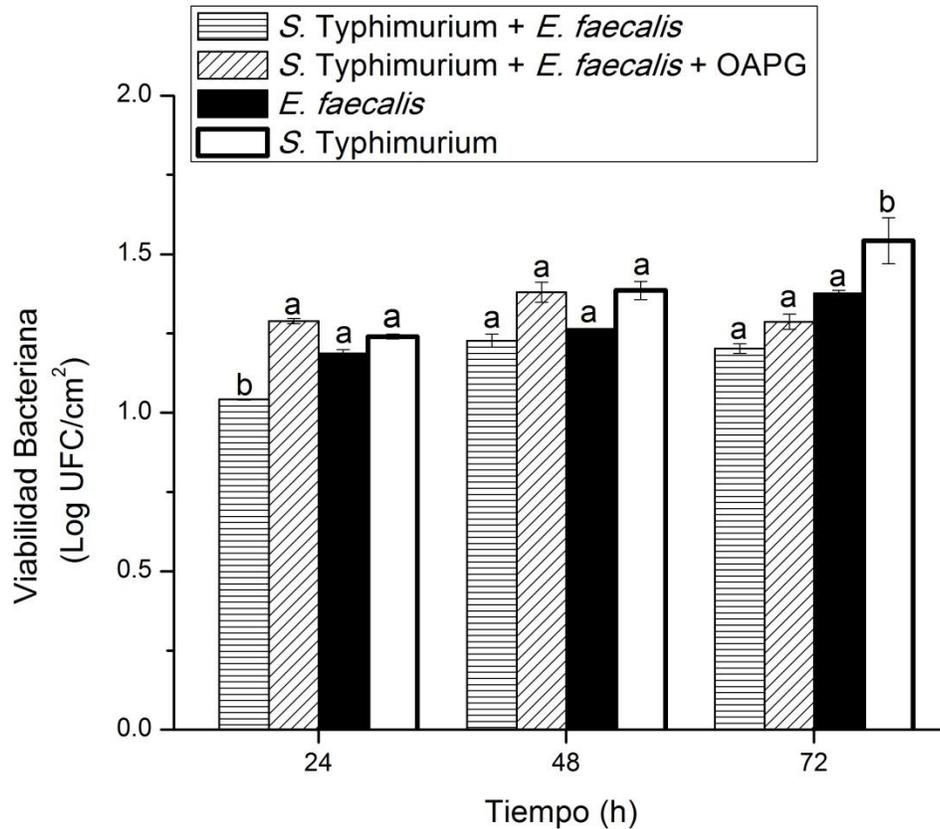


Figura 13. Efecto de oligosacáridos de ácido poligalacturónico (OAPG) sobre la viabilidad de *Salmonella* Typhimurium en presencia de *Enterococcus faecalis*.

 Viabilidad de *Salmonella* Typhimurium en presencia de *Enterococcus faecalis* (control),
  Efecto de OAPG sobre la viabilidad de *S. Typhimurium* en presencia de *Enterococcus faecalis* (tratamiento),
  Viabilidad de *Enterococcus faecalis*,
  Viabilidad de *Salmonella* Typhimurium. Los resultados representan los valores medios de dos experimentos independiente \pm desviación estándar; literales diferentes indican diferencias significativas entre el control y el tratamiento por la prueba de Tukey-Kramer ($P \leq 0.05$).

Se aprecia que la viabilidad de *Salmonella* Typhimurium frente a *Enterococcus faecalis* en presencia de los OAPG difiere significativamente ($P \leq 0.05$) respecto al control, a las 24 h de incubación, con un aumento de la viabilidad del patógeno. A las 48 h no se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) respecto al control, indicando que los OAPG no incrementa el antagonismo en

contra del patógeno, cuando el sistema de estudio es el epicarpio de melón. Es hasta las 78 h cuando se ve diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre la viabilidad de *S. Typhimurium* contra la viabilidad del tratamiento con OAPG y del control, aun así, no se mostraron los resultados esperados entre el tratamiento y el control que era donde se buscaba la reducción de la viabilidad en la presencia de los OAPG. Estos resultados concuerdan con lo observado en el ensayo *in vitro* donde las cepas de BAL no mostraron efecto antagónico contra *S. Typhimurium* en donde no había presencia de glucosa en el medio.

El género de *Enterococcus* ha sido relacionado con la fermentación de oligosacáridos, en donde este microorganismo tiene la capacidad de metabolizar los azúcares del ácido galacturónico. Este trabajo fue realizado por Wongputtisin y Khanongnuch (2015) quienes elaboraron una mezcla de BAL integrada por bacterias de *Enterococcus faecium* y *Pediococcus acidilactici*. Esta mezcla de BAL presentaron antagonismo en contra de patógenos como *Salmonella* Havana y *Escherichia coli*, en presencia de oligosacáridos obtenidos de la hidrólisis enzimática de la goma de semillas de albahaca (*Ocimum basilicum* Linn). Los investigadores reportaron que la concentración de ácido poligalacturónico en estas semillas fue alta, en donde se vio favorecido el crecimiento de las BAL, en caso contrario de los patógenos que no se observó el efecto del crecimiento en dichos microorganismos.

De manera similar, el tratamiento con OAPG en presencia de *Pediococcus pentosaceus* no presentó diferencias significativas ($P \leq 0.05$) respecto al control en ninguno de los tiempos de incubación, como se observa en la Figura 14. Por lo tanto, se asume que los OAPG no favorecen la disminución del patógeno, pero la viabilidad *S. Typhimurium* se mantuvo constante, lo cual se podría considerar como un efecto antagonista del tipo bacteriostático, es decir, que mantiene la concentración inicial pero no la disminuye conforme pasa el tiempo, esto impidiendo que el número de UCF/cm² del patógeno aumente, pero se mantenga constante.

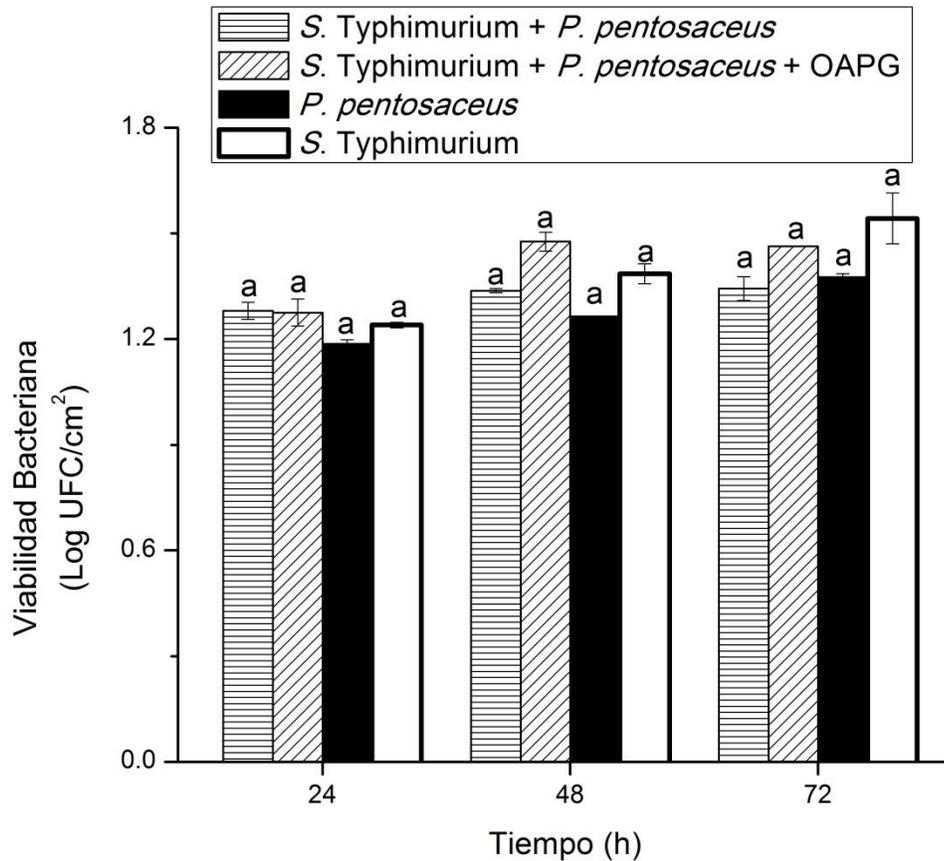


Figura 14. Efecto de oligosacáridos de ácido poligalacturónico (OAPG) sobre la viabilidad de *Salmonella* Typhimurium en presencia de *Pediococcus pentosaceus*.  Viabilidad de *Salmonella* Typhimurium en presencia de *Pediococcus pentosaceus* (control),  Efecto de OAPG sobre la viabilidad de *S. Typhimurium* en presencia de *Pediococcus pentosaceus* (tratamiento),  Viabilidad de *Pediococcus pentosaceus*,  Viabilidad de *Salmonella* Typhimurium. Los resultados representan los valores medios de dos experimentos independiente \pm desviación estándar; literales diferentes indican diferencias significativas entre el control y el tratamiento por la prueba de Tukey-Kramer ($P \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos en el ensayo donde se utilizó el microorganismo *Pediococcus pentosaceus*, en presencia de oligosacáridos pecticos, se presentan en la Figura 15. Se puede observar que durante las primeras 24 h de incubación, la concentración del patógeno se mantuvo igual ($P \leq 0.05$) estadísticamente similar en presencia o ausencia de los OP, sin embargo a diferencia de los ensayos realizados con los OAPG, a las 48 h se observaron

diferencias significativas ($P \leq 0.05$) respecto al control (*Pediococcus pentosaceus*), con una reducción en el conteo de viabilidad de UCF/cm² del patógeno *S. Typhimurium*. Esto sugirió que el antagonismo de *P. pentosaceus* fue favorecido por los OP incluso en un sistema de mayor complejidad estructural y donde la accesibilidad a otros nutrientes puede verse limitada, como lo es el epicarpio de melón.

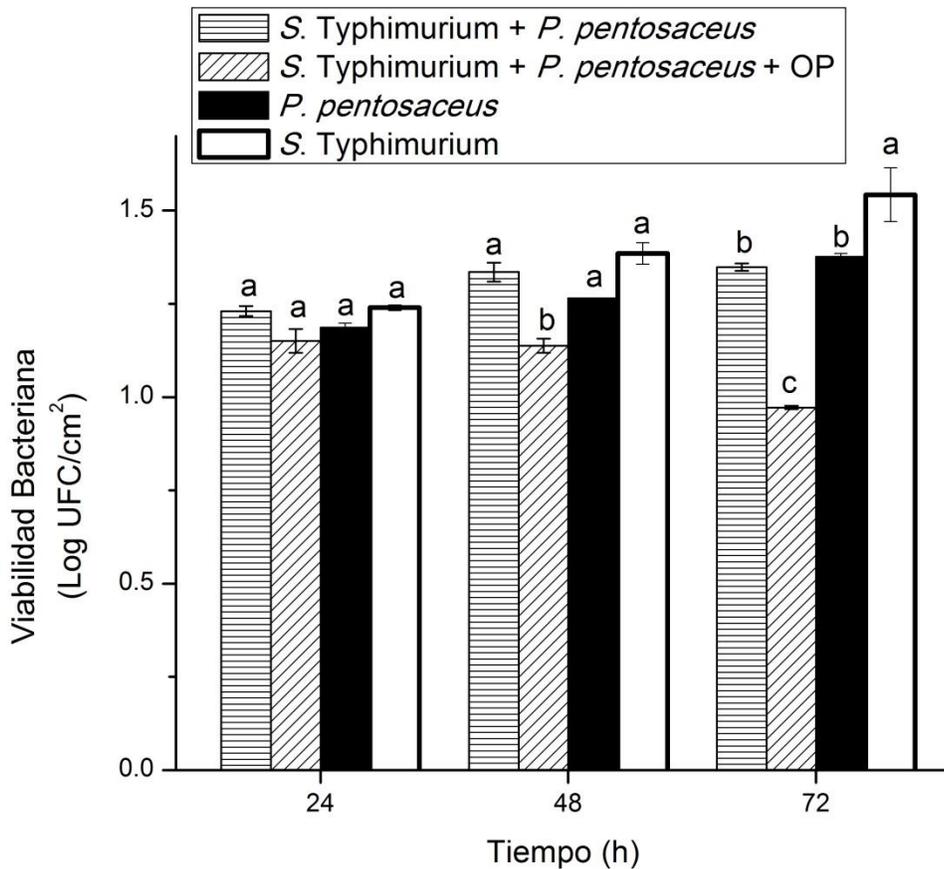


Figura 15. **Efecto de oligosacáridos de pectina (OP) sobre la viabilidad de *Salmonella Typhimurium***  Viabilidad de *Salmonella Typhimurium* en presencia de *Pediococcus pentosaceus* (control),  Efecto de OP sobre la viabilidad de *S. Typhimurium* en presencia de *Pediococcus pentosaceus* (tratamiento),  Viabilidad de *Pediococcus pentosaceus*,  Viabilidad de *Salmonella Typhimurium*. Los resultados representan los valores medios de dos experimentos independiente \pm desviación estándar; literales diferentes indican diferencias significativas entre el control y el tratamiento por la prueba de Tukey-Kramer ($P \leq 0.05$).

Se observó que aunque se trate del mismo microorganismo, *P. pentosaceus*, este mostró comportamientos diferentes en presencia de OAPG y OP en el ensayo *in vivo*, lo cual indica que posiblemente esto se deba a que este microorganismo no posee enzimas que pueden hidrolizar los enlaces del ácido poligalacturónico, por lo tanto, no se metabolizan estos carbohidratos. En cambio, podrían estar segregando las enzimas necesarias para romper los enlaces que unen los diferentes carbohidratos presentes en los OP. En su mayoría los azúcares presentes en los OP son la glucosa, arabinosa y galactosa (Mandalari y col., 2007). Los OP al estar conformados por diferentes azúcares pueden ser metabolizados con mayor facilidad ya que los microorganismos tienen preferencia sobre los carbohidratos sencillos. Por lo tanto, la hidrólisis del ácido poligalacturónico no es tan eficiente en este microorganismo como es el caso de los OP, esto se puede deber a la gran variedad de enzimas que participan en este proceso. Este comportamiento también puede ser que se traten de dos cepas diferentes del mismo microorganismo, lo que indicaría, subespecies distintas.

Las enzimas participantes en la degradación de la pectina son del grupo de las pectinasas que son las que podrían estar permitiendo a las BAL la metabolización de los OP. Las pectinasas se pueden clasificar en: pectinesterasas, exopectinasas, endopectinasas y endopectinliasas, todas ellas actúan de manera diferente, ya sea que atacan cierto grupo específico, o que prefieren cierto sustrato. Existen las que hidrolizan aleatoriamente o también las que hidrolizan en forma específica (Olano- Martin, Gibson y Rastall, 2002; Mandalari y col. 2007; Davila- Zambrano, 1996). Estas enzimas al momento de hidrolizar los OP, los degradan a trímeros, dímeros o monómeros de diferentes azúcares, los cuales al ser metabolizados por las BAL producen los metabolitos secundarios los cuales actúan como sustancias antimicrobianas, produciendo AGCC, ácido láctico, o también bacteriocinas, las cuales actúan en contra de microorganismos patógenos, tal es el caso de *S. Typhimurium* (Onumpai, 2011; Mandalari y col. 2007).

Uno de los mecanismos antimicrobianos presentado por las BAL es el de competencia por espacio y nutrientes, lo cual se refleja en el aumento del número de UFC de las BAL, se propone que este tipo de antagonismo no se está llevó a cabo en este estudio, ya que durante el experimental también se mantuvo la viabilidad constante de *Pediococcus pentosaceus* (175), en donde se mostró que los Log de UFC/cm² se mantuvieron constantes a las diferentes horas de incubación, lo cual indicó, que la energía que se está produciendo por el metabolismo de la fuente de carbono, se está utilizando para la producción de metabolitos secundarios, como la producción de sustancias antimicrobianas y no para incrementar el número de células.

Otro mecanismo antimicrobiano es la producción de bacteriocinas. Se ha reportado que las BAL del genero *Pediococcus* como *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. halophilus* y *P. dextrinicus* tienen la capacidad de producir bacteriocinas como las pediocinas (Naidu, 2006). Las cuales tienen un amplio campo de aplicación en los alimentos, en los que son utilizadas como agentes antimicrobianos contra patógenos (Jack y col., 1995). Estas bacteriocinas están clasificadas en la clase II, presenta las siguientes características: tienen un peso molecular menor a 10 kDa, son estables al calor y al pH, en su estructura tiene un extremo hidrofóbico y otro hidrofílico, lo que les permite insertarse en la membrana de la célula del patógeno, dando lugar a la pérdida de la carga eléctrica, dando lugar a la desestabilización provocando la muerte celular (Cotter y col., 2005). Por lo tanto, la disminución del crecimiento de *S. Typhimurium* por *P. pentosaceus* en presencia de OP sugiere un antagonismo del tipo bactericida. Estos resultados invitan a estudiar como los OP aumentan la capacidad antagónica de BAL, como *P. pentosaceus*.

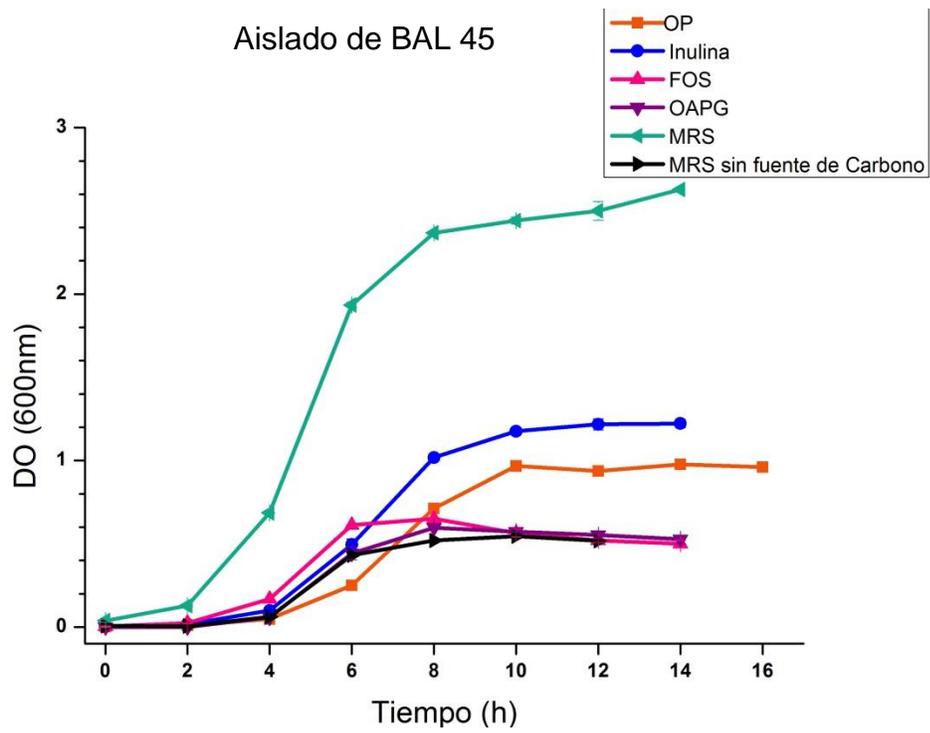
VII. CONCLUSIONES

Como parte de la microbiota de melón cantaloupe, se identificó a *Enterococcus faecalis* y *Pediococcus pentosaceus*. Los oligosacáridos de ácido poligalacturónico al 1 %, mostraron efecto estimulante en el antagonismo *in vitro* de *Enterococcus faecalis* y *Pediococcus pentosaceus*, en contra de *Salmonella* Typhimurium, sin embargo, no se mostró este efecto en el ensayo *in vivo*, en cambio, los oligosacáridos pécticos al 1 % estimularon el efecto antagónico del aislado de *Pediococcus pentosaceus* en contra de *Salmonella* Typhimurium en estudios *in vitro* e *in vivo*, se observó el efecto estimulante en el antagonismo, obteniendo reducción de las UFC de *Salmonella* Typhimurium.

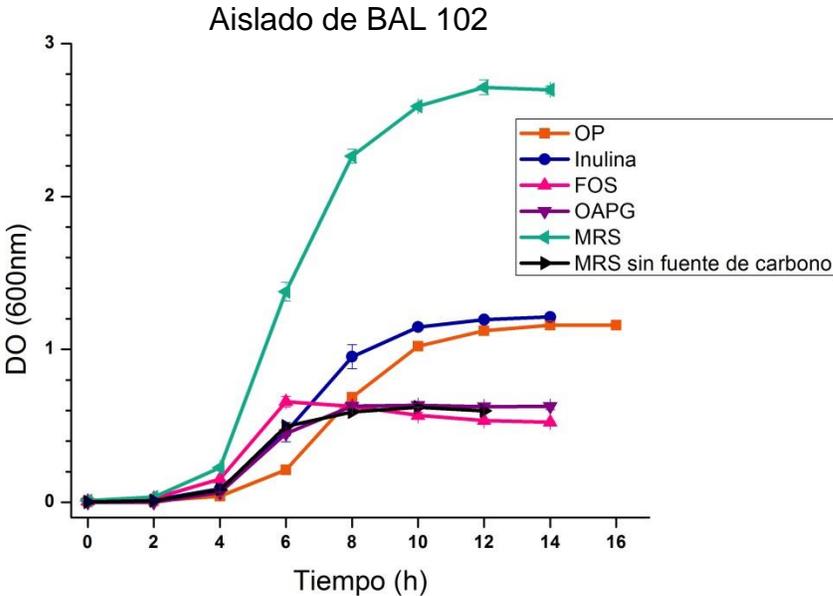
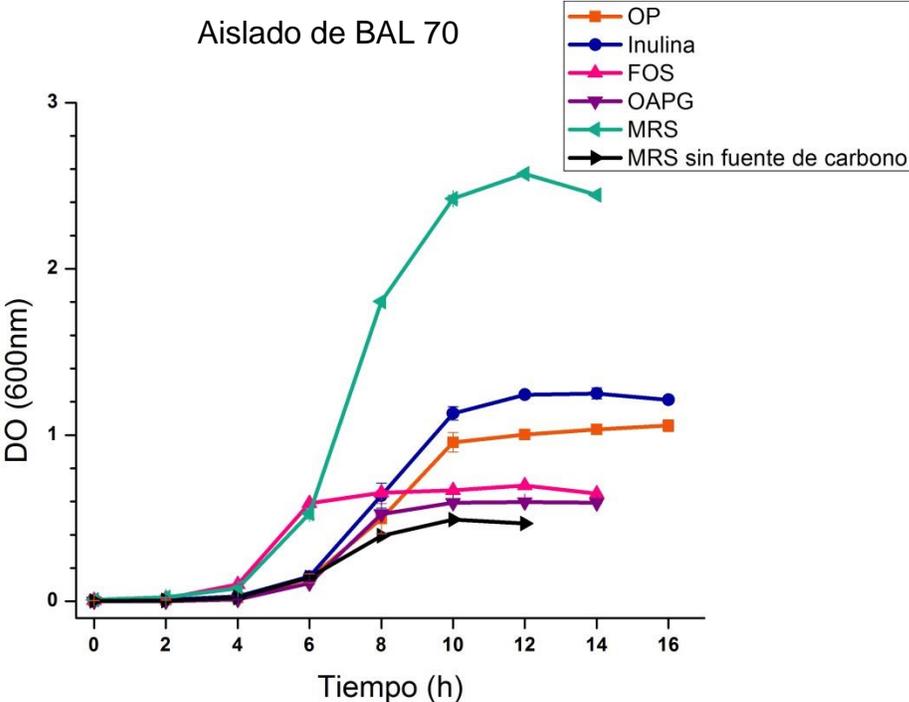
Por lo tanto, nuestros resultados sugieren la posible aplicación de la mezcla de oligosacáridos pecticos y *Pediococcus pentosaceus* como una potencial alternativa a los métodos químicos de reducción o eliminación de patógenos en frutas y hortalizas.

ANEXO I

Curvas de crecimiento de los aislados de BAL seleccionados, en presencia de los diferentes oligosacáridos.

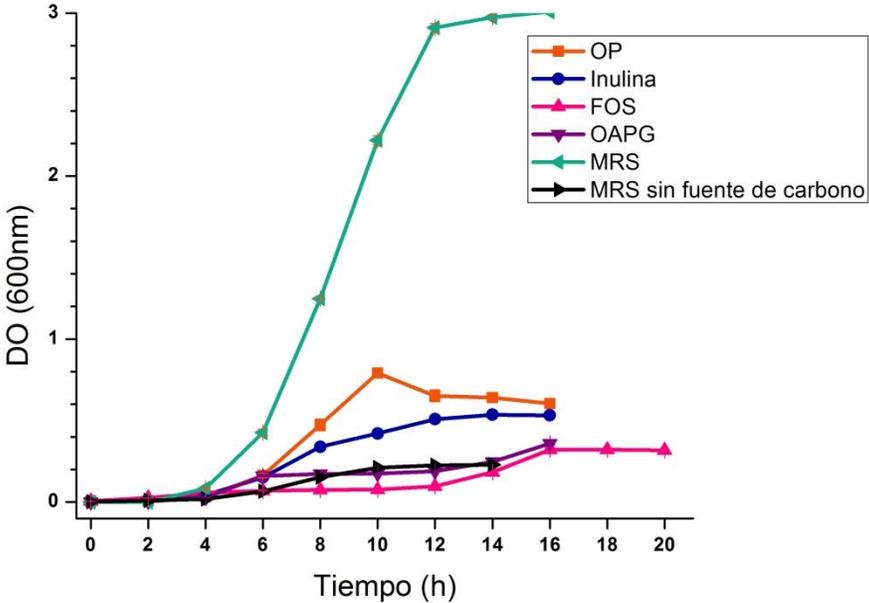


Curvas de crecimiento de los aislados de BAL seleccionados, en presencia de los diferentes oligosacáridos (continuación).

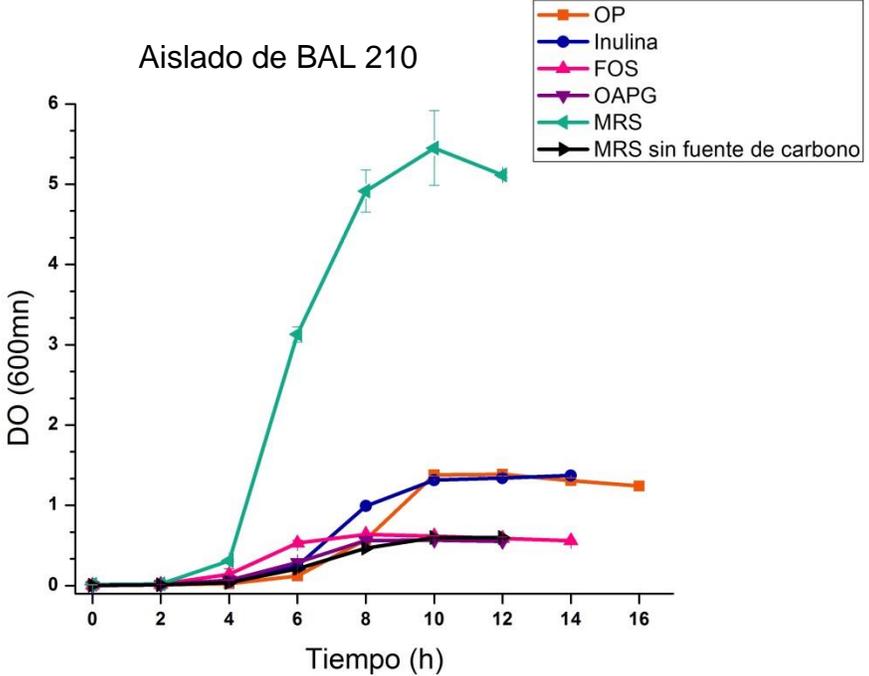


Curvas de crecimiento de los aislados de BAL seleccionados, en presencia de los diferentes oligosacáridos (continuación).

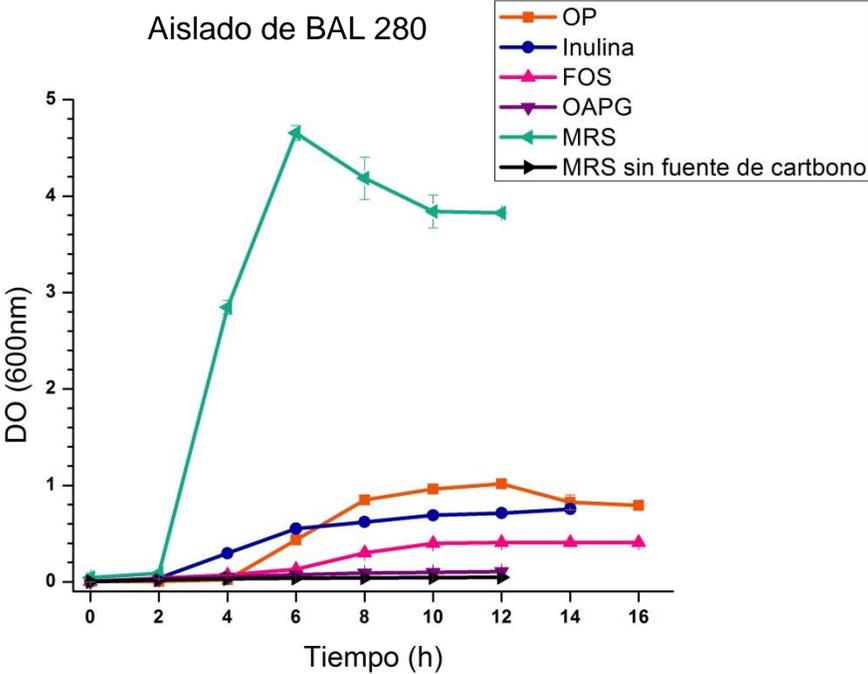
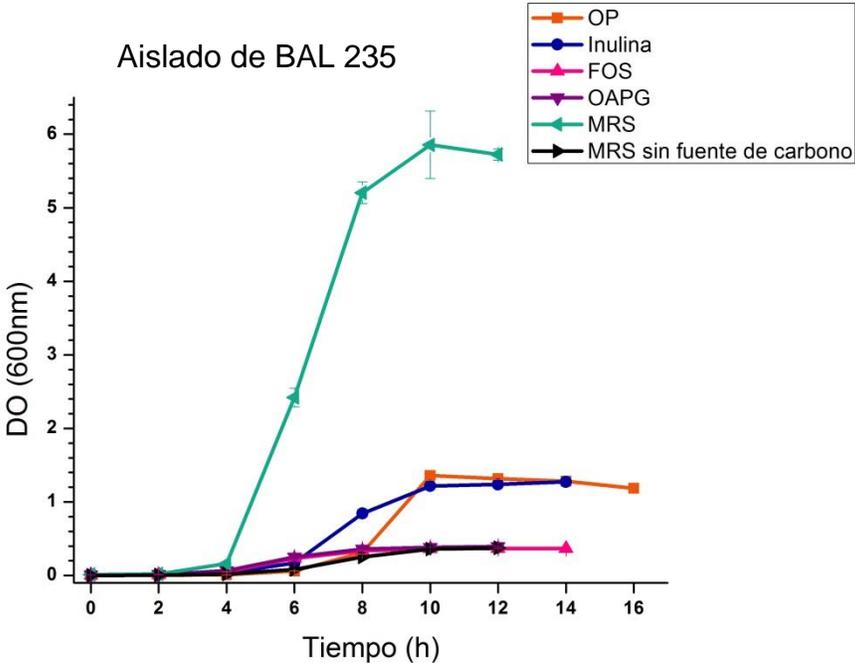
Aislado de BAL 170



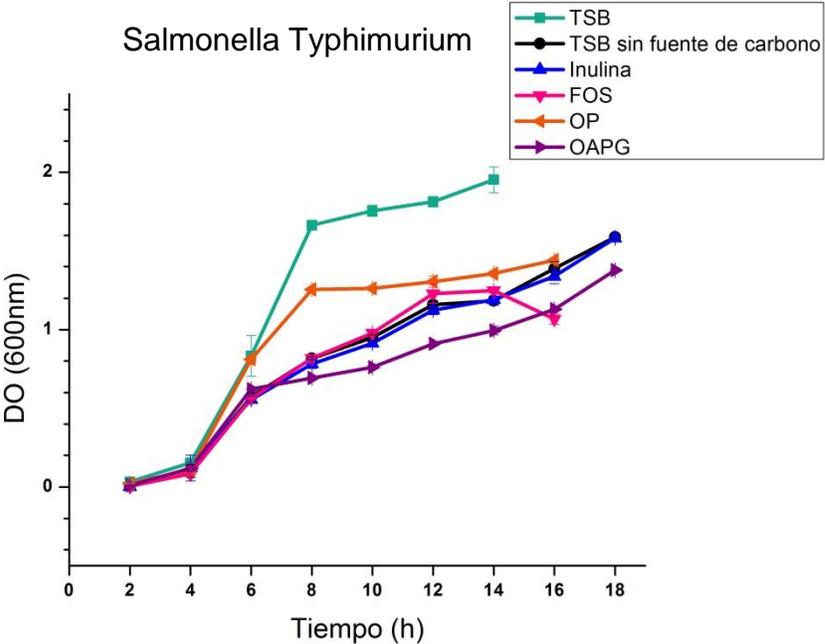
Aislado de BAL 210



Curvas de crecimiento de los aislados de BAL seleccionados, en presencia de los diferentes oligosacáridos (continuación).



Curvas de crecimiento de los aislados de BAL seleccionados, en presencia de los diferentes oligosacáridos (continuación).



ANEXO II

Secuencia de nucleótidos del Gen 16S rARN de la bacteria *Enterococcus faecalis*

5'GAAGTTGCGGGCTGCTAATACATGCAGTCGAACGCTTCTTTCCTCCCGAG
TGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATAC
CGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGT
GTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG
CTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAA
GGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTA
ACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCG
GCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG
GAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
CGATGAGTGCTAAGTGTTGGAAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAA
ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGGTTTAATTC
GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTA
GAGATAGAGCTTTCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGGTGCATGGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTGCGTGGAAATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTATTGGTAAGTTGCCATCATTTAAGTGGGGCACTCTAGCGAGA
ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGGTGGGGGATAAACGTCAAATCATC
CAGGCCCTTATGAACTGGGGCTACAACCGTGGTTCAAATGGGGAAAGTAC
AACCAAATTCCCTTAAACCCCGGAGTGTTGG 3'

Secuencia de nucleótidos del Gen 16S rARN de la bacteria *Pediococcus pentosaceus* (170)

5' GGCAGGCGCTGCCTATACTGCAAGTTCGAACGAACTTTCCGTTAATTGAT
TATGACGTGCTTGCACTGAATGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCAGAAGCAGGGGATAACACCTG
GAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCCTGGTTTTCTTTA
AAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAG
TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCC
GCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGA
ACGTGGGTGAGAGTAACTGTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTA
ATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAACTGGGAGAC
TTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC
GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCATGCCGTAACGATGATTACTAATTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTT
CAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAATCCGCCTGGGGAGTACGACCGCA
AGGTTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCACGTCTTGACATCTT
CTGCCAACCTACCAGAGTAGGTGTTCCCTTCGGGGACCAAATGACACGTG
GTGCAGGGGTGTCATCGAATCAAGACCCTCTATGTAAGAAGAAAGGGGCG
TACAACCCAACATCGTTAACAAAGGTAAAAATACTCTAAGTGGGGCGCCC
ACAGATATATATACTAG 3'

Secuencia de nucleótidos del Gen 16S rARN de la bacteria *Pediococcus pentosaceus* (175)

5'GCCAGTGGCGGCGTGCTATACATGCAAGTCGAACGAACTTCCGTTAATT
GATTATGACGTGCTTGCCTGCACTGAATGAGATTTAACACGAAGTGAGTGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACCT
GGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCCTGGTTTTCTTT
TAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGCATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGATGCGTAGCCGACCTGAG
AGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAA
GAACGTGGGTGAGAGTAACTGTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTC
TAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAACTGGGAG
ACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAA
CTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCATGCCGTAAACGATGATTACTAAGTGTTGGAAGGGTTTCCGCC
CTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAATCCGCCTGGGGGAGTACGAC
CGCAAGGTTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA
ACATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA
TCTTCTGCCAACCTAAGAAGATTAGGTGTTCCCTTCGGGGACAGAATGAC
AGGTGGGTGCATGGGTTGTCGTCAGCTCCTGTCGTGGAAATGTTGGGGTT
AAGTCCCCGCAACGAACCGCAACCCCTTATTAATAATTTGCCAGCCATTC
CAGTTTGGGCACTCTTATTGGAACTGGCCGGTGACAAACCCGGAAGAAA
GGTGGGGGACAAACCTCAAATCCTCCATGGCCCCTTATAGACCTGGGGCT
ACAACCCGTGCTTACAATGGGAGTGGTACACCCAAATTCCCGAAAACCCG
CCGGGGTTTAACCTAATCCCTTTAAAACCATTTTCCATTTCTGGATTGGT
GG 3'

REFERENCIAS

- Andrade-Bustamante G. 2014. Aislamiento e identificación de bacterias psicrótrofas con actividad antagonista frente a *Salmonella Saintpaul* y *E. coli* O157:H7 en cilantro (*Coriandrum sativum* L.). Maestría en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Annous B. A., Solomon E. B., Cooke P. H. y Burke A. 2005. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on cantaloupe melons. *Journal of Food Safet.* 25(4): 276-287.
- Badosa E., Trias R., Parés D., Pla M. y Montesinos E. 2008. Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in Catalonia (Spain) using normalised plate-counting methods and real time polymerase chain reaction (QPCR). *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 88(4): 605-611.
- Bailón L., González M. y Cervantes S. 2003. Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 175 pp.
- Barros R. R., María Da Gloria S. C., Peralta J. M., Facklam R. R. y Teixeira L. M. 2001. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pediococcus* Strains Isolated from Human Clinical Sources. *Journal of Clinical Microbiology.* 39(4): 1241-1246.
- Beuchat L. R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection.* 59(2): 204-216.
- Bruno M. y Montville T. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* 59(9): 3003–3010.

- Bustamante P., Mayorga L., Ramírez H., Martínez P., Barranco E. y Azaola A. 2006. Evaluación microbiológica de compuestos con actividad prebiótica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37(2): 5-10.
- Carr F. J., Chill D. y Maida N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4): 281-370.
- Casas I. A. y Dobrogosz W. J. 2000. Validation of the prebiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 12(4): 247–285.
- Castellano P., Belfiore C., Fadda S., y Vignolo G. 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*. 79(3): 483-499.
- Castillo A., Martínez-Tellez M., y Rodríguez-García M. 2009. Melons. In C. P. Gerba, K. R. Matthews, G. M. Sapers (Eds.), *The produce contamination problem: Causes and solutions* (2a. ed., pp. 208–229). California: Academic Press.
- Castillo-Martinez F., Balciunas E. M., Converti A., Cotter P. D. y De Sousa R. 2013. Bacteriocin production by *Bifidobacterium spp.* A review. *Biotechnology advances*. 31: 482–488.
- Causey, J. L., Feirtag, J. M., Gallaher, D. D., Tunland, B. C., y Slavin, J. L. 2000. Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. *Nutrition Research*. 20(2): 191-201.
- CDC. 2013. Outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections associated with multiple raw produce items — United States.: (Centers for Disease Control and Prevention).
- Chapman B. J. 2005. An Evaluation of an On-farm Food Safety Program for Ontario Greenhouse Vegetable Producers: A Global Blueprint for Fruit and Vegetable Producers. University of Guelph.
- Cock L. S., Duque L. F. R., Castillo N. B. L. y Valencia, C. E. E. 2012. *Weissella confusa* como un agente bioprotector en la inocuidad alimentaria contra patógenos Gram negativos. *Alimentos Hoy*. 21(27). 102-114.

- Conesa, D. P., Martínez, G. L., y Berruezo, G. F. R. 2004. Principales prebióticos y sus efectos en la alimentación humana. Paper presented at the Anales de veterinaria de Murcia.
- Corte Osorio, L., Martínez Flores, H., y Ortiz Alvarado, R. 2011. Efecto del consumo de la fibra dietética en la expresión cuantitativa del receptor de butirato GPR43 en colon de ratas. *Nutrición Hospitalaria*, 26(5), 1052-1058.
- Cotter P. D., Hill C. y Ross R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3(10), 777-788.
- Cummings J., Roberfroid M., Andersson H., Barth C., Ferro-Luzzi A., Ghos Y. y James W. 1997. A new look at dietary carbohydrate: chemistry, physiology and health. Paris Carbohydrate Group. *European Journal of Clinical Nutrition*. 51(7): 417-423.
- Darvill A., Augur C., Bergmann C., Carlson R. W., Cheong J.-J., Eberhard S. y Meyer B. 1992. Oligosaccharins—oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. *Glycobiology*. 2(3): 181-198.
- Davila-Zambrano L.E. 1996. Purificación y caracterización de una enzima pectinasa producida por *Aspergillus niger* por medio de la técnica de fermentación sólida. Proyecto de investigación. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Delzenne N. M. y Roberfroid M. 1994. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lwt-Food Science and Technology*. 27(1): 1-6.
- Desai A., Powell I. y Shah N. 2004. Survival and activity of probiotic lactobacilli in skim milk containing prebiotics. *Journal of Food Science*. 69(3): FMS57-FMS60.
- Di Cagno R., Coda R., De Angelis M. y Gobbetti M. 2013. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*. 33(1): 1-10.
- Doi K., Nishizaki Y., Fujino Y., Ohshima T., Ohmomo S. y Ogata S. 2009. *Pediococcus lolii* sp. nov., isolated from ryegrass silage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59 (5): 1007-1010.

- Ekinci F., y Gurel M. 2008. Effect of using propionic acid bacteria as an adjunct culture in yogurt production. *Journal of Dairy Science*. 91(3): 892-899.
- FAO y OMS. 2001. Propiedades saludables y nutricionales de leche en polvo con bacterias vivas ácido lácticas. Consulta de expertos FAO:OMS. consultado 18-05-2016 en : <http://www.fao.org/ESN/Probio/probio.htm>.
- Fernández, E. E. 2000. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 922 pp.
- Food and Drug Administration (FDA). 2015. Consultado 20-04-2016 en <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM168625.pdf>
- Forbes B. A. y Sahm D. F. 2009. Comprar Bailey y Scott. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana. 12 Edición. Colombia. 1027 p. *Microbiology*. 70:1923-1930.
- Garmendia G., y Méndez S. V. 2006. Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. *Horticultura: Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros*. 197: 18-27.
- Gibson G. R. y Wang X. 1994. Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS Microbiology Letters*. 118(1-2): 121-127.
- Gómez B., Gullón B., Remoroza C., Schols H. A., Parajó J. C. y Alonso, J. L. 2014. Purification, characterization, and prebiotic properties of pectic oligosaccharides from orange peel wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40): 9769-9782.
- Gómez B., Gullón B., Yáñez R., Parajó J. C. y Alonso J. L. 2013. Pectic oligosaccharides from lemon peel wastes: Production, purification, and chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(42): 10043-10053.
- González-Martínez B., Gómez-Treviño M., y Jiménez-Salas Z. 2003. Bacteriosinas de probióticos. *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición. Universidad Autónoma de Nuevo León*. 44 (2).

- Guidi A., y Arandia Quiroga M. Z. 2010. Obtención de pectina a partir de la cáscara de maracuyá mediante hidrólisis ácida. *Journal Boliviano de Ciencias*. 67.
- Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A., y Barlow, M. 2014. Growth rates made easy. *Molecular Biology and Evolution*. 31(1): 232-238.
- Harapas D., Premier R., Tomkins B., Franz P. y Ajlouni S. 2010. Persistence of *Escherichia coli* on injured vegetable plants. *International Journal of Food Microbiology*. 138: 232-237.
- Hinnebusch B. F., Meng S., Wu J. T., Archer S. Y. y Hodin R. A. 2002. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *The Journal of Nutrition*, 132(5): 1012-1017.
- Hove H., Nordgaard-Andersen I. y Mortensen B. 1994. Effect of lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids, and the absorption of lactose. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 59: 74–79.
- Hudault S., Liévin V., Bernet-Camard M.-F. y Servin A. L. 1997. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(2): 513-518.
- Jack R. W., Tagg J. R. y Ray B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*. 59(2): 171-200.
- Jaskari J., Kontula P., Siitonen A., Jousimies-Somer H., Mattila-Sandholm T. y Poutanen K. 1998. Oat β -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49(2): 175-181.
- Jayani R. S., Saxena S. y Gupta R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40(9): 2931-2944.
- Kandler O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 49(3): 209-224.

- Kropinski A. M., Mazzocco A., Waddell T. E., Lingohr E., y Johnson R. P. 2009. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*, 69-76.
- Lang C. y Dörnenburg H. 2000. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53(4): 366-375.
- Lee K. W., Park J. Y., Sa H. D., Jeong J. H., Jin D. E., Heo, H. J. y Kim, J. H. 2014. Probiotic properties of *Pediococcus* strains isolated from jeotgals, salted and fermented Korean sea-food. *Anaerobe*, 28, 199-206.
- Leff J. W. y Fierer N. 2013. Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables. *PloS one*. 8(3): e59310.
- Li P. J., Xia J. L., Nie Z. Y. y Shan Y. 2016. Pectic oligosaccharides hydrolyzed from orange peel by fungal multi-enzyme complexes and their prebiotic and antibacterial potentials. *LWT-Food Science and Technology*. 69, 203-210.
- Li W., Zhang J., Yu C., Li Q., Dong F., Wang, G. y Guo, Z. 2015. Extraction, degree of polymerization determination and prebiotic effect evaluation of inulin from Jerusalem artichoke. *Carbohydrate Polymers*. 121: 315-319.
- Lievin V., Peiffer I., Hudault S., Rochat F., Brassart D., Neeser J., y Servin, A. 2000. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*. 47(5): 646-652.
- Madrigal L. y Sangronis E. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 57(4):387.
- Maldonado A. C. E., Ramírez L. A. G., y Campuzano O. I. M. 2005. Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 58(1), 2601-2609.
- Mandalari G., Palop C.N., Tuohy K., Gibson G. R., Bennett R. N., Waldron K. W., Bisignano N., Nardad, A., y Faulds, C. B. 2007. In vitro evaluation of the prebiotic activity of a pectin oligosaccharide-rich extract enzymatically

derived from bergamot peel. *Applied microbial and cell Physiology*. 73: 1173–1179.

Manderson K., Pinart M., Tuohy K., Grace W., Hotchkiss A., Widmer W., Yadhav M. P., Gibson G. R. y Rastall, R. 2005. In vitro determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(12): 8383-8389.

Martínez-Télez M.A., Vargas-Arispuro I., Silva-Bielenberg H.K., Espinoza-Medina I.E., Rodríguez-Leyva, F.J. y González-Aguilar, G. 2007. Buenas practicas en la producción de alimentos. Trillas. primera edición. México, D.F. 460p.

Mederos Y. y Hormaza J. 2008. Consideraciones generales en la obtención, caracterización e identificación de los oligogalacturónidos. *Cultivos Tropicales*. 29(1): 83-90.

Mislivec P. B., Beuchat L. R., Cousin M. A., Vanderzant C., y Splittstoesser D. F. 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*.

Mora D., Fortina M. G., Parini C., y Manachini P. L. 1997. Identification of *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* based on 16S rRNA and *ldhD* gene-targeted multiplex PCR analysis. *FEMS Microbiology Letters*. 151(2): 231-236.

Morales-Koelliker D., y Vélez-Ruíz J. 2013. Prebióticos: su importancia en la salud humana y propiedades funcionales en tecnología de alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* 7: 12-24.

Mussatto S. I., y Mancilha I. M. 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*. 68(3): 587-597.

Naidu A. S., Unal R., y Tulpinski J. 2006. Bacteriocins: antimicrobial activity and applications. *Food Science and Technology-New York-marcel dekker*, 148, 1391.

Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994. Procedimientos para la toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis

- Olano-Martin E., Gibson G. R. y Rastall R. A. 2002. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3): 505-511.
- Onumpai C., Kolida S., Bonnin E. y Rastall R. A. 2011. Microbial utilization and selectivity of pectin fractions with various structures. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(16): 5747–5754.
- Park Y. y Almeida M. 1991. Production of fructooligosaccharides from sucrose by a transfructosylase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 7(3): 331-334.
- Parnell T. L., Harris L. J. y Suslow T. V. 2005. Reducing Salmonella on cantaloupes and honeydew melons using wash practices applicable to postharvest handling, foodservice, and consumer preparation. *International Journal of Food Microbiology*. 99(1): 59-70.
- Parra R. 2010. Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 8(1): 93-105.
- Pedreschi R., Campos D., Noratto G., Chirinos R., y Cisneros-Zevallos, L. 2003. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(18): 5278-5284.
- Ramírez J. C. R., Ulloa P. R., Velázquez M. Y., González J. A. U., y Romero F. A. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. 2(7).
- Rastall R. 2010. Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annual Review of Food Science and Technology*. 1: 305-339.
- Requena T., y Peláez C. 1995. Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 35(1): 19-44.
- Riaz S., Nawaz S. K., y Hasnain S. 2010. Bacteriocins produced by *L. fermentum* and *L. acidophilus* can inhibit cephalosporin resistant *E. coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 643-648.

- Roberfroid M., Gibson G. R., Hoyles L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland Wolvers D., Watzl B., Szajewska H., Stahl B., Guarner F., Respondek F., Whelan, K., Comax V., Davicco M., Léotoing, L., Wittrant Y., Delzenne, N., Cani, P., Neyrinck, A. y Meheust, A. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*. 104(S2), S1-S63.
- Rodriguez-Leyva F.J. 2004. Determinación de las fuentes de contaminación bacteriológica y tratamientos de desinfección en las cadenas productivas de cebollín (*Allium fistulosum*) y espárrago (*Asparagus officinatis*). Maestría en Ciencias, Centro de investigación en alimentación y desarrollo, A.C.
- Rosa C., y Franco B. 2009. Bacteriocinas de bacterias lácticas. *Conscientiae Saúde*, 1, 09-15.
- Rossi M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini M., Pompei A., Zanoni S., y Matteuzzi D. 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(10): 6150-6158.
- Saarela M., Hallamaa K., Mattila-Sandholm T., y Matto J., 2003. The effect of lactulose lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *International Dairy Journal*. 13: 291-302.
- Salminen S., Wright A. y Ouwehand A. 2004. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Marcel Dekker, Inc. Tercera edición. New York, USA. 632.
- Saminathan M., Sieo C. C., Kalavathy R., Abdullah N., y Ho, Y. W. 2011. Effect of prebiotic oligosaccharides on growth of *Lactobacillus* strains used as a probiotic for chickens. *African Journal of Microbiology Research*, 5(1), 57-64.
- Savadogo A., Ouattara A., Bassole H., y Traore A. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria—a minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5(9).
- Sharma R. R., Singh D., y Singh R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*. 50(3): 205-221.

- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (SAGARPA) 2011. Monitor agroeconómico en Sonora. Consultado 12-08-16 <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/monitor%20estados/Sonora.pdf>
- Serrat-Díaz M., Dumé-Arias R., Del-Todo-Martínez, Y., Rodríguez-Gámez O., y Almenares-Verdecia, J. 2013. Hidrólisis enzimática del ácido péctico con una endopoligalacturonasa de levadura: Cinética y distribución de masas moleculares. *Revista Cubana de Química*, 25(1), 48-54.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (SENASICA), 2010. Consultado 20-04-2016 en <http://www.senasica.gob.mx/>
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (SENASICA) 2011. Ley sobre la modernización de FDA en materia de Inocuidad alimentaria. Año 3. No.01 Consultado el 18-05-2016 en [file:///C:/Users/PC/Downloads/2011BoletinNo1Enero%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/PC/Downloads/2011BoletinNo1Enero%20(1).pdf)
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (SENASICA), 2015. Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación. Consultado el 18-05-2016 en <http://senasica.gob.mx/?id=3446>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2014. Producción agropecuaria y pesquera: Melón cantaloupe. Consultado el Septiembre del 2016 en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Simpson S. D., Ashford D. A., Harvey D. J., y Bowles D. J. 1998. Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. *Glycobiology*. 8(6): 579-583.
- Thompson S. A. 2008. Feeling the squeeze: Tomato growers take big hit in food scare. *Rural cooperatives*.
- Van der Meulen R., Avonts L. y De Vuyst L. 2003. Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-170 010. *Applied Environmental*. 70 (4): 1923-1930

- Van Laere K. M., Hartemink R., Bosveld M., Schols H. A., y Voragen A. G. 2000. Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1644-1652.
- Varo L. B., Dueñas S. K., Sánchez R., Ramírez E. I., y Salinas C. 2009. Bacterias ácido lácticas con propiedades probióticas aisladas de hortalizas: *Microbiología, ENCB-IPN Prolongación*.
- Vásquez S. M., Suárez H., y Zapata S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1), 64-71.
- Wongputtisin P. y Khanongnuch C. 2015. Prebiotic properties of crude oligosaccharide prepared from enzymatic hydrolysis of basil seed gum. *Food Science and Biotechnology*, 24(5), 1767-1773.
- Yousef A.E., JB Luchansky, AJ Degnan y MP Doyle. 1991. Behavior of *Lysteria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or pediocin AcH during storage at 4 or 25°C. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 1461-1467.